

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Alisa
GRICAJEVA

Naujų bakterinių lipolizinių fermentų paieška ir analizė

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija N 010

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2014-2018 metais Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto (vėliau Gyvybės mokslų centro, Biomokslų instituto) Mikrobiologijos ir Biotechnologijos katedroje.

Mokslinius tyrimus iš dalies rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinė vadovė - Prof. dr. Lilija Kalėdienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

TURINYS

SANTRUMPOS	6
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1 Lipolizinių fermentų paplitimas ir šaltiniai.....	12
1.2 Pagrindiniai lipolizinių fermentų paieškos būdai	14
1.3 Bakterinių lipazių ir esterazių skirtumai.....	15
1.4 Fiziologinė lipolizinių fermentų reikšmė bakterijose	17
1.5 Prokariotinių lipolizinių fermentų struktūros ypatumai lemiantys jų funkciją	20
1.6 Bakterijų lipolizinių fermentų raiška ir sekrecija	24
1.7 Lipolizinių fermentų hidrolizės mechanizmas	27
1.8 Lipolizinių fermentų katalizuojamos reakcijos	29
1.9 Lipolizinių fermentų savitumas.....	31
1.9.1 Savitumas konkreitiems substratams	31
1.9.2 Pozicinis savitumas	32
1.9.3 Enantiosavitumas	34
1.10 Bakterinių lipolizinių fermentų klasifikacija.....	34
1.11 Lipolizinių fermentų imobilizavimas	40
1.12 Lipolizinių fermentų pritaikymas.....	44
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	52
2.1 Cheminės medžiagos.....	52
2.2 Fermentai.....	52
2.3 Molekulinės biologijos rinkiniai	52
2.4 Darbe naudoti bakterijų kamieniai, vektoriai ir pradmenys	52
2.5 Darbe naudotos mitybinės terpės	56
2.6 Suminės genomines ir plazmidines DNR išskyrimas	57
2.7 Elektroforezė agarozės gelyje	57
2.8 Mikroorganizmų identifikavimas.....	58
2.8.1 16S rDNR amplifikavimas ir filogenetinė analizė.....	58
2.8.2 <i>Staphylococcus</i> sp. AG1 gDNR sekoskaita ir skaitmeninė DNR-DNR hibridizacija.....	58
2.8.3 <i>Staphylococcus</i> sp. AG1 koagulazės ir novobiocino testas.....	59
2.9 Lipolizinių fermentų aktyvumo nustatymas.....	59

2.10	Atrinktų kultūrų lipolizinius fermentus koduojančių genų pirminė analizė ir pagausinimas, naudojant PGR.....	60
2.11	<i>Bacillus</i> sp. L1 ir <i>S. saprophyticus</i> AG1 lipolizinius fermentus koduojančių genų heterologinės raiškos sistemos kūrimas.....	61
2.12	Lipolizinių fermentų raiška ir jos optimizavimas.....	63
2.13	Baltymų NDS-PAGE ir žimografinė analizė	63
2.14	Lipolizinių fermentų išsidėstymo rekombinantinėse ląstelėse nustatymas	64
2.15	Fermentų gryninimas.....	65
2.15.1	Baltymų išsodinimas	65
2.15.2	Giminingumo chromatografija nedematūruojančiomis sąlygomis	65
2.15.3	Giminingumo chromatografija dematūruojančiomis sąlygomis.....	66
2.15.4	Gelfiltracija.....	67
2.15.5	Giminingumo chromatografija dematūruojančiomis sąlygomis baltymų renatūracijai.....	67
2.15.6	Baltymų dializė	68
2.16	LipBST ir EstAG1 biocheminis charakterizavimas.....	68
2.16.1	Optimalių fermentų aktyvumui temperatūros ir pH nustatymas taikant PAM	68
2.16.2	Substratinio savitumo nustatymas	69
2.16.3	Termostabilumo nustatymas	69
2.16.4	Fermentų kinetinių konstantų nustatymas.....	70
2.16.5	Metalų jonų, detergentų, organinių tirpiklių ir kitų junginių įtakos fermentiniam aktyvumui nustatymas	70
2.16.6	Fermentų regiosavitumo nustatymas	71
2.16.7	LipBST gebos katalizuoti natūralių riebalinių medžiagų hidrolizę įvertinimas.....	71
2.17	Lipolizinių fermentų imobilizavimas ant oktilsefarozės ir cukraus fabriko atliekų pirolizės produkto.....	71
2.18	Imobilizuoto LipBST rapsų aliejaus peresterinimas metanolio.....	72
2.19	Plonasluoksnė chromatografija	72
2.20	LipBST ir EstAG1 erdvinių struktūrų modeliavimas	73
2.21	Filogenetinė EstAG1 analizė	74
2.22	EstAG1 katalizei svarbių a.r. identifikavimas.....	74
2.23	Kokybinė <i>estAG1</i> geno raiškos transkripcijos lygyje analizė <i>S. saprophyticus</i> AG1	75
2.23.1	<i>S. saprophyticus</i> AG1 suminės RNR išskyrimas.....	75

2.23.2	Atvirkštinės transkripcijos PGR (AT-PGR).....	76
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	77
3.1	Lipolizinius fermentus produkuojančių mikroorganizmų paieška ir identifikavimas	77
3.2	L1 kultūros identifikavimas: 16S rDNR ir lipolizinių fermentų genai ...	77
3.4	LipBST erdvinės struktūros modelis	84
3.5	LipBST charakterizavimas	85
3.5.1	LipBST temperatūros ir pH optimumas, termostabilumas.....	85
3.5.2	LipBST substratinis savitumas, regiosavitumas ir kinetiniai parametrai	89
3.5.3	Metalų jonų, detergentų ir organinių tirpiklių įtaka LipBST aktyvumui	91
3.5.4	LipBST natūralių riebalinių medžiagų hidrolizės tyrimas	96
3.6	LipBST imobilizavimas ir gebos katalizuoti peresterinimo reakcijas įvertinimas.....	98
3.7	AG1 kultūros identifikavimas.....	101
3.8	EstAG1 a.r. sekos analizė, geno klonavimas, raiška ir gryninimas	103
3.9	EstAG1 charakterizavimas	107
3.9.1	EstAG1 temperatūrinis, pH optimumas ir termostabilumas.....	107
3.9.2	EstAG1 substratinis savitumas ir regiosavitumas	110
3.9.3	Metalų jonų, detergentų ir organinių tirpiklių įtaka EstAG1 aktyvumui	112
3.10	EstAG1 erdvinės struktūros modeliavimas.....	116
3.11	Daugybinis sekos palyginimas ir analizė.....	118
3.12	EstAG1 katalizei svarbių a.r. identifikavimas.....	121
3.13	EstAG1 filogenetinė analizė	123
3.14	EstAG1 geno transkripcijos analizė.....	124
4.	APIBENDRINIMAS	126
	IŠVADOS	132
	PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	133
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	136

SANTRUMPOS

Abs – absorbcija;

Amp – ampicilinas;

Amp^R – selektyvus plazmidėje koduojamas atsparumo ampicilinui žymuo;

aps/min – apsisukimai per minutę;

ASR – atviras skaitymo rėmelis;

AT-PGR – atvirkštinės transkripcijos PGR (angl., *reverse-transcription PCR, RT-PCR*);

Cam – chloramfenikolis;

CFAPP- cukraus fabriko atliekų pirolizės produktas;

DAG – diacilglicerolis;

dsDNazė – dvigrandei DNR (genominei DNR) specifinė endonukleazė (angl., *double-stranded DNA specific endonuclease, dsDNase*);

EC (numeris) – Fermentų komisijos priskirtas numeris (angl., *Enzyme Comission number*);

FSP – fazių sąlyčio paviršius;

GDSL – Gly-Asp-Ser(Leu);

GGGX – Gly-Gly-Gly-X;

GXSXG – Gly-X-Ser-X-Gly;

IMAC – imobilizuotų metalų jonų afininė (giminingumo) chromatografija;

IPTG - izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozidas;

Kan – kanamicinas;

Kan^R – selektyvus plazmidėje koduojamas atsparumo kanamicinui žymuo;

kDNR – komplementari DNR (angl., *complementary DNA, cDNA*);

LPS – lipopolisacharidas;

MAG – monoacilgliceroliai;

MKR – plazmidinio vektoriaus multikloninis regionas;

NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė;

OT – optinis tankis;

p-NP – *para*-nitrofenolis;

REazė – restrikcijos endonukleazė;

RR – riebalų rūgštys;

TAE – Tris-acetato-EDTA buferinis tirpalas;

TAG – triacilgliceroliai;

T1SS – I tipo sekrecijos sistema (angl., *type I secretion system*);

T2SS – II tipo sekrecijos sistema (angl., *type II secretion system*);

T_M – pradmenų lydymosi temperatūra;

Tris – trishidroksimetilaminometanas (2-amino-2-hidroksimetil-1,3 propandiolis);

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

Aminorūgštys:

Ala (A) – alaninas;

Asn (N) – asparaginas;

Asp (D) – asparto rūgštis (aspartatas);

Gly (G) - glicinas;

Glu (E) – glutamo rūgštis (glutamatas);

His (H) – histidinas;

Lys (K) – lizinas;

Ser (S) – serinas;

Tyr (Y) – tirozinas;

X – bet kokia a.r.;

Sintetiniai *p*-NP substratai:

p-NPA – etano rūgšties *p*-nitrofenolio esteris (*p*-nitrofenolacetatas);

p-NPB – butano rūgšties *p*-nitrofenolio esteris (*p*-nitrofenolbutiratas);

p-NPC – oktano rūgšties *p*-nitrofenolio esteris (*p*-nitrofenolkaprilatas);

p-NPD – dekano rūgšties *p*-nitrofenolio esteris (*p*-nitrofenoldekanoatas);

p-NPL – dodekano rūgšties *p*-nitrofenolio esteris (*p*-nitrofenollauratas);

p-NPM – tetradekano rūgšties *p*-nitrofenolio esteris (*p*-nitrofenolmiristatas);

p-NPP – heksadekano rūgšties *p*-nitrofenolio esteris (*p*-nitrofenolpalmitatas);

p-NPS – oktadekano rūgšties *p*-nitrofenolio esteris (*p*-nitrofenolstearatas).

ĮVADAS

Hidrolazių klasės (EC 3) fermentai katalizuoja cheminių ryšių skilimą vandeninėje terpėje. Vandens pertekliaus sąlygomis, šių reakcijų pusiausvyra pasislenka produktų susidarymo link ir dėl to hidrolizės reakcijos fiziologinėmis sąlygomis yra negrįžtamos. Hidrolazės veikia skirtingų tipų substratus: polisacharidus, DNR, baltymus ir lipidus. Šių biologinių makromolekulių homeostazė yra itin svarbi kiekvienam gyvajam organizmui, todėl hidrolazės yra visuotinai paplitusios ir dideliais kiekiais sintetintos visiems gyvybės domenams priklausančių organizmų (Kovacic ir kt., 2019).

Karboksilesterių hidrolazės (EC 3.1.1.X) sudaro labai įvairialypę hidrolazių, katalizuojančių esterinių ryšių virsmus, jų skilimą ir susidarymą, grupę. Daugelis šių fermentų pasižymi tuo, kad turi labai platų galimų substratų spektrą, o tai leidžia daryti prielaidą, kad jų evoliucija sudarė sąlygas organizmams įsisavinti įvairius anglies šaltinius ir užtikrino šių fermentų dalyvavimą kataboliniuose keliuose (Lopes ir kt., 2011). Karboksilesterių hidrolazėms priklausantys lipoliziniai fermentai – karboksilesterazės arba tikrosios/nesavitos esterazės (karboksilesterių hidrolazės, EC 3.1.1.1) ir lipazės (triacilglicerolio acilhidrolazės, EC 3.1.1.3) (toliau – lipoliziniai fermentai) sudaro didelę, visiems gyviesiems organizmams fiziologiškai svarbią bei didelį pramoninį pritaikomumą turinčią fermentų grupę. Bakteriniai lipoliziniai fermentai dalyvauja įgyvendinant įvairias šių mikroorganizmų funkcijas: nuo riebalinių medžiagų apykaitos energijai gauti iki patogenezės (Hausmann ir Jaeger, 2010). Dėl savo ypatingo biokatalizinių savybių „rinkinio“, bakteriniai lipoliziniai fermentai yra itin patrauklūs tvariai pramonei. Jie yra vertinami ne tik dėl karboksilesterinių ryšių turinčių junginių hidrolizės, bet ir dėl *in vitro* vykstančios karboksilesterinių ryšių sintezės ir kitų nespecifinių aktyvumų. Bakterinių lipolizinių fermentų lengvas išgavimas, stabilumas įvairiose reakcijos terpėse, aukštose temperatūrose, pH ir platus substratinis savitumas įgalina jų platų panaudojimo spektrą oleochemijos, polimerų, tekstilės, biodyzelino gavimo, ploviklių ir kitose pramonės šakose. Turėdami vieną puikiausių enantioatrankumo savybių, bakteriniai lipoliziniai fermentai išskiriami kaip vieni svarbiausių biokatalizatorių naudojamų optiškai gryną cheminių junginių gavimui. Jų biotechnologinę reikšmę atspindi tai, kad tam tikros esterazės ir lipazės yra komercializuotos pasaulinių biotechnologijos kompanijų, tokių kaip Fluka, Novozymes, Biocatalysts Ltd ir kitų (Kademi ir

kt., 2008, Singh ir kt., 2016). Be to, pasitelkiant šiuos fermentus, gali būti sprendžiamos ne mažiau svarbios aplinkosaugos problemos.

Nors ne mažai žinomų lipolizinių fermentų savybės ir kelių iš jų struktūra yra išsamiai ištirtos, atskleistas jų katalizinis veikimas ir sukurta daugybė patogių metodų, padidinančių šių fermentų išeigą ir aktyvumą (baltymų inžinerija, cheminė modifikacija, imobilizavimas ir kt.) (Lopez-Gallego ir kt., 2012; Akbulut ir kt., 2013; Kumar ir kt., 2014; Gudiukaitė ir kt., 2014), paklausa atrasti naujus tokius fermentus nemažėja. Bakterijų lipoliziniai fermentai šiuo metu išlieka vieni plačiausiai biotechnologijoje naudojamų biokatalizatorių (Stergiou ir kt., 2013).

Taip pat, nepaisant šiuo metu didelio identifikuotų lipolizinių fermentų skaičiaus (~5000), tik nedidelei jų daliai (<10 %) yra sukurti rekombinantiniai variantai ir jie yra funkciškai ištirti (Kovacic ir kt., 2019).

Darbo tikslas

Bakterijų lipolizinių fermentų identifikavimas taikant genomų analizę, atrinktų fermentų heterologinė sintezė bei išsamus atrinktų fermentų funkcinis charakterizavimas ir analizė.

Uždaviniai

- 1) Atlikti atrinktų aktyvių bakterinių lipolizinių fermentų producentų genomų analizę ir identifikuoti lipolizinius fermentus, priklausančius karboksilesterazėms (EC 3.1.1.1) ir lipazėms (EC 3.1.1.3);
- 2) Atlikus bioinformatinę identifikuotų tikslinių fermentų sekų analizę, sukurti LipBST ir EstAG1 fermentų heterologinės sintezės sistemas;
- 3) Charakterizuoti LipBST ir EstAG1 lipolizinius fermentus;
- 4) Ištirti laisvo LipBST fermento hidrolizinį potencialą, imobilizuoti fermentą bei įvertinti gauto fermentinio preparato gebėjimą katalizuoti peresterinimo reakcijas;
- 5) Identifikuoti EstAG1 lipolizinio fermento aktyviajame centre išsidėstančias katalizei svarbias a.r. liekanas;
- 6) Kokybiškai įvertinti *estAG1* raišką transkripcijos lygyje *Staphylococcus saprophyticus* AG1 ląstelėse.

Mokslinis naujumas ir praktinė darbo reikšmė

Per pastaruosius dešimtmečius žymiai patobulėjus genomų sekoskaitai, duomenų bazėse tapo prieinamas didelis duomenų kiekis, kurių analizė leidžia lengvai identifikuoti naujus fermentus ir padeda užpildyti žinių apie tam tikrus fermentus spragą. Taip pat šis metodas leidžia atrasti naujų biokatalizatorių, nereikalaujant didelių su klasikine mikrobiologine arba metagenomine paieška bei baltymų inžinerija susijusių sąnaudų.

Šiame darbe, taikant genomų analizę, identifikuoti ir pirmą kartą išsamiai funkciškai charakterizuoti *Bacillus* sp. L1 (identifikuotas kultūros lipolizinius fermentus koduojančių genų rinkinys identiškas ir būdingas tik *Bacillus stratosphericus* rūšiai) ir *S. saprophyticus* AG1 rekombinantiniai, tik numanomų statusą iki šiol turėję lipoliziniai fermentai. Šiame darbe pirmą kartą išsamiai charakterizuotas *B. stratosphericus* rūšiai filogenetiškai artimo kamieno itin aktyvus lipolizinis fermentas – LipBST lipazė, kuri pasižymėjo funkcinėmis savybėmis, tinkamomis įvairių riebalinių medžiagų biodegradacijai. Gauti rezultatai rodo galimybę taikyti LipBST lipazę vystant tvarią ir ekologiškai draugišką pramonę. Fermentas sėkmingai išbandytas riebalais užterštų, pakartotinam panaudojimui skirtų polietilenu paviršių valymui. LipBST – tai pirmasis funkciškai ištirtas ir charakterizuotas *B. stratosphericus* rūšies bakterijoms būdingas lipolizinis fermentas.

Taip pat, šiame darbe, *S. saprophyticus* AG1 genome identifikuotas ir pirmą kartą charakterizuotas numanomas, tolimai su bakterijų hormonams jautrių lipolizinių (bHJL) fermentų šeimos homologais susijęs EstAG1 lipolizinis fermentas. Nustatyta, kad EstAG1 lipolizinis fermentas pasižymi netipiniais konservatyvių sekų motyvais. Vietoje itin konservatyvios, daugumai lipolizinių fermentų būdingos GX SXG sekos, EstAG1 nustatytas GDGTG pentapeptidas, neturintis katalizinio konservatyvaus Ser. GDGTG motyvas iki šiol nebuvo aprašytas nei vienoje šiai dienai žinomoje ir išskirtoje bakterijų lipolizinių fermentų šeimoje. Toks GDGTG motyvas šiame darbe identifikuotame ir charakterizuotame EstAG1 lipoliziniame fermente bei kai kurių *Staphylococcus* sp. genomuose koduojamų numanomų eksperimentiškai netirtų lipolizinių fermentų sekose nustatytas pirmą kartą. Šio darbo metu pirmą kartą parodyta, kad katalizinė nukleofilinė Ser a.r. liekana EstAG1 lipoliziniame fermente (ir galimai jam artimuose fermentuose) yra išsidėsčiusi arčiau C-galo esančioje, iki šiol neaprašytoje SPLL a.r. sekoje. EstAG1 pirminės sekos ypatybės ir ≤ 30 %

fermento panašumas su artimiausiais funkciškai ir struktūriškai charakterizuotais bHJL atstovais, leidžia išskirti EstAG1 fermentą kaip naujos bakterinių lipolizinių fermentų šeimos atstovą, kuri, remiantis naujausia Hitch ir Clavel (2019) klasifikacija, galima priskirti naujai XXXVI bakterinių lipolizinių fermentų šeimai.

Šio darbo rezultatai ne tik suteikia eksperimentinių įrodymų ir tam tikrų įžvalgų (biocheminis charakterizavimas, *in silico* struktūrinė analizė ir kt.) apie iki šiol netirtus *B. stratosphericus* ir *S. saprophyticus* AG1 sintetinamus lipolizinius fermentus, bet ir praplečia mokslines žinias apie bakterinių lipazių ir esterazių įvairovę.

Ginamieji teiginiai:

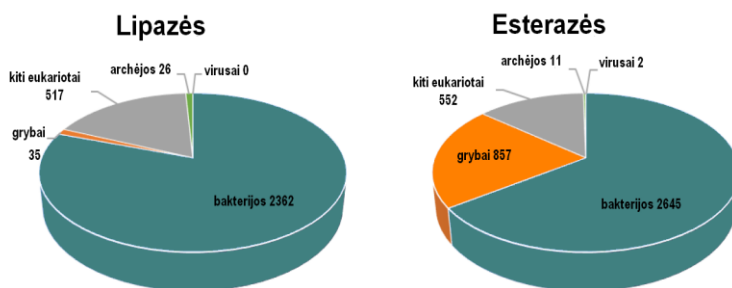
- *Bacillus stratosphericus* ir *Staphylococcus saprophyticus* AG1 genomų analizė leido identifikuoti naujus lipolizinius fermentus, pagal konservatyvių regionų homologiją klasifikuojamus kaip EC 3.1.1.1, EC 3.1.1.3 bei EC 3.1.1.x, ir priklausančius tiek aprašytiems homologų turintiems, tiek necharakterizuotiems tiksliniams fermentams.
- *Bacillus* sp. L1 kamieno LipBST lipazė turi didelį potencialą būti taikoma biotechnologinėje pramonėje aktualiuose riebalų hidrolizės procesuose.
- EstAG1 a.r sekoje nustatytas netradicinis, iki šiol neaprašytas GDGTG pentapeptidas, kurio sudėtyje nėra itin konservatyvios katalizinės Ser a.r. liekanos; EstAG1 katalizinė Ser a.r. liekana išsidėsto iki šiol neaprašytame baltymo sekos SPLL motyve.
- EstAG1 – organiniams tirpikliams tolerantiška, a.r. sekos prasme unikali bakterinė esterazė, kurią galima priskirti naujai iki šiol neaprašytai XXXVI bakterinių lipolizinių fermentų šeimai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Lipolizinių fermentų paplitimas ir šaltiniai

Pirmieji bakterijų lipoliziniai fermentai (lipazės) buvo atrasti 1901 m. danų fiziologo C. Eijkmano *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* ir *Bacillus fluorescens* rūšyse, kurios šiuo metu yra, atitinkamai, žinomos kaip *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Pseudomonas fluorescens* (Eijkmann, 1901, Sangeetha ir kt., 2011). Nuo to laiko žinoma, kad lipoliziniai fermentai yra sintetinami daugelio bakterijų ir eukariotinių organizmų (augalų, gyvūnų, mieliagybių, mikromicetų) bei archėjų (Kishore ir kt., 2011).

Analizuojant nuolat pildomą fermentų duomenų bazę BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/>), šiuo metu randamos 4257 lipazės (EC 3.1.1.3) ir 3121 karboksiesterazės (EC 3.1.1.1) (toliau – esterazės) (Kovacic ir kt., 2019). Jų tarpe tik 350 lipazių ir 273 esterazės turi nuorodą į pirminius šaltinius, o tai parodo, kad labai daug lipolizinių fermentų iki šiol nėra eksperimentiškai ištirti. Lipolizinių fermentų taksonominio pasiskirstymo analizė UniProt duomenų bazėje (<https://www.uniprot.org/>) parodė, kad šie fermentai yra konservatyvūs visuose trijuose gyvybės domenuose ir dauguma jų yra kilę iš mikroorganizmų (1.1 pav.) (Kovacic ir kt., 2019).



1.1 pav. Lipazių ir esterazių paplitimas skirtinguose organizmuose (pagal BRENDA duomenų bazę) (pritaikyta iš: Kovacic ir kt., 2019).

Gyvūnų lipoliziniai fermentai dažniausiai išskiriami iš galvijų, avių, kiaulių kasų, tačiau tokie fermentai dažnai nėra grynai ir tai apsunkina jų panaudojimo pramonėje galimybes. Pavyzdžiui, kiaulių kasos lipazių mėginiuose dažnai aptinkami nedideli tripsino, suteikiančio kartų skonį, kiekiai, o tai apriboja jų panaudojimą maisto pramonėje (Sharma ir kt., 2014). Kitas nepageidaujamas priemaišas, apribojančias gyvūninių

lipolizinių fermentų panaudojimą, dažniausiai sudaro gyvūnų virusai ir hormonai. Lipolizinių fermentų išgavimas iš augalų yra taip pat komplikuoatas dėl sudėtingo gryninimo bei galimybės gauti tinkamą biomasės kiekį. Dėl šių ir kitų kylančių problemų, puikią pramoniam taikymui alternatyvą sudaro mikroorganizmų sintetiniai lipoliziniai fermentai. Biotechnologiniam pritaikymui daugiausiai pranašumų turi bakterijų lipoliziniai fermentai: jie yra lengviau išgaunami (paprasčiau gaunamas pakankamas biomasės kiekis fermentų išskyrimui, fermentai dažniausiai nėra po transliacijos modifikuojami), taip pat lengva manipuluoti bakterijų genais norint taikyti rekombinantinę technologiją, genų inžineriją ir kt. Bakterijų lipoliziniai fermentai yra itin efektyvūs biokatalizatoriai, kuriems būdingos tam tikros unikalios ir ypatingai vertingos savybės. Pastarąsias sudaro jau minėtos plačios pH ir temperatūros veikimo ribos, plačios substratinio savitumo ribos, regio-, enantioatrankumas, stabilumas organiniuose tirpikliuose, detergentuose ir kt. (Stergiou ir kt., 2013). Visą tai įgalina efektyvesnę lipolizinių fermentų panaudojimą pramonės šakose, kur šie fermentai jau yra naudojami, ir rasti jiems naujus pritaikymus.

Lipolizinių fermentų producentai randami įvairiose aplinkose: nuo vidutinių iki ekstremalių klimato zonų, kurios formuoja tam tikras šių fermentų savybes. Saviti lipoliziniai fermentai yra nustatomi karščiui, šalčiui ar didelėms druskų koncentracijoms atspariuose mikroorganizmuose. Pagrindiniai natūralūs bakterinių lipazių producentai, kurių fermentai yra naudojami pramonėje arba pasižymi itin dideliu panaudojimo potencialu yra įvairūs *Bacillus* genties atstovai, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus xylosus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Dehalococcoides*, *Geobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhodofera*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Vibrio*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, *Chromobacterium violaceum*, *Colwellia psychrerathraea*, *Pseudoalteromonas haloplanktis* ir kt. (Sangeetha ir kt., 2011; Stergiou ir kt., 2013). Tarp ekstremofilų, sintetinančių dideliu lipoliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus, pažymėtina bakterija *Thermosyntropha lipolytica*, hipertermofilinės archėjos *Archaeoglobus fulgidus*, psichrofilinės bakterijos *Psychrobacter immobilis*, *Psychrobacter okhotskensis*, *Acinetobacter calcoaceticus* ir halofilinė archėja *Haloarcula marismortui* (Stergiou ir kt., 2013). Šių mikroorganizmų lipazės pastaruju metu tapo svarbia pramoninių fermentų grupe (Cavicchioli ir kt., 2011)

Esterazės taip pat, kaip ir plačiai paplitusios lipazės, sintetamos įvairių mikroorganizmų: *Streptomyces* sp. (Nishimura ir Inouye 2000), *Pseudomonas* sp. (Prim ir kt., 2006; Tserovska ir kt., 2006), *Bacillus* sp. (Ding ir kt. 2014), *Lactobacillus* sp. (Choi ir Lee 2001), *Thermoanaerobacterium* sp. (Shao ir Wiegel 1995), *Micrococcus* sp. (Fernández ir kt., 2004), *Ophistoma* sp. (Calero-Rueda ir kt., 2002), *Aspergillus* sp. (Giuliani ir kt., 2001), *Humicola* sp. (Hatzakis ir kt., 2003), *Sporotrichum* sp. (Topakas ir kt., 2003), *Saccharomyces* sp. (Lomolino ir kt., 2003), *Candida* sp. (Ghosh ir kt., 1991). Pagrindinį hipertermofilinių tikrųjų esterazių producentų šaltinį daugiausiai sudaro archėjos. Pirmoji ekstremofilo esterazė buvo išskirta iš termoacidofilinės *Sulfolobus acidocaldarius* archėjos, o pirmoji šalčiui atspari halofilinio mikroorganizmo esterazė išskirta iš *Alkalibacterium* sp. Šių mikroorganizmų esterazės taip pat turi platų pramoninį pritaikymą (Wang ir kt., 2016).

Mikroorganizmų lipoliziniai fermentai pagal išsidėstymą ląstelėse skirstomi į viduląstelinius, surištus su membrana ir užląstelinius. Yra žinomas bakterijų kamienas *Bacillus clausii*, kuris sintetina tik viduląstelines lipazes. Viduląstelines lipazes sintetinančios bakterijos dažnai nehidrolizuoja ilgagrاندžių TAG ir dėl to, augdamos, kaip vienintelį anglies šaltinį geba utilizuoti tik glicerolį ir paprastus lipidus (Sangeetha ir kt., 2011).

1.2 Pagrindiniai lipolizinių fermentų paieškos būdai

Neribota mikroorganizmų biologinė įvairovė sudaro didžiulį potencialą naujų lipolizinių fermentų atradimui (Aharoni, 2009). Dabartinėje sparčiai besivystančioje bakterinių fermentų tyrimų epochoje išskiriami trys pagrindiniai fermentų atradimo ir išgavimo būdai: tiesioginis - klasikinis mikrobiologinis, metagenominė atranka/analizė ir mikrobinių genomų analizė (Machado ir kt., 2015, Zafareta ir kt., 2016, Bodra-Molina ir kt., 2017, Jayanath ir kt., 2018).

Dėl lipolizinius fermentus produkuojančių mikroorganizmų savybės naudoti riebalus kaip vienintelį anglies šaltinį, jie dažnai gali būti išskiriami iš gendančių, riebalinių maisto produktų, pramoninių nuotekų, riebalais, nafta užteršto dirvožemio, sąvartynų, gamybinių atliekų ir kt., taikant klasikinės mikrobiologijos metodus (Elnashar ir kt., 2013, Tsuji ir kt., 2013, Yalcin ir kt., 2014, Casas-Godoy ir kt., 2018). Pavyzdžiui, tiriant riebalais užterštą dirvožemį, išskirtas *Pseudomonas stutzeri* PS59 kamienas, sintetinantis itin šalčiui atsparią lipazę (Li ir kt., 2014). Naudojant panašų metodą, iš žemės ūkio laukų buvo išskirtas *Staphylococcus aureus* kamienas,

sintetinantis šarminę, termostabilią lipazę. Šiuo atveju, mėginių atranka buvo atliekama ant mitybinio agaro lėkštelių, papildytų tributirinu (Sarkar ir kt., 2012).

Deja, įprasti mikroorganizmų išskyrimo metodai negali būti naudojami nekultivuojamų lipolizinius fermentus sintetinančių mikroorganizmų atradimui; jie taip pat neleidžia išskirti lipolizinius fermentus koduojančių genų. Dėl to kuriami nauji metodai, leidžiantys tiesiogiai atrasti naujus lipolizinius fermentus koduojančius genus, apeinant mikroorganizmų išskyrimą mikrobiologiniais metodais. Per pastaruosius keletą dešimtmečių dėl greitos naujų molekulinės biologijos metodų pažangos, tapo žymiai paprasčiau atlikti pilną genomo sekoskaitą. Dabartiniu metu viešose duomenų bazėse yra laisvai prieinami gausūs duomenys apie bakterijų genomus ir genų sekas (Soror ir kt., 2009, Mak ir kt., 2015). Sukauptų duomenų bazėse bakterijų sekų analizė leidžia nesunkiai nustatyti mažai tirtus arba visiškai naujus hipotetinius fermentus. Nekultivuojamiems naujiems lipolizinių fermentų producentams atrasti taip pat taikomas metagenominis tikslinių mikroorganizmų paieškos būdas (Peng ir kt., 2014). Taikant šį metodą, iš tikslinių aplinkos mėginių, kuriuose gali būti lipolizinius fermentus išskiriančių mikroorganizmų, tiesiogiai išskyrus DNR, konstruojamos DNR bibliotekos ir vykdomos PGR, naudojant oligonukleotidus, komplementarius konservatyviems lipolizinių fermentų genų regionams (Culligan ir kt., 2014). Alternatyvus pastarajam metodas yra funkcinės metagenomikos metodas, kai iš aplinkos izoliuota DNR klonuojama ir gauti heterologiniai klonai atrenkami pagal gebą hidrolizuoti specifinius substratus (Lopez-Lopez ir kt., 2014). Taip, taikant genominių ir metagenominį lipolizinių fermentų tyrimo metodus yra atveriamos plačios galimybės, siekiant užpildyti žinių spragas apie šiuos fermentus. Naujų lipolizinių fermentų atradimas yra svarbus biotechnologijų sektoriui, nes šie fermentai plačiai taikomi daugelio pramonei svarbių junginių, kurių paklausa vis didėja, sintezei (Gudiukaitė ir Gricajeva, 2017). Kitas svarbus aspektas – naujos fundamentinės žinios apie šių plačiai gamtoje paplitusių fermentų evoliuciją, struktūros-funkcijos sąryšį ir bazinius lipolizinių fermentų katalizės mechanizmus (Ferrer ir kt., 2007, Aharoni, 2009, Zhang ir kt., 2018).

1.3 Bakterinių lipazių ir esterazių skirtumai

Lipoliziniai fermentai natūraliomis fiziologinėmis sąlygomis katalizuoja acilgliceroliuose esančių esterinių ryšių hidrolizę, atpalaiduojant laisvasias RR ir glicerolį. Daugelis literatūros šaltinių teigia, kad esterazės

katalizuoja vandenyje tirpių, trumpagrandžių RR esterių (<10-12 anglies atomų RR), o tuo tarpu lipazės - vandenyje netirpių, bekrūvių ilgagrandžių ($\geq 10-12$ anglies atomų RR) RR esterių hidrolizę. Kitas dažnai minimas skiriamasis esterazių ir lipazių požymis yra tarpfazinės aktyvacijos fenomenas, kuris yra būdingas tik lipazėms. Pagal tarpfazinės aktyvacijos koncepciją, lipolizės reakcija prasideda tik po fermento adsorbcijos riebalinio substrato ir vandens fazių sąlyčio paviršiuje (FSP) (Chahinian ir Sarda, 2009, Lopez-Lopez ir kt., 2014). Yra nustatyta, kad substratų, esančių monomerinėje formoje atžvilgiu, lipazės pasižymi minimaliu aktyvumu, tačiau, kai substrato koncentracija yra pakankamai didelė, kad viršytų tirpumo ribą ir suformuotų emulsijas bei micles, stebimas staigus hidrolizinio lipazės aktyvumo padidėjimas. Tokia dviem etapais vykstanti lipazių katalizė aiškinama tuo, kad šie fermentai turi unikalų, aktyvųjį fermento centrą dengiantį dangtelio (angl., *lid*) domeną, kuris substrato emulsijos lipidiniame paviršiuje pasislenka, aktyvusis fermento centras pasidaro atviras ir prieinamas substratui, po ko vyksta staigus fermento aktyvumo didėjimas. Esterazių katalizuojamų reakcijų kinetiką galima aprašyti taikant klasikinį Michaelis-Menten modelį, o lipazių kinetikai aprašyti taikomi kiti modeliai, tokie kaip Verger-de-Haas modelis (Kiriliauskaitė, 2015).

Tačiau atsiranda duomenų rodančių, kad tarpfazinės aktyvacijos fenomenas, tiek savitumas skirtingo ilgio anglies atomų grandinės turintiems substratams yra netinkami kriterijai lipazių ir esterazių atskirumui. Šiuo metu jau yra nustatyta daugybė dangtelio domeną turinčių esterazių, kurioms būdinga tarpfazinė aktyvacija, taip pat yra dangtelį turinčių lipazių, kurioms nebūdinga tarpfazinė aktyvacija (Kapoor ir Gupta, 2012, Stergiou ir kt., 2013). Nepaisant to, lipolizinių fermentų hidrolizės mechanizmas yra vienodas (Casas-Godoy ir kt., 2018).

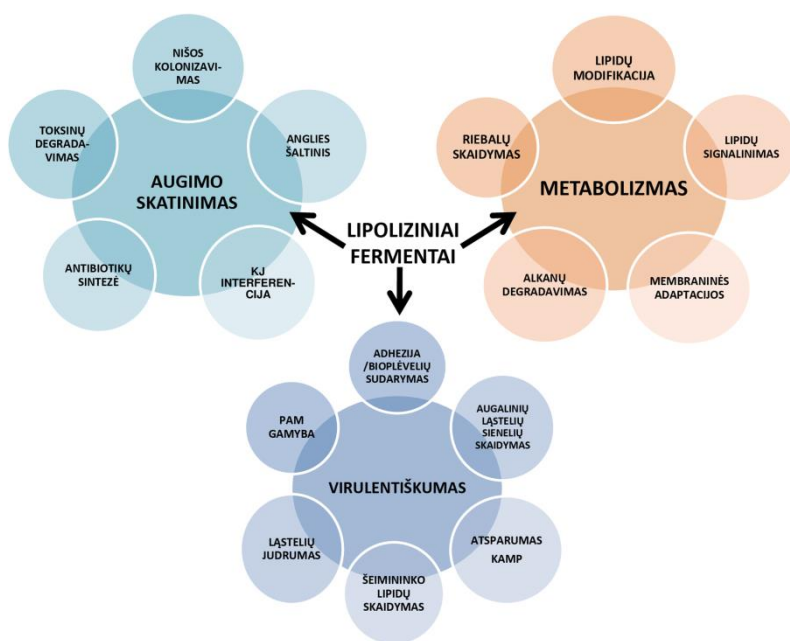
Tiek lipazės, tiek esterazės gali pasižymėti labai plačiu substratiniu savitumu: abiejų tipų fermentai gali katalizuoti trumpagrandžių ir ilgagrandžių RR esterių virsmus. Dėl to ir šis šių fermentų skirstymo kriterijus turi būti persvarstytas. Dažnai skirtingų tipų minėtiems lipoliziniams fermentams nustatomas tarpinis tarp tikrųjų esterazių ir lipazių substratinis savitumas, kai, pavyzdžiui, geriausiai skaidomas trumpagrandis substratas (pvz., C_4), bet taip pat dideliu aktyvumu fermentas pasižymi ir vidutinės grandinės bei ilgagrandžių substratų (C_8-C_{14}) atžvilgiu (Gricajeva ir kt., 2019). Atsižvelgiant į šias savybes, lipolizinius fermentus dažnai

siūloma klasifikuoti kaip „universalios lipazės“ (EC 3.1.1.X) (Barriuso ir kt., 2016, Vaquero ir kt., 2016).

Lipazės ir esterazės taip pat siūloma skirstyti remiantis jų sekų a.r. sąstato ir baltymų paviršiaus elektrosstatinio krūvio pasiskirstymo skirtumais. Taip pat nustatyta, kad hidrolizuojant tirpius RR esterius, lipazėms būdingas didesnis K_M negu esterazėms (Fojan ir kt., 2000, Casas-Godoy ir kt., 2018).

1.4 Fiziologinė lipolizinių fermentų reikšmė bakterijose

Daugumos bakterijų sintetinamų lipolizinių fermentų atliekamos fiziologinės funkcijos iki šiol nėra pilnai suprastos. Šių fermentų kompleksinė ir labai sudėtinga raiškos reguliacija leidžia numanyti, kad jų pirminė fiziologinė funkcija yra žymiai sudėtingesnė negu paprasta riebalų hidrolizė, leidžianti bakterijų ląstelėms apsirūpinti numanomais anglies šaltiniais (1.2 pav.).



1.2 pav. Numanomos lipazių ir esterazių fiziologinės funkcijos. PAM – paviršiaus aktyviosios medžiagos, KAMP – katijoniniai antimikrobiniai peptidai, KJ – kvorumo jutimas arba nuo bakterijų tankio priklausomas fiziologinis atsakas (angl., *quorum-sensing*) (pritaikyta iš: Hausman ir Jaeger, 2010).

Patogeninių mikroorganizmų gebėjimas prisitaikyti prie šeimininko ir aplinkos yra labai svarbus patogenizei. Viena iš mikroorganizmų adaptacijos

strategijų yra lipolizinių fermentų sintezė, leidžianti gauti laisvų riebalų rūgščių (RR) ir sutrikdyti šeimininko ląstelių barjerus. Manoma, kad lipoliziniai fermentai tam tikrų bakterijų rūšių naudojami kaip virulentiškumo veiksniai (Devescovi ir kt., 2007, Degrassi ir kt., 2008). Pavyzdžiui, bakterija *P. aeruginosa* priskiriama oportunistiniams patogenams, kurie gali infekuoti ligonių, dažnai sergančių cistine fibroze, kvėpavimo takus. Minėtos bakterijos lipazė ir fosfolipazė C katalizuoja **dipalmitoilfosfatidilcholino (DPFC)** hidrolizę, kurios metu atpalaiduojamas dipalmitoilglicerolis ir palmitatas (Beatty ir kt., 2005). DPFC sudaro pagrindinį šeimininko plaučių surfaktanto, reikalingo sumažinti paviršiaus įtempimą alveolių membranose, komponentą (Schmidt ir kt., 2007). Iš cistine fibroze sergančių pacientų plaučių išskirtų *P. aeruginosa* ląstelių LPS molekulėse nustatoma neįprasta lipido A kompozicija: 33 % jo sudaro palmitatas, nesutinkamas laukinio tipo *P. aeruginosa* (Ernst ir kt., 1999). Nustatyta, kad tam tikrų *S. saprophyticus* kamienų membraninė Ssp lipazė yra reikalinga šios bakterijos invazijai ir įsitvirtinimui infekcijos vietoje – šlapimo takų epitelio ląstelėse (Sakinč ir kt., 2005). Iškelta ir kita hipotezė, kad *S. saprophyticus* Ssp lipazė modifikuoja ląstelių-taikinių membranų lipidų sąstatą ir sudaro fagosominio/fagolizosominio pasprukimo nuo imuninės sistemos mechanizmo dalį (Szabados ir kt., 2013). Taigi, labai tikėtina, kad lipoliziniai fermentai, ypač lipazės, padeda bakterijoms kolonizuoti šeimininko skirtingus organus bei audinius, padidina jų atsparumą šeimininko imuninei sistemai.

Neseniai įrodyta, kad lipazės gali turėti svarbią imunomoduliacinę funkciją. *S. aureus* lipazė, vykstant patogeno invazijai, padeda „apeiti“ imuninį atsaką, inaktyvuodama bakterinės kilmės LPS (imuninio atpažinimo maskavimas), kurių reikia įgimto imuninio atsako aktyvavimui ir padeda bakterijoms išgyventi infekcijos metu (Chen ir Alonzo III, 2019).

Be abejo, bakterijoms lipoliziniai fermentai taip pat yra svarbūs lipidų degradavimui, norint įsisavinti aplinkoje prieinamą anglies šaltinį. Kaip pavyzdys, *P. aeruginosa* YS-7 kamienas geba kolonizuoti atšiaurias ekologines nišas, tokias kaip aliejaus emulsijos, turinčios labai mažą vandens kiekį (1 %) (Shabtai, 1991).

Nustatyta, kad laboratorinėmis sąlygomis esterazės dažnai nėra būtinos ląstelių išgyvenamumui (Berger ir kt., 1998). Tačiau probiotinė kultūra *Lactobacillus reuteri*, augdama terpėje su stresine tulžies druskų koncentracija, indukuoja 7.3 kartų didesnę esterazės raišką, o šios esterazės koduojančio geno sutrikdymas minėtomis augimo sąlygomis, drastiškai

sumažina šių bakterijų išgyvenamumą. Šis reiškinys parodo, kad *Lb. reuteri* esterazė dalyvauja ląstelių membranų reorganizavime (Wall ir kt., 2007, Whitehead ir kt., 2008). Be to, net keturiuose bakterijų kamienuose buvo parodyta, kad H₂O₂ koncentracijos didinimas indukuoja esterazių raiškos pasikeitimus, kas leidžia manyti, kad šie fermentai padeda bakterijoms susidoroti ir su patiriamu oksidaciniu stresu (Hausmann ir Jaeger, 2010).

Bakterijų esterazės taip pat svarbios kaip tarprūšinės sąveikos ir bendravimo reguliaciniai elementai. Esterazės skaido nuo bakterijų ląstelių tankio priklausomo fiziologinio atsako sistemoje (angl., *quorum-sensing*) naudojamas signalines molekules. Pavyzdžiui, *Ideonella* genties bakterijų esterazė katalizuoja augalų patogeno *Ralstonia solanacearum* signalinės 3-hidroksipalmitato rūgšties metilo esterio (3-OH PAME) molekulės skaidymą (Shinohara ir kt., 2007). *P. fluorescens* esterazė degraduoja signalinius laktonus, naudojamus ne tik *Pseudomonas* genties, bet ir daugelio kitų bakterijų nuo jų tankio priklausomo atsako sistemose.

Esterazės yra susijusios ir su tam tikrų antibiotikų sinteze. *Streptomyces* rūšių esterazės katalizuoja kaupiamųjų TAG hidrolizę. Po šio proceso atpalaiduojamos RR naudojamos kaip anglies šaltinis antibiotikų sintezei (Elend ir kt., 2006, Hausmann ir Jaeger, 2010).

Esterazės, taip pat kaip ir lipazės, gali prisidėti prie patogeninių bakterijų virulentiškumo: augalų ląstelių sienelės skaidančių *Clostridium* ir *Lactobacillus plantarum* ir kitų *Lactobacillus* genties bakterijų esterazės hidrolizuoja esterinius ryšius tarp hidroksicinamono rūgšties ir angliavandenių (Wang ir kt., 2004, Hausmann ir Jaeger, 2010). Žmogaus patogeno *Helicobacter pylori* vienintelis identifikuotas lipolizinis fermentas EstV esterazė yra tiesiogiai susijusi su peptinių skrandžio opų ir vėžio išsivystymu (Ruiz ir kt., 2007). *Mycobacterium tuberculosis* patogeniškumas taip pat stipriai priklauso nuo lipolizinių fermentų. Taikant transpozonų mutagenzę nustatyta, kad sukonstruotuose susilpnintuose *M. tuberculosis* kamienuose dauguma mutavusių genų lokusų buvo susiję su lipidų metabolizmu arba lipidų transportavimu per membraną. Vienas tokių lokusų buvo genas, koduojantis LipF lipazę, priklausančią IV lipolizinių fermentų šeimai (Zhang ir kt., 2005). Taip pat nustatyta, kad *P. aeruginosa* EstA esterazės deleciniai mutantai pasižymėjo stipriai sutrikusiu ląstelių judrumu, ramnolipidų sinteze ir gebėjimu formuoti bioplėveles (Wilhelm ir kt., 2007, Hausmann ir Jaeger, 2010).

1.5 Prokariotinių lipolizinių fermentų struktūros ypatumai lemiantys jų funkciją

Pirmosios išaiškintos lipolizinių fermentų erdvinės struktūros priklauso *Rhizomucor miehei* ir žmogaus kasos išskiriamoms lipazėms (Brady ir kt., 1990, Winkler ir kt., 1990). Pirmojo bakterinio lipolizinio fermento struktūra buvo nustatyta 1997 m. *P. fluorescens* sintetinamai esterazei (Kim ir kt., 1997). Panaudojus proteazės slopiklį fenilmetilsulfonilfluoridą, buvo nustatyta, kad šios esterazės katalizinė triada sudaryta iš Ser-114, His-199 ir Asp-168. 2012 m. Baltymų duomenų bazėje (angl., *the Protein Database, PDB*) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/>) buvo deponuota apie 100 lipolizinių fermentų erdvių struktūrų (Casas-Godoy ir kt., 2012). Šiuo metų išaiškintų lipolizinių fermentų struktūrų skaičius siekia ~200. Tačiau šios, PDB prieinamos tretinės struktūros, reprezentuoja tik 50 organizmų lipolizinius fermentus.

Nepaisant mažo lipolizinių fermentų a.r. sekų panašumo, kuris kartais nesiekia 20 %, daugėjant išaiškintų šių fermentų struktūrų, buvo nustatyta, kad dauguma šių fermentų, kurių molekulinė masė svyruoja nuo 19 iki ~75 kDa (Kovacic ir kt., 2019), pasižymi bendra konservatyvia α/β -hidrolazės klostė ir turi kanoninį GX SXG pentapeptidą, išsidėstantį aplink katalizinį Ser (Jaeger ir Reetz, 1998). Vėliau buvo nustatyta didelė lipolizinių fermentų šeima, turinti GD SL katalizinio centro konservatyvų motyvą ir $\alpha/\beta/\alpha$ -klostę. Šiuo metu taip pat yra žinoma keletas lipolizinių fermentų turinčių β -laktamazėms homologišką klostę, kuri struktūriškai skiriasi nuo α/β - ir $\alpha/\beta/\alpha$ -hidrolazių klosčių (Casas-Godoy ir kt., 2018).

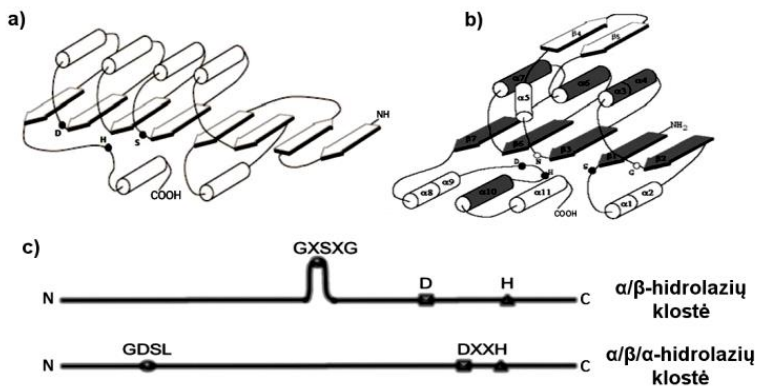
α/β -hidrolazių, $\alpha/\beta/\alpha$ -hidrolazių klostės ir katalizinė triada. Karboksilesterazių (EC 3.1.1.1) ir lipazių (EC 3.1.1.3) a.r. sekų tretinių struktūrų tyrimas atskleidė, kad dauguma šių fermentų priklauso α/β -hidrolazių antšeimiui: šiems fermentams būdingas α/β -hidrolazių susilankstymas arba kitaip dar vadinama α/β -hidrolazinė klostė. Ši klostė yra būdinga skirtingiems hidrolazių klasės fermentams: haloalkanų dehalogenazėms, acetilcholino esterazėms, dienlaktonų hidrolazėms, serino karboksipeptidazėms, kutinazėms, tioesterazėms, prolino iminopeptidazėms, prolino oligopeptidazėms ir epoksido hidrolazėms (Arpigny ir Jaeger, 1999, Jaeger ir kt., 1999, Casas-Godoy ir kt., 2018). α/β -hidrolazių klostę paprastai sudaro centrinis 8 lygiagrečių β -juostų lakštas, kuriame β -juostos išsidėsčiusios 12435678 tvarka ir antroji juosta (β_2) yra antilygiagreti (1.3 pav.) (Lenfant ir kt., 2013). Juostos β_3 - β_8 yra sujungtos aplink centrinį

lakštą, šonuose išsidėstančiomis α -spiralmėmis. Struktūroje tarp β -juostų ir α -spiralių taip pat nustatomos ir atitinkamos kilpos (1.3 pav., a, c) (Ollis ir kt., 1992, Jaeger ir kt., 1999, van Pouderooyen, 2001, Bornscheuer, 2002). Šiems globulinę struktūrą sudarantiems stabiliems pastoliams būdingas ypatingas plastiškumas: skirtingi struktūriniai elementai ar netgi ištisi domenai, pavyzdžiui, daugeliui lipazių būdingas dangtelio domenas, gali įsiterpti į kilpas, sujungiančias minėtas β -juostas ir α -spirales, nesutrikdant visos α/β -hidrolazės klostės. Dėl tokio plastiškumo α/β -hidrolazės klostę turintys baltymai pasižymi didele biocheminių ir fiziologinių funkcijų įvairove ir yra paplitę visuose gyvuosiuose organizmuose (Rauwerdink ir Kazlauskas, 2015).

Lipolizinių fermentų konservatyvią katalizinę triadą sudaro Ser (nukleofilas), Asp/Glu (rūgštinė am. r. liekana) ir His. Katalizinė lipolizinių fermentų triada yra labai panaši į serino proteazėse nustatomą katalizinę triadą, bet turi skirtumų katalizinių a.r. išsidėstymo tvarkoje. Lipolizinių fermentų α/β -hidrolazės klostėje katalizinis Ser yra išsidėstęs į γ panašiam linkyje po β 5-juostos prieš toliau besitęsiančią vieną iš α -spiralių ir tai sudaro itin konservatyvią klostės savybę (Casas-Godoy ir kt., 2018).

Paprastai Ser yra randamas fiksuotoje pozicijoje baltymo a.r. sekos GX SXG pentapeptide, kur X yra bet kokia a.r. Šio motyvo sudaromas aštrus linkis tarp α -spiralės ir β -juostos matomas tretinėje baltymo struktūroje yra vadinamas nukleofiline alkūne. Daugeliui lipazių/esterazių būdingas būtent GX SXG pentapeptidas, tačiau yra nustatyta ir kitų šių fermentų sekų, kuriuose išsidėsto nukleofilinis Ser: viena jų yra GDSL, kuri dažniausiai išsidėsto arčiau fermento N-galo (Ollis ir kt., 1992, Angkawidjaja ir Kanaya, 2006, Kovacic ir kt., 2019). GDSL lipolizinių fermentų šeimai priklausančios $\alpha/\beta/\alpha$ -hidrolazių klostės struktūrai būdinga hidrofobinė šerdis, sudaryta iš penkių β -juostų ir mažiausiai keturių α -spiralių. Papildomi $\alpha/\beta/\alpha$ -hidrolazių klostės antrinės struktūros elementai ir skirtumai substratą rišančiose kilpose lemia funkcinę GDSL hidrolazių įvairovę. Tai atspindi substratų, hidrolizuojamų šių fermentų, spektras: glikoesteriai, arilesteriai, į vašką panašūs lipidai, fosfolipidai, lizofosfolipidai, acil-KoA tioesteriai, peptidai ir TAG'ai (Lescic ir kt., 2010). GDSL motyvas, turintis aktyviojo centro Ser liekaną, sudaro konservatyvios sekos, vadinamos I bloku, dalį. I blokas išsidėsto arčiau fermento N-galo (1.3 pav., b, c). Asp ir His a.r., sudarančių katalizinę triadą, liekanos dažniausiai randamos III ir IV blokuose, atitinkamai. Gly, priklausantis oksianijoninei angai, sudaro itin konservatyvią liekaną, priskiriamą II blokui. Šie duomenys leido pasiūlyti

naują SGNH-hidrolazių šeimos pavadinimą, kuris naudojamas kaip GDSL pavadinimo sinonimas (Kovacic ir kt., 2019).



1.3 pav. Lipolizinių fermentų pirminių ir antrinių struktūrų elementai. Klasikinės α/β -hidrolazės klostės (a) ir $\alpha/\beta/\alpha$ -hidrolazės klostės (b) topologijų diagramos. Minimali $\alpha/\beta/\alpha$ -klostė apibūdinama kaip konservatyvus struktūrinis elementas kai kuriuose SGNH-hidrolazėse (*Aspergillus aculeatus* ramnogalakturonano acilesterazė, RGAE; *Streptomyces scabies* esterazė, SsEst; galvijų trombocitus aktyvuojantis veiksnys acilhidrolazė IB, PAF AH; *E. coli* tioesterazė, TAP ir kt.) paveiksle pavaizduota pilka spalva. Juodais taškais pažymėtos katalizinės tirados Ser, His, Asp liekanos; baltais – konservatyviosios, oksianijoninę angą sudarančios a.r. liekanos (Gly, Asn). (c) Katalizinės triados a.r. liekanų pozicijos pirminėje α/β - and $\alpha/\beta/\alpha$ -klostes turinčių lipolizinių fermentų struktūrose (pritaikyta iš: Kovacic ir kt., 2019).

Skirtingai nuo α/β -hidrolazių, $\alpha/\beta/\alpha$ -hidrolazių klostę turinčiuose lipoliziniuose fermentuose katalizinės Asp ir His a.r. liekanos sudaro DXXH motyvo dalį. Be to, plačiai paplitusi ir itin konservatyvi α/β -hidrolazių tarpe nukleofilinė alkūnė nebūdinga GDSL hidrolazėms. Nepaisant akivaizdžių skirtumų, GDSL hidrolazių katalizės mechanizmas yra tapatus bendram α/β -hidrolazių, kurios turi Ser-His-Asp katalizinę triadą, katalizės mechanizmui (Kovacic ir kt., 2019).

Oksianijoninė anga. Katalizinio lipolizinių fermentų mechanizmo metu susidaro tetraedrinis (pereinamoji fermentinės reakcijos būseną) tarpinis junginys stabilizuojamas vandenilinių ryšių, susidarančių tarp dviejų a.r. amidų protonų ir substrato karbonilo grupės deguonies (plačiau 1.7 poskyryje). Minėtos vandenilinius ryšius sudarančios a.r. sudaro taip vadinamą oksianijoninę angą (Gupta ir kt., 2015). Pirmąją oksianijoninės angos a.r. liekaną sudaro antroji GX₁SX₂G pentapeptido X₂ a.r., o antroji

išsidėsto lipolizinių fermentų N-gale, kilpoje tarp β 3-juostos ir α A-spiralės. Remiantis Lipazių Inžinerijos duomenų baze (angl., *Lipase Engineering Database, LED*), pagal sutinkamų oksianijoninių angų struktūras, lipolizinius fermentus galima suskirstyti į tris tipus: **GX**, **GGGX** ir **Y** (Widmann ir kt., 2015). Pleiss ir kt. (2000) identifikavo dvejų tipų oksianijonines angas, **GX** ir **GGGX**. **GX** tipe, **G** sudaro konservatyvus Gly, o **X** – tai oksianijoninė a.r. liekana. **GGGX** atveju, oksianijoninės angos liekana yra **G**, po kurios seka **X** – konservatyvi hidrofobinė a.r. liekana (Pleiss ir kt., 2000). Oksianijoninė anga gali būti iš anksto suformuota uždaroje fermento konformacijoje ir nekeisti savo pozicijos dangtelio atsidarymo metu (taip pat tai būdinga lipoliziniams fermentams neturintiems dangtelio), arba oksianijoninė anga gali susiformuoti išskirtinai tik fermento dangtelio atsidarymo metu (Pleiss ir kt., 2000, Lotti ir Alberghina, 2007).

Sutinkamų oksianijoninių angų tipas gali turėti lemiamos reikšmės lipolizinių fermentų savitumo substratams atžvilgiu. Lipoliziniai fermentai turintys **GX** tipo oksianijonines angas hidrolizuoja vidutinio ilgio ir/arba ilgas anglies atomų grandines turinčius RR substratus, o **GGGX** tipo oksianijoninės angos, dažniausiai nustatomos lipazėse ir karboksilesterazėse, savitai katalizuoja juose trumpagrandžių substratų hidrolizę (Lotti ir Alberghina, 2007).

Trečio tipo oksianijoninė anga, **Y** anga, buvo identifikuota Fischer ir kt. (2006). Šio tipo oksianijoninę angą sudaro itin konservatyvus Tyr hidroksigrupė. Šis tipas randamas *Candida antarctica* lipazėje A (šeima abh38), kai kuriuose esterazėse (pvz., kokaino esterazėse) ir bakterinėse lipazėse (Fischer ir kt., 2006, Casas-Godoy ir kt., 2018).

Lipolizinių fermentų α -spiralinės kilpos - dangtelis. Išaiškinus *R. miehei* ir žmogaus kasos lipazių trimates struktūras buvo identifikuotas dangtelio domenai, dengiantis šių fermentų tunelius vedančius prie jų aktyviųjų centrų. Lipolizinių fermentų dangteliai sudaryti iš vienos ar daugiau amfifilinių α -spiralėlių, sujungtų su pagrindine fermento dalimi per lanksčią struktūrą. Vienų mikroorganizmų lipazių dangteliai yra sudėtingi, pavyzdžiui, *Geobacillus thermocatenulatus* lipazė turi dvigubą dangtelį, sudarytą iš fermento didžiąją dalį sudarančių a.r. (Kapoor ir Gupta, 2012; Cheng ir kt., 2014). Kitų mikroorganizmų lipazių dangteliai gali būti maži, sudaryti tik iš keletu a.r. ir net pilnai nedengti aktyvaus fermento centro (Kapoor ir Gupta, 2012). Dangtelis - paslankus lipolizinių fermentų struktūros elementas, kuris lipidų ir vandens fazių sąlyčio paviršiuje

pasilenka nuo fermento aktyviojo centro ir jį atidengia, kitaip tariant, įvyksta dangtelio konformacinis pokytis, dėl kurio aktyvusis centras tampa prieinamas substratui (tarpfazinė aktyvacija). Įvykus tarpfazinei aktyvacijai, taip pat atidengiama katalizinį centrą supanti hidrofobinė sritis, skatinanti fermento ir substrato sąveiką (Rehm ir kt., 2010).

Substratą rišanti “kišenė” (angl., *substrate-binding site*). Lipolizinių fermentų aktyvusis centras yra išsidėstęs specifinės „kišenės“ viduje, baltymo struktūros centrinio β -lakšto viršūnėje. Substratą prisijungiančios kišenės kraštai daugiausiai sudaryti iš hidrofobinių a.r. liekanų, kurios, įvykus fermento ir substrato susijungimui, sudaro sąveikas su hidrofobiniu lipidiniu substratu. Lipolizinių fermentų substrato prisijungimo kišenės skiriasi hidrofobinę sąveiką užtikrinančios srities plotu, forma, dydžiu, gyliu ir fizikinėmis bei cheminėmis savybėmis, o tai dažnai užtikrina skirtingų lipolizinių fermentų savitumą skirtingiems substratams. Remiantis lipolizinių fermentų aktyvaus centro rišimosi kišenės geometrine sandara, Pleiss ir kt. (1998) lipolizinius fermentus suskirstė į tris grupes: 1) hidrofobinę, siauro plyšio formos substrato jungimosi kišenę, išsidėstančią negiliai baltymo struktūroje turintys lipoliziniai fermentai (būdinga *Rhizomuchor* ir *Rhizopus* lipazėms ir kt.); 2) piltuvo formos substrato jungimosi kišenę turintys lipoliziniai fermentai (būdinga *C. antarctica*, *Pseudomonas* lipazėms, žinduolių kasos lipazei ir kutinazėms); 3) tunelio pavidalo substrato jungimosi kišenę turintys lipoliziniai fermentai (būdinga *Candida rugosa* lipazėms) (Pleiss ir kt., 1998, Casas-Godoy ir kt., 2018).

1.6 Bakterijų lipolizinių fermentų raiška ir sekrecija

Mikroorganizmų išskiriami lipoliziniai fermentai dažniausiai yra tiriami išskirtinai biotechnologiniu požiūriu ir itin daug pastangų dedama optimalių sąlygų, reikalingų maksimaliai jų sintezei, tyrimams (Rosenau ir Jaeger, 2000). Nors daugybės bakterinių lipolizinių fermentų genų sekų yra nustatyta, molekuliniai mechanizmai, reguliuojantys šių genų raišką prokariotuose, iki šiol nėra aiškūs ir yra menkai tiriami (Rosenau ir Jaeger, 2000; Krzeslak ir kt., 2008). Šiuo metu žinoma tik keletas lipolizinius fermentus koduojančių genų raiškos reguliaciją aiškinančių tyrimų pavyzdžių (Jaeger ir kt., 1999, Eggret ir kt., 2003, Abdou ir kt., 2011).

Be labai globalaus lipolizinius fermentus koduojančių genų raiškos reguliavimo, pasitelkiant nuo bakterijų ląstelių tankio priklausomo atsako sistemą, egzistuoja daugybė įvairių papildomų reguliacijos elementų

leidžiančių bakterijoms pritaikyti lipolizinių fermentų sintezę prie specifinių, aplinkos sąlygų diktuojamų, poreikių. Lipolizinių fermentų raiška mikroorganizmuose yra daugiausiai priklausoma nuo aplinkos veiksnių arba pokyčių, vykstančių užląstelinės mitybinės terpės sudėtyje. Daugelio bakterijų užląstelinų lipolizinių fermentų raišką gali indukuoti natūralioje jų aplinkoje ar mitybinėje augimo terpėje esantys lipidai, RR, glicerolis ir įvairūs angliavandeniliai (Boekema ir kt., 2007, Casas-Godoy ir kt., 2018).

Užląsteliniai bakterijų lipoliziniai fermentai į išorinę terpę gali būti sekretuojami per skirtingas sekrecijos sistemas (Sangeetha ir kt., 2011). Lipazių sekrecijos pradžia priklauso nuo mikroorganizmo, bet dažniausiai fermentas pradedamas sekretuoti vėlyvojoje eksponentinėje arba stacionarioje augimo fazėje (Shah ir Bhatt, 2012). Bakterijose lipolizinių fermentų sekrecija, sulankstymas ir translokacija taip pat, kaip ir raiškos reguliacija, yra pakankamai sudėtingi procesai, kuriuose dalyvauja daugybė įvairių baltymų (Boekema ir kt., 2008).

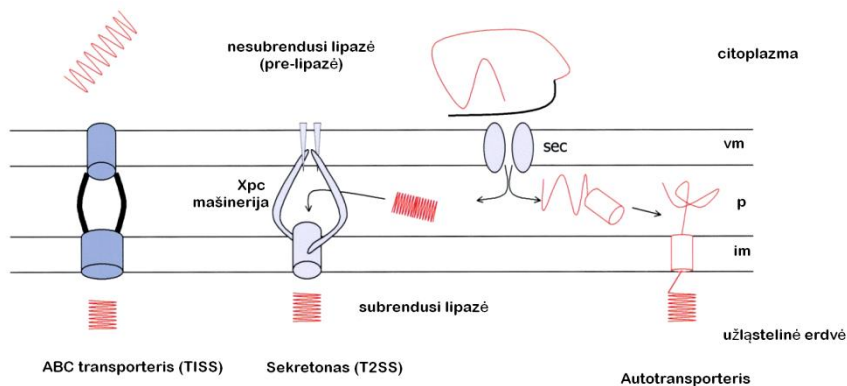
Nuo Sec translokono priklausoma baltymų sekrecijos sistema yra viena plačiausiai paplitusių translokazių, kurios substratai yra įvairūs nesusilankstę baltymai, įskaitant ir lipolizinius fermentus. Ši sekrecijos sistema yra konservatyvi visuose gyvybės domenuose. Sec sekrecijos sistemą tipišku atveju sudaro tirpus SecA dimeras bei iš SecY, E, D, G ir F baltymų sudarytas membraninis kompleksas. Daugumos Gram-neigiamų ir Gram-teigiamų mikroorganizmų lipoliziniai fermentai yra potencialūs Sec sistemos substratai. Sec sekrecijos sistemos perkeliama lipoliziniai fermentai turi atpažįstamą N-galinę signalę seką, sudarytą iš trijų skirtingomis savybėmis pasižyminčių regionų: teigiamai įkrauto N-galinio regiono (n-regionas), hidrofobinės šerdies (h-regionas) ir polinio C-galo (c-regionas) (Rosenau ir Jaeger, 2000, Palmer ir Bergs, 2012). Panašias Sec-translokazes turi *E. coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ir kitos bakterijos. Gram-teigiamoms bakterijoms šis mechanizmas yra pakankamas, kad jų sekretuojamos lipazės pasiektų išorinę terpę, o Gram-neigiamų bakterijų lipazės turi pereiti dar ir išorinę membraną. Sekretuojami per Sec sistemą, kai kurie lipoliziniai fermentai gali būti tvirtinami membranose. Sekrecija per išorinę Gram-neigiamų bakterijų membraną dažniausiai vyksta dviem būdais: per I arba II tipo sekrecijos sistemą (Rosenau ir Jaeger, 2000).

I tipo sekrecijos sistema arba ABC eksporteriai. Šio tipo sekrecijos sistema (T1SS) yra vienas iš plačiausiai paplitusių Gram-neigiamų bakterijų baltymų sekrecijos mechanizmų (Angkawidjaja ir Kanaya, 2006). *P.*

fluorescens ir *S. marcescens* šios sistemos perkeliama lipazė ir esterazė signalinę seką turi C-gale (dažniausiai tai G-G-X-G-X-D a.r. motyvas) (Rosenau ir Jaeger, 2000, Costa ir kt., 2015). T1SS sudaryta iš trijų baltyminių subvienetų, kurie perveria vidinę ir išorinę bakterijų membranas: 1) vidinėje membranoje esantis ABC baltymas; 2) MFP baltymas (periplazminėje erdvėje sudaro kompleksą su ATP rišančia kasete); 3) išorinės membranos OMP baltymas. Lipazė pernašos į išorinę terpę procesui būtina ATP (Angkawidjaja ir Kanaya, 2006; Fronzes ir kt., 2009). ABC baltymas pasižymi ATPaziniu aktyvumu ir tiekia energiją, reikalingą fermento sekrecijos procesui, dalyvauja lipazės atpažinime. MFP baltymas dalyvauja substrato atpažinime, jungia ABC su OMP, dalyvauja baltymų sulankstyme, o MFP-OMP sąveika atskiria ABC kompleksą nuo periplazminės erdmės ir aktyvuoja visą eksporto sistemą (Angkawidjaja ir Kanaya, 2006, Costa ir kt., 2015).

Sekrecija, tarpininkaujant autotransporteriu. Esant tam tikroms fiziologinėms sąlygoms, lipolizinius fermentus palankiau išlaikyti arčiau ląstelės ir pritvirtinti prie ląstelės paviršiaus. Pavyzdžiui, *P. aeruginosa* esterazė EstA sudaryta iš dviejų skirtingų domenų. N-galo domenas apsaugo katalizinį aktyvumą ir yra pritvirtintas prie ląstelės paviršiaus. Spėjama, kad jo perėjimas per išorinę membraną vyksta tarpininkaujant C-galo domeniui - baltymui-autotransporteriu, kuris yra perkeliama į periplazmą nuo Sec baltymų priklausomos sistemos (Rosenau ir Jaeger, 2000).

Sekrecija, tarpininkaujant sekretonui arba II tipo sekrecijos sistema. Dažnai po to, kai Gram-neigiamų bakterijų lipoliziniai fermentai yra perkeliama per Sec sekrecijos sistemą į periplazmą, nukerpamas signalinis peptidas ir fermentas yra sulankstomas į aktyvią konformaciją. Šis procesas vyksta padedant kitiems baltymams: Lif šaperonui ir bendriesiems periplazminio sulankstymo katalizatoriams - disulfido izomerazei DsbA ir DsbC (Jaeger ir kt., 1999; Rosenau ir Jaeger, 2000; Svendsen, 2003; Allen ir kt., 2009, Michael ir Voulhoux, 2009). Po to Gram-neigiamų bakterijų lipoliziniai fermentai gali būti sekretuojami per išorinę membraną, tarpininkaujant 14 skirtingų baltymų kompleksui, vadinamam sekretonui. Šis mechanizmas sudaro sistemą, vadinamą II tipo sekrecijos keliu (T2SS) (Rosenau ir Jaeger, 2000, Boekema ir kt., 2008). Kaip gali vykti lipolizinių fermentų sekrecija pavaizduota 1.4 paveiksle.



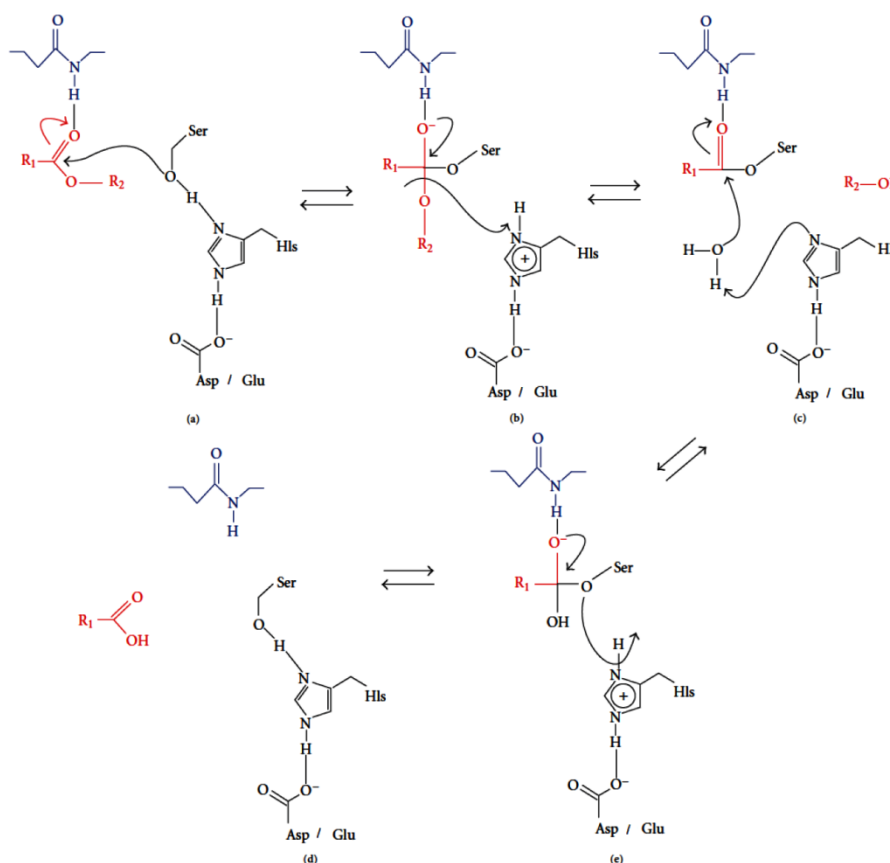
1.4 pav. Lipolizinių fermentų sekrecijos sistemos Gram-neigiamose bakterijose. Gram-teigiamose bakterijose lipolizinių ir kitų baltymų sekrecijai pakanka Sec sistemos. Žymėjimai: vm – vidinė membrana, p – periplazminė ertmė, im – išorinė membrana (pritaikyta iš: Rosenau ir Jaeger, 2000).

Ypatingą „posekreicinę“ modifikaciją patiria kai kurie *Staphylococcus* genties atstovų lipoliziniai fermentai. Jie yra sintetinami kaip pre-pro-fermentai, kurie tipišku atveju yra sudaryti iš 35-38 a.r. ilgio signalinio peptido, vadinamo pre-regionu, 207-321 a.r. ilgio hidrofiliųjų savybių turinčio peptido vadinamo pro-regionu bei subrendusio peptido. Subrendęs peptidas (aktyvi lipazė) randamas *Staphylococcus* užląstelinėje terpėje ir yra sudarytas iš ~383-396 a.r. Šie lipoliziniai fermentai iš pradžių modifikuojami pašalinant pre-seką (signalinį peptidą) ir sekretuojami pro-peptido formos, po ko specifinių proteazių paverčiami subrendusiais fermentais (Kouwen ir kt., 2010).

1.7 Lipolizinių fermentų hidrolizės mechanizmas

Nepaisant bandymų atskirti lipazes ir esterazes remiantis jų savitumu substratui, dangtelio domeno buvimu arba ne, šių lipolizinių fermentų katalizinę triadą aktyviajame centre sudaro Ser-Asp/Glu-His a.r. liekanos, jos atlieka vieną svarbiausių funkcijų – katalizę (Lopez-Lopez ir kt., 2014). Lipolizinių fermentų reakcijos mechanizmas priskiriamas Ping-Pong Bi-Bi tipui, nes reakcijoje dalyvauja riebaliniai substratai, pavyzdžiui, TAG, ir vandens molekulė (bisubstratinė reakcija). Katalizuojant reakciją lipoliziniui fermentui turinčiam dangtelio domeną, katalizė prasideda nuo fermento adsorbcijos ant lipidų ir vandens FSP. Katalizės mechanizmas, kuris vyksta dviem etapais, yra bendras visiems lipoliziniams fermentams nepriklausomai nuo to reikalinga fermentui tarpfazinė aktyvacija ar ne

(Phuah ir kt., 2012, Kriliauskaitė, 2015, Choong ir kt., 2018). Lipolizės mechanizmas parodytas 1.5 pav.



1.5 pav. Lipazių katalizuojamos lipolizės mechanizmas. Katalizinė triada ir vandens molekulė pažymėti juodai; oksianijoninė anga – mėlynai; substratas – raudonai. (a) Nukleofilinė Ser hidroksilo ataka; (b) pirmoji tetraedro formos pereinamoji reakcijos būsena; (c) acilfermento tarpinio junginio susidarymas ir vandens nukleofilinė ataka; (e) antroji tetraedro formos pereinamoji reakcijos būsena; (d) laisvas fermentas (pritaikyta iš: Ribeiro ir kt., 2011).

Katalizė (1.5 pav.) prasideda nuo acilinimo stadijos. Ser hidroksigrupės deguonies atomas atakuoja hidrolizuojamo lipidinio substrato esterinio ryšio karbonilo grupės anglies atomą. Susiformuoja tetraedrinis tarpininkas (pirmoji reakcijos pereinamoji būsena), kuriam būdingas neigiamas skaidomo esterinio ryšio karbonilo deguonies atomo krūvis ir keturi atomai prisijungę prie karbonilo anglies (toks išsidėstymas primena tetraedrą).

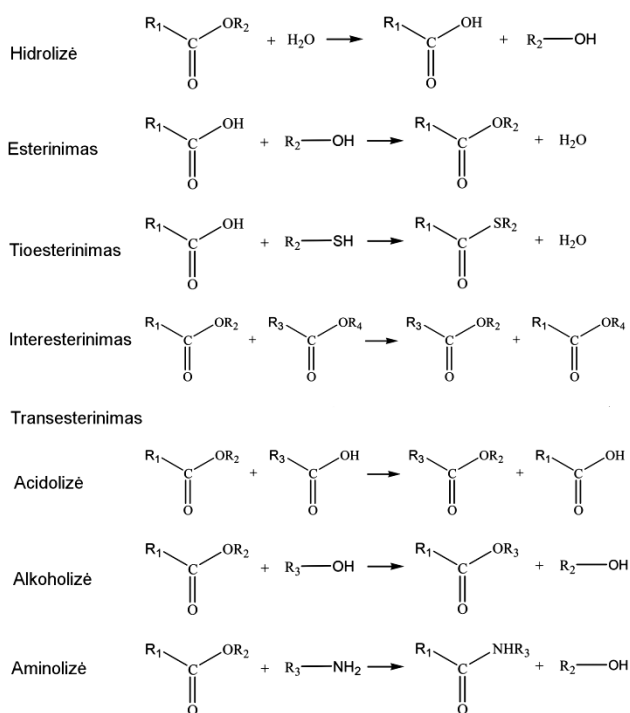
Tarpinis junginys stabilizuojamas vandenilinių ryšių tarp neigiamai įkrauto karbonilo deguonies atomo ir mažiausiai dviejų pagrindinės grandinės a.r. >NH grupių (oksianijoninė anga). Kaip jau buvo minėta, viena iš >NH priklauso a.r. liekanai, išsidėstančiai už nukleofilinio Ser, kita – β 3 klostės galo a.r. liekanai. Ser nukleofiliskumas sustiprinamas katalizinio His, kuriam nuo Ser hidroksigrupės yra perduodamas protonas. Protono perdavimas yra palengvinamas rūgštinės katalizinės a.r. (Asp arba Glu), kuri tiksliai orientuoja His imidazolo žiedą ir dalinai panaikina susidariusį ant jo krūvį (Jaeger ir kt., 1999; Ribeiro ir kt., 2011). Galiausiai, protonas yra perkeliamas ant skeliamo esterinio ryšio deguonies atomo ir ryšys nutrūksta. Šiame etape viena iš substrato RR esteriniu ryšiu prijungiama prie nukleofilinio Ser (susidaro kovalentinis tarpinis junginys - acilfermentas), o alkoholi turinti substrato dalis yra atpalaiduojama į supantį tirpalą.

Kitas etapas yra deacilinimas, kurio metu vandens molekulė hidrolizuoja kovalentinį tarpinį junginį. Vandens molekulė aktyvuojama katalizinės triados His, kuris perima nuo jos protoną. Susidaręs OH^- jonas atakuoja kovalentiškai prie Ser prisijungusios acilo grupės karbonilo anglies atomą ir vėl susidaro laikinas neigiamai įkrautas tetraedro formos tarpinis junginys, kuris yra stabilizuojamas jau minėtos oksianijoninės angos. Aktyvaus centro His perduoda protoną aktyvaus Ser liekanos deguonies atomui, po ko yra atpalaiduojamas acilo komponentas. Po acilo produkto difuzijos, fermentas pasiruošęs pakartotinai katalizei (Ribeiro ir kt., 2011). Alkoholis atveju vietoj vandens molekulės nukleofilo funkciją atlieka alkoholis (Casas-Godoy ir kt., 2018).

1.8 Lipolizinių fermentų katalizuojamos reakcijos

Nors natūrali lipolizinių fermentų prigimtis katalizuoti TAG esterinių ryšių hidrolizę, atitinkamai pakeitus fermentinės reakcijos sąlygas, šie fermentai geba katalizuoti kitokių tipų reakcijas, pavyzdžiui, skirtingų tipų esterinimą ir peresterinimą. Hidrolizės arba lipolizės metu skeliami monoacilglicerolių, diacilglicerolių ir triacilglicerolių esteriniai ryšiai susidarant RR ir gliceroliui. Nepaisant to, lipoliziniai fermentai gali būti aktyvūs plataus substratų spektro atžvilgiu. Termodinamiškai palankiomis sąlygomis (pvz., esant mažam vandens aktyvumui), lipoliziniai fermentai geba katalizuoti sintezės reakcijas, kurios yra skirstomos į du pagrindinius reakcijų tipus – esterinimą ir peresterinimą. Katalizuojant fermentui, esterinimo reakcijos metu, prie alkoholio kovalentiniu ryšiu yra prijungiama RR, susidaro esteris ir yra atpalaiduojama vandens molekulė (Stergiou ir kt.,

2013). Hidrolizės ir esterinimo reakcijos sudaro peresterinimo reakcijų pagrindą (Kiriliauskaitė, 2015). Klasikinė peresterinimo reakcija vadinama alkoholize, šios reakcijos metu įvyksta TAG arba esterio ir alkoholio apsikeitimas alkoksi grupėmis ir susidaro nauji esteriai(-is) ir alkoholis. Prie peresterinimo reakcijų priskiriamos ir tokios reakcijos kaip acidolizė, aminolizė ir interesterinimas. Acidolizės metu apsikeitimas acilo liekanomis vyksta tarp TAG ir RR, o aminolizės atveju acilo liekaną TAG arba esterio molekulėje pakeičia aminos deacilinimo stadijoje veikiantis kaip nukleofilas. Interesterinimo reakcijų metu acilo liekanomis apsikeičia dvi TAG arba esterių molekulės (Stergiou ir kt., 2013, Aouf ir kt., 2014). Pagrindinių tipų lipolizinių fermentų katalizuojamų reakcijų schema pateikta 1.6 paveiksle.



1.6 pav. Lipolizinių fermentų katalizuojamos reakcijos (pritaikyta iš: Aouf ir kt., 2014).

Dažniausiai sintezės reakcijos vyksta bevandeniuose arba nedideliu termodinaminiu vandens aktyvumu pasižyminčiuose fermentinių reakcijų mišiniuose. Termodinaminis aktyvumas tai molekulių prieinamumo tirpiklyje matas. Sintezės reakcijų mišiniai tokiu atveju būna be tirpiklio arba yra naudojamas organinis tirpiklis. Taip pat lipolizinių fermentų katalizuojamų sintezės reakcijų sistemose bevandenė aplinka gali būti

užtikrinama naudojant imobilizuotus fermentus arba išdžiovintus jų preparatus. Kai kuriais sintezės reakcijų atvejais, nustatyta, kad nedidelis vandens kiekis, užtikrinantis fermento teisingą konformaciją, yra reikalingas.

Lipoliziniai fermentai taip pat gali pasižymėti kitais susijusiais aktyvumais: fosfolipaziniu, lizofosfolipaziniu, kutinaziniu, cholesterolio esterazių arba amidaziniu. Be to, tam tikri lipoliziniai fermentai gali katalizuoti ir netradicines reakcijas, tokias kaip Michaelis reakcija, epoksidacija, laktonizacija, polimerizacija, angliavandenių acilinimas ir kt. (Bora ir kt., 2013, Aouf ir kt., 2014, Ghasemi ir kt., 2014).

1.9 Lipolizinių fermentų savitumas

Lipolizinių fermentų savitumas arba atrankumas - tai savybė, susijusi su jų geba pasirinkti katalizuoti tik vieno ar kito substrato virsmus. Dažniausiai išskiriami trys lipolizinių fermentų savitumo tipai: savitumas konkrečiam substratui (absolūtusis savitumas), pozicinis savitumas (regiosavitumas) ir stereosavitumas (enantiosavitumas).

1.9.1 Savitumas konkrečioms substratams

Lipoliziniai fermentai priskiriami prie plačiu substratiniu savitumu pasižyminčių fermentų, kurie gali katalizuoti įvairių substratų virsmus, tačiau dažniausiai, priklausomai nuo substrato molekulės struktūros ypatumų, skirsis šių fermentų katalizės, vieno ar kito substrato atžvilgiu, greitis.

Lipoliziniai fermentai gali pasižymėti savitumu MAG, DAG arba TAG. MAG savitai skaidantys lipoliziniai fermentai (monoacilglicerolių lipazės, MAGL) plačiai paplitę bakterijose, nes MAG šiems ir kitiems mikroorganizmams yra itin toksiški. MAGL yra taip pat randamos augaluose ir gyvūnuose, pavyzdžiui, *Arabidopsis thaliana* turi MAGL labai panašią į žmogaus. Pastarasis lipoliziniu aktyvumu pasižymintis fermentas abiejuose organizmuose yra atsakingas už paskutinį lipidų skaidymo žingsnį. Kitos, neįprastu savitumu pasižyminčios lipazės pavyzdys yra *Malassezia globosa* Lip1 lipazė, kuri pasižymi savitumu išskirtinai MAG ir DAG ir yra visiškai neaktyvi TAG atžvilgiu (Casas-Godoy ir kt., 2018).

Savitumas konkrečioms substratams taip pat nusako lipolizinių fermentų savitumą arba atrankumą substratų RR tipo (grandinės sotumo laipsnis ir kt.) ir grandinės ilgio atžvilgiu. Pavyzdžiui, *Bacillus* sp., *Pseudomonas alcaligenes* EF2 ir *P. alcaligenes* 24 lipazės pasižymi

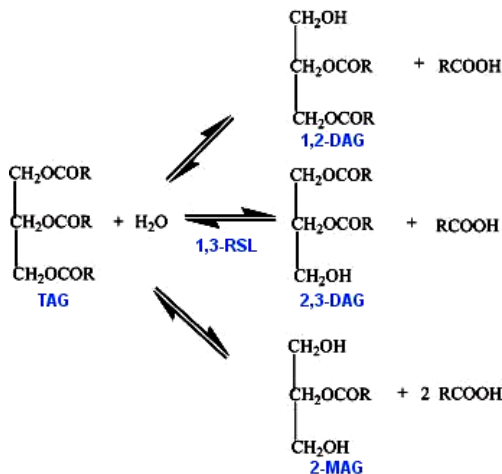
savitumu vidutines ir ilgas RR grandines (anglies atomų skaičius nuo 10 ir daugiau) turintiems TAG, o *B. subtilis* 68, *Bacillus* sp. THL027, *P. aeruginosa* 10145, *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. ATCC 21808, *C. viscosum* ir *Aeromonas hydrophyla* lipazės teikia pirmenybę mažoms ar vidutinio ilgio RR. *S. aureus* 226 lipazė pasižymi savitumu nesočiosioms RR. Kai kurių bakterijų ir kitų mikroorganizmų lipoliziniai fermentai pasižymi tuo, kad yra saviti tik tam tikroms specifinėms RR arba jų grupėms (chemosavitumas). Pavyzdžiui, mieliagybio *Geotrichum candidum* lipazė yra savita RR su dvigubuoju ryšiu tarp C₉ ir C₁₀ (Charton ir Macrae, 1992). Be to, lipoliziniai fermentai gali būti saviti ne tik alifatiniams, bet ir alicikliniams, bicikliniams, aromatiniams ir kitokiems substratams (Gupta ir kt., 2004, Casas-Godoy ir kt., 2018).

Lipolizinių fermentų platus substratinis savitumas, gali būti tiesiogiai lemiamas aktyvaus centro substratą rišančios kišenės formos (geometrijos) ir ją sudarančių a.r. prigimties. Nustatyta, kad negilios, plyšio ir/ar piltuvo formos lipolizinių fermentų substratą rišančios kišenės apsprendžia fermentų savitumą trumpagrandžiams ir vidutinę grandinę turintiems acilgliceroliams, o tunelio formos– ilgagrandžiams (Barriuso ir kt., 2016). Be to, nustatyta, kad lipolizinių fermentų savitumui substratams reikšmės gali turėti ir šių fermentų dangtelio domenai. Tai nustatyta atliekant tam tikrų lipolizinių fermentų taikiniui specifinę mutagenezę ir kuriant chimerinius baltymus. Atlikus tam tikrų *Pseudomonas fragi* dangtelio domeno a.r. liekanų mutagenezę, nustatyta, kad fermentas keičia savo savitumą: tampa savitas vidutinio ilgio RR anglies atomų grandines turintiems substratams (Santarossa ir kt., 2005).

1.9.2 Pozicinis savitumas

Lipolizinių fermentų regiosavitumas apibrėžia šių fermentų atrankumą skaidomojo esterinio ryšio triacilglicerolyje pozicijos atžvilgiu. Remiantis lipolizinių fermentų regiosavitumu, juos galima suskirstyti į 2 grupes: nesavitus esterinio ryšio TAG molekulėje pozicijai ir *sn*-1,3-regiosavitus. Poziciniu aspektu nesaviti lipoliziniai fermentai katalizuodami TAG hidrolizę skelia esterinį ryšį, išsidėstantį bet kurioje glicerolio C atomo pozicijoje (C1 / C2 / C3). Poziciniu savitumu nepasižymintys lipazės veikia TAG molekules atsitiktinai ir hidrolizuoja jas iki laisvųjų RR ir glicerolio. Poziciniu savitumu nepasižymintys lipoliziniai fermentai bakterijų tarpe paplitę plačiausiai.

Sn-1,3-regiosavitos lipazės pasižymi poziciniu savitumu (Saxena ir kt., 1996) ir katalizuoja prie glicerolio C1 ir C3 atomų esančių esterinių ryšių hidrolizę. Taip TAG yra hidrolizuojamas iki laisvųjų RR, 1,2(2,3)-DAG ir 2-MAG (1.7 pav.).



1.7 pav. *sn*-1,3 poziciniu savitumu pasižyminčių lipolizinių fermentų katalizuojamos TAG hidrolizės schema. 1,3-RSL – *sn*-1,3-regiosavitas lipolizinis fermentas, RCOOH – susidaranti laisvosios RR (pritaikyta iš: Kapoor ir Gupta, 2012).

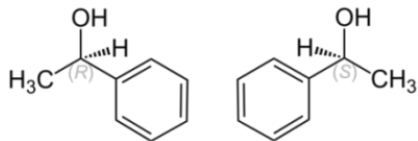
Lipolizinių fermentų katalizuojamos TAG hidrolizės metu susidarantių 2-MAG ir 1,2- ar 2,3-DAG viduje vyksta lėta acilgrupės migracija, susidarant 1,3-DAG ar 1-MAG, kurie yra hidrolizuojami *sn*-1,3-savito lipolizinio fermento toliau iki laisvų RR ir glicerolio. Dėl to galiausiai gaunama pilna TAG hidrolizė. Dažnai regiosavitos lipazės yra užląstelinės (Gupta ir kt., 2004, Kapoor ir Gupta, 2012). Nustatyta labai mažai lipolizinių fermentų pasižyminčių *sn*-2 poziciniu savitumu.

Lipoliziniai fermentai pasižymintys *sn*-1,3-regiosavitumu sintetinami *Bacillus* sp. (Saxena ir kt., 2011), *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* (Cai ir kt., 2015), *Yarrowia lipolytica*, *R. miehei*, *Rhizomucor endophyticus*, *Rhizomucor delemar*, *Thermomyces lanuginosus*, *C. antarctica* (lipazė B). Neįprastos *sn*-2 poziciniu savitumu pasižyminčios lipazės išskirtos iš *Staphylococcus* genties bakterijų ir *Geotrichum* sp. FO401B (lipazė C) (Casas-Godoy ir kt., 2018).

1.9.3 Enantiosavitumas

Chiralinės molekulės - tai molekulės, turinčios asimetrinį centrą ir egzistuojančios dvejose enantiomerinėse formose - R ir S, kurios yra viena kitos veidrodinis atspindys (enantiomerų pavyzdys parodytas 1.8 pav.). Tokioms chiralinėms molekulėms būdingos labai panašios cheminės savybės (lydymosi taškas, tirpumas, reaktyvumas), tačiau dažnai šios molekulės pasižymi skirtingomis biologinėmis savybėmis (Kasprzyk-Hordors ir Baker, 2012, Bhardwaj ir Gupta, 2017). Lipolizinių fermentų enantioatrankumas yra šių fermentų savybė katalizuoti chiralinių molekulių virsmus reakcijos mišinyje, kur sutinkamos abi chiralinės molekulės enantiomerinės formos. Dėl šių priežasčių lipoliziniai fermentai kelia didelį susidomėjimą žemės ūkiui (insekticidų ir herbicidų gamyba) ir farmacijos bei grynujų cheminių junginių sintezės sektoriams.

Taikant metagenominę funkcinę atranką, išskirtas LipG9 lipolizinis fermentas, katalizuojantis alkoholio (R,S)-1-feniletanolio (1.8 pav.) peresterinimą vinilacetatu ir analogiško esterio (R,S)-1-fenilacetato hidrolizę, pasižymėjo enantiosavitumu R-izomerinei minėtų junginių formai (Alnoch ir kt., 2015).



1.8 pav. 1-feniletanolio chiralinės R ir S molekulių formos (enantiomerai) (pritaikyta iš: Alnoch ir kt., 2015).

Fermento-substrato komplekso struktūrų rentgenografinė struktūrinė analizė, molekulinis tetraedro formos pereinamosios būsenos modeliavimas, substrato prijungimas aktyviajame centre, leido pagilinti lipazių enantioatrankumo fenomeno supratimą naudojant *B. cepacia* modelinę tyrimo sistemą (Kim ir kt., 2013). Taip pat naujausi tyrimai parodė, kad lipazių geba atskirti pirminius ir antrinius alkoholius gali būti kontroliuojama reguliuojant reakcijos mišinyje esančio tirpiklio poliškumą. Deja, remiantis lipolizinių fermentų struktūra ar energetine analize, pagrįstai paaiškinti jų enantioatrankumo kol kas nepavyko (Pleiss ir kt., 2000, Meng ir kt., 2014).

1.10 Bakterinių lipolizinių fermentų klasifikacija

Prieš 20 metų Arpigny ir Jaeger (1999) publikavo originalų darbą, kuriame tuo metu žinomi 53 bakterijų lipoliziniai fermentai, remiantis juos sudarančių a.r. sekų ir fundamentinių biologinių savybių skirtumais, buvo

suskirstyti į 8 (I-VIII) šeimas (Arpigny ir Jaeger, 1999). Arpigny ir Jaeger (1999) pasiūlytoje klasifikacijoje tikrosios lipazės buvo patalpintos į vieną šeimą (I-ąją arba tikrųjų lipazių šeimą), kuri buvo suskirstyta į pošeimius (Arpigny ir Jaeger, 1999, Jaeger ir Eggert, 2002). Iš pradžių, remiantis tikrąsias lipazes sintetinančių bakterijų taksonomine padėtimi, specifiniais šių fermentų a.r. sekų motyvais ir šaperonų poreikiu, buvo apibūdinti tik šeši pošeimiai (Arpigny ir Jaeger, 1999). 2002 m. Jaeger ir Eggert iš naujo apibrėžė tikrųjų bakterinių lipazių pošeimius, skeldami I.5 pošeimį į du naujus: I.5 ir I.6, o I.6 talpintus fermentus perkėlė į naują I.7 pošeimį (Jaeger ir Eggert, 2002).

Šiai dienai, po pirmosios klasifikacijos paskelbimo buvo pasiūlyta beveik dvigubai daugiau naujų bakterinių lipolizinių fermentų šeimų (Handrick ir kt., 2001, Ewis ir kt., 2004, Lee ir kt., 2006, Levisson ir kt., 2007, Bender ir kt., 2009, Kim ir kt., 2009, Hu ir kt., 2010, Lee ir kt., 2010, Rao ir kt., 2011, Bassegoda ir kt., 2012, Charbonneau ir Beauregard, 2013, Zafareta ir kt., 2016, Castilla ir kt., 2017, Parapouli ir kt., 2018). Kovacic ir kt. (2019), tęsdami Arpigny ir Jaeger (1999) darbą, visai neseniai paskelbė bakterinių lipolizinių fermentų klasifikacijos atnaujinimą, kuris buvo papildytas, įtraukus eilę naujų, neseniai atrastų lipolizinių fermentų ir išsiplėtė iki 19 šeimų (I-XIX) ir 8 pošeimių (I.1 – I.8) (Kovacic ir kt., 2019). Vis dėlto daugelis lipolizinių fermentų liko neklasifikuoti (Hitch ir Clavel, 2019). Tai pat, anot Hitch ir Clavel (2019), klasifikacija tapo nenuosekli: mokslinėje literatūroje yra daug publikacijų, skelbiančių apie naujo bakterinio lipolizinio fermento identifikavimą, tačiau tyrimams patvirtinti dažnai trūksta išsamaus palyginimo, leisiančio naujai atrastą fermentą prijungti prie egzistuojančios klasifikacijos, suteikiant jam tinkamą šeimos numerį (Hitch ir Clavel, 2019). Klaidingų „naujų“ lipolizinių fermentų pavyzdžiai – X ir XV šeimos, kurios buvo nepriklausomai pasiūlytos po 2 kartus. Norint užkirsti kelią dirbtiniam ir nenuosekliam bakterinių lipolizinių fermentų sistematizavimui, Hitch ir Clavel (2019) pasiūlė naujausią, gerokai Kovacic ir kt. (2019) papildančią klasifikaciją (Kovacic ir kt., 2019, Hitch ir Clavel, 2019). Mokslininkai atliko išsamią literatūros analizę ir kiekvienos, skelbiamos šeimos tipinių baltymų palyginamąją analizę, nustatė sekų taksonominę priklausomybę ir šiuo metu pratęsiant ir papildant Kovacic ir kt. (2019) klasifikaciją, siūlo išskirti 35 (I-XXXV) šeimas ir 11 pošeimių (I.1-I.11). Bakterinių lipolizinių fermentų klasifikacijos apibendrinimas pateiktas 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Bakterinių lipolizinių fermentų šeimos. Lentelėje pateikti: publikacija, kurioje šeima pirmą kartą integruota į klasifikaciją, kiekvienos šeimos tipinis baltymas, jo prieigos numeris NCBI duomenų bazėje, siūloma funkcija, būdingas konservatyvusis pentapeptidas (GX SXG) arba kitas nukleofilinio Ser išsidėstymo motyvas ir trumpas šeimos apibūdinimas.

Šeima	Pošeimis	Publikacija	Tipinio baltymo prieigos nr.	Funkcija	GX SXG	Trumpas šeimos apibūdinimas
I	1	Arpigny ir Jaeger (1999)	D50587	Tikroji lipazė	GHSXG	I.1 ir I.2: T2SS sekretuojamos lipazės; natyviai struktūrai įgyti reikalingi specifiniai Lif šaperonai
	2	Arpigny ir Jaeger (1999)	X70354	Tikroji lipazė		
	3	Arpigny ir Jaeger (1999)	D11455	Tikroji lipazė	GHSLG	T1SS sekretuojamos, 50-65 kDa lipazės
	4	Arpigny ir Jaeger (1999)	M74010	Tikroji lipazė	AHSMG	Mažo Mm, dažnai <i>Bacillus</i> lipazės, neturinčios dangtelio
	5	Arpigny ir Jaeger (1999)	U78785	Tikroji lipazė	AHSQG	<i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Clostridium</i> lipazės
	6	Eggert ir Arpigny (2002)	M12715	Tikroji lipazė Fosfolipazė	GHSMG	Pre-pro-peptidinės struktūros <i>Staphylococcus</i> lipazės
	7	Eggert ir Arpigny (2002)	X99255	Tikroji lipazė	GHSQG	Centrinis regionas panašus į I.2 lipazių; dažnai virulentiškumo veiksniai
	8	Hitch ir Clavel (2019)	Q31F07	Tikroji lipazė	G(F/L/Y) STG	Jūrų psichrofilų fermentai, nedidelė homologija su kitomis šeimomis
	9	Hitch ir Clavel (2019)	DQ458963	Tikroji lipazė	GHSLG	Priskiriamas vienas fermentas– iš Korėjos potvynių zonos nuosėdų metagenomo išskirta LipG lipazė
	10	Hitch ir Clavel (2019)	FJ529693	Tikroji lipazė	GLSMG	Priklauso viena iš „Chinese Holstein“ galvijų prieskrandžio metagenomo išskirta RlipE1 lipazė
	11	Hitch ir Clavel (2019)	EU285670	Tikroji lipazė Fosfolipazė	GHSLG	Šeimą sudaro fermentas išskirtas iš Korėjos potvynių zonos nuosėdų metagenomo
II	Arpigny ir Jaeger (1999)	P10480	Sekretuojama aciltransferazė	GDSL	Šeimai būdinga išskirtinė $\alpha/\beta/\alpha$ -hidrolazės klostė	
III	Arpigny ir	M86351	Užląstelinė lipazė	GHSMG	<i>Streptomyces</i> ir	

	Jaeger (1999)				<i>Moraxella</i> rūšių lipazės
IV	Arpigny ir Jaeger (1999)	X62835	Esterazė	GDSAG	Fermentai pasižymintys sekų homologiškumu žinduolių HJL*
V	Arpigny ir Jaeger (1999)	M58445	PHA - depolimerazė/ esterazė	GVSWG	Būdingas ~20 % homologiškumas epoksido hidrolazėms, dehalogenazėms ir haloperoksidazėms
VI	Arpigny ir Jaeger (1999)	D90904	Esterazė	GFSQG	~40 % sekų homologiškumas žinduolių lizofosfolipazėms
VII	Arpigny ir Jaeger (1999)	Q01470	Karbamato hidrolazė	GQSGG	Fermentai panašūs į acetilcholino esterazes ir žanyno/kepenų karboksilesterazes
VIII	Arpigny ir Jaeger (1999)	AAA99492	Stereosavita esterazė	sekoje sutinkami GXSVG ir SVTK	Struktūriškai nuo α/β - hidrolazių nutolę fermentai; turi didelių sekos panašumų su β - laktamazėmis ir DD- peptidazėmis
IX	Kovacic ir kt. (2019)	AY026355	PHA- depolimerazė	AHSMG	Didelis aktyvumas vandenyje netirpių PHA atžvilgiu, nėra lipazinio aktyvumo, nedidelis esterazinis; homologai nustatyti I.4 pošeimyje
X	Hitch ir Clavel (2019)	NP_228147	Karboksilesterazė	GHSLG	<i>Thermotoga</i> genčiai specifinės karboksilesterazės
XI	Hitch ir Clavel (2019)	ABY60416	Esterazė	GHSMG	Fermentai būdingi 41 nekultivuojamų bakterijų genčiai, apibūdintas tik vienas – EstA (33 kDa)
XII	Kovacic ir kt. (2019)	EU515239	Lipazė	GXSLG	Įvairių jūros ekonių metagenomo fermentai
XIII	Hitch ir Clavel (2019)	AY186197	Karboksilesterazė	GLSLG	<i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> ir susijusių bakterijų esterazės
XIV	Kovacic ir kt. (2019)	NP_623858	Karboksilesterazė	CHSMG	Funkciškai apibūdintas tik vienas atstovas; būdingas sekos homologiškumas žinduolių cholesterolio aciltransferazėms
XV	Kovacic ir kt. (2019)	AEN92268	Karboksilesterazė	GLSMG	Šeimos fermentams būdingas neįprastas, iš α -spirales ir 2 antilygiagrečių β - juostų sudarytas dangtelis

XXVI	Kovacic ir kt. (2019)	AGF29555	Lipazė	GISYG	Šeimą sudaro vienas šalčiui atspaus, apibūdintas fermentas
XXVII	Kovacic ir kt. (2019)	KX096709	Lipazė	GYSQG	Būdingas sekos homologiškumas X šeimai ir bakterijoms netipinė Y-formos oksianijoninė anga
XXVIII	Hitch ir Clavel (2019)	EF408871	Fosfotidilcholinui savita fosfolipazė	THSTG	Šimos fermentai monofiletiniai <i>Legionellaceae</i> šeimai
XIX	Kovacic ir kt. (2019)	KX353755	Lipazė	GHSQG	Vienintelis atstovas – iš nuotekų išskirto <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> fermentas
XX	Hitch ir Clavel (2019)	ACL67852	Esterazė	GHSMG	Bakterijų genomuose homologų neturintis fermentas, išskirtas iš šiaurės Kinijos jūros metagenomo
XXI	Hitch ir Clavel (2019)	ABS61180	Lipazė	AXSXG	Tik <i>Fervidobacteria</i> būdingi lipoliziniai fermentai
XXII	Hitch ir Clavel (2019)	GQ866023	Sekretuojama esterazė	GHSQG	Homologų tarp kultivuojamų bakterijų neturintys fermentai, nustatyti įvairių augalų rizosferų mikrobiomų metagenome
XXIII	Hitch ir Clavel (2019)	ACJ13070	Lipazė	AHSMG	Homologų tarp kultivuojamų bakterijų neturintys fermentai atrasti Brazilijos mangrovių nuosėdų metagenome
XXIV	Hitch ir Clavel (2019)	NP_214559	Esterazė	GMSLG	<i>Mycobacterium</i> būdingi fermentai, funkciškai charakterizuotas tik vienas
XXV	Hitch ir Clavel (2019)	GQ340926	Lipazė	GFSNG	Bakterijų genomuose homologų neturintis, jūros nuosėdų metagenome nustatytas fermentas su transmembraniniu regionu
XXVI	Hitch ir Clavel (2019)	HQ156900	Sekretuojama esterazė	GHSFG	Bakterijų genomuose homologų neturintis fermentas, atrastas Vokietijos dirvožemio metagenome
XXVII	Hitch ir Clavel (2019)	HQ156914	Esterazė	GHSLG	Vokietijos dirvožemio metagenome nustatytas fermentas; homologiškos sekos nustatytos dirvožemio <i>Mycobacterium</i> sekoms

XXVIII	Hitch ir Clavel (2019)	YP_345621	Lipazė	GYSGG	<i>Rhodococcus</i> genčiai specifinės lipazės
XXIX	Hitch ir Clavel (2019)	HQ262952	Lipazė	GPSGG	Šeimą sudaro tarp sekvenuotų bakterijų genomų homologų neturintis fermentas nustatytas Andų miškų dirvožemio metagenome
XXX	Hitch ir Clavel (2019)	JN001203	Esterazė	AHSLG	Kinijos dirvožemio mėginių metagenome atrastas fermentas neturintis homologų tarp bakterijų sekvenuotų genomų
XXXI	Hitch ir Clavel (2019)	KF313138	Esterazė	GHSAG	<i>Psychrobacter</i> genčiai specifiniai fermentai
XXXII	Hitch ir Clavel (2019)	AFR79233	Lipazė	GHSAG	Pietų Kinijos jūros metagenome atrastas fermentas, turintis homologiškų sekų <i>Glaciecola</i> sekvenuotuose genuose
XXXIII	Hitch ir Clavel (2019)	KX301277	Esterazė	GHSAG	Homologų tarp sekvenuotų bakterijų genomų neturintis EstDZ2 fermentas iš Solnechny karščio versmės (Rusija) metagenomo
XXXIV	Hitch ir Clavel (2019)	GAC12013	Homoserino transacetilazė	GDSMG	<i>Alteromonadaceae</i> ir <i>Pseudoalteromonadaceae</i> specifiniai fermentai
XXXV	Hitch ir Clavel (2019)	ACM59679	Acetilksilano esterazė	GDSIT	<i>Bacillaceae</i> , <i>Chthonomonadaceae</i> ir <i>Paenibacillaceae</i> specifiniai fermentai

*HJL – hormonams jautrios lipazės.

Klasifikacijoje akcentuojami fermentų a.r. sekų skirtumai, ypatingą dėmesį kreipiant į fermentų konservatyvius a.r. motyvus, tokius kaip GX SXG pentapeptidas, oksianijoninę angą sudarančios a.r. liekanos ir kt., taip pat kiekvienos šeimos aprašyme pateikiamos nustatytos biocheminės šeimos atstovų veikimo ypatybės.

Žinomi ir kiti bandymai klasifikuoti bakterinius lipolizinius fermentus (Messaoudi ir kt., 2010), kuriant duomenų bazines tokias kaip MELDB (Kang ir kt., 2006) ir LIPABASE (Messaoudi ir kt., 2011), tačiau šios klasifikacijos „neprigijo“ ir šiuo metu yra uždarytos ir nebeprieinamos. Taip pat panašias fermentų grupes klasifikuoja LED (angl., *Lipase Engineering Database*)

(Pleiss ir kt., 2000) ir ESTHER (Lenfant ir kt., 2013) duomenų bazės, bet jos nėra specifinės tik bakteriniams lipoliziniams fermentams.

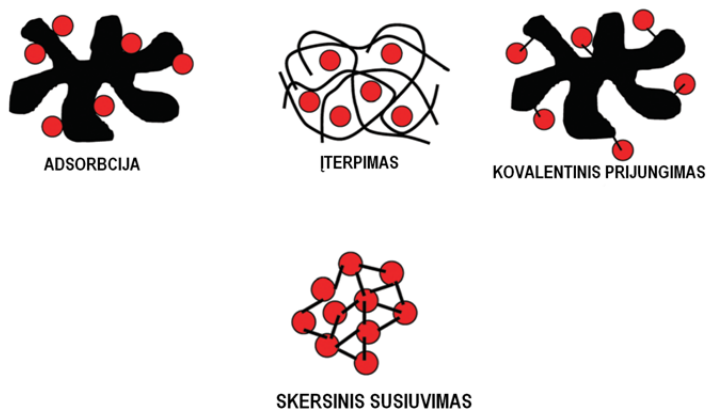
Šiuo metu auksiniu bakterinių lipolizinių fermentų klasifikavimo standartu laikoma pirmą kartą Arpigny ir Jaeger (1999) pasiūlyta ir šiuo metu iki 35 šeimų Hitch ir Clavel (2019) praplėsta klasifikacija. Dėl savo paprastumo, ši klasifikacija yra iki šiol plačiausiai mokslinės bendruomenės naudojama bakterinių lipolizinių fermentų klasifikacija (Arpigny ir Jaeger, 1999, Hitch ir Clavel, 2019).

1.11 Lipolizinių fermentų imobilizavimas

Šiuo metu daugelio biotechnologiniu požiūriu vertingų fermentų imobilizavimas yra neatsiejamas nuo jų panaudojimo pramoniniu mastu. Lipolizinių fermentų preparatai yra dažniausiai prieinami vandeninių tirpalų formoje ir nėra tinkami tiesiogiai naudoti šiuo metu pramonėje svarbioje organinėje sintezėje. Esterių sintezė, naudojant laisvus lipolizinius fermentus, yra neefektyvi dėl vykstančio fermentų slopinimo organiniais tirpikliais arba trumpagrandėmis rūgštimis, naudojamomis proceso metu (Horchani ir kt., 2012). Imobilizavimas – tai vienas efektyviausių sprendimų, naudojamų esant įvairiems fermentų taikymo apribojimams, susijusiems su jų biologiniais ypatumais (tirpumas vandenyje, slopinimas substratais, produktais arba kitais junginiais, nepakankamas stabilumas pramoninėmis sąlygomis, mažesnis aktyvumas nefiziologinių substratų atžvilgiu ir kt.). Imobilizavimas palengvina fermentų pašalinimą iš reakcijos mišinių, įgalina fermento pakartotiną panaudojimą, kas labai padidina proceso ekonomiškumą, leidžia išsaugoti dažnai brangius fermentinius preparatus, palengvina procesų, vykstančių bioreaktoriuose, kontrolę. Jeigu fermentas yra imobilizuojamas tinkamai ir teisingai, tai gali būti vertinama savitu tam tikrų fermento savybių pagerinimo metodu (Guzik ir kt., 2014, Barbosa ir kt., 2015, Cipolatti ir kt., 2016, Lian ir kt., 2017). Tinkamas imobilizavimas gali pagerinti fermentų aktyvumą, stabilumą, savitumą, atsparumą slopikliams ir netgi jų grynumą. Imobilizuoti fermentai, lyginant su jų laisvomis formomis, dažnai yra apsaugoti nuo agregavimo ir proteolizės. Pastarosios fermento savybės taip pat gali būti pagerintos moduluojant imobilizuoto fermento mikroaplinką (Barbosa ir kt., 2015, Manoel ir kt., 2015, dos Santos ir kt., 2015, Barbosa ir kt., 2016, Rueda ir kt., 2016).

Tipiniai lipolizinių fermentų imobilizavimo metodai (1.9 pav.) apima įterpimo (angl., *entrapment/encapsulation*), imobilizavimo ant kietų nešiklių (fizinis, elektrostatinis, kovalentinis, giminingumo ligandams

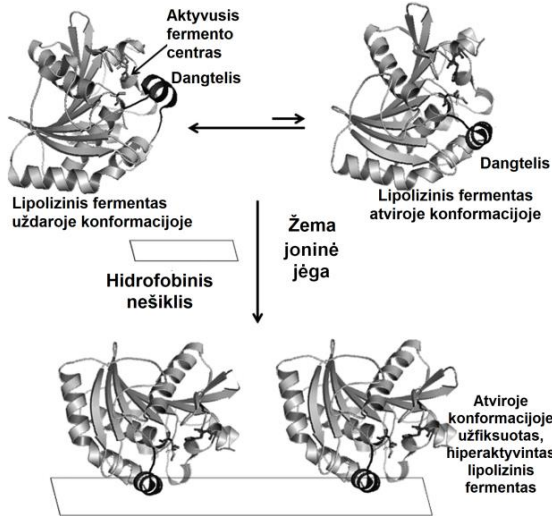
imobilizavimas) ir skersinį susiuvimą (angl., *cross-linking*), gaunant susiūtus fermentų kristalus (angl., *cross-linked enzyme crystals*, CLEC) arba agregatus (angl., *cross-linked enzymes aggregates*, CLEA) (Adlercreutz, 2013, Hwang ir kt., 2013).



1.9 pav. Dažniausiai naudojami lipolizinių fermentų imobilizavimo būdai. Juodai žymima imobilizavimo medžiaga, raudoni apskritimai žymi fermentus (pritaikyta iš: Adlercreutz, 2013).

Vienas paprasčiausių lipolizinių fermentų imobilizavimo būdų yra jų fizikinė adsorbcija. Šiuo atveju vandeninis fermentinis tirpalas yra tiesiog sumaišomas su nešikliu (neorganiniu/organiniu, natūraliu/sintetiniu, mono- ar polimeriniu ir kt.) ir, susidarius pakankamo stiprumo ryšiams, fermentas adsorbuojasi ant nešiklio. Lipolizinių fermentų atveju, dažniausiai tarp fermento ir nešiklio atsirandančios sąveikos yra hidrofobinės, tačiau joninė sąveika su jonų mainų nešikliais taip pat gali būti sėkminga ir efektyvi (Zheng ir kt., 2012). Apskritai, įvairūs lipoliziniai fermentai sudaro ypatingą fermentų grupę, kuriai adsorbcinis imobilizavimas gali būti taikomas kaip savitas fermento hiperaktyvinimo būdas. Dangtelius turintys lipoliziniai fermentai gali natūraliai įgyti dvi skirtingas konformacijas: atvirą ir uždara. Atvira konformacija, kaip jau buvo minėta, įgyjama fermentui aktyvuojantis hidrofobinės (substrato) ir hidrofiliinės (vandens) fazės sąlyčio paviršiuje, pasislenka hidrofobinis dangtelio domenai ir aktyvusis fermento centras tampa atviras. Ši unikali lipolizinių fermentų veikimo ypatybė naudojama šių fermentų „užfiksavimui“ aktyvioje formoje, panaudojant imobilizavimo ant hidrofobinių nešiklių, kurie imituoja hidrofobinius lipazių ir esterazių

substratus, metodą (1.10 pav.) (Brady ir Jordaan, 2009, Cantone ir kt., 2013, Secundo, 2013, Manoel ir kt., 2015, Rueda ir kt., 2016).



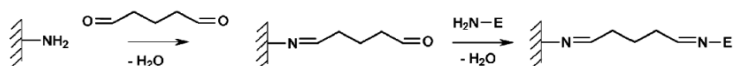
1.10 pav. Lipolizinių fermentų imobilizavimo, užsifiksuojant aktyvioje konformacijoje ant nešiklio hidrofobinio paviršiaus, schema (pritaikyta iš: Barbosa ir kt., 2015).

Nepaisant to, metodas gali turėti tam tikrų trūkumų, vienas kurių yra baltymų desorbcija. Virgen-Ortiz ir kolegų (2017) nustatė, kad lipolizinių fermentų desorbciją nuo hidrofobinių nešiklių gali būti dažnai nulemta reakcijos mišinio savybių (pvz., aukštos organinių tirpiklių koncentracijos) ir daugelio substratų bei susidarančių produktų, kurie reakcijos mišinyje gali veikti kaip detergentai (Virgen-Ortiz ir kt., 2017). Kadangi lipoliziniai fermentai vandeniniuose tirpaluose dėl savo prigimties linkę spontaniškai, ir daugiau negu kiti baltymai, jungtis prie hidrofobinių paviršių, hidrofobinės adsorbcijos metodas taip pat gali būti naudojamas vieną žingsnį apimančiam lipolizinių fermentų grynimui ir imobilizavimui. Fizikinei lipolizinių fermentų adsorbcijai gali būti naudojamos įvairios neorganinės prigimties medžiagos. Toks imobilizavimo būdas gali būti labai naudingas ir netgi vadinamas ekologišku dėl fermentų prijungimui panaudojamų gamtinių ir pramoninių atliekų (Gricajeva ir kt., 2018).

Tačiau, dažnai dėl susidarančių silpnų fermento sąveikų su hidrofobiniu nešikliu, norint pagerinti adsorbciją, taikomi įvairūs preparatų dehidratavimo metodai. Be to, kad šie metodai leidžia stipresnę lipolizinių fermentų prisitvirtinimą, jie nulemia jų panaudojimą išskirtinai tik organinės sintezės sektoriuje. Lipolizinių fermentų adsorbcija ant porėtų neorganinių nešiklių (diatomito, hidroksiapatito, aliuminio (III) oksido ir kt.) gali būti vykdoma naudojant organinius tirpiklius, tokius kaip acetonas, metanolis ir etanolis. Taip pat, nešiklio ir tam tikro lipolizinio fermento mišinys gali būti paliekamas džiūti iki tol, kol fermentas dehidratuoja ir nusėda ant nešiklio.

Tokiu būdu gauti fermentiniai preparatai, norint išvengti desorbcijos, turi būti naudojami tik organinėje terpėje (Adlercreutz, 2013, Sharma ir Kanwar, 2014). Minėtų organinių bevandenių reakcijų mišiniai gaunami naudojant *n*-heksaną, *tert*-butanolį, izooktaną, heptaną ir kt. organinius junginius. Šios medžiagos paslenka lipolizinių fermentų katalizuojamas reakcijas į sintezės pusę, gaunant maksimalią esterinimo ir peresterinimo reakcijų išeią (Marty ir kt., 1992, Rahaman, 2006). Organinių tirpiklių panaudojimas lipolizinių fermentų katalizuojamų reakcijų metu yra taip pat ypatingai patrauklus pramoniniu požiūriu dėl to, kad dauguma lipolizinių fermentų substratų yra tirpūs juose, o tai neleidžia susidaryti pašaliniais produktams ir įvykti mikrobiniam užsikrėtimui (Sharma ir Kanwar, 2014).

Kitas dažnas fermentų imobilizavimo ant kietų nešiklių būdas yra kovalentinis prijungimas. Dauguma aprašytų ir taikomų įvairiems fermentams kovalentinio imobilizavimo metodų, su tam tikromis išlygomis, tinka ir lipolizinių fermentų imobilizavimui šiuo būdu. Kovalentinis imobilizavimas dažniausiai sukelia riboto laipsnio fermento inaktyvaciją, kuri gali būti ir gana stipri, jeigu kovalentiškai modifikuojamos svarbios fermento katalizei a.r. funkcinės grupės. Kovalentinis imobilizavimas kartais atliekamas į reakcijos mišinį pridant substratų, jų analogų arba slopiklių, kurie grįžtamai sąveikauja su fermento aktyviuoju centru ir taip užkerta kelią šiame regione galinčiai įvykti kovalentinei modifikacijai. Kovalentinio lipolizinių ir kt. fermentų imobilizavimo ant kietų nešiklių naudojant gliutaraldehydą schema pavaizduota 1.11 pav.



1.11 pav. Kovalentinis imobilizavimas naudojant gliutaraldehydą (pritaikyta iš: Adlercreutz, 2013).

Pastaruoju metu vis daugiau dėmesio sulaukia kovalentinis imobilizavimas ant įvairių nanomedžiagų tokių kaip magnetinės nanodalelės (MND) dėl jų didelio paviršiaus ploto ir tūrio santykio bei lengvo jų atskyrimo nuo reakcijos mišinio paveikus išoriniu magnetiniu lauku. MND laikomos biosuderinamomis, netoksiškomis medžiagomis. Šios medžiagos įgalina fermento orientacijos ant nešiklio reguliavimą ir nepasižymi išorinės difuzijos efektais, o tai MND padaro patrauklias didelio masto pramoniniam naudojimui. Fermentai neefektyviai jungiasi prie natūralių MND, dėl to dažniausiai reikalingos jų paviršiaus modifikacijos (padengimas polimerinėmis medžiagomis ir skersinis susiuvimas). Skersiniam MND ir

lipolizinių fermentų susiuvimui naudojamas gliutaraldehidas (Adlercreutz, 2013). Aldehido grupės nešiklyje reaguoja su imobilizuojamo fermento aminogrupėmis. Šis reagentas gali būti naudojamas norint gauti itin tankų daugiataškį kovalentinį prijungimą (Barbosa ir kt., 2014, Vaghari ir kt., 2016, Bezerra ir kt., 2017). Tačiau, toks imobilizavimas gali sukelti fermentinio aktyvumo mažėjimą, nepalankius konformacinius pokyčius, denatūraciją, pageidaujamų savybių pokyčius, masės perdavimo apribojimus ir kt. (Cipolatti ir kt., 2016, Vaghari ir kt., 2016).

Lipolizinių fermentų įterpimas silicio dioksido pagrindu gaminamuose nešikliuose vykdomas naudojant zolis-gelis (angl., *sol-gel*) sintezės metodą. Imobilizuojamo fermento vandeninis tirpalas sumaišomas su hidrolizuojamais organinio silano dariniais, tokiais kaip tetrametoksisilanas ir alkil trimetoksisilanas. Koloidinio silicio dioksido dalelių zolio sintezei dažnai naudojamas silanus hidrolizuojantis natrio fluorido katalizatorius. Taip gaunamos koloidinio silicio dioksido dalelės sujungiamos kondensacijos reakcijose suformuojant gelį (Adlercreutz, 2013). Zolis-gelis būdu įterpiamos lipazės pasižymi didesniu stabilumu nei ant tokios pat medžiagos adsorbcijos būdu imobilizuotos lipazės, dėl vykstančio lipazių desorbcijos nuo adsorbuoto preparato.

Skersinis sujungimas, gaunant fermentų kristalus (CLEC) arba agregatus (CLEA) vykdomas naudojant bifunkcinį reagentą, dažnai gliutaraldehidą. Šis metodas įgalina imobilizavimą be nešiklio (dos Santos ir kt., 2017). Ryškiais pranašumais pasižymi skersiniais ryšiais sujungti fermentų agregatai (CLEA): juos lengva paruošti naudojant grubius fermentinius mišinius, po ko yra gaunamas koncentruotas fermentinis darinys, pasižymintis dideliu aktyvumu ir stabilumu. Be to, CLEA paruošimas nereikalauja didelę gamybinių sąnaudų. Nepaisant to, toks cheminis junginys gali turėti tam tikrų trūkumų: žemą aktyvumo išlaikymą, atkuriamumą ir mechaninį stabilumą (CLEA dažniausiai nėra mechaniškai atsparūs) (Sheldon ir Pelt, 2013). Taip pat pažymėtina, kad naudojant skirtingų imobilizavimo būdų derinius gali būti gaunami įvairiapusiškai geresni ir naudingesni imobilizuotų fermentų preparatai (Adlercreutz, 2013).

1.12 Lipolizinių fermentų pritaikymas

Pasaulinė fermentų rinka 2017 m. buvo įvertinta >7 mlrd. dolerių ir yra prognozuojama, kad ši suma pasieks >10 mlrd. 2024 m. Lipoliziniai fermentai yra trečia didžiausia pagal pardavimus pasaulyje fermentų grupė ir jų pagaminamų produktų teikiama komercinė nauda savo ruožtu taip pat

įkainojama milijardais dolerių (Ray, 2012). Dėl savo lengvo, pigaus išgavimo ir kitų privalumų, mikrobiniai (bakterijų ir mikromicetų) lipoliziniai fermentai sudaro ~90 % pasaulinės šių fermentų rinkos (Lee ir kt., 2015, Casas-Godoy ir kt., 2018, Javed ir kt., 2018, Raveendran ir kt., 2018). Šiuo metu jau neabejojama, kad šie fermentai pagerina daugelį pramonės procesų ekonomine prasme bei prisideda prie švaresnės pramoninės gamybos. Lyginant su tradiciniais metodais, fermentinių procesų metu yra pasiekama ta pati pageidaujamo produkto išeiga, nesukeliant didesnės taršos, nekenkiant aplinkai, nes fermentai yra bioskaidūs ir netoksiški (Abdelmoez ir Mustafa, 2014). Fermentinių procesų metu pagaminami tokios pat arba net geresnės kokybės produktai, sunaudojant mažiau žaliavos, cheminių junginių, vandens, energijos ir susidaro mažiau probleminių atliekų. Lipolizinių fermentų panaudojimo sritys apibendrintos 1.12 pav.



1.12 pav. Mikrobinų lipolizinių fermentų pritaikymo sektorių pavyzdžiai (pritaikyta iš: Hasan ir kt., 2006).

Maisto pramonė. Šiuo metu lipoliziniai fermentai sudaro neatsiejamą moderniosios maisto pramonės dalį ir yra labai vertinami dėl jų gebos katalizuoti riebalų interesterinimo bei hidrolizės reakcijas, pagerinančias tam tikrų maisto produktų skonines savybes (Sharma ir kt., 2011). Jie yra naudojami įvairiose maisto pramonės srityse: sūrio ir kitų pieno produktų (sviesto, margarino, grietinėlės), vaisių sulčių, daržovių fermentacijoje,

kepinių ir saldumynų gamyboje (Andualema ir kt., 2012, Adrio ir Demain, 2014, Sood ir kt., 2016). Esteriai, gaunami trumpagrاندžių RR ir alkoholių peresterinimo metu, naudojami kaip ypatingą skonį maistui suteikiantys aromatiniai junginiai. Jų pavyzdžiai yra etilacetatas (kriaušių aromatas), etilbutiratas, etilmetilbutiratas (įvairių vaisių aromatas), metilbutiratas (ananasų aromatas), oktilbutiratas (apelsinų aromatas) ir kt. (Aravindan ir kt., 2007; Sangeetha ir kt., 2011, Sharma ir kt., 2011, Horchani ir kt., 2012). Aliejų ir kitų riebalinių medžiagų modifikacija yra viena iš maisto perdirbimo pramonės sričių, kuri reikalauja naujoviškų ir „žalių“ technologijų. Lipazės geba pakeisti lipidų savybes, keisdamos TAG esančių RR grandinių vietą arba pakeisdamos vieną ar daugiau jų naujomis (Houde ir kt., 2004, Verma ir kt., 2012). Tokiu būdu, sąlyginai nebrangiai, mažiau pageidaujamas lipidas gali būti verčiamas aukštesnės vertės riebaline medžiaga (Andualema ir Gessesse, 2012, Verma ir kt., 2012). Taip gaunami kakavos sviesto, žmogaus pieno riebalų pakaitalai („Betapol“ – žmogaus pieno riebalų pakaitalas, skirtas kūdikiams maitinti), farmacijai svarbios polinesočiosios RR ir kt. (Hasan ir kt., 2006).

Naujų organoleptinių pieno produktų savybių gavimui ne mažiau svarbi yra lipolizinių fermentų riebalų hidrolizės reakcijų katalizė. Lipazės plačiai naudojamos pieno riebalų, sviesto lipolizei, brandinant sūrius (Konkit ir kt., 2016). Priklausomai nuo RR sudėties skiriasi sūrio tekstūra, o kvapą suteikia įvairūs pirminiai ir antriniai metabolitai, susidarę skaidant riebalus (Houde ir kt., 2004). Pridedant lipolizinių fermentų gali būti atpalaiduojamos trumpagrاندės RR (C_4 ir C_6), kurios suteikia aitrų, aštrų skonį, tuo tarpu vidutinio ilgio RR (C_{12} ir C_{14}) atpalaidavimas suteikia produktui muilo prieskonį. Priklausomai nuo dalinės pieno riebalų lipolizės laipsnio, sūriui bei kitiems pieno produktams gali būti suteikiamos skirtingos pageidaujamos organoleptinės savybės (Peng ir kt., 2014). Be to, pasitelkiant lipolizinius fermentus taip pat yra palengvinamas nepageidaujamų riebalų pašalinimas nuo mėsos ir žuvies produktų (biolipolizė) (Sharma ir Kanwar, 2014).

Polinesočiosios RR (PNRR) priskiriamos nepakeičiamoms RR, kurių gavimas svarbus membraninių lipidų ir prostaglandinų sintezei. Mikrobiniai lipoliziniai fermentai naudojami įvairių augalinių ir gyvūninių riebalų papildymui PNRR (Jaeger ir Reetz, 1998). Be to, naudojant lipolizinius fermentus gali būti gaunamos paviršiaus aktyviosios medžiagos (emulsikliai) tokios kaip MAG monooleinas, DAG'iai. Jie gali būti naudojami kaip priedai duonos masės, tešlos stabilizavimui (Sangeetha ir kt., 2011, Horchani ir kt., 2012, Sarmah ir kt., 2018). Naudojant lipazes taip pat yra gaminami

valgomų bioplėvelių pirmtakai, kurie yra svarbūs maisto laikymo ir apdorojimo procesuose (Garlapati ir Banerjee, 2013).

Kosmetikos pramonė. Lipoliziniai fermentai kosmetikos pramonėje turi gana svarbų vaidmenį specialių aromatinių trumpagrandžių esterių ir kitų aktyvių junginių sintezėje bei antraeilį vaidmenį gaminant taip vadinamą „funkcinę kosmetiką“. Šiose srityse dažniausiai naudojamos imobilizuotos lipazės ir esterazės (Ansorge-Schumacher ir Thum, 2013).

Alifatinių ir aromatinių RR ir alkoholių esteriai kartu su terpenų alkoholiais, aldehidais, fenoliais ir kt. randami kvapiose medžiagose, naudojamose kvėpalų ir kitų asmens higienos produktų gamyboje. Vandenyje tirpūs retinolio dariniai, kurie yra svarbūs kaip odos priežiūros priemonės, paruošiami imobilizuotų lipolizinių fermentų katalizuojamų reakcijų metu. Cinamono, elago ir ferulo rūgščių esteriai - biotechnologijai aktualūs organiniai junginiai, gali būti konvertuojami į aromatinius junginius, naudojamus kaip priedai kosmetikoje ir kremuose, apsaugančiuose nuo žalingų saulės spindulių (Sharma ir Kanwar, 2014). Yra žinomi keli pavyzdžiai, kai katalizuojant lipazėms, buvo susintetinti įvairių kvapių junginių mišiniai. Vienas žinomiausių yra (-)-mentolis. Vienas naujausių būdų gauti grynus (-)-mentolio esterius yra (\pm)-mentolio enantioatrankus peresterinimas, panaudojant bakterines lipazes. Naudojant stafilokokines lipazes buvo susintetintos skirtingos antioksidantų molekulės, kurios gali būti naudojamos kaip laisvųjų radikalų gaudyklės stabdančios senėjimą ir kaip fotoapsauginiai junginiai (Horchani ir kt., 2012).

Biodyzelinas. Biokuras – tai mažai išmetamųjų teršalų turintis dyzelinio kuro pakaitalas, gaunamas iš atsinaujinančių gamtos išteklių ir riebalinių medžiagų atliekų (Leung ir kt., 2010). Palyginus su naftos pagrindu pagamintu kuru, biokuras neturi pastebimų žalingų poveikių mašinos variklio ilgaamžiškumui ir pasižymi įvairiais privalumais – jis yra bioskaidus, atsinaujinantis ir netoksiškas. Dėl to biokuras sulaukia vis daugiau susidomėjimo visame pasaulyje (Li ir kt., 2010). Lipazės katalizuoja TAG peresterinimo trumpos grandinės alkoholiais reakcijas, susidarant alkilo esteriams - biokurui (Gupta ir kt., 2011). Biokuras sintetinamas chemokataliziniais, termokataliziniais ir biokataliziniais būdais. Pastaruoju atveju, kaip biokatalizatoriai tarnauja lipoliziniai fermentai (Sangeetha ir kt., 2011).

Viena pagrindinių kliūčių, su kuriomis yra susiduriama norint panaudoti lipolizinius fermentus biokuro gamybai yra biokatalizatoriaus

kaina. Viena iš ypatingai naudingų priemonių sąnaudų sumažinimui – imobilizuotų lipolizinių fermentų panaudojimas. Imobilizuota *S. aureus* SAL3 lipazė buvo panaudota 1-butanolio ir oleino rūgšties esterinimo reakcijų katalizei (Horchani ir kt., 2009). Reakcijos produktas – 1-butiloleatas – naudingas dyzelinio kuro priedas: polivinilchlorido plastifikatorius, vandeniui atsparus agentas (Horchani ir kt., 2012).

Medicina ir farmacijos pramonė. Paprastai į rinką patenkantys vaistai yra sudaryti iš vieno arba dviejų izomerų ir būtent dėl regiosavitumo ir gebos atskirti enantiomerus, tikrosios esterazės ir lipazės yra itin plačiai naudojamos farmacijoje: chiralinių junginių gryninimui raceminiuose mišiniuose ir chiralinių vaistų (Flurbiprofen, Ibuprofen, Suprofen ir kt.) gavimui (Sharma ir kt., 2011). Pavyzdžiui, karboksilesterazė NP (Naproxen) iš *B. subtilis* Thai I-8 buvo labai efektyviai panaudota naprokseno - nesteroidinio, skausmą malšinančio vaisto enantioatrankiai (tik vienas iš dviejų naprokseno optinių izomerų pasižymi terapinėmis savybėmis) sintezei (Sood ir kt., 2016). *S. marcescens* lipazė plačiai naudojama 3-fenilglicidinės rūgšties esterio asimetrinei hidrolizei, naudojamai diltiazemo hidrochlorido (vaistų grupės, priklausančios kalcio kanalų slopikliams, veikiantiems atpalaiduojančiai širdies ir kraujagyslių raumeninį audinį ir naudojamiems hipertenzijos ir širdies ritmo sutrikimams gydyti) gavimui. *C. rugosa* lipazė naudota lovastatino, mažinančio cholesterolio lygį kraujyje, sintezėje. Lipoliziniai fermentai taip pat yra svarbūs daugelio vaistų, tokių kaip aspirinas, klopidogrelis, delaprilis, imodoprilis, temokaprilis (acetilcholino esterazių slopikliai) ir irinotikanas (priešvėžinis vaistas) cheminėje modifikacijoje (Andualema ir kt., 2012, Xu ir kt., 2016).

Gauti lipolizinių fermentų katalizuojamų enantioatrankių reakcijų metu MAG ir DAG naudojami įvairių vaistinių preparatų (priešuždegiminių, priešcholesterolinių ir trombocitolizinių) gamybai (Ray, 2012). Taip pat lipazės yra svarbios modifikuojuot MAG, reikalingus farmacijoje naudojamų emulsiklių gamybai.

Detergentai. Vienas labiausiai pritraukiančių dėmesį ir daug žadančių lipolizinių fermentų, kaip riebalus hidrolizuojančių fermentų pritaikymų, yra jų kaip detergentų priedų panaudojimas (Sangeetha ir kt., 2011). Dauguma detergentų pagal savo sudėtį yra panašūs ir jų valymo mechanizmai yra beveik vienodi. Šiuo metu, siekiant patobulinti detergentų savybes, į juos yra dedami vienas ar daugiau fermentų, tokių kaip proteazė, amilazė, celiuliazė ir lipazė. Fermentai sustiprina detergentų gebą šalinti dėmes ir padaro

detergentą saugesniu arba visiškai saugiu aplinkai (Sharma ir Kanwar, 2014).

Lipazės, naudojamos detergentų pramonėje, turi atitikti tokius kriterijus: stabilumas šarminiame pH, tirpumas vandenyje, atsparumas detergentuose esančioms proteazėms ir paviršiaus aktyvioms medžiagoms bei mažas savitumas substratams, o būtent tokios yra dauguma bakterijų išskiriamų lipazių (Sangeetha ir kt., 2011).

Lipoliziniai fermentai yra ypatingai patrauklūs naudoti skalbimui žemose temperatūrose. Lipazės, išgautos iš *Bacillus flexus* XJU– 1, *Bacillus licheniformis*, *B. licheniformis* VSG1, *Bacillus pumilus* SG2, *B. subtilis* JPBW– 9, *Geobacillus* sp., *P. aeruginosa* ir *S. marcescens* DEPTK2 jau yra naudojamos tokių detergentų sudėtyje, bet nuolatos ieškoma ir naujų, „šaltam skalbimui“ panaudotinų psichrofilinių fermentų (Niyonzima ir More, 2015, Javed ir kt., 2017).

Medienos ir popieriaus pramonė. Fermentų pritaikymas, naudojant lipazes popieriaus gamybos ir perdirbimo procesuose dideliu mastu prasidėjo nuo 1990 m. ir tai buvo pirmasis atvejis kai fermentai buvo sėkmingai panaudoti popieriaus pramonėje (Bajpai, 1999).

Šiuo metu lipazių panaudojimas celiuliozės ir popieriaus pramonėse yra itin svarbus, norint gamybos metu kontroliuoti dervos susidarymą. Derva apibūdinama kaip medienos lipofilinių ekstraktų aglomeratai, kurie sukelia medienos masės pajuodavimą ir įrangos apsvėlimą guma, sulipimą. Perdirbant popierių susidaro klijai, kurių sudėtyje esantį polivinilacetatą sėkmingai skaido pridedamos esterazės (Jegannathan ir Nielsen, 2013). Norint gauti naują laikraštinių popierių arba baltą popierių, perdirbant laikraščius, iš jų turi būti pašalintas rašalas (Bajpai, 2013). Kai rašalas yra pagamintas augalinių aliejų pagrindu, lipofilinių rašalo komponentų hidroliziniui skaidymui taip pat naudojamos lipazės (Hasan ir kt., 2006). Tai ne tik padidina popieriaus baltumą, bet ir sumažina perdirbimui naudojamų cheminių junginių, vandens kiekius, taupo energiją, taip mažina šių medžiagų poveikį aplinkai bei mažina produkcijos kainą (Skals ir kt., 2008, Ramnath ir kt., 2017). Japonijos “Nippon Paper Industries” įmonė 90 % atvejų, šalinant TAG iš medienos, naudoja būtent mikrobines lipazes (Sangeetha ir kt., 2011, Sharma ir kt., 2011, Verma ir kt., 2012).

Aplinkosauga. Lipazių panaudojimas biodegradacijos procesuose yra gana svarbus aspektas lipazių biotechnologijoje. Riebalus perdirbančių

fabrikų ir maitinimo įstaigų atliekos tiek *in situ*, tiek *ex situ* gali būti šalinamos panaudojant lipolizinius fermentus (Verma ir kt., 2012). Vienas iš metodų, taikomų užterštų gruntinių vandenų valymui, yra grynų ir mišrių bakterijų kultūrų, kurios gamina aktyvias lipazes, kultivavimas *in situ*. Nuotekos, kuriose yra maisto perdirbimo, odos rauginimo, automobilių pramonės ir kitų atliekų gali būti utilizuojamos, naudojant įvairias bakterijų lipazes. Perspektyvus yra šalčiui atsparių mikroorganizmų naudojimas lipidais užterštų aplinkų valymui vidutinio ir šalto klimato zonose (Sangeetha ir kt., 2011, Verma ir kt., 2012, Bora ir kt., 2013).

Dirbtinai sukurti pesticidai dažnai yra esteriniai junginiai. Mikroorganizmų, kurie aktyviai išskiria lipolizinius fermentus, panaudojimas priklauso mažiausiai kenksmingam, saugiam, ekologiškam ir ekonomiškam metodui. Organofosfatiniai insekticidai tokie kaip piretroidai ir malationas turi kenksmingą poveikį žmonėms ir kitiems aukštesniesiems organizmams (Wang ir kt., 2009, Goda ir kt., 2010). Gana efektyviai malationą skaido *Alicyclobacillus tengchongensis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* rūšių bakterijos, kurios naudojamos dirvožemio, užteršto malationu, bioremediacijai (Xie ir kt., 2013, Khan ir kt., 2016). Taip pat nustatyta, kad malationą gali skaidyti *Brevibacillus* sp. ir *B. cereus* (Singh ir kt., 2012). Kitas insekticidų detoksifikavimo žinduoliuose ir vabzdžiuose kelias - piretroidų skaidymas pasitelkiant izomeriniu savitumu pasižyminčius lipolizinius fermentus. Sėkmingai nustatyti ir išgryninti karboksilesterinių ryšių hidrolizę piretroiduose katalizuojančių karboksilesterazių genai būdingi *B. cereus* SM3, *A. niger* ZD11, *Nephotettix cincticeps* ir kt. (Wang ir kt., 2009, Zhai ir kt., 2012, Zhu ir kt., 2013).

Lipoliziniai fermentai tai pat gali būti naudojami plastiko depolimerizavimui ir jo perdirbimui. Mikrobiniai lipoliziniai fermentai – galingi biokatalizatoriai, galintys katalizuoti efektyvią įvairių poliesterių hidrolizę ir dalyvauti tokio plastiko, kaip polilaktinė rūgštis (PLA) depolimerizavime (Hsieh ir kt., 2015, Tchigvintsev ir kt., 2015, Hajighasemi ir kt., 2016).

Biojutikliai. Nauja ir perspektyvi sritis yra lipazių, kaip biojutiklių panaudojimas. Biojutikliai gali būti cheminio arba elektroninio pobūdžio. Svarbus analizinis lipazių panaudojimas – tai lipidų nustatymas klinikiniuose mėginiuose. Paveikus TAG lipaze, susidaro glicerolis ir laisvosios RR, o jų nustatymas chemiais ir fermentiniais metodais leidžia spręsti apie riebalų

kiekį organizme. Šis principas leidžia gydytojams tiksliai diagnozuoti širdies ir kraujagyslių ligas (Verma ir kt., 2012).

Biopolimerų gamyba. Esterinės grupės įvedimas į polisacharidą buvo svarbus pasiekimas, kuris leido modifikuoti originalią hidrofilią polisacharidų prigimtį ir gauti naujomis terminėmis ir mechaninėmis savybėmis pasižyminčius junginius (Aburto ir kt., 1999, Horchani ir kt., 2012). Nustatyta, kad pilnai bioskaidžios termoplastinės medžiagos gali būti gaunamos tirpinant krakmolą organiniuose tirpikliuose ir vykdant jo esterinimą (Heinze ir kt., 2000, Fang ir kt., 2000). Tokie junginiai galėtų pakeisti nebioskaidžius plastikus (Hochani ir kt., 2012).

Taigi, lipoliziniai fermentai jau kurį laiką žinomi dėl savo vaidmens žaliojoje chemijoje. Jie turi daug pritaikymo sričių ir augant pramonei, atitinkamai, nepaliaujamai auga ir lipolizinių fermentų poreikis. Pramonėje dažnai taikomi lipoliziniai fermentai išskirti iš eukariotinių (aukštesniųjų) mikroorganizmų (daugiausiai mikromicetų), tačiau bakterijų lipoliziniai fermentai reprezentuoja lengviau išgaunamų biologinių katalizatorių grupę. Plačiau taikant bakterines lipazes ir esterazes, galėtų mažėti fermentų išgavimo proceso sąnaudos ir atitinkamai pramoniniai procesai, panaudojant tokius fermentus, būtų ekonomiškesni, nes labai dažnai biokatalizatorių panaudojimą biotechnologijoje riboja jų kaina.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Cheminės medžiagos

Visi darbe naudoti reagentai yra analizinės/molekulinės biologijos klasės ROTH, AppliChem, Sigma-Aldrich (Vokietija), Thermo Fisher Scientific (Lietuva) patvirtintos cheminės medžiagos, jei nenurodyta kitaip.

2.2 Fermentai

Taq (Taq DNA Polymerase, recombinant), *Pfu* (Pfu DNA Polymerase, High-Fidelity) ir *Phusion* (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) DNR polimerazės, PCR Master Mix (2X) su *Taq* polimeraze; FastDigest *NdeI*, *XhoI* REazės; T4 DNR ligazė; šarminė fosfatazė (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase), dsDNazė (Thermo Scientific dsDNase). Visi išvardinti fermentai, jei nenurodyta kitaip, naudojami remiantis jų gamintojo (Thermo Fisher Scientific) standartiniais rekomenduojamais protokolais.

2.3 Molekulinės biologijos rinkiniai

GeneJet Genomic DNA Purification Kit (genominės DNR išskyrimo rinkinys), GeneJet Plasmid Miniprep Kit (plazmidžių išskyrimo rinkinys), GeneJet PCR Purification Kit (PGR produktų valymo rinkinys), GeneJet Gel Extraction Kit (PGR produktų gryninimo iš agarozės gelio rinkinys), InsTAclone PCR Cloning Kit (TA klonavimo rinkinys), Verso 1-Step RT-PCR Kit, with Thermo-Start Taq (Hot Start) (vieno žingsnio AT-PGR rinkinys). Išvardinti rinkiniai įsigyti Thermo Fisher Scientific ir naudojami remiantis šio gamintojo rekomenduojamais standartiniais protokolais. RNR išskyrimo ir gryninimo/koncentravimo rinkiniai *Quick-RNA Fungal / Bacterial Miniprep Kit* ir *RNA Clean & Concentrator-25 Kit* (Zymo Research, JAV), atitinkamai, naudojami remiantis gamintojo protokolais.

2.4 Darbe naudoti bakterijų kamienai, vektoriai ir pradmenys

Darbe naudotos bakterijų kultūros išskirtos iš riebalinėmis medžiagomis užteršto dirvožemio mėginių bei riebalinio maisto (šaldytuve sugedusio fermentinio sūrio). Klonavimui ir raiškai darbe naudoti įvairūs *E. coli* (Novagen) bakterijų kamienai. Elektrokompetentinės *E. coli* ląstelės ruoštos remiantis Sambrook ir Russell (2011) rekomenduojamu protokolu (Sambrook ir Russell, 2011). Išsamesnė informacija apie lipolizinių fermentų donorines kultūras, recipientinius heterologinių šeimininkų ir kitus kamienus pateikta 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Darbe naudoti mikroorganizmai.

Kamieniai	Savybės / panaudojimo tikslas	Šaltinis
<i>Bacillus</i> sp. L1	Mezofilinė iš riebalinio maisto išskirta kultūra, darbe naudota kaip lipolizinius fermentus koduojančių genų šaltinis	Šis darbas
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> AG1	Mezofilinė iš riebalais užteršto dirvožemio išskirta kultūra, darbe naudota kaip lipolizinius fermentus koduojančių genų šaltinis	Šis darbas
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 ^T	Kamienas naudotas palyginamiesiems atsparumo novobiocinui ir koaguliazės testams atlikti	Dovana (LSMU)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Kamienas naudotas palyginamiesiems atsparumo novobiocinui ir koaguliazės testams atlikti	Dovana (LSMU)
<i>E. coli</i> DH5 α genotipas: ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA</i> :argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 <i>phoA supE44 gyrA96</i> λ - <i>thi</i> ⁻¹ <i>relA1</i>	Rekombinantinių plazmidžių gausinimo kamienas (klonavimo kamienas)	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) genotipas: <i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHI</i> Δ <i>EcoRI</i> - <i>B</i> <i>int</i> ::(<i>lacI</i> :: <i>PlacUV5</i> :: <i>T7 gene1</i>) <i>i21</i> Δ <i>anin5</i>)	Klasikinės tikslinių genų raiškos kamienas	Novagen
<i>E. coli</i> C41 (DE3) genotipas: F <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B</i> <i>m_B</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	<i>E. coli</i> raiškos kamieno atmaina, sukurta visų organizmų klasių toksiškų baltymų raiškai (turi mutaciją užkertančią kelią ląstelių žūčiai, kai vyksta toksinių baltymų raiška); darbe naudotas tikslinių baltymų raiškos optimizavimo eksperimentuose	Dovana (P. Kavaliauskas)
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) genotipas: F <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> <i>m_B</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) <i>pRARE</i> (<i>Cam^R</i>)	BL21 kamieno atmaina, sukurta baltymų, kurių raiškai naudojami <i>E. coli</i> retai sutinkami kodonai, sintezei. Turi pRARE plazmidę su Cam atsparumo žymeniu, ir tiekia tRNR AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA kodonams; darbe naudotas tikslinių baltymų raiškos optimizavimo eksperimentuose	Dovana (P. Kavaliauskas)

Darbe naudoti plazmidiniai vektoriai, sukurti konstruktai, jų naudojimo tikslas ir šaltiniai pateikti 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Darbe naudoti plazmidiniai vektoriai

Plazmidinis vektorius	Panaudojimo tikslas	Šaltinis
pTZ57R/T	<i>lipBST</i> TA klonavimo vektorius, Amp ^R	TFS*
pET-26b(+)	IPTG indukuojama C-gale 6-His žymėtų rekombinantinių genų raiška, gaunant padidintą baltymų sintezę, Kan ^R	Invitrogen
pTZ57R/T_ <i>lipBST</i>	LipBST koduojančio geno pagausinimas	Šis darbas
pET-26b(+)_ <i>lipBST</i>	LipBST koduojančio geno heterologinė raiška, gaunant padidintą šio baltymo sintezę	Šis darbas
pET-26b(+)_ <i>estAG1</i>	EstAG1 koduojančio geno heterologinė raiška, gaunant padidintą šio baltymo sintezę	Šis darbas
pET-26b(+)_ <i>estAG1_S179G</i>	Mutantinį EstAG1 (a.r. S179G pakaita) baltymą koduojančio geno heterologinė raiška, gaunant padidintą šio baltymo sintezę	Šis darbas
pET-26b(+)_ <i>estAG1_S179A</i>	Mutantinį EstAG1 (a.r. S179A pakaita) baltymą koduojančio geno heterologinė raiška, gaunant padidintą šio baltymo sintezę	Šis darbas
pET-26b(+)_ <i>estAG1_T152A</i>	Mutantinį EstAG1 (a.r. T152A pakaita) baltymą koduojančio geno heterologinė raiška, gaunant padidintą šio baltymo sintezę	Šis darbas
pET-26b(+)_ <i>estAG1_E246A</i>	Mutantinį EstAG1 (a.r. E246A pakaita) baltymą koduojančio geno raiška, gaunant padidintą šio baltymo sintezę	Šis darbas
pET-26b(+)_ <i>estAG1_H276A</i>	Mutantinį EstAG1 (a.r. H276A pakaita) baltymą koduojančio geno raiška, gaunant padidintą šio baltymo sintezę	Šis darbas
pET-26b(+)_ <i>estAG1:S179A:E246A:H276A</i>	Trigubą mutaciją (S179A:E246A:H276A) turintį EstAG1 baltymą koduojančio geno raiška, gaunant padidintą šio baltymo sintezę	Šis darbas

* - Thermo Fisher Scientific.

Svarbiausių darbe naudotų pradmenų (METABION, Vokietija) pavadinimai, sekos, panaudojimo tikslas ir kt. pateikti 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Darbe naudoti oligonukleotidai (pradmenys).

Oligonukleotido pavadinimas	Seka (5'→3')	Panaudojimo tikslas
27F*	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rDNR pagausinimas
1495R**	CTACGGCTACCTTGTACGA	
M13/pUC (-20)F	GTA AACGACGGCCAGT	pTZ57R/T_ <i>lipBST</i> plazmidės analizė ir sekoskaita
M13/pUC (-26)R	CAGGAAACAGCTATGAC	

LipBPF LipBPR	ATGCTCTAACTATCCTCTGCA TTAATATGGAATATCTCCATG	<i>Bacillus</i> sp. L1 LipBP baltymą koduojančio geno pagausinimas
LipBSF LipBSR	ATGAGCGAAAACATG CTCGAGCCTGCTTTTTTCAC	<i>Bacillus</i> sp. L1 LipBS baltymą koduojančio geno pagausinimas
LipBSIF LipBSIR	ATGAGAGAAGGGCATTG TTACAACCGTAACCATCTG	<i>Bacillus</i> sp. L1 LipBSI baltymą koduojančio geno pagausinimas
LipBST1F LipBST1R	GCGCC CATATG AAAGTGATTTCG GCGCC CTCGAG ATTTCGTATTCTGTC	<i>Bacillus</i> sp. L1 LipBST baltymą koduojančio geno pagausinimas su <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos taikiniai
EstAG1F EstAG1R	GCGCC CATATG AAATCAAGACTG GCGCC CTCGAG TTCATCTTTAACG	<i>S. saprophyticus</i> AG1 EstAG1 baltymą koduojančio geno pagausinimui su <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos taikiniai
EstAG1_S179/G179F EstAG1_S179/G179R	pGGCCCGTTACTAGATGCCAA pAAACAAATATAATTTACTTGG	Taikiniui specifinės S179G mutacijos įvedimas į EstAG1 baltymą koduojančią seką pET-26b(+) <i>_estAG1</i>
EstGA1_S179/A179F EstAG1_S179/A179R	pGCGCGTTACTAGATGCC pAAACAAATATAATTTACTTGG	Taikiniui specifinės mutacijos S179A įvedimas į EstAG1 baltymą koduojančią seką pET-26b(+) <i>_estAG1</i>
EstAG1_T152/A152F EstAG1_T152/A152R	pGCGGGTGCTGCTTTAGCACT pGCCATCTCCATAATGACAAT	Taikiniui specifinės T152A mutacijos įvedimas į EstAG1 baltymą koduojančią seką pET-26b(+) <i>_estAG1</i>
EstAG1_G151/S151F EstAG1_G151/S151R	pAGCACTGGTGCTGCTTTAGC pATCTCCATAATGACAATAG	Taikiniui specifinės G151S mutacijos įvedimas į EstAG1 baltymą koduojančią seką pET-26b(+) <i>_estAG1</i>
EstAG_E246/A246F EstAG_E246/A246R	pGCGATTACCTCCAGACATG pGTATGCACCGCCAAACATAT	Taikiniui specifinės E246A mutacijos įvedimas į EstAG1 baltymą koduojančią seką pET-26b(+) <i>_estAG1</i>
EstAG1_H276/A276F EstAG1_H276/A276R	pGCGGCTTTCCCTTATTACC pAATCATCTTTTATATTCAT	Taikiniui specifinės H276A mutacijos įvedimas į EstAG1 baltymą koduojančią seką pET-26b(+) <i>_estAG1</i>
T7P T7T	TAATACGACTCACTATAGGG GCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET plazmidinių vektorių įvairių rekombinantinių konstrukčių analizė ir sekoskaita

* - F žymi tiesioginį pradmenį, ** - R žymi atvirkštinį pradmenį; p- oligonukleotidas yra fosforilintas 5'-gale. Paryškintos ir pabrauktos oligonukleotidų sekos žymi *NdeI* ir *XhoI* REazių atpažinimo taikinius.

2.5 Darbe naudotos mitybinės terpės

Mitybinės terpės lipolizinių fermentų producentų kokybinei atrankai:

TBA (Tributirino agaras): 0,5 % peptonas, 0,3 % mielių ekstraktas, 1 % ultragarsu emulguotas tributirinas, 1,5 % agaras (Gupta ir kt., 2003);

RBA (Rodamino B agaras): 1 % triptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 1 % rodaminas B, 1 % ultragarsu emulguotas alyvuogių aliejus, 1,5 % agaras (Kouker ir Jaeger, 1987).

Terpės sterilinamos autoklavuojant 20 min. 121 °C temperatūroje. Mikroorganizmai auginami 30-60 °C temperatūroje.

Mitybinės terpės natyvių ir rekombinantinių bakterijų kultivavimui:

Standartinės komercinės terpės **CASO/TSB** agaras, **LB (Luria-Bertani)** agaras (ruošiant skystas terpes agaro nepridedama), **M9**; kultivuojant rekombinantines bakterijas LB/M9, po autoklavavimo terpės papildomos antibiotikais, kurie yra sterilinami filtruojant.

LB/M9 terpėse kultivuojant rekombinantinę *E. coli* DH5 α su pTZ57R/T arba pET-26b(+) plazmidiniais vektoriais arba jų konstruktais, terpės papildomos iki galutinės 100 μ g/mL ampicilino (Amp) arba 50 μ g/mL kanamicino (Kan) koncentracijos, atitinkamai, jeigu nenurodyta kitaip;

LB/M9 terpėse kultivuojant rekombinantines *E. coli* BL21 (DE3) / C41 (DE3) su pET-26b(+) ir jo konstruktais, terpės papildomos iki galutinės 50 μ g/mL kanamicino (Kan) koncentracijos;

LB/M9 terpėse kultivuojant rekombinantinę *E. coli* Rosetta (DE3) su pET-26b(+) ir jo konstruktais, terpės papildomos iki galutinių 50 μ g/mL Kan ir iki 30 μ g/mL chloramfenikolio (Cam) koncentracijų;

mM9 (modifikuota M9 terpė): 2 mM MgSO₄, 100 μ M CaCl₂, 5 \times M9 druskų tirpalas: 50 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, 10 mM NaCl, 20 mM NH₄Cl (pH 7, ruošiamas atskirai), 2 % gliukozė (40 % tirpalas ruošiamas atskirai) arba 1 % ultragarsu emulguotas tributirinas, 0,1 % standartinio 1000 \times vitaminų tirpalo (Elbing ir Brent, 2002);

1000 \times vitaminų tirpalo sudėtis (100 mL): 100 mg biotino, 100 mg inozitolo, 50 mg nikotino rūgšties (vit. B3), 50 mg piridoksino, 5 mg riboflavino (vit. B2), 50 mg tiamino.

Terpė skirta rekombinantinių ląstelių regeneracijai po elektroporacijos:

SOC: 0,2 % triptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 0,05 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,095 % MgCl₂, 0,24 % Mg₂SO₄, 0,36 % D(+)-gliukozės.

Terpė, naudojama elektrokompetentinių ląstelių ruošimui:

GYT: 10 % glicerolis, 0,0125 % mielių ekstraktas, 0,25 % triptonas.

CASO/TSB, LB, M9, mM9, GYT terpės ir tirpalai sterilinami autoklavuojant 20 min. 121 °C temperatūroje. 40 % gliukozės tirpalas - 15 min. 115 °C. Bakterijos augintos 35-37 °C temperatūroje arba kaip aprašyta.

2.6 Suminės genominės ir plazmidinės DNR išskyrimas

Atrinktų lipolizinių kultūrų genominės DNR (gDNR) išskyrimui ruošiama jų biomasė. Šiam tikslui bakterijos auginamos ant CASO/TSB agarizuotos terpės. Užaugusių bakterijų biomasė perkeliama į skystas CASO/TSB mitybines terpes ir auginama iki eksponentinės augimo fazės 35 °C temperatūroje, aeruojant 180 aps/min. Užaugusių bakterijų biomasės surenkamos centrifuguojant 9000 × g, 3 min., kambario temperatūroje. Genominė mikroorganizmų DNR iš jų biomasių išskiriama naudojant GeneJet Genomic DNA Purification Kit.

Plazmidinės DNR išskyrimui rekombinantinės *E. coli* ląstelės auginamos skystoje LB terpėje (37 °C, 180 aps/min) su 100 µg/mL Amp pTZ57R/T ir LB terpėje su Kan – pET-26b(+) plazmidėms išskirti. Bakterijų biomasė surenkama centrifuguojant 9000 × g, 3 min., kambario temperatūroje. Iš surinktos biomasės plazmidinė bakterijų DNR išskiriama naudojant GeneJet Plasmid Miniprep Kit.

2.7 Elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė vykdoma 1 % agarozės (TopVision Agarose) geliuose. Agarozės geliai ruošiami naudojant 1×TAE buferinį tirpalą ir papildomi etidžio bromidu iki galutinės 0,5 mg/mL koncentracijos. Elektroforezė leidžiama 1×TAE buferyje, palaikant 8-10 V/cm įtampą. Atliekant DNR elektroforezę naudojami MassRuler DNA ladder Mix ir GeneRuler DNA Ladder Mix DNR molekuliniai žymenys. Geliai analizuojami apšvietus UV (DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro).

2.8 Mikroorganizmų identifikavimas

2.8.1 16S rDNR amplifikavimas ir filogenetinė analizė

16S rRNR koduojantis genas nuo tikslinių kamienų gDNR pagausinamas PGR naudojant universalius pradmenis: 27F ir 1495R. Vienai PGR reakcijai (50 µL) atlikti naudojami 5 µL 10×PGR buferinio tirpalo su (NH₄)SO₄, 2 mM dNTP mišinio (po 0,2 mM kiekvieno dNTP), 2 mM MgCl₂, po 0,5 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmens, 2,5 U rekombinantinės *Taq* DNR polimerazės, atitinkamo mikroorganizmo gDNR (konc. 1 ng/µL). Mišinys papildomas iki 50 µL atitinkamu vandens tūriu. 16S rDNR PGR sąlygos: 1. pradinė denatūracija 95 °C (2 min.), 2. denatūracija 95 °C (1 min.), 3. pradmenų prilydymas 50 °C (2 min.) 4. grandinės ilginimas 72 °C (3 min.), 5. galutinis grandinės ilginimas 72 °C (7 min.), 2-4 žingsniai kartojami po 29 kartus (Kuisienė, 2008). Atlikus PGR, produktai gryninami naudojant GeneJet PCR Purification Kit komercinį rinkinį. DNR analizuojama kaip aprašyta 2.7 poskyryje.

Išgrynintų 16S rDNR amplikonų sekoskaita atliekama 16 kapiliarų genetiniu analizatoriumi 3130xl (AppliedBiosystems) VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre (Vilnius, Lietuva). Sekos analizuojamos DNASTAR LaserGene 7.1 programos įrankiais, atliekamas jų sugretinimas pasitelkiant BLASTn (angl., *Basic Local Alignment Tool Nucleotide*) algoritmą, prieinamą NCBI duomenų bazėje (ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul ir kt., 1990). 16S rDNR filogenetinei analizei naudotos tiriamųjų genčių tipinių kamienų 16S rDNR sekos atrinktos, naudojantis Silva duomenų baze (arb-silva.de/projects/living-tree/). Evoliucinis ryšys analizuojamas naudojant MEGA 7.0 (Kumar ir kt., 2016). Daugybiniam sekų palyginimui naudojamas Clustal W algoritmas (Thompson ir kt., 1994). Evoliucinė istorija nustatoma taikant artimiausiųjų kaimynų (angl., *Neighbour-Joining*) metodą (Saitou ir Nei, 1987) su Bootstrap verte lygia 1000 pakartojimų (Felsenstein, 1985, Kumar ir kt., 2016).

2.8.2 *Staphylococcus* sp. AG1 gDNR sekoskaita ir skaitmeninė DNR-DNR hibridizacija

Išskirta *Staphylococcus* sp. AG1 gDNR pateikiama viso genomo sekoskaitai BaseClear (Nyderlandai). Naujos kartos sekoskaitos bibliotekų sukūrimui, gDNR fragmentuojama, naudojant Illumina HiSeq2500 generuojami porinių-galų nuskaitymai. Trumpų nuskaitymų *de novo* surinkimui tikrinama Illumina gautų nuskaitymų kokybė ir taisomos klaidos

naudojant BayesHammer įrankį (Nikolenko ir kt., 2013). Nuskaitymai su pašalintomis klaidomis surenkami į sąrankas (angl., *contigs*) naudojant SPAdes 3.10 programą (Bankevich ir kt., 2012). Sąrankų tvarka ir atstumai tarp jų nustatomi naudojant SSPACE 2.3 (Boetzer ir kt., 2011). Tolimesnė analizė atliekama panaudojant GapFiller 1.10, Pilon 1.21 programas (Boetzer ir Pirovano, 2012, Walker ir kt., 2014). Genomas BaseClear anotuojamas naudojant Prokka greitąjį prokariotinį anotavimą (angl., *Prokka: rapid prokaryotic annotation*) (Seemann, 2014), ir, papildomai palyginimui naudojant RAST serverį (rast.nmpdr.org/rast.cgi).

Skaitmeninė lyginamoji DNR-DNR hibridizacija (sDDH) atliekama <http://ggdc.dsmz.de/home.php>, naudojant Genomo-Genomo Atstumo Skaičiuotuvą (GGAS) (angl., *Genome-to-Genome Distance Calculator, GGDC*) (Meier-Kolthoff ir kt., 2013). Palyginimui pasirenkami tipinio *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305-NCTC 7292^T (AP008934.1) kamieno genomas, *S. saprophyticus* NCTC 7666 (SAYP00000000.1), *S. saprophyticus* 1A (LR134089.1) ir tipinių *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971 (LT963439.1), *Staphylococcus equorum* NCTC 12414^T (UHDI00000000.1), *Staphylococcus succinus* subsp. *succinus* DSM 14617^T (LCSH00000000.1) tipinių kamienų genomai, kurie remiantis 16S rDNR sekų filogenetine analize, buvo nustatyti kaip artimos *Staphylococcus* sp. AG1 rūšys.

2.8.3 *Staphylococcus* sp. AG1 koagulazės ir novobiocino testas

Staphylococcus sp. AG1 identifikavimui papildomai atlikti specifiniai biocheminiai testai: koaguliazės ir jautrumo novobiocinui (papildoma iki galutinės 20 µg/mL koncentracijos) testai (Raz ir kt., 2005, Ferreira ir kt., 2012). Naudoti kontroliniai kamienai: *S. aureus* ATCC 25923^T ir *S. epidermidis* ATCC 12228.

2.9 Lipolizinių fermentų aktyvumo nustatymas

Kiekybinis lipolizinių fermentų aktyvumas nustatomas spektrofotometriškai (PerkinElmer Lambda 25 UV/VIS Spectrometer) matuojant susidarančio reakcijos metu *p*-NP absorbcijos pokytį 410 nm (Abs₄₁₀) bangos ilgyje. Bendrą 1 mL fermentinės reakcijos mišinį sudaro 50 mM Britono-Robinsono buferinio tirpalo (Bendikienė ir kt., 2004) (pH 8), 3-20 µL 10 mM *p*-NPC (C_{8:0}) 2-propanolyje ir atitinkamas tūris fermentinio tirpalo. Optimalios reakcijai substrato ir fermento koncentracijos nustatomos empiriškai (fermentinės reakcijos greitis turi didėti linijiškai). Reakcija

vykdoma 35 °C arba 45 °C temperatūroje priklausomai nuo analizuojamo fermento. Prieš inicijuojant reakciją, buferinio tirpalo ir substrato mišinys inkubuojamas 10 min. 35/45 °C temperatūrose, fermentinis tirpalas – 3 min. Po inkubacijos buferinio tirpalo ir substrato mišinys sumaišomi su fermentiniu tirpalu. Fermentinė reakcija vykdoma termostatuojamame spektrofotometro kiuvečių laikiklyje (Perkin Elmer PTP-1+1 Peltier System, PCB 1500 Water Peltier System) atitinkamoje temperatūroje 5 min., 410 nm bangos ilgyje matuojamas *p*-NP absorbcijos pokytis. Lipolizinių fermentų bendrieji aktyvumai apskaičiuojami pagal formulę:

$$U = \frac{\Delta Abs \times V_m}{\epsilon \times d \times V_f \times \Delta t}, \text{ kur}$$

ΔAbs = $Abs_{\text{Seksperimentinis}}$ - $Abs_{\text{Spradinis}}$;

V_m – bendras reakcijos mišinio tūris, mL;

ϵ – *p*-NP molinės atenuacijos koeficientas Abs_{410} , 1,477 mM⁻¹ mm⁻¹;

d – kiuvetės storis, 10 mm;

V_f – fermentinio tirpalo tūris reakcijos mišinyje, mL;

Δt – reakcijos laikas, min.

Lipolizinių fermentų aktyvumo vienetas (U) – fermento kiekis, kuris išlaisvina 1 μmol *p*-NP per 1 min., griežtai nustatytais tyrimo sąlygomis. Savitasis lipolizinis aktyvumas išreiškiamas aktyvumo vienetais 1 mg baltymo (U/mg).

2.10 Atrinktų kultūrų lipolizinius fermentus koduojančių genų pirminė analizė ir pagausinimas, naudojant PGR

Lipolizinių fermentų genų paieškai ir analizei naudojami NCBI duomenų bazėje prieinami *B. stratosphericus* (identifikuota kaip tiriamajam *Bacillus* sp. L1 artimiausia bakterijų rūšis) genomai ir šiame darbe sekvenuotas ir anotuotas *S. saprophyticus* AG1 genomas. Tikslinių kamienų genomuose nustatytus numanomus (angl., *putative*), necharakterizuotus lipolizinius fermentus (lipazes ir esterazes) koduojantys genai analizuojami naudojant DNASTAR LaserGene 7.1 programų paketą. Naudojant interaktyvius SignalP-5 (cbs.dtu.dk/services/SignalP/) ir Secretome-2.0 (cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/) serverius, nustatomos tikslinių fermentų signalinės sekos, apsprendžiančios jų sekreciją į užląstelinę terpę ir įvertinamas sekrecijos mechanizmas, signalinių peptidų sekų ilgiai bei kirpimo vietos. ProP 1.0 (cbs.dtu.dk/services/ProP/) įrankis naudojamas propeptidų prognozavimui (Bendtsen ir kt., 2004, 2005; Petersen ir kt., 2011).

Bacillus sp. L1 genome koduojamų lipolizinių fermentų genų nustatymui ir pagausinimui taikant PGR metodą, pradmenys (2.3 lentelė) kuriami remiantis rastų numanomų lipazių ir esterazių genų homologiškų sekų konservatyviais regionais. Gausinimui naudojama *Taq* polimerazė ir PGR sąlygos pateiktos 2.8.1 poskyryje. Optimalios pradmenų prilydymo temperatūros ir jų koncentracijos parenkamos empiriškai.

Staphylococcus sp. AG1 lipolizinių fermentų genų pagausinimui pradmenys kuriami remiantis po sekoskaitos anotuotame genome nustatytomis numanomų lipazių ir esterazių genų sekomis (2.3 lentelė). PGR naudojama aukšto tikslumo *Phusion* polimerazė. Vieną 50 µL PGR reakcijos mišinį sudaro 1X *Phusion* HF buferinio tirpalo (5X), 2 mM dNTP (po 0,2 mM kiekvieno), 1,5 mM MgCl₂, tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys (po 0.5 µM kiekvieno), 10 U *Phusion* polimerazės (0,02 U/µL) ir matricinė DNR (1 ng/µL). Mišinys papildomas iki 50 µL atitinkamu vandens tūriu. PGR sąlygos: 1. pradinė denatūracija 98 °C (30 sek.), 2. denatūracija 98 °C (10 sek.), 3. pradmenų prilydymo temperatūra parenkama empiriškai atsižvelgiant į jų lydymosi temperatūras (T_M) (10 sek.) 4. polimerizacija 72 °C (30 sek./kb), 5. galutinė polimerizacija 72 °C (7 min.), 2-4 žingsniai kartojami po 29 kartus. Genų pagausinimas patvirtinamas atliekant DNR elektroforezę agarozės gelyje (2.7).

2.11 *Bacillus* sp. L1 ir *S. saprophyticus* AG1 lipolizinius fermentus koduojančių genų heterologinės raiškos sistemos kūrimas

***Bacillus* sp. L1.** *Taq* polimerazės pagausintas tikslinį lipolizinių fermentą koduojantis genas su *NdeI/XhoI* restrikcijos endonukleazių atpažinimo taikiniai ir dA nuosvyromis klonuojamas į pTZ57R/T plazmidinį vektorių, taikant TA klonavimo strategiją pagal InsTAclone PCR Cloning Kit gamintojo protokolą. Rekombinantinėmis pTZ57R/T transformuojamos *E. coli* DH5α ląstelės jas elektroporuojant (1800 mV, 5 ms). Teigiami *E. coli* DH5α transformantai atrenkami naudojant baltų / mėlynų kolonijų atrankos sistemą LB terpėje su 100 µg/mL Amp, emulguotu tributirinu (1 %), IPTG (200 µg/mL) ir X-gal (20 µg/mL). Norint patvirtinti genų įsijungimą į atitinkamą pTZ57R/T vektoriaus MKR vietą, transformantų kolonijos analizuojamos taikant kolonijų PGR su M13/pUC (-20) ir M13/pUC (-26) pradmenimis (2.3 lentelė) pagal InsTAclone PCR Cloning Kit gamintojo protokolą, naudojant iš ankto paruoštą PCR Master Mix (2X) PGR mišinį su *Taq* polimeraze. Po kolonijų PGR atrinkti teigiami *E. coli* DH5α

transformantai užsėjami į LB terpes su 100 µg/mL Amp (auginama 37 °C temperatūroje, 180 aps/min, 12 val.). Iš užaugusių ląstelių išskiriama plazmidinė DNR naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit, atliekama restrikcinė analizė (veikiama *NdeI/XhoI* REazėmis, norint patvirtinti reikiamo dydžio inserto įsiterpimą į atitinkamą pTZ57R/T MKR vietą). Klonuojamo lipolizinio geno insertas patvirtinamas atliekat sekoskaitą.

Toliau atliekamas genų-insertų perkėlimas iš pTZ57R/T į pET-26b(+) raiškos vektorių, siekiant sukurti sistemą padidintai tikslinio fermento sintezei. Atliekama pTZ57R/T konstruktų ir pET-26b(+) dviguba restrikcija naudojant *NdeI* bei *XhoI* REazes ir toliau iškirpto geno fragmento ir paveikto REazėmis pET-26b(+) preparatyvinė DNR elektroforezė, fragmentai valomi iš gelio pagal GeneJet Gel Extraction Kit gamintojo protokolą ir liguojami naudojant T4 DNR ligazę. Sukurti konstruktai perkeliama į *E. coli* DH5α ląsteles transformuojant. Kolonijos analizuojamos taikant kolonijų PGR su T7P ir T7R pradmenimis (2.3 lentelė). Iš teigiamų atrinktų *E. coli* DH5α transformantų skiriama plazmidinė DNR (2.6 poskyris). Vėliau atliekama rekombinantinių plazmidžių restrikcinė analizė (veikiama *NdeI/XhoI* REazėmis). Genų sekų tikslumas patvirtinamas taikant sekoskaitą, konstruktas perkeliama į padidintai tikslių baltymų sintezei skirta *E. coli* BL21 (DE3) kamieną.

S. saprophyticus AG1. Lipolizinius fermentus koduojančių genų klonavimui naudojama klasikinė molekulinio klonavimo technika. Atliekama lipolizinius fermentus koduojančių amplifikuotų genų fragmentų ir pET-26b(+) vektoriaus dviguba restrikcija su *NdeI* ir *XhoI* REazėmis. Restrikcijos endonukleazų atpažinimo vietos į tikslinius genus įvedamos PGR metu. Po dvigubos restrikcijos vykdoma gautų fragmentų preparatyvinė DNR elektroforezė, fragmentai gryninami iš gelio ir liguojami naudojant T4 DNR ligazę. *E. coli* DH5α kamienai transformuojami gautais konstruktais elektroporuojant ląsteles. Norint patvirtinti genų insertų įsijungimą į pET-26b(+) vektoriaus MKR, transformantų kolonijos analizuojamos taikant kolonijų PGR su T7P ir T7R pradmenimis (2.3 lentelė). Tolimesni klonavimo etapai yra tokie pat kaip ir *Bacillus* sp. L1 lipolizinio fermento atveju (nurodyta anksčiau šiame poskyryje).

LipBST ir EstAG1 a.r. sekų daugybiniam palyginimui naudojamos artimiausios homologinės sekos, rastos atliekant BLASTp NCBI, Baltymų duomenų banko (angl., *Protein Data Bank, PDB*), Uniprot/SwissProt duomenų bazėse. Daugybinis sekų sugretinimas vykdomas pasitelkiant Clustal W algoritmą (MEGA 7 programoje ir kituose interaktyviuose

internetiniuose serveriuose). Sugretintų sekų panašumai ir galimos formuojamos antrinės struktūros atkuriamos naudojant ESPript3.0 (Easy Sequencing in PostScript) (escript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/).

2.12 Lipolizinių fermentų raiška ir jos optimizavimas

Siekiant gauti optimalią padidintą baltymų sintezę, rekombinantiniais raiškos vektoriais, su įterptais tikslinių lipolizinių fermentų genais, transformuojami skirtingi raiškos kamienai (*E. coli* BL21 (DE3), C41 (DE3), Rosetta (DE3)) juos elektroporuoja. Transformantai išsėjami ant LB su 50 µg/mL Kan (auginant *E. coli* Rosetta (DE3)), į terpę papildomai įdedama 30 µg/mL Cam), užaugę klonai tikrinami atliekant kolonijų PGR. Teigiamų *E. coli* transformantų kolonijos užsėjamos į skystas LB terpes su atitinkamais antibiotikais ir auginamos 37 °C, 12 val. Iš užaugusių atitinkamų bakterijų suspensijų paimama po 500 µL ląstelių ir įnešama į dvi kolbas su 50 mL LB terpės su atitinkamais antibiotikais. Auginama 37 °C temperatūroje aeruojant (200 aps/min). Bakterijoms pasiekus $OT_{600}=0,6$, tikslinių genų raiška indukuojama įnešant 100 mM IPTG kiekį, atitinkantį jo galutinę 1 mM koncentraciją terpėje. Kontrolei naudojamos nepaveiktos IPTG transformantų kultūros. Indukcijos metu iš abiejų kolbų paimama po 1 mL ląstelių suspensijos mėginių. Po indukcijos nuo 1 iki 7 val. imami tiek IPTG paveiktų, tiek kontrolinių ląstelių mėginiai taip, kad ląstelių kiekis indukcijos momentu ir tiriamu po indukcijos laiko momentu sutaptų. Surinktos ląstelės yra centrifuguojamos 1 min., 9000 x g, 4 °C, nuosėdos resuspenduojamos 50 µL 4× baltymų užnešimo tirpalo (40 % glicerolio, 240 mM Tris-HCl, 8 % NDS, 0,04 % bromfenolio mėlynojo). Indukuotų ir neindukuotų ląstelių bendri baltymų profiliai yra analizuojami atliekant NDS-PAGE (2.13 poskyris).

Nustačius tinkamiausią raiškai kamieną, tikslinių baltymų sintezę rekombinantinėse bakterijose toliau optimizuojama, keičiant indukuojamų ir kontrolinių transformantų augimo terpes (LB/M9), indukuojamų bakterijų OT_{600} (0,4, 0,6 ir 0,8), induktoriaus galutinę koncentraciją terpėje (0,1 mM, 0,4 mM ir 1 mM) bei augimo temperatūrą (37 °C, 27 °C, 17 °C).

2.13 Baltymų NDS-PAGE ir zimografinė analizė

Tiksliniai baltymai išskirstomi ir analizuojami atliekant glicininę NDS-PAGE su 5 % koncentruojančiu ir 12 % skirstomuoju geliais. Jie ir buferinių tirpalų sistema ruošiami pagal klasikinių Laemmli metodą (Laemmli, 1970). Po elektroforezės, norint atlikti zimografinį tyrimą, viena

gelio dalis plaunama distiliuotu vandeniu ir dažoma Page Blue dažais pagal gamintojo protokolą, o kita gelio dalis naudojama zimografiniam tyrimui. Zimografijai naudojama NDS-PAGE gelio dalis plaunama renatūracijos buferiniu tirpalu (50 mM Britono-Robinsono buferinis tirpalas su 1% detergento Triton X-100, pH 8), 3 kartus po 15 min. ir 3 kartus po 10 min. 50 mM Britono-Robinsono buferiniu tirpalu (pH 8) be Triton X-100. Taip apdorotas gelis perkeliamas į sterilią Petri lėkštelę ir užpilamas 50 mM Britono-Robinsono buferiu su agaru ir 1 % emulguoto tributirino. Terpei sustingus, lėkštelės perkeliama į 35-37 °C termostatą ir inkubuojama nuo 12 iki 24 val. Atsiradus skaidrioms zonoms terpėje su tributirinu (tai lipidinio substrato tributirino, esančio užpiloje terpėje, skaidymo padarinys) Page Blue dažytas NDS-PAGE gelis ir zimograma perdengiami, nustatoma preliminari tiriamojo lipolizinio fermento molekulinė masė.

2.14 Lipolizinių fermentų išsidėstymo rekombinantinėse ląstelėse nustatymas

Indukuotos ir neindukuotos (kontrolinės) bakterijų ląstelių suspensijos surenkamos nustatyta didžiausio rekombinantinių lipolizinių fermentų sintezės valandą jas centrifuguojant 10 min., 9000 x g, 4 °C. Supernatantas nupilamas, o nuosėdos suspenduojamos 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) buferiniame tirpale santykiu 1:4 (ląstelės:buferinis tirpalas). Suspenduotos ląstelės ardamos ultragarsu 15 min. nustačius 5 sek. ardymo, 15 sek. šaldymo programą (Sonics VibraCell). Norint atskirti citoplazminę tirpią ir netirpią frakcijas, rekombinantinių ląstelių lizatas centrifuguojamas 10 min., 12000 x g, 4 °C. Tirpi frakcija perkeliama į kitą mėgintuvėlį, o netirpi tirpinama 6 M karbamido turinčiame tirpale. Norint iširti užląstelinės terpės baltymų profilį, supernatantas yra koncentruojamas į atitinkamą supernatanto kiekį įpilant 1 % trichloracto rūgšties (TCA), gerai išmaišoma ir inkubuojama 15 min. ant ledo. Po inkubacijos mišinys centrifuguojamas 10 min., 14000 x g, 4 °C. Supernatantas nupilamas, o nuosėdos du kartus plaunamos acetonu (naudojamas tūris lygus 1 % nuo supernatanto tūrio) ir centrifuguojamos 5 min., 14000 x g, 4 °C. Acetonas nupilamas, o nuosėdos 60 min. džiovinamos. Gauti baltymų mėginiai tirpinami 50 µL 4× NDS-PAGE baltymų užnešimo buferyje. Tikslinio baltymo lokalizacija skirtingose frakcijose analizuojama NDS-PAGE (2.13).

2.15 Fermentų gryninimas

Šiame darbe išsamiau tirti ir charakterizuoti *Bacillus* sp. L1 ir *S. saprophyticus* AG1 lipoliziniai fermentai LipBST ir EstAG1, atitinkamai. Remiantis jų skirtingais heterologinės raiškos ypatumais, buvo pasitelktos skirtingos jų gryninimo strategijos, kurių išsamus aprašymas pateiktas tolimesniuose šio skyrelio poskyriuose. LipBST sekretuojamas lipolizinis fermentas buvo gryninamas taikant išsodinimą amonio sulfatu bei imobilizuotų metalų jonų (Ni^{2+}) giminingumo chromatografiją (toliau IMAC) nedenaatūrojančiomis sąlygomis. Netirpius kūnelius formuojantis EstAG1 lipolizinis fermentas grynintas taikant IMAC denatūrojančiomis sąlygomis ir gelfiltraciją. Pastarieji metodai taip pat naudoti norint parinkti optimalias sąlygas denatūruoto, netirpius kūnelius formuojančio baltymo renatūracijai kolonėlėje. Svarbų EstAG1 renatūracijai ir gryninimui žingsnį sudarė po chromatografijų atlikta fermentinio tirpalo dializė (2.15.6).

2.15.1 Baltymų išsodinimas

LipBST iš kultūrinio skysčio atskirto nuo ląstelių išsodinamas norint sukcentruoti fermentą ir dalinai atskirti nuo kitų rekombinantinės kultūros sekretomo baltymų. Šiam tikslui, IPTG indukuotos rekombinantinės *E. coli*, turinčios pET-26b(+) su LipBST insertu (pET-26b(+)_lipBST), auginamos LB terpėje su 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan iki augimo valandos, kai nustatytas didžiausias sintetinio lipolizinio fermento kiekis. Užaugus ląstelėms jos centrifuguojamos 9000 x g, 10 min., 4 °C. Empiriškai nustatoma, koks amonio sulfato įsotinimo laipsnis reikalingas tiriamųjų baltymų išsodinimui iš kultūrinio skysčio. Išsėdę baltymai centrifuguojami 14000 x g, 20 min., 4 °C. Gautos baltymų nuosėdos suspenduojamos 25 mM natrio fosfatiniame buferyje (NaPi) (pH 7,3) ir dializuojamos 25 mM NaPi kaip aprašyta 2.15.6. Dializuoti baltymai analizuojami NDS-PAGE (2.13 poskyris). Norint atlikti tolimesnį gryninimą, dializuotos nuosėdos koncentruojamos PEG 4000 ir suspenduojamos nedenaatūrojančiomis sąlygomis atliekamo IMAC užnešimo buferiniame tirpale (sudėtis pateikta 2.15.2 poskyryje). Lipolizinis aktyvumas matuojamas naudojant p-NPC kaip aprašyta 2.9 poskyryje.

2.15.2 Giminingumo chromatografija nedenaatūrojančiomis sąlygomis

Naudojant IMAC nedenaatūrojančiomis sąlygomis buvo gryninamas tirpus užląstelinis LipBST lipolizinis fermentas. Užnešimo buferiniame

tirpale (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl ir 2 mM imidazolo, pH 8) ištirpintas mėginys užnešamas ant IMAC derva (Profinity IMAC Resins, Bio-Rad) pakrautos kolonėlės. Surenkama frakcija, kurią sudaro neprisirišę prie Ni²⁺ jonų baltymai. Norint atplauti netikslinius, prie dervos prisijungusius baltymus, pro kolonėlę praleidžiami 5 tūriai praplovimo buferinio tirpalo (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl ir 20 mM imidazolo, pH 8), surenkamos plovimo frakcijos. Tikslinio baltymo eliucija nuo Ni²⁺ jonais įkrautos dervos vykdoma be gradiento, praleidžiant 5-is kolonėlės tūrius eliucijos buferinio tirpalo (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl ir 250 mM imidazolo, pH 8). Baltymų koncentracija frakcijose nustatoma, matuojant sugerties pokytį UV₂₈₀. Baltymų grynumas analizuojamas NDS-PAGE, atliekama zimografinė analizė (2.13 poskyris). Prieš atliekant NDS-PAGE ir zimogramą, mėginiai yra dializuojami (2.15.6 poskyris). Baltymų koncentracija nustatoma Bradfordo metodu naudojant 5× komercinį Bradfordo reagentą (ROTH). Naudojant skirtingas jaučio serumo albumino (JSA) (angl., *bovine serum albumine*, BSA) koncentracijas, sudaroma standartinė kalibracinė kreivė (Bradford, 1976). Lipolizinis aktyvumas matuojamas naudojant *p*-NPC kaip aprašyta 2.9 poskyryje.

2.15.3 Giminingumo chromatografija denatūruojančiomis sąlygomis

Rekombinantinių ląstelių citoplazmoje netirpius kūnelius sudarantis EstAG1 lipolizinis fermentas gryninamas taikant IMAC denatūruojančiomis sąlygomis. Netirpi rekombinantinių *E. coli* ląstelių citoplazmos frakcija tirpinama karbamido pagrindu paruoštame IMAC užnešimo buferiniame tirpale (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazolo, 8 M karbamido, pH 8). IMAC atliekama naudojant automatizuotą chromatografinę sistemą (BioLogic DuoFlow, Bio-Rad) ir komercines iš anksto IMAC derva pripildytas 1 mL kolonėles. Ištirpinti baltymai užnešami ant užnešimo buferiniu tirpalu ekvilibruotos kolonėlės ir plaunami 5-iais kolonėlės tūriais užnešimo buferinio tirpalo, surenkama neprisirijusių baltymų frakcija. Netiksliniai prie Ni²⁺ jonais pakrautos dervos prisijungę baltymai atplaunami pro kolonėlę praleidžiant 5-is kolonėlės tūrius plovimo buferinio tirpalo (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazolo, 6 M karbamido, pH 8). Tikslinio EstAG1 lipolizinio fermento eliucija vykdoma be gradiento: pro kolonėlę leidžiami 5-i kolonėlės tūriai eliucijos buferinio tirpalo (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazolo, 6 M karbamido, pH 8). Frakcijų sugerties UV₂₈₀ pokyčiai fiksuojami UV

detektoriumi. Norint nustatyti tikslinių baltymų grynumą ir preliminarią išeią, frakcijos analizuojamos taikant NDS-PAGE (2.13), Baltymų koncentracija matuojama Bradfordo metodu, kiekybinis aktyvumas įvertinamas spektrofotometriškai taikant metodiką, aprašytą 2.9 poskyryje.

2.15.4 Gelfiltracija

Norint atskirti EstAG1 tikslinį baltymą nuo IMAC eliucijos buferiniame tirpale esančių karbamido, NaCl ir imidazolo likučių, atliekama mėginio gelfiltracija naudojant Sephadex™ G-25, (GE Healthcare, JK) gelį. Ant 20 mL kolonėlės užnešamas ne didesnis nei 25 % nuo kolonėlės tūrio mėginio tūris. Mėginiui difundavus į gelį, baltymai eliuuojami 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (pH 7,5) buferiniu tirpalu. Surinktos eliucijos frakcijos analizuojamos matuojant sugerties pokyčius UV₂₈₀. Didelės koncentracijos surinktų frakcijų grynumas įvertinamas atliekant NDS-PAGE (2.13). Lipolizinis aktyvumas matuojamas naudojant *p*-NPC substratą, kaip aprašyta 2.9 poskyryje. Frakcijos apjungiamos ir dializuojamos (2.15.6 poskyris).

2.15.5 Giminingumo chromatografija denatūruojančiomis sąlygomis baltymų renatūracijai

Ant iš anksto užnešimo buferiniu tirpalu praplautos kolonėlės užnešamas EstAG1 ir kitų baltymų iš netirpios citoplazminės frakcijos mišinys (ištirpintas karbamido turinčiame užnešimo buferiniame tirpale). Kolonėlė plaunama 5× kolonėlės tūriais užnešimo buferinio tirpalo, surenkama neprijungusių prie IMAC dervos baltymų frakcija (2.15.3 poskyris). Toliau, norint ne tik gryninti, bet ir renatūruoti tikslinius lipolizinius fermentus, pirma, taikomas linijinis gradientas (60 min., 0,5 mL/min.) mažinant karbamido koncentraciją plovimo buferiniame tirpale. Kolonėle pradedamas leisti užnešimo buferinis tirpalas, turintis 100 % (8 M) karbamido ir, linijiškai mažinant jo koncentraciją, kolonėlės plovimas, norint renatūruoti tikslinį baltymą, baigiamas renatūracijos buferiniu tirpalu (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 mM β-merkaptioetanolio, 2 mM imidazolo, pH 8) be karbamido (0 M). Toliau taikomas linijinis gradientas denatūracijos buferiniame tirpale didinant imidazolo koncentraciją: nuo 20 mM iki 300 mM. Gautos frakcijos analizuojamos, matuojant sugerties pokyčius UV₂₈₀, NDS-PAGE (2.13). Gryno fermento eliucijos frakcijos apjungiamos, gelfiltruojamos (2.15.4) ir dializuojamos (2.16.6). Lipolizinis aktyvumas matuojamas naudojant *p*-NPC substratą kaip aprašyta 2.9 poskyryje.

2.15.6 Baltymų dializė

Dializės maišelis (ZelluTrans 3,5 MWCO, ROTH) drėkinamas distiliuotame vandenyje 15 min., pripildomas gryninamo baltyminio tirpalo, užspaudžiamas ir merkiamas į IMAC surišimo buferinį tirpalą (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazolo, pH 8), natrio fosfatinį (50 mM, pH 7,2) arba Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), norint atlikti buferinių tirpalų mainus po IMAC. Dializuojamojo pavyzdžio ir buferinio tirpalo santykis – 1:50. Dializė vykdoma mažiausiai 24 val., 4 °C temperatūroje, maišant ir bent 3 kartus keičiant buferinį tirpalą. Mėginiai po dializės koncentruojami naudojant PEG 4000.

2.16 LipBST ir EstAG1 biocheminis charakterizavimas

Atliekant LipBST ir EstAG lipolizinių fermentų biocheminį charakterizavimą, kiekviename etape matuojamas lipolizinis aktyvumas kaip aprašyta 2.9 poskyryje. Nepaveikto fermento santykinis aktyvumas prilygintas 100 %.

2.16.1 Optimalių fermentų aktyvumui temperatūros ir pH nustatymas taikant PAM

Paviršiaus atsako metodologija, PAM (angl. *response surface methodology, RSM*) – tai statistinių ir matematinių metodų rinkinys, skirtas eksperimento planavimui, modelio sudarymui bei proceso optimizacijai. Kiekvieną reakciją ar procesą galima atlikti skirtingomis sąlygomis, nuo kurių priklauso reakcijos išeiga ar proceso efektyvumas. Tikslas – naudojant PAM optimizuoti procesą, t.y., surasti tokias nepriklausomų kintamųjų (pavyzdžiui, temperatūra, substrato ir/ar fermento koncentracija, laikas ir pan.) vertes, kad proceso rezultatas būtų geriausias. Įprastu optimizacijos atveju, vienu metu keičiamas tik vienas kintamasis, o kiti palaikomi pastovūs ir vertinama to kintamojo įtaką procesui. Šis metodas reikalauja daugybės skirtingų eksperimentų, ypač tada, jeigu procesas priklauso nuo daugiau negu dviejų skirtingų kintamųjų. Taip pat sunku aprašyti veiksnių tarpusavio sąveiką. Naudojant PAM suplanuojami eksperimentai, kuriuose keičiami visi proceso veiksniai, tokiu būdu nustatoma ne tik pavienė, bet ir bendra kintamųjų įtaka atsakui, sudaromas matematinis modelis (Šinkūnienė ir kt., 2011).

Siekiant nustatyti bendrą reakcijos temperatūros ir pH poveikį LipBST bei EstAG1 lipoliziniams aktyvumams, taikomas PAM centrinis

kompozicinis planas (angl., *central composite design, CCD*). Eksperimentinis planas ir duomenys analizuojami naudojant DesignExpert 12 (Stat-Ease) programinę įrangą. Norint nustatyti optimalias fermentų veikimui sąlygas skirtingose temperatūrose ir pH, atliekamos dispersijos (variacijos) (angl., *analysis of variance, ANOVA*), regresijos analizės ir modeliuojamas trimatis atsako paviršiaus plotas. Tokiu būdu, PAM metodologija leidžia greičiau nustatyti optimalias fermentų veikimui temperatūros ir pH reikšmes. PAM tyrimui pasirinktos kintamųjų 5 °C (EstAG1 – 15 °C) – 65 °C temperatūros ir 3-12 pH reikšmės.

2.16.2 Substratinio savitumo nustatymas

Lipazių savitumas substratui nustatomas optimaliomis fermento veikimui temperatūros ir pH sąlygomis, naudojant *p*-NPA (C_{2:0}) *p*-NPB (C_{4:0}), *p*-NPC (C_{8:0}), *p*-NPD (C_{10:0}), *p*-NPL (C_{12:0}), *p*-NPM (C_{14:0}), *p*-NPP (C_{16:0}) ir *p*-NPS (C_{18:0}) substratinius tirpalus. Trumpą (*p*-NPA, *p*-NPB) ir vidutinę anglies atomų grandinę (*p*-NPC) turintys 10 mM substratiniai tirpalai gaminami tirpinant jų atitinkamus kiekius 2-propanolyje. Kiti vidutinio ilgio (*p*-NPD, *p*-NPL) ir ilgas anglies atomų grandines (*p*-NPM, *p*-NPP, *p*-NPS) turintys substratai yra emulguojami: 17,6 mg *p*-NPD, 19,28 mg *p*-NPL, 20,97 mg *p*-NPM, 22,65 mg *p*-NPP, 24,33 mg *p*-NPS atskirai ištirpinami 6 mL 2-propanolio, o 90 mL buferinio tirpalo (50 mM Britono-Robinsono, pH 8) ištirpinama 100 mg gumiarabiko ir 207 mg natrio dezoksicholato. Į 19 mL paruošto buferinio tirpalo su gumiarabiku ir natrio dezoksicholatu, intensyviai maišant, sulašinamas 1 mL *p*-NPD/*p*-NPL/*p*-NPM/*p*-NPP/*p*-NPS tirpalo (ruošiamas substrato tirpalo tūris priklauso nuo mėginių kiekio, tačiau išlaikomas 1:19 substrato ir buferio santykis). Taip paruošta substrato emulsija tinkama naudoti ~2 val. Lipolizinis aktyvumas nustatomas kaip aprašyta 2.9 poskyryje.

2.16.3 Termostabilumo nustatymas

Fermentų termostabilumas analizuojamas nustatant liekamąjį lipolizinį aktyvumą optimaliomis temperatūros ir pH sąlygomis po fermentų inkubavimo be substrato. Fermentai inkubuojami nuo 60 iki 240 min., 25, 35, 45, 55 ir 65 °C temperatūrose LipBST atveju ir 25, 30, 35, 40, 45, 50 °C temperatūrose, analizuojant EstAG1 fermento termostabilumą.

2.16.4 Fermentų kinetinių konstantų nustatymas

Pagrindiniai LipBST kinetiniai parametrai nustatomi naudojant 40 mM pradinės koncentracijos *p*-NPB, *p*-NPC ir *p*-NPD substratinius tirpalus. EstAG1 kinetiniai parametrai matuojami naudojant skirtingas *p*-NPC substrato koncentracijas. Michaelis-Menten konstanta (K_M) ir maksimalus reakcijos greitis (V_{max}) analizuojami, remiantis Michaelis-Menten lygtimi taikant Lineweaver-Burk linearizavimo metodą (Lineweaver ir Burk, 1934), naudojant GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc., USA) programą. Fermentų apskukų skaičius (k_{kat} - katalizinė konstanta) ir kinetinis efektyvumas (k_{kat}/K_M) apskaičiuojami pagal formules $V_{max} / [E_0]$ ir k_{kat}/K_M , atitinkamai. $[E_0]$ – bendra fermento koncentracija reakcijos mišinyje. Reakcijos sąlygos: LipBST: 35 °C, 50 mM Briton-Robinson buferinis tirpalas, pH 9; EstAG1: 45 °C, 50 mM Briton-Robinson buferinis tirpalas, pH 8. Lipolizinis aktyvumas matuojamas kaip aprašyta 2.9 poskyryje.

2.16.5 Metalų jonų, detergentų, organinių tirpiklių ir kitų junginių įtakos fermentiniam aktyvumui nustatymas

Įvairių metalų jonų (K^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} ; 5 mM), slopiklių (EDTA, Pefabloc-SC, 5 mM), detergentų (Tween 40, Tween 60, Tween 80, Triton X-100, NDS; 1 %, v/v), chaotropinės medžiagos karbamido (1 %, v/v), organinių tirpiklių (2-propanolio, etanolio, metanolio, acetono, *n*-heksano, DMSO; 50 % v/v) poveikis LipBST aktyvumui nustatomas inkubuojant fermentą su šiomis medžiagomis 30 min. 35 °C temperatūroje, pH 9. Liekamasis lipolizinis aktyvumas matuojamas standartinėmis reakcijos sąlygomis (35 °C, pH 9 naudojant *p*-NPB ir *p*-NPC substratus). Nepaveikto LipBST santykinis aktyvumas prilygintas 100 %.

EstAG1 atveju, įvairių cheminių agentų poveikis buvo tiriamas į standartinės fermentinės reakcijos (45 °C, pH 8, matuojama naudojant *p*-NPC) mišinį pridėdant 1 mM ir 5 mM K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , chelatoriaus EDTA; 0,02; 0,05; 0,1 ir 0,5 % Tween 20, Tween 60, Tween 80, Triton X-100, NDS arba CTAB; 0,5; 1; 5, 10; 20% etanolio, metanolio, dimetilsulfoksido (DMSO), dioksano, *n*-heksano, *tert*-butanolio, acetono ir 2-propanolio. Jeigu po poveikio tam tikromis medžiagomis nustatomas fermento aktyvumo padidėjimas arba fermentas nepraranda aktyvumo, tiriamas EstAG1 stabilumas, inkubuojant 30 min., 25 °C, pH 8 su 1 mM atitinkamų metalų jonų, 1 % (v/v) detergentų, 50 % (v/v) organinių tirpiklių. Liekamasis EstAG1 lipolizinis aktyvumas matuojamas

standartinėmis reakcijos sąlygomis (45 °C, pH 8, naudojant *p*-NPC). Nepaveikto EstAG1 santykinis aktyvumas prilygintas 100 %.

2.16.6 Fermentų regiosavitumo nustatymas

Tiriamųjų fermentų pozicinio savitumo (regiosavitumo) nustatymui kaip substratai naudojami linų sėmenų aliejus (LipBST regiosavitumo įvertinimui) ir 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerolis (EstAG1 regiosavitumo įvertinimui). Reakcijos atliekamos vandeniniame reakcijos tirpale su substratu ir fermentiniais tirpalais supilstytais santykiu nuo 1:1 iki 1:10, atitinkamai. Reakcijos mišiniai inkubuojami maišant nuo 1 iki 24 val. kambario temperatūroje. Kontrolei, minėtomis sąlygomis linų sėmenų aliejus ir 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerolis inkubuojami su žinomo regiosavitumo komercine lipaze - Lipolase L100 (Novozymes, Danija), taip pat vykdoma reakcija, kur riebalinis substratas nėra veikiamas fermento. Iš reakcijos mišinio, pasirenkant skirtingas inkubavimo val., renkami mėginiai, kuriuose reakcija stabdoma dietilo eteriu (santykiu 1:1). Iki chromatografinės analizės mėginiai patalpinami į -20 °C. Gauti produktai analizuojami pasitelkiant plonasluoksnę chromatografiją (2.19 poskyris).

2.16.7 LipBST gebos katalizuoti natūralių riebalinių medžiagų hidrolizę įvertinimas

LipBST geba katalizuoti natūralių riebalinių medžiagų hidrolizę vertinama naudojant trioleiną, rapsų, linų sėmenų aliejus bei kiaulių taukus. Hidrolizės mišinį sudaro 0,4 mL tiriamos riebalinės medžiagos sumaišytos su skirtingais kiekiais LipBST (nuo 0,05 mg/mL iki 0,5 mg/mL). Paruošti mėginiai inkubuojami ~24 val. 35 °C temperatūroje maišant. Renkami mėginiai (po 50 µL) tirpinami dietilo eteryje santykiu 1:1. Norint nustatyti hidrolizės produktus, mėginių organinio tirpiklio ir vandeninės fazės analizuojamos taikant plonasluoksnę chromatografiją (2.19 poskyris).

2.17 Lipolizinių fermentų imobilizavimas ant oktilsefarozės ir cukraus fabriko atliekų pirolizės produkto

Paruošiama oktilsefarozės nešiklio suspensija: 2 g hidrofobinių dalelių praplaunami 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) buferio ir centrifuguojami 1 min. 4000 × g, 4 °C. Taip paruošta oktilsefarozė sumaišoma su 5-10 mL 0,1-0,5 mg/mL rekombinantinio LipBST ištirpinto 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 7,5) ir, švelniai maišant, inkubuojama kambario temperatūroje.

LipBST imobilizacija ant oktilsefarozės patvirtinama preparato supernatante matuojant lipolizinį aktyvumą (2.9 poskyris) ir baltymų koncentraciją Bradfordo metodu. Efektyvios imobilizacijos atveju pastarųjų rodiklių reikšmės reikšmingai sumažėja. Taip paruoštas fermentinis preparatas nucentrifuguojamas ir analizuojamas nustatant optimalias veikimui temperatūros ir pH sąlygas, įvertinamas termostabilumas ir įvairių cheminių junginių poveikis (2.16.5 poskyris). Preparatas taip pat naudojamas fermento gebos katalizuoti peresterinimo reakcijas (rapsų aliejaus peresterinimą metanoliu) (2.18 poskyris) įvertinimui.

LipBST ant cukraus fabriko atliekų pirolizės produkto (CFAPP) imobilizuojamas analogiškai aprašytai šio fermento imobilizacijai ant oktilsefarozės dalelių. Taip pat, LipBST gebos katalizuoti sintezės reakcijas įvertinimui, fermento imobilizavimas ant CFAPP vykdomas taikant kitą, ankstesniuose darbuose sėkmingą katalizę organinėje terpėje užtikrinusią imobilizavimo metodiką (Gricajeva ir kt., 2018). Imobilizavimui 2 g nešiklio sumaišoma su -20 °C temperatūroje atšaldytu acetonu. Nešiklio dalelėms homogeniškai pasiskirsčius, pridedama 5-10 mL 0,1-0,5 mg/mL rekombinantinio LipBST ir inkubuojama 30 min. Nešiklio padengo LipBST precipitatas džiovinamas 4 °C temperatūroje.

2.18 Imobilizuoto LipBST rapsų aliejaus peresterinimas metanoliu

Rapsų aliejaus peresterinimo metanoliu (biodyzelino gavimo) įvertinimui paruošiamas reakcijos mišinys, kurį sudaro: 0,4 mL rapsų aliejaus, 0,2 mL metanolio, 5 mL *n*-heksano bei 1 g imobilizuoto fermentinio preparato. Identiški reakcijų mišiniai be fermento bei pridedant 1 g oktilsefarozės arba atitinkamą kiekį CFAPP sudaro reakcijų kontroles. Fermentinė reakcija vykdoma 25 °C purtant 250 aps/min. Nuo reakcijos pradžios iki 96 val. kas 2-10 val. iš reakcijos mišinių renkami mėginiai po 50 µL. Reakcija mėginiuose sustabdoma įpilant 50 µL dietilo eterio ir užšaldant -20 °C temperatūroje. Mėginiai analizuojami taikant plonasluoksne chromatografiją.

2.19 Plonasluoksne chromatografija

Hidrolizės ir peresterinimo reakcijų produktų analizė atliekama naudojant TLC Silica Gel G-25 UV-254 plonasluoksne chromatografijos stiklines 5×10 cm ir 10×10 cm plokšteles (0,25 mm silikagelio sluoksniu dengtos stiklinės plokštelės) (MACHERY-NAGEL). Mėginiai po 2-10 µl

užnešami ant plokštelės 8-10 mm atstumu vienas nuo kito, 10 mm atstumu nuo kraštų. Po mėginių užnešimo plokštelės džiovinamos ir dedamos į chromatografinį indą su judriąja plonasluoksnės chromatografijos faze, kurią hidrolizės produktų išskirstymui sudaro petrolio eterio, dietilo eterio bei ledinės acto rūgšties mišinys supilstytas santykiu 80:20:2 (v/v/v). Peresterinimo produktų išskirstymui naudojama tokia pati tirpiklių sistema tik medžiagos supilstomos santykiu 85:15:2 (v/v/v). Judriajai fazei pakilus iki norimo aukščio, plokštelė išimama ir 5 min. džiovinama traukos spintoje. Produktų detekcijai chromatogramos ryškinamos jodo garais prisotintose kamerose (Kazlauskas ir kt., 2015).

2.20 LipBST ir EstAG1 erdvinių struktūrų modeliavimas

LipBST ir EstAG1 trimačių struktūrų modeliavimas atliekamas naudojant automatinius baltymų struktūros homologijos modeliavimo bioinformatinius žiniatinklio serverius tokius, kaip SWISS-MODEL (swissmodel.expasy.org/) ir Iterative ASSEMBLY Refinement (I-TASSER) (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). Tikslinių baltymų modeliai serveriuose kuriami, remiantis prieinamais LipBST ir EstAG1 artimiausių nustatytos struktūros homologų šablonais. LipBST modelio kūrimui naudoti programų atrinkti 3D šablonai: *B. subtilis* lipazė (PDB: LI6W), *B. subtilis* lipazės A mutantas (PDB: 3QZU), *Archeoglobus fulgidus* ATCC 49558 lipazė (PDB: 2ZYR), *B. subtilis* lipazė A (PDB: 5CTA). EstAG1 modelio kūrimui naudoti nustatytos trimatės struktūros baltymų šablonai: *S. aureus* numanoma esterazė (PDB: 3D7R), bHJL homologas EstE7 iš metagenominės bibliotekos (PDB: 3K6K), esterazės rPPE mutantas WI87H (PDB: 4OB7), hormonams jautri lipazė iš metagenominės bibliotekos (PDB: 3DNM), E40 estezės mutantas S202W / I203F (PDB: 5GMS), esterazė iš bHSL šeimos (PDB: 4XVC), karboksilesterazė EST2 komplekse su heksadekano sulfonatu (PBP: 1Q23) ir kitos. I-TASSER prognozuojami modeliai atrenkami remiantis C ir TM prognozavimo (modeliavimo) patikimumo balais. C-balas (angl., *C-score*) nurodo gauto modelio patikimumą ir TM-balas (angl., *TM-score*) yra visuotinio struktūrinio panašumo tarp gautų numanomų LipBST / EstAG1 struktūrų ir jiems sukurti naudotų baltymų šablonų). Modeliams vizualizuoti naudojama PyMOL programa.

2.21 Filogenetinė EstAG1 analizė

Taikant BLASTp algoritmą, duomenų bazėse atrenkamos didžiausia homologija su EstAG1 pasižyminčios baltymų sekos: 104 iš NCBI, 6 iš UniProt/PDB. Remiantis tuo, kad ESTHER duomenų bazėje EstAG1 pagal sekos homologiją buvo priskirtas bHJL šeimai, į analizę buvo įtrauktos papildomos mokslinėje literatūroje aprašomų baltymų a.r. sekos (prieigos nr.: AB029896, SC07131, FN985096, BAB05967, AAW62260, AAZ67909, 4Q3O.1, 3K6K.1, 3DNM.1, 4Q05.1, 4XVC.1). Galutinį duomenų rinkinį, naudojamą EstAG1 filogenetinei analizei ir filogenetinio medžio konstravimui, sudarė 122 sekos, iš kurių tik UniProt/PDB ir mokslinėje literatūroje aprašyti homologai sudarė transkripto/baltymo lygyje nustatytus ir aprašytus baltymus. Daugybiniai sekų palyginiai medžių rekonstrukcijai generuojami naudojant Clustal W (MEGA 7 programoje ir kituose žiniatinklyje prieinamuose serveriuose). Evoliucinė EstAG1 padėtis nustatoma naudojant didžiausio panašumo, DP (angl., *Maximum likelihood, ML*) metodą paremtą Jones-Taylor-Thronton (JJT) modeliu. Filogenetinis medis sudaromas naudojant MEGA 7.

2.22 EstAG1 katalizei svarbių a.r. identifikavimas

Metodas pasitelktas norint nustatyti EstAG1 lipoliziniam aktyvumui svarbias a.r. liekanas, išsidėstančias aktyviajame centre: katalizinės triados ir GDGTG konservatyviojo motyvo a.r. liekanas, bei siekiant patvirtinti, kad netradicinėje vietoje išsidėstantis Ser-179 sudaro vieną iš katalizinių a.r. liekanų ir yra itin svarbus katalizei. A.r. pakaitų įvedimui kaip matrica naudojamas pET-26b(+)_estAG1 rekombinantinis raiškos konstruktas. Tikslinių a.r. (Gly151Ser, Thr152Ala, Ser179Gly, Ser179Ala, Glu246Ala, His276Ala) pakaitos įvedamos taikant taikiniui specifinę mutagenę. Rekombinantinės plazmidės pagausinimui naudojama *Pfu* DNR polimerazė ir komplementarūs mutageniniai oligonukleotidai (2.3 lentelė). Genui komplementarūs mutageniniai pradmenys konstruojami SnapGene 1.1.3 programoje.

Mutacijos įvedamos atliekant visos pET-26b(+)_estAG1 plazmidės PGR (angl., *whole plasmid PCR*). PGR reakcijos mišinį sudaro 1× Pfu HF buferinis tirpalas, 2 mM dNTP (po 0,5 mM kiekvieno), po 0,5 μM tiesioginio ir atvirkštinio mutageninių pradmenų, *Pfu* DNR polimerazė, DNR matrica (0,5 ng/μL). Plazmidė amplifikuojama parinkus tokias PGR sąlygas: 1. pradinė denatūracija: 98 °C (30 sek), 2. denatūracija: 98 °C (30

sek.), 3. pradmenų prilydymas: 50-65 °C temperatūra nustatoma priklausomai nuo pradmenų T_m (10 sek.), 4. DNR elongacija: 72 °C (30 sek./kb), 5. galutinė elongacija: 72 °C, 7 min.). 2-4 PGR stadijos kartojamos 30 kartų. Po PGR, pradinė metilinta DNR pašalinama paveikiant gautus PGR produktus *DpnI* REaze. PGR metu pagausintos linijinės formos plazmidės veikiamos T4 DNR ligaze ir gausinamos *E. coli* DH5 α (kaip aprašyta aukščiau). Nukleotidų pakaitų (mutacijų) įvedimas patvirtinamas atliekant rekombinantinių plazmidžių sekoskaitą. Heterologinė *EstAG1* variantų raiška vykdoma *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse (2.12 poskyris). Fermentai išskiriami iš netirpios citoplazminės frakcijos ir gryninami bei analizuojami kaip aprašyta 2.15.3, 2.15.4, 2.15.6 ir 2.13 poskyriuose.

2.23 Kokybinė *estAG1* geno raiškos transkripcijos lygyje analizė *S. saprophyticus* AG1

Siekiant kokybiškai įvertinti *S. saprophyticus* AG1 genome koduojamo *estAG1* raišką transkripcijos lygyje ir nustatyti, ar tikslinio *estAG1* geno transkripcija gali būti indukuojama terpėje esančių riebalinių medžiagų, iš tiriamųjų bakterijų biomasės tam tikrais augimo momentais atitinkamose terpėse buvo skiriama suminė RNR ir atliekama AT-PGR.

2.23.1 *S. saprophyticus* AG1 suminės RNR išskyrimas

S. saprophyticus AG1 bakterijų suminės RNR išskyrimui bakterijos kultivuojamos skystose CASO / LB / mM9 (su ir be ultragarsu emulguoto 1 % tributirino) mitybinėse terpėse auginant 35 °C temperatūroje, 180 aps/min. Mėginiai suminės RNR skyrimui renkami iš skirtingų bakterijų augimo fazių: ankstyvosios, vidurinėsios, vėlyvosios eksponentinių fazių, stacionariosios ir žūties fazių. Bakterijų biomasė renkama atliekant 2 nepriklausomus auginimus minėtose terpėse. Suminė RNR skiriama naudojant komercinį *Quick-RNA Fungal/Bacterial Kit* rinkinį pagal standartinę rekomenduojamą gamintojo protokolą. Išskirta suminė RNR gryninama ir koncentruojama naudojant *RNA Clean and Concentrator-25* rinkinį. Suminės RNR mėginiai analizuojami atliekant elektroforezę agarozės gelyje kaip aprašyta 2.7 poskyryje. Prieš atliekant AT-PGR, pilnam galimų DNR priemaišų eliminavimui, suminės RNR mėginiai veikiami DNaze. Mėginių švarumas po poveikio DNaze tikrinamas atliekant 16S rDNR PGR (kaip aprašyta 2.8.1 poskyryje) naudojant išskirtos suminės RNR mėginius kaip matricą.

2.23.2 Atvirkštinės transkripcijos PGR (AT-PGR)

Atvirkštinei transkripcijai naudojami iš bakterijų biomasės mėginių išskirti suminės RNR preparatai. AT-PGR naudojamas Verso One-Step RT-PCR Kit remiantis gamintojo protokolu. AT-PGR reakcijai atlikti naudojami *S. saprophyticus* AG1 *estAG1* specifiniai pradmenys. RT-PGR (*Touchdown*) sąlygos:

- kDNR sintezė (atvirkštinė transkripcija) – 50 °C, 15 min. (1 ciklas);
- Verso AT inaktyvacija – 95 °C, 15 min. (1 ciklas);
- denatūracija – 95 °C, 20 sek. (40 ciklų);
- pradmenų prilydymas – temperatūra priklauso nuo pradmenų T_M , 30 sek. (40 ciklų, +0,2 °C/ciklui);
- grandinės ilginimas – 72 °C, 1 min. (40 ciklų);
- galutinis grandinės ilginimas – 72 °C, 5 min. (1 ciklas).

AT-PGR produktai analizuojami atliekant elektroforezę agarozės gelyje kaip aprašyta 2.7 poskyryje.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

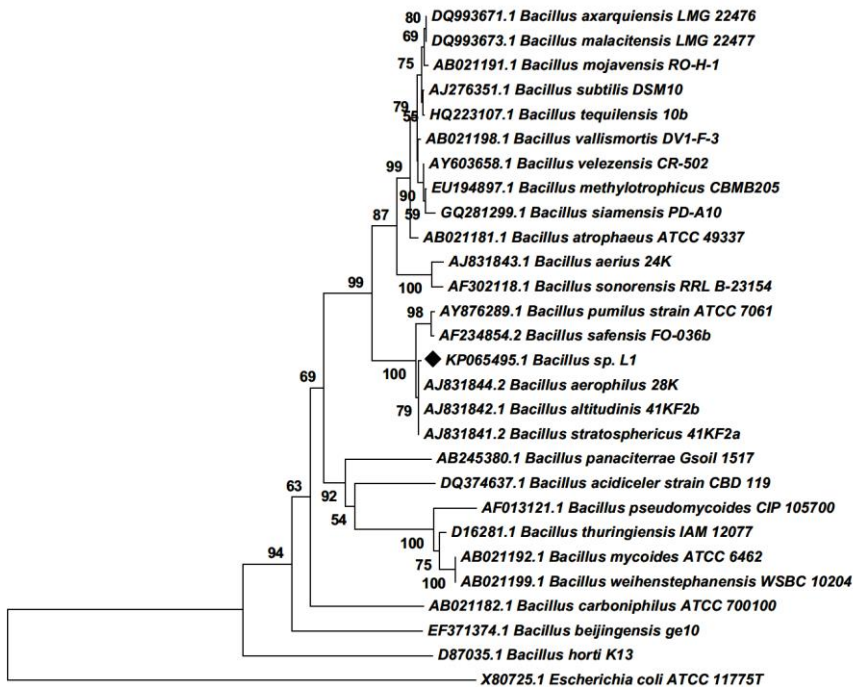
3.1 Lipolizinius fermentus produkuojančių mikroorganizmų paieška ir identifikavimas

Darbo pradžioje atlikta bakterijų, išskirtų iš riebalinėmis medžiagomis ir nafta užterštų dirvožemio mėginių bei riebalinio maisto, kokybinė atranka naudojant terpes, praturtintas riebaliniais substratais - alyvuogių aliejumi arba tributirinu. Aktyviausios kultūros atrinktos remiantis aplink jas agarizuotose selektyviose terpėse atsiradusių lipolizės skaidriu (TBA terpėje) arba fluorescencijos (RBA terpėje) zonų dydžiu (rezultatai nepateikti). Iš keletos nustatytų substratus skaidžiusių kultūrų, tolimesnei analizei buvo pasirinktos dvi: didžiausiu tiksliniu aktyvumu pasižymėjusios, 35 °C temperatūroje augusios (mezofilinės) bakterijų kultūros, kurios šiame darbe pavadintos L1 ir AG1.

3.2 L1 kultūros identifikavimas: 16S rDNR ir lipolizinių fermentų genai

L1 kultūros 16S rRNR geno sekoskaita ir tolimesnė dalinės sekos analizė atliekant BLASTn (NCBI) parodė, kad kultūra priklauso *Bacillus* genčiai. *Bacillus* – svarbi bakterijų gentis, kurią sudaro heterogeninė aerobinių arba fakultatyvinių anaerobų, endosporas formuojančių, Gram-teigiamų mikroorganizmų grupė (Liu ir kt., 2013). Dėl savo metabolinės įvairovės ir efektyvaus sporų plitimo, *Bacillus* yra kosmopolitinė. Šiai dienai *Bacillus* gentį sudaro 371 patvirtinta rūšis (bacterio.net/bacillus.html).

Tolimesnė tiriamosios lipolizinės L1 kultūros 16S rDNR sekos filogenetinė analizė atskleidė, kad lyginant su tipinių *Bacillus* sp. kamienų 16S rDNR sekomis, L1 filogenetiškai artimiausia *B. pumilus* grupei priklausančioms *B. stratosphericus*, *Bacillus altitudinis* ir *Bacillus aerophilus* rūšims (3.1 pav.). Be pastarųjų rūšių, *B. pumilus* grupei priklauso *B. pumilus* ir *Bacillus safensis*. Šios grupės bakterijos, nepaisant jų fenotipinės įvairovės, pasižymi dideliu genetiniu homologiškumu. Dažnai jų atskyrimui, be 16S rDNR, pasitelkiama tam tikrų namų ruošos genų filogenetinė analizė (Liu ir kt., 2013).



3.1 pav. Filogenetinis medis, iliustruojantis *Bacillus* sp. L1 evoliucinę padėtį, remiantis tipinių genties kamienų dalinėmis 16S rDNR sekomis. Šalia medžio šakų nurodyti filogenetinių medžių atsikartojimų, kai taksonai, atliekant „bootstrap“ testą (1000 pakartojimų), susigrupuoja šalia sudarydami vieną klasterį, procentinės tikimybės. Medžio šakų ilgio vienetai atitinka evoliucinio atstumo vienetus, naudotos filogenetinio medžio sudarymui. Kodai parašyti prieš kiekvieną tipinio kamieno rūšies pavadinimą nurodo jų 16S rDNR prieigos numerį GenBank. Filogenetinis medis redukuotas, atsižvelgiant į kai kurių tipinių kamienų tolimą filogenetinį giminingumą su tiriamuoju kamieniu (neiškraipant *Bacillus* sp. L1 filogenijos).

Vykdamt lipolizinių fermentų paiešką, pasitelkiant *Bacillus* sp. L1 gDNR kaip matricą, buvo pagausinti trys teorinius tikslinių fermentų dydžius atitinkantys PGR produktai, kuriems šiame darbe buvo suteikti *lipBST*, *lipBS* ir *lipBSI* pavadinimai. Gautų produktų sekoskaita atskleidė, kad jie koduoja numanomus (angl., *putative*) lipolizinius fermentus, randamus *B. stratosphericus* LAMA 585 genome. LipBST, LipBS ir LipBSI sekos buvo identiškios (100 % panašumas ir persidengimas) pagal homologiją anotuotoms triacilglicerolio lipazės, sekretuojamos (užląstelinės) lipazės acilhidrolazės ir 3 klasės lipazės (atitinkami GenBank prieigos nr.: EMI12622.1, EMI11992.1, EMI14902.1) a.r. sekoms, atitinkamai.

Nors 16S rDNR sekoskaita ir filogenetinė analizė neleidžia tiksliai identifikuoti atrasto lipolizinio L1 kamieno rūšies, jo genome PGR metodu

nustatytas ir sekoskaita patvirtintas lipolizinius fermentus koduojančių genų rinkinys (*lipBST*, *lipBS*, *lipBSI*) būdingas tik *B. stratosphericus*. Tik *lipBST* homologiškų sekų randama ir kitose *Bacillus* sp. (*B. pumilus* ir *B. altitudinis*) bakterijų genomuose. Tai leidžia daryti prielaidą, kad *Bacillus* sp. L1 iš jam nustatytų (3.1 pav.) artimų rūšių, yra artimiausias *B. stratosphericus*. Pažymėtina, kad eksperimentinių duomenų apie *B. stratosphericus* lipolizinius genus / fermentus transkripcijos / transliacijos lygyje iki šiol nėra gauta ir jie nėra aprašyti.

Bacillus sp. L1 16S rRNR dalinė geno seka patalpinta GeneBank (NCBI), sekos prieigos numeris KP065495.1.

3.3 *Bacillus* sp. L1 lipolizinių fermentų sekų analizė, *lipBST* klonavimas, raiška ir gryninimas

Nustačius, kad DNR fragmentai, kuriuos pavyko pagausinti nuo *Bacillus* sp. L1 gDNR koduoja lipolizinius fermentus, tolimesnei analizei buvo pasirinktas tik vienas - 215 a.r. lipazės/esterazės pirmtakas (22.89 kDa), kurį koduoja 648 bp, pradiniuose eksperimentų etapuose pavadintas *lipBST* (3.1 lentelė) (geno sekos prieigos nr. GeneBank: KP331444.1). Remiantis tuo, kad šį ir kitus identifikuotus lipolizinius fermentus numanomai sintetinant *Bacillus* sp. L1 kultūra buvo išskirta iš žema temperatūra pasižyminčios aplinkos bei analizuojant literatūros duomenis apie panašaus dydžio lipazes/esterazes, kurias sintetina kiti *Bacillus* sp. kamieniai, buvo padaryta prielaida, kad *lipBST* gali koduoti šalčiui atsparią lipazę (Eggert ir kt., 2003, Wi ir kt., 2014, Yadav ir kt., 2016). Kadangi vienas iš šio darbo tikslų buvo išskirti lipolizinį fermentą, kuris galėtų tarnauti aukštų temperatūrų nereikalaujančiuose, ekologiškai draugiškuose procesuose, būtent *lipBST*, buvo pasirinktas klonavimui, heterologinei raiškai, funkcinio aktyvumo charakterizavimui, pramonei aktualios įvairių natūralių riebalų hidrolizės įvertinimui bei fermento imobilizavimui.

Atlikus bioinformatinę analizę, nustatytos ir kitų *Bacillus* sp. L1 genome koduojamų lipolizinių fermentų tam tikros savybės (3.1 lentelė). Atlikus LipBS BLASTp analizę ESTHER duomenų bazėje nustatyta, kad tai $\alpha/\beta/\alpha$ - arba SGHN hidrolazių antšeimiui priklausančios, didelės įvairių lipazių ir esterazių šeimos (II šeimos pagal Kovacic ir kt., 2019) atstovas (Kovacic ir kt., 2019). Pažymėtina, kad šios šeimos fermentų tretinė struktūra ($\alpha/\beta/\alpha$ -klostė) iš esmės skiriasi nuo α/β -hidrolazėms būdingos struktūros ir yra unikali ne tik lipolizinių fermentų, bet ir visų žinomų hidrolazių tarpe. Šios šeimos fermentų aktyvusis centras panašus į Ser-His-

Asp(Glu) katalizinę triadą turinčių serino hidrolazių aktyvųjų centrą, tačiau gali neturėti rūgštinės katalizinės a.r. (Wei ir kt., 1995).

Kitas *Bacillus* sp. L1 genome koduojamas numanomas lipolizinis fermentas – LipBSI. Remiantis ESTHER ir NCBI duomenų bazėje atliktu BLASTp, LipBSI, atitinkamai, priklauso „Lipase_3“ arba XI lipolizinių fermentų šeimai (Kovacic ir kt., 2019). Šiai šeimai priklausantys fermentai savo a.r. sekomis labai skiriasi nuo kitų žinomų lipolizinių fermentų. Šiai šeimai be bakterinių lipolizinių fermentų, tokių kaip LipG (Lee ir kt., 2006) priklauso ir ferulo esterazės – mikromicetų ir kitų mikroorganizmų fermentai, gaminami ir naudojami augalų ląstelių sienelių ardymui, hidrolizuojant fenolines grupes, atsakingas už arabinoksilano skersinį sujungimą su kitomis polimerinėmis struktūromis. Taip pat šiai šeimai priklauso *Fusarium solani* fosfolipazė, pasižyminti galaktolipaziniu aktyvumu (Jallouli ir kt., 2015).

3.1 lentelė. *Bacillus* sp. L1 genome nustatyti lipoliziniai fermentai.

Aptiktas produktas			
Savybės	<i>lipBST</i>	<i>lipBS</i>	<i>lipBSI</i>
Geno dydis, bp	648	816	1490
Pirmtako ilgis, a.r.	215	271	486
Signalinė seka	Sec sistemos ir SPI signalinės peptidazės atpažįstamas signalinis peptidas, kirpimo vieta tarp N-galo Ala34 ir Ala35 a.r. pozicijų (AKA-AA)	Sec sistemos ir SPII signalinės peptidazės atpažįstamas lipoproteininis signalinis peptidas, kirpimo vieta tarp Ala36 ir Cys37 a.r. pozicijų (LSA-CS)	Signalinio peptido nėra arba nestandartinis
Subrendusio baltymo ilgis, a.r.	181	235	486 arba ?*
Numanoma pirmtakų ir subrendusių baltymų molekulinė masė, kDa	22,89 / 19,16	30,72 / 26,53	53,96 / ?
Numanoma lokalizacija	Užląstelinė terpė	Ląstelės membrana	Neaiški
Antšeimis	α/β – hidrolazė	$\alpha/\beta/\alpha$ -hidrolazė	α/β – hidrolazė

Lipolizinio fermento šeima (šm.) pagal Hitch ir Clavel (2019) ir ESTHER duomenų bazę, atitinkamai	I šm. arba tikrųjų lipazių šeima (I.4 pošeimis) arba "Lipase_2"	II šm. (ESTHER α/β -hidrolazių antšeimiui priklausantys fermentai nėra talpinami)	XI šm. arba „Lipase_3“
Numanomi EC numeriai	EC 3.1.1.3 / 1	EC 3.1.1.3	EC 3.1.1.3

* - subrendusio baltymo a.r. sekos ilgis/molekulinė masė nežinomi dėl nenustatytos, galimai šalinamos signalinės sekos.

Didžiausia tolimesnei analizei pasirinkto LipBST homologija nustatyta keturiems *B. pumilus* (AGW07449.1: 96,74 % panašumas, 100 % persidengimas, ABO32303.1: 98,57 % panašumas, 97 % persidengimas, ADK63095.1: 98,56 % panašumas, 96 % persidengimas, AAR84668.1: 93,49 % panašumas, 100 % persidengimas), *B. licheniformis* (CAB95850.2: 93,27 % panašumas, 96 % persidengimas) ir *B. subtilis* 168 (72,25 % panašumas, 97 % persidengimas) lipoliziniams fermentams. Pastarojo *B. subtilis* kamieno fermentas yra artimiausias LipBST nustatytos tretinės struktūros homologas ir pirmasis išaiškintos struktūros α/β -hidrolazių antšeimio atšovas, kuriam būdingas minimalus α/β -hidrolazės susilankstymas (van Pouderoyan ir kt., 2001). LipBST identiškų sekų randama ir kituose *Bacillus* sp. deponuotuose, automatiškai pagal homologiją anotuotuose genomuose, tačiau šios sekos neturi nuorodų į pirminę mokslinę literatūrą, tiesiogiai susijusią su fermentų charakterizavimo darbais.

LipBST ir visi jo artimiausi homologai priklauso tikrųjų lipazių šeimai, I.4 pošeimiui, kurių molekulinė masė svyruoja nuo 19 iki 21 kDa, o tai yra mažiausios iki šiol nustatytos lipazės/esterazės. Daugeliui žinomų lipolizinių fermentų būdingas konservatyvus Gly-X-Ser-X-Gly pentapeptidas su nukleofiliniu Ser, I.4 pošeimio *Bacillus* sp. lipazėse/esterazėse yra pakeistas Ala-X-Ser-X-Gly. LipBST fermentui, be konservatyviame Ala-X-Ser-X-Gly išsidėstančio Ser-111, būdingos ir kitos klasikinės, numanomai, kartu su minėtų Ser katalizinę triadą sudarančios Asp-167 ir His-190 a.r. liekanos, o PVVMVHG sekoje išsidėsto oksianijoninę angą formuojančios a.r. (Messaoudi ir kt., 2010).

Viso ilgio LipBST baltymą su numanomu 34 a.r. signaliniu peptidu koduojančio geno klonavimui į pTZ57R/T plazmidę buvo naudoti LipBST fragmentai, pagausinti naudojant LipBST1F ir LipBST1R pradmenis su restrikcijos endonukleazių taikiniai (2.3 lentelė). LipBST koduojančio geno (648 bp) sėkmingas įsistatymas į pTZ57R/T plazmidę patvirtintas teigiamų

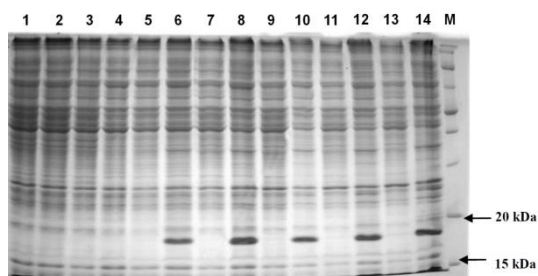
E. coli DH5 α transformantų kolonijų PGR su M13 serijos plazmidei specifiniais pradmenimis (2.3 lentelė), bei pagausintų ir iš jų išskirtų rekombinantinių plazmidžių restrikcinę analizę naudojant *Nde*I ir *Xho*I REazės.

Iš klonavimo vektoriaus iškirptas *lipBST* fragmentas sėkmingai perklonuotas į raiškos vektorių pET-26b(+). *lipBST* insertas pET-26b(+) vektoriuje patvirtintas atliekant *E. coli* DH5 α transformantų kolonijų PGR (su plazmidei specifiniais T7F/T7R pradmenimis) ir restrikcinę analizę. pET-26b(+)_*lipBST* konstrukto sekoskaita ir sekos analizė neparodė jokių žalingų ASR poslinkių.

Norint optimizuoti LipBST raišką (padidintą heterologinę baltymo sintezę), indukcija buvo lygiagrečiai atliekama skirtinguose bakterijų raiškai skirtuose kamieniuose: *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* C41 (DE3) ir *E. coli* Rosseta (DE3), transformuojant juos pET-26b(+)_*lipBST* ir auginant transformantus LB terpėje su Kan (*E. coli* Rosseta (DE3) atveju pridedama ir Cam), 37 °C temperatūroje. Po tikslinio baltymo raiškos indukcijos, bendras ląstelių baltymų profilis buvo vertinamas NDS-PAGE bei nustatomas lipolizinis aktyvumas kultūriniame skystyje (supernatante).

Tikslinio baltymo raiška gauta visuose šiam tikslui pasirinktuose kamieniuose (rezultatai nepateikti, gauti baltymų profiliai analogiškai 3.2 pav. pavaizduotiems profiliams). *E. coli* Rosetta (DE3) raiškai skirtos ląstelės ypatingos tuo, kad turi tRNR, kurios gali atpažinti daugiau specifinių kodonų (Gram-teigiamų bakterijų, eukariotų) nei kiti su pET sistema suderinami *E. coli* kamienai (Umlauf ir kt., 2015). Dėl to kelta hipotezė, kad šiame raiškos kamienoje heterologinė LipBST baltymo sintezė bus efektyvesnė lyginant su klasikiniu *E. coli* BL21 (DE3) kamieniu. Tačiau *E. coli* Rosseta (DE3) iki indukcijai tinkamo OT (šiuo optimizacijos etape buvo pasirinktas „Pet System Manual“ vadovo rekomenduojamas OT=0,6 bei 0,4 mM IPTG koncentracija) augo ilgai, o didžiausias baltymų kiekis ir aktyvumas gautas tik 5 val. po indukcijos. Taip pat lyginant su *E. coli* BL21 (DE3) ir C41 (DE3) gautais bendrų baltymų profiliais NDS–PAGE geliuose, *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelėse kokybiškai nustatyti mažiausi baltymų kiekiai. *E. coli* C41 (DE3) indukuotose ląstelėse gautas kokybiškai didžiausias tikslinio baltymo (4, 5 ir 6 val. po indukcijos) kiekis, bet, nustatant baltymo lokalizaciją ir matuojant aktyvumą užląstelinės terpės frakcijoje nustatyta, kad LipBST *E. coli* C41 (DE3) ląstelėse telkiasi į netirpius kūnelius (agreguoja) ir dėl to šis kamienas tolimesniuose darbuose taip pat nebuvo naudojamas. Klasikiniame *E. coli* BL21 (DE3) po LipBST raiškos pradžios,

didžiausias lipolizinis aktyvumas supernatante ir bendras baltymų kiekis ląstelėse nustatytas 2 val. po indukcijos (3.2 pav.). Šiame raiškos kamienne gautas tirpus rekombinantinis LipBST baltymas. Įvertinus indukcijos rezultatus, rekombinantinio sekretuojamo LipBST sintezei ir tolimesnei jos optimizacijai buvo pasirinktas klasikinis, vienas dažniausiai raiškai naudojamų - *E. coli* BL21 (DE3) kamienas. 3.2 paveiksle pavaizduoti po IPTG indukcijos gauti *E. coli* BL21 (DE3) su pET-26b(+)_lipBST ląstelių baltymų profiliai. Vykdamt raišką, tikslinis baltymas nustatytas ties ~19 kDa baltyminiu žymeniu, kas atitinka subrendusio (su pašalintu 34 a.r. liekanų signaliniu peptidu bei C-gale prijungtais 6×His) LipBST dydį.

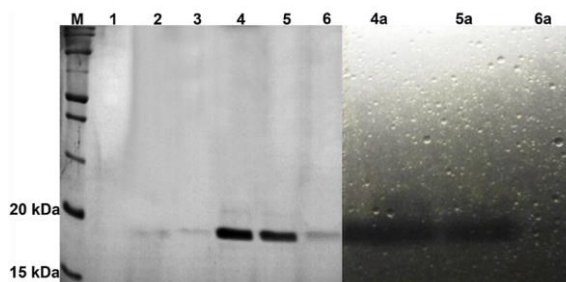


3.2 pav. *E. coli* BL21 (DE3) transformantų bendrų baltymų kiekių profiliai. 1, 2, 3, 4 – kontrolės: 1 - neindukuotų *E. coli* be pET-26b(+)_lipBST konstrukto baltymų profilis; 2 - indukuotų *E. coli* be pET-26b(+)_lipBST baltymų profilis; 3 – neindukuotų *E. coli* su tuščia pET-26b(+) baltymų profilis; 4 - indukuotų *E. coli* su pET-26b(+) baltymų profilis; 5, 7, 9, 11, 13 – kontrolinių, neindukuotų 1, 2, 3, 4 ir 5 val. po indukcijos paimtų ląstelių mėginių baltymų profiliai; 6, 8, 10, 12, 14 – indukuotų 1, 2, 3, 4, 5 val. po indukcijos paimtų ląstelių mėginių baltymų profiliai; M – PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder baltymų molekulinės masės žymuo (Thermo Fisher Scientific).

Kontrolinėse neindukuotose *E. coli* BL21 (DE3) su pET-26b(+)_lipBST ląstelėse užfiksuotas mažas santykinis lipolizinis aktyvumas, sukeltas bazinės raiškos, o tiriant *E. coli* BL21 (DE3) be pET-26b(+)_lipBST baltymų profilius, tiriamojo baltymo sintezė nenustatyta.

Toliau atliekant LipBST sintezės optimizaciją *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse nustatyta, kad iš dviejų pasirinktų raiškos tyrimams terpių (LB / M9), daugiau aktyvaus baltymo gauta LB terpėje. Tinkamiausias indukcijai, gaunant didesnę kiekį aktyvaus baltymo, nustatytas OT₆₀₀=0,4, o M9 terpėje – 0,8. Tiriant optimalią indukcijai galutinę IPTG koncentraciją (0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM ir 1 mM), didelės įtakos LipBST sintezei nebuvo nustatyta, dėl to indukcijai buvo pasirinkta ir naudojama mažiausia tinkanti 0,1 mM IPTG koncentracija.

LipBST gryninimui buvo naudojamas nuo rekombinantinių ląstelių atskirtas supernatantas. LipBST iš supernatanto sukonzentruotas atliekant išsodinimą amonio sulfatu, kurio 60 % įsotinimo laipsnis tirpale buvo tinkamas minėtam tikslui pasiekti. Po dializės, pašalinus likutinį amonio sulfatą ir atlikus buferių mainus, LipBST fermentinis tirpalas buvo gryninamas atliekant IMAC nedenatūruojančiomis sąlygomis. Nustatyta, kad fermento gryninimui optimali imidazolio koncentracija eliuacijos buferyje yra 300 mM. Gautų frakcijų NDS-PAGE analizės rezultatai pateikti 3.3 paveiksle.



3.3 pav. Išgryninto LipBST IMAC frakcijų NDS-PAGE (kairėje) ir zimograma. 1, 2, 3 – neprisijungusių baltymų frakcijos; 4, 5, 6 – LipBST eliuacijos frakcijos. Zimogramoje 4a, 5a ir 6a pažymėti takeliai atitinka 4, 5, 6 takelius NDS-PAGE. M -baltymų molekulinės masės žymuo PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder.

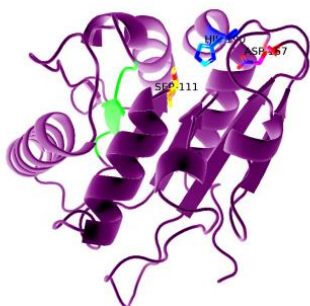
Kaip parodė NDS-PAGE rezultatai, tikslinis LipBST lipolizinis fermentas buvo sėkmingai išgrynintas ir tinkamas tolimesniems tyrimams.

3.4 LipBST erdvinės struktūros modelis

LipBST tretinės struktūros modelio sudarymui buvo pasitelkta I-TASSER automatinė erdvinės baltymų struktūros modeliavimo sistema. Iš penkių programos sudarytų modelių, kurie buvo sukurti remiantis tam tikrais žinomos tretinės struktūros artimiausių baltymų šablonais, buvo pasirinktas vienas, pasižymėjęs didžiausiais modelio patikimumo įverčiais (balais): - 1,17 C-balu ir $0,57 \pm 0,15$ T-balu. Sumodeliuota numanoma LipBST erdvinė molekulinė struktūra pavaizduota 3.4 pav.

LipBST ir visi nustatyti jo artimiausi homologai – tai mažiausios iki šiol aprašytos ir žinomos lipazės/esterazės, kurioms būdingas kompaktiškas, minimalus α/β -hidrolazės sulankstymas, sudarytas iš 6 lygiagrečių β -juostų, kurias juosia 5 α -spiralės: dvi vienoje β -lakšto pusėje ir trys – kitoje. Numanomos LipBST katalizinės triados a.r. liekanos (Ser-111, Asp-167 ir His-190) bei oksianijoninę angą formuojančios a.r. liekanos išsidėsto

pozicijose būdingose visiems panašiams išaiškintos struktūros I.4 pošeimio *Bacillus* sp. lipoliziniams fermentams (van Pouderoyen ir kt., 2001).



3.4 pav. LipBST erdvinės struktūros modelis. Violetinė spalva žymi minimalų α/β -hidrolazės klostės sudaromą katalizinį domeną. Žalia spalva žymimas oksianijoninę angą formuojantis a.r. liekanų motyvas. Molekulės modelio viršutinėje dalyje parodytos trys numanomai katalizinę triadą sudarančios a.r. liekanos: Ser-111, Asp-167 ir His-190.

Taip pat sumodeliuotoje tretinėje LipBST struktūroje, kaip ir artimiausiuose žinomos išaiškintos struktūros homologuose, nėra dangtelio domeno ir numanomai katalizinę triadą sudarančios a.r. liekanos yra atidengtos ir veikiamos tirpalo, supančio baltymą. Viename iš panašiausių išaiškintos struktūros baltymų – *B. subtilis* LipA struktūroje oksianijoninė anga yra iš anksto suformuota ir jos konformacija katalizės metu nesikeičia. Priešingai vyksta lipoliziniuose fermentuose turinčiuose dangtelio domeną, kuris didele dalimi įgalina tokių fermentų katalizės procesą – čia oksianijoninę angą sudarančių a.r. motyvo formuojama struktūra keičia konformaciją fermentui pereinant iš uždaros į atvirą, kataliziškai aktyvią formą (Guncheva ir Zhyriakova, 2011).

3.5 LipBST charakterizavimas

3.5.1 LipBST temperatūros ir pH optimumas, termostabilumas

Temperatūra ir pH – vieni svarbiausių veiksnių, lemiančių fermentų katalizuojamų reakcijų greitį, todėl tiriant jų veiklą *in vitro*, temperatūros ir pH poveikio nustatymas yra vienos pirminių ir būtinų sąlygų optimalaus fermentų aktyvumo įvertinimui. Dėl to, LipBST veikimas, pirmiausia, buvo optimizuotas įvertinant šių dviejų veiksnių įtaką. Norint atlikti greitesnę pasirinktų veiksnių įtakos fermentiniam aktyvumui analizę, buvo pasitelkta DesignExpert 12 programinės įrangos PAM, leidusi įvertinti abiejų pasirinktų veiksnių bendrą įtaką. Eksperimentinis planas ir atsakas bei atliktos dispersinės analizės (ANOVA) duomenys pateikti 3.2 ir 3.3 lentelėse.

3.2 lentelė. Eksperimentinis planas ir atsako įverčiai (santykinis aktyvumas, %) gauti atliekant bendro temperatūros ir pH poveikio įvertinimą optimaliam LipBST veikimui (aktyvumui).

<i>Matavimo nr.</i>	<i>Veiksny 1 A: Temperatūra, °C</i>	<i>Veiksny 2 B: pH</i>	<i>Atsakas 1 Santykinis aktyvumas, U/mg</i>
1	35	7,5	100 ± 0,9023
2	65	12	0
3	-7,43	7,5	0
4	77,43	7,5	0
5	35	7,5	97,56 ± 1,8723
6	35	7,5	90,45 ± 0,0733
7	35	7,5	98,23 ± 1,5642
8	35	13,86	3,09 ± 0,0026
9	5	3	0
10	65	3	0
11	35	7,5	94,12 ± 0,3451
12	35	1,14	0
13	5	12	0

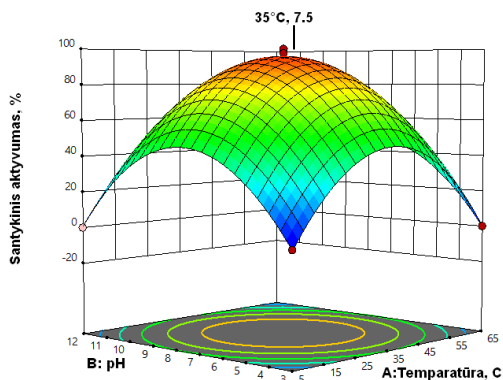
Modelio bei jį sudarančių kintamųjų reikšmingumas aprašomas F- ir p-reikšmėmis (3.3 pav.).

3.3 lentelė. LipBST aktyvumo skirtingose temperatūrose ir pH optimizacijos modelio ANOVA.

	Kvadratų suma	df	Vidutinis kvadratas	F-reikšmė	p-reikšmė	
<i>Modelis</i>	28176,71	5	5635,34	643,66	< 0.0001	<i>Reikšminga</i>
A-Temperatūra	0,0000	1	0.0000	0,0000	1,0000	
B-pH	2,39	1	2,39	0,2726	0,6177	
AB	0,0000	1	0.0000	0,0000	1,0000	
A ²	16181,41	1	16181,41	1848,21	<0.0001	
B ²	15667,20	1	15667,20	1789,48	<0.0001	
<i>Likutinė paklaida</i>	61,29	7	8,67			
Atitikimo nebuvimas	3,58	3	1,19	0,083	0,9659	<i>Nereikšmingas</i>
Teorinė paklaida	57,71	4	14,43			
<i>R²: 0.9978</i>						

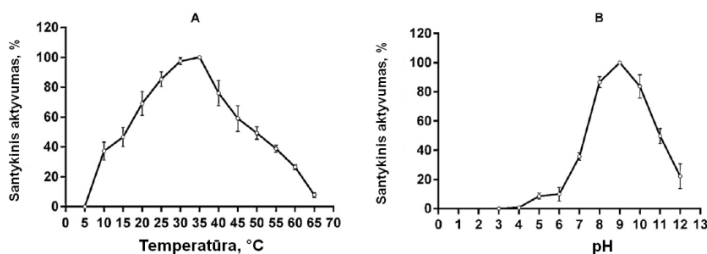
F-reikšmė apibūdina modelio/jo dedamosios ir atitinkamos paklaidos dispersijų santykį, todėl, jai esant arti vieneto arba žemesnei, mažai tikėtina, jog modelis ar kintamasis bus reikšmingas. p-reikšmė laikoma statistiškai patikima esant $p < 0,05$. Sudaryto modelio F- ir p-reikšmės buvo 643,66 ir <0,0001, atitinkamai. Tai parodo, kad modelis yra reikšmingas, t.y.,

statistiškai tinkamas aprašyti ryšį tarp nepriklausomų kintamųjų (temperatūros ir pH) bei atsako. Apskaičiuotas determinacijos koeficientas (R^2) - 0,9978. Tokia šio koeficiento reikšmė parodo, kad net 99,78 % atsako priklauso nuo pasirinktų kintamųjų, o likę 0,22 % nėra aprašomi sudaryto statistinio modelio. PAM analizės atsako paviršiaus plotas, apibūdinantis bendrą temperatūros ir pH poveikį optimaliam LipBST lipolizinio fermento aktyvumui pavaizduotas 3.5 paveiksle.



3.5 pav. PAM analizės atsako paviršiaus plotas. Optimizavimo rezultatai: 35 °C, pH 7,5. Naudotas substratas: *p*-NPB.

Kadangi programos sukurtas siūlomas eksperimentinis planas (3.2 lentelė) apėmė pakankamai siauras įverčių ribas (net ir programiškai pasirenkant didesnę matavimų skaičių), norint išsamiau ištirti ir plačiau įvertinti temperatūros ir pH poveikį LipBST aktyvumui, nuspręsta pritaikyti ir klasikinę fermento veikimo priklausomybės nuo temperatūros ir pH tyrimą, įvertinant šių veiksnių įtaką atskirai (3.6 pav.).



3.6 pav. LipBST veikimo priklausomybės nuo (A) temperatūros ir (B) pH, pamatuotų vertinant šių veiksnių poveikį fermentiniam aktyvumui atskirai.

Atlikus matavimus, nustatyta, kad LipBST aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros sudaro tipišką varpo formos priklausomybę ir, kad išgrynintas LipBST fermentas, kaip ir buvo nustatyta įgyvendinant PAM

eksperimentinį planą, didžiausiu aktyvumu pasižymėjo 35 °C temperatūroje. Visgi, tokia pati aktyvumo vertė nustatyta 30 °C temperatūroje. Rezultatai parodė, kad LipBST geba veikti plačiose temperatūrų ribose: nuo 10 °C iki 65 °C. 10 °C temperatūroje LipBST pasiekė 37 % aktyvumo, o 20 °C – 70 %. Keliant temperatūrą virš nustatytos optimalios veikimo temperatūros, LipBST aktyvumas krito greičiau negu temperatūrų diapazone nuo 10 °C iki 30-35 °C (3.6 pav., A). Tiriant LipBST termostabilumą, buvo nustatyta, kad visą inkubavimo skirtingose temperatūrose laiką fermentas pasižymėjo didesniu nei 70 % liekamuojų aktyvumu (3.4 lentelė), o 2-3 val. 35 °C temperatūroje buvo užfiksuotas 128 ± 1 % ir 118 ± 6 %, atitinkamai, liekamasis LipBST aktyvumas.

3.4 lentelė. LipBST termostabilumo analizės rezultatai.

Temperatūra, °C	Liekamasis LipBST aktyvumas (%) skirtingomis inkubavimo val.			
	1 val.	2 val.	3 val.	4 val.
25	93 ± 2	96 ± 1	89 ± 5	83 ± 3
35	97 ± 4	126 ± 1	118 ± 6	95 ± 2
45	79 ± 2	85 ± 2	78 ± 1	81 ± 2
55	55 ± 1	71 ± 7	70 ± 1	77 ± 7
65	0,36 ± 0,4	0	0	0

Remiantis fermento veikimo priklausomybės nuo temperatūros ir termostabilumo tyrimo rezultatais galima daryti išvadą, kad fermentas tolerantiškas žemesnėms temperatūroms, geriausiai veikia vidutinėse (mezofilinėse) temperatūrose (Rashid ir kt., 2001, Feller ir Gerday, 2003, Litantra ir kt., 2013), bet pakankamu stabilumu pasižymi ir aukštesnėse temperatūrose (>50 % aktyvumas 45-55 °C temperatūrose 4 val.).

Fermentų aktyvumą žemose temperatūros apsprendžia baltymo specifinių struktūrų prigimtis ir įgyjamos konformacijos. Šalčiui atsparūs baltymai dažniausiai pasižymi didesniu lankstumu ir juose natūraliai sutinkamas mažesnis stabilizuojančių sąveikų bei a.r. kiekis (Rabbani ir kt., 2015). LipBST atveju nustatyta, kad šio fermento struktūrai nėra būdingi disulfidiniai tilteliai ar prostetinės grupės, kas kartu su kitomis baltymo stabilumą apsprendžiančiomis savybėmis (didelis Pro a.r. liekanų kiekis ir kt.) dažnai būdinga karščiui atspariems fermentams. Remiantis gautomis LipBST temperatūros savybėmis, fermentas galėtų būti naudojamas ekologiškai draugiškų procesų katalizėje, kur gamyba nereikalauja aukštų temperatūrų.

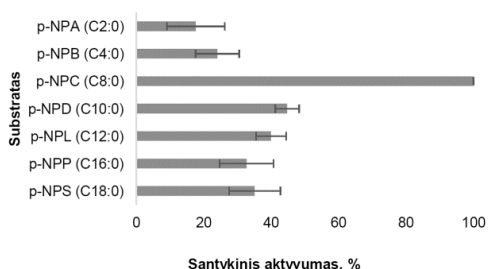
Klasikinis LipBST aktyvumo priklausomybės nuo skirtingų vandenilio jonų koncentracijų terpėje tyrimas parodė, kad šis fermentas yra

alkalifilinis lipolizinis fermentas - didžiausias aktyvumas pasiekiamas, kai aplinkos pH 9 (3.6 pav., B). Apie 90 % liekamasis aktyvumas taip pat buvo užfiksuotas pH 8 ir 10. Fermentas nebuvo aktyvus, kai aplinkos pH 3-4, o pH 5-6 ir 7 buvo nustatytas 10 % ir 40 %, atitinkamai, santykinis liekamasis aktyvumas. pH diapazone aukštesniame negu 10 LipBST pasižymėjo ~50 % (pH 11) ir 30 % (pH 12) liekamuųjų aktyvumu. LipBST aktyvumo optimumas šarminiam pH lemiamas tuo, kad būtent tokioje aplinkoje tam tikros polipeptidinės grandinės a.r. liekanos įgyja katalizei ir stabilumui svarbią ir tinkamą jonizaciją. Dažnai pH svarbus ir tam tikrai katalizei tinkamai substrato jonizacijai įgyti.

Alkalifilinės lipazės yra svarbios detergentų pramonėje. Žinomi *Bacillus* sp. lipoliziniai fermentai, kurie yra stabilūs tiek neutraliame, tiek šarminiame pH. Įvairiems pramoniniams procesams dažnai patraukliausias yra pH 9 ir aukštesniame pH aktyvios lipazės/esterazės. Yra žinomos keletas *Bacillus* sp. lipazių optimaliai veikiančių rūgštiniame pH. Tokios lipazės yra naudojamos odos apdirbimo pramonėje (Guncheva ir Zhyriakova, 2011).

3.5.2 LipBST substratinis savitumas, regiosavitumas ir kinetiniai parametrai

Norint nustatyti, kokio ilgio anglies atomų grandinę turintiems substratams savitas tikslinis fermentas, buvo naudoti sintetiniai *p*-NP esteriai. Kaip nurodyta histogramoje (3.7 pav.), LipBST didžiausiu aktyvumu pasižymėjo vidutinio anglies atomų grandinės ilgio *p*-NPC ($C_{8:0}$) substrato atžvilgiu, tačiau gebėjo katalizuoti ir trumpagrandžių ($C_{2:0}$, $C_{4:0}$), kitų vidutinės grandinės ($C_{10:0}$, $C_{12:0}$) ir ilgagrandžių ($C_{16:0}$, $C_{18:0}$) *p*-NP hidrolizę.



3.7 pav. LipBST substratinis savitumas skirtingą anglies atomų grandinės ilgi turinčių *p*-NP esterijų atžvilgiu.

Didžiausias optimaliomis sąlygomis (35 °C, pH 9, *p*-NPC) nustatytas LipBST aktyvumas – 6244,5 U/mg. Toks savitasis aktyvumas, lyginant su literatūroje aprašomais įvairių lipolizinių fermentų aktyvumais, yra didelis.

Tolimesnis šiame darbe atliktas LipBST charakterizavimas ir veikimo priklausomybių nuo įvairių aplinkos veiksnių nustatymas buvo vykdomas palaikant minėtas optimalias fermento veikimui sąlygas.

Pagrindinės kinetinės LipBST konstantos nustatytos atliekant fermento veikimo priklausomybės nuo substratų koncentracijos tyrimą. Šiam tikslui buvo pasirinkti trys skirtingi *p*-NP substratai: *p*-NPB ($C_{4:0}$), *p*-NPC ($C_{8:0}$) ir *p*-NPD ($C_{10:0}$). Gautų LipBST kinetinių konstantų trijų skirtingų substratų atžvilgių skaitinės reikšmės pateiktos 3.5 lentelėje. Žemiausia K_M ir didžiausios katalizinės konstantos (k_{kat}) bei fermento kinetinio efektyvumo (k_{kat}/K_M) vertės buvo gautos tiriant *p*-NPC substrato koncentracijos įtaką LipBST fermentinės reakcijos greičiui. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad fermentas giminingiausias *p*-NPC - vidutinę anglies atomų grandinę turinčiam substratui, nes šio substrato koncentracija, reikalinga pusei maksimalaus reakcijos greičio pasiekti, buvo 1,5 ir 57 kartų žemesnė nei reikalinga matuojant su *p*-NPB ir *p*-NPD, atitinkamai. Toks giminingumas substratui ir kinetinis efektyvumas *p*-NPC atžvilgiu gali būti aiškinamas savita LipBST struktūrine prigimtimi – dangtelio domeno nebuvimu. Nustatyta, kad fermentuose, pasižyminčiuose minimaliu α/β -hidrolaziniu susilankstymu, fermentas geriausiai katalizuoja ne ilgesnę nei $C_{8:0}$ anglies atomų grandinę turinčius substratus. Fermentas lengviau išdėsto/talpina substratus su trumpesnėmis anglies atomų grandinėmis, o ilgesnes anglies atomų grandines turintys substratai išsikiša nuo fermento paviršiaus ir dėl to nėra taip efektyviai hidrolizuojami (van Pouderooyen ir kt., 2001).

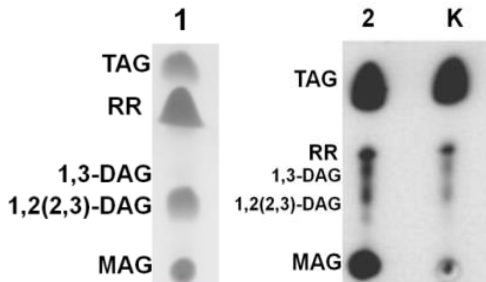
3.5 lentelė. LipBST pagrindinės kinetinės konstantos, nustatytos tiriant skirtingų *p*-NP substratų koncentracijų įtaką fermentinės reakcijos greičiui.

Substratas	V_{max} (mM min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{kat} (min ⁻¹)	k_{kat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)
<i>p</i> -NPB	1,1	5×10^{-2}	$4,6 \times 10^3$	$9,2 \times 10^4$
<i>p</i>-NPC	2,5	$3,4 \times 10^{-2}$	$9,9 \times 10^3$	$30,0 \times 10^4$
<i>p</i> -NPD	0,1	194×10^{-2}	$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^4$

LipBST regiosavitumas tirtas pasitelkiant linų sėmenų aliejų ir žinomo pozicinio savitumo komercinę lipazę kaip kontrolę. Plonasluoksnėje chromatogramoje gauti linų sėmenų aliejaus hidrolizės produktai nurodo, kad LipBST nėra atranki RR pozicijai TAG molekulėje (3.8 pav.).

Lyginant su 1,3-regiosavita lipaze Lipolase 100 L, kurios hidrolizės produktus sudarė MAG (tikėtina 2-DAG, kurio 1,3-regiosavitas fermentas toliau nehidrolizuoja) ir 1,2(2,3)-DAG (tarpiniai hidrolizės produktai), LipBST linų sėmenų aliejaus hidrolizės profilyje matomi susidarę 1,3-DAG

ir 1,2(2,3)-DAG tarpiniai hidrolizės produktai, kurie susidaro esant nespecifiniam RR skėlimui nuo TAG molekulės. Regiosavitumu nepasižymintys lipoliziniai fermentai, susidarant įvairiems tarpiniams produktams, gana greitai pilnai hidrolizuoja TAG iki laisvų RR ir glicerolio. Prie poziciniu savitumu nepasižyminčių lipolizinių fermentų priskiriama labai daug iš įvairių mikrobinių šaltinių išskirtų lipazių ir esterazių (Kapoor ir Gupta, 2012).



3.8 pav. Linų sėmenų aliejaus (LSA) hidrolizės, katalizuojant LipBST ir Lipolase 100 L, produktų chromatograma. 1 – LSA hidrolizė naudojant Lipolase 100 L, 2 – LSA hidrolizė naudojant LipBST, K – fermentų nepaveiktas LSA.

Poziciniu savitumu nepasižymintys fermentai pritaikomi daugelyje įvairių pramonės sričių, kur susidarę hidrolizės reakcijos produktai nėra svarbūs - tai detergentų pramonė, nuotekų vandenų valymas, odos apdirbimo, popieriaus perdirbimo sektoriai ir kt. (Hasan ir kt., 2005). Pramonės srityse, kur svarbu gauti tam tikras RR arba specifinius DAG, taip pat norint pakeisti vienas tam tikrose TAG molekulės pozicijose išsidėstančias RR kitomis, norint gauti struktūrizuotus lipidus, atskirti raceminius mišinius, neregiosavitos lipazės/esterazės dažniausiai nėra pritaikomos (Yokozeki ir kt., 1982).

3.5.3 Metalų jonų, detergentų ir organinių tirpiklių įtaka LipBST aktyvumui

Darbe buvo įvertinta įvairių metalų jonų įtaka fermentiniam LipBST aktyvumui, atliekant fermentinę reakciją standartinėmis sąlygomis (35 °C, pH 9, kaip aprašyta 2.9 poskyryje) naudojant *p*-NPB ir *p*-NPC substratus.

Vertinant LipBST aktyvumą po inkubacijos su įvairių metalų chloridais, nustatyta, kad visi vien- ir divalenčiai metalų jonai šiomis sąlygomis turėjo slopinantį poveikį fermentui hidrolizuojant *p*-NPB. Didžiausias 59 ± 2 % liekamasis aktyvumas nustatytas tik po poveikio Mn^{2+} . LipBST gebėjimą hidrolizuoti *p*-NPB taip pat prarado po inkubavimo su EDTA ir Pefabloc-SC (3.6 lentelė).

3.6 lentelė. Įvairių metalų chloridų ir inhibitorių poveikis LipBST aktyvumui matuojant su skirtingais *p*-NP esteriais.

Medžiaga	Liekamasis LipBST aktyvumas (%) su skirtingais <i>p</i> -NP substratais	
	<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC
<i>Metalų jonai</i>		
K ⁺	42 ± 6	98 ± 0,13
Li ⁺	34 ± 6	89 ± 0,11
Ca ²⁺	30 ± 7	90 ± 0,54
Mg ²⁺	29 ± 6	97 ± 0,12
Co ²⁺	16 ± 2	98 ± 0,001
Mn ²⁺	59 ± 2	99 ± 0,01
Ba ²⁺	44 ± 7	107 ± 0,004
Cd ²⁺	38 ± 6	106 ± 1,23
Ni ²⁺	16,2 ± 0,4	95 ± 0,07
Fe ³⁺	5 ± 1	44 ± 0,01
<i>Inhibitoriai</i>		
EDTA	9 ± 1	84 ± 0,1
Pefabloc-SC	0	3 ± 0,01

Visai kitokie rezultatai gauti po 30 min. poveikio tais pačiais metalų jonais, atliekant fermentinę reakciją su *p*-NPC (giminingiausiu LipBST substratu): po inkubavimo su visais tirtais metalų jonais, išskyrus Fe³⁺, fermentas pasižymėjo beveik 100 % liekamuoju aktyvumu (3.6 lentelė). Taip pat santykinai didelis liekamasis aktyvumas nustatytas po inkubavimo su EDTA. Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad LipBST funkcinis aktyvumas visiškai nepriklauso nuo metalų jonų.

Yra žinoma, kad įvairūs metalų jonai gali skirtingai veikti lipolizinius fermentus: juos aktyvinti, slopinti arba veikti neutraliai. Literatūros duomenimis, termostabilius lipolizinius *Bacillus* sp. fermentus (dažniausiai I.5 pošeimiui priklausančius lipolizinius *Bacillus* sp. fermentus) aktyvinantys veikia įvairūs divalenčiai jonai, tokie kaip Ca²⁺. Šiuo atveju, Ca²⁺ ar kiti divalenčiai jonai, labai retai tiesiogiai dalyvauja katalizėje, jie dažniausiai veikia fermento struktūrą ją stabilizuodami (koordinuodami laiko ir užfiksuoją kai kuriuos lanksčius molekulinės elementus), kas lemia didesnę fermento aktyvumą (Nagar ir kt., 2013). Taip pat Ca²⁺ gali sudaryti netirpius Ca-druskų kompleksus su katalizės metu atpalaiduojamomis RR, taip sumažinant fermento slopinimą produktu. Kiti metalų jonai, be aktyvinančio poveikio, dažnai dėl įvairių priežasčių gali turėti slopinantį arba neutralų poveikį įvairioms *Bacillus* lipazėms/esterazėms (Guncheva ir Zhyriakova, 2011). Šiame darbe gautas mažesnis LipBST liekamasis aktyvumas *p*-NPB substrato atžvilgiu po inkubavimo su visais tyrimui pasirinktais metalų jonais galėtų būti aiškinamas tuo, kad teigiamai įkrautiems metalų jonams jungiantis prie neigiamą krūvį turinčių fermento a.r. liekanų bei dėl kitų

galimai atsirandančių katijonų sąveikų su baltymu, keičiasi fermento konformacija ir/arba tinkama jonizacija. Dėl to, mažiau nei *p*-NPC LipBST giminingo *p*-NPB substrato hidrolizės katalizė vyksta neefektyviai, o tuo tarpu minėti procesai *p*-NPC katalizės taip akivaizdžiai nepaveikia. Įdomu tai, kad nors ir nebuvo nustatytas aktyvinantis metalų poveikis, LipBST buvo slopinamas įvairius metalų jonus daugiau ar mažiau chelatuojančiu agentu EDTA. Slopinimas su Pefabolc-SC nurodo į tai, kad tiriamasis fermentas yra serino hidrolazė ir tai, kad viena svarbiausių fermento funkciniam aktyvumui aminorūgščių yra Ser a.r. liekana, prie kurios specifiskai jungiasi minėtas slopiklis.

Nustatyti, kaip fermentus veikia įvairūs metalų jonai svarbu ne tik jų veikimo mechanizmo išaiškinimui, bet ir norint svarstyti apie fermento tinkamumą pritaikyti vienoje ar kitoje pramonės srityje. Įvairiems metalų jonams, detergentams atsparūs ir juose stabilūs alkalifiliniai lipoliziniai fermentai dažnai yra pageidaujami detergentų pramonėje.

Žinios apie tai, kokią įtaką skirtingi detergentai daro lipolizinių fermentų veiklai, yra svarbios tiek moksliniu, tiek taikomuoju aspektais. Detergentai naudojami lipolizinių fermentų katalizuojamose reakcijose, nes gali padidinti vandens-lipido paviršiaus plotą, taip pagerindami emulsijos stabilumą, padidinti substratų tirpumą, stabilizuoti fermentą atviroje konformacijoje (tai dažniausiai nėra taikoma fermentams, neturintiems dangtelio domeno) ir neleisti jam agreguoti. Skirtingų detergentų poveikis lipoliziniams fermentams jų pridėjus į fermentinės reakcijos mišinį arba po inkubavimo priklauso nuo šių cheminių medžiagų tipo (joniniai, nejoniniai), koncentracijos. Bendrų taisyklių, leidžiančių paaiškinti fermento-substrato-detergento ar fermento-detergento sąveikas iki šiol nėra ir kiekvienu atveju galimi skirtingi sąveikos padariniai. Apibendrinant visų tirtų *Bacillus* sp. lipolizinių fermentų atsaką į detergentus, galima daryti išvadą, kad dauguma šių fermentų yra tolerantiški detergentų poveikiui, gali būti stabilūs juose ir netgi jų hiperaktyvinami (Guncheva ir Zyriakova, 2011, Helisto ir Korpela, 1998). Detergentų įtakos LipBST aktyvumui tyrimas atskleidė, kad fermentas buvo stipriai jų slopinamas: liekamasis aktyvumas, vertinant gebėjimą hidrolizuoti tiek *p*-NPB, tiek *p*-NPC substratus, nesiekė 15 %. Vienintelę išimtį sudarė anijoninis detergentas NDS: po inkubavimo su šiuo denatūruojančiu agentu, fermentas, išlaikė ~70 % liekamojo lipolizinio aktyvumo (3.7 lentelė). Toks NDS poveikis LipBST yra pakankamai unikalus, nes dažniausiai šiam detergentui lipoliziniai fermentai nėra atsparūs ir yra jo veikiami neigiamai, sukeliant reikšmingą aktyvumo kritimą

(Kamarudin ir kt., 2014, Mohd‘a ir Juergen, 2010). Kadangi lipoliziniai fermentai yra dažnai linkę agreguoti, pastarieji rezultatai, galimai, gali būti aiškinami tuo, kad naudotos NDS koncentracijos (darant prielaidą, kad LipBST buvo dalinai agregavęs) sumažino susidariusių hidrofobinių ryšių kiekį tarp fermento molekulių, dėl ko pagerėjo substrato prieiga prie aktyvaus centro ir buvo kompensuojamas NDS neigiamas poveikis (Kaur ir kt., 2016). Slopinantis naudotų nejoninių detergentų poveikis gali būti aiškinamas tuo, kad jie užblokavo dangtelio domeno neturinčio fermento aktyvųjį centrą, neleidami jungtis substrato molekulėms.

3.7 lentelė. Įvairių detergentų ir organinių tirpiklių poveikis LipBST aktyvumui matuojant su skirtingais *p*-NP esteriais.

Medžiaga	Liekamasis LipBST aktyvumas (%) su skirtingais <i>p</i> -NP substratais	
	<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC
<i>Detergentai ir kt.</i>		
Tween 40	14 ± 1	4 ± 0,10
Tween 60	11 ± 1	6 ± 0,15
Tween 80	10 ± 1	6 ± 0,25
Triton X-100	14 ± 1	11 ± 0,02
NDS	70 ± 6	78 ± 0,03
Karbamidas (<i>chaotropikas</i>)	13 ± 4	6 ± 0,20
<i>Organiniai tirpikliai</i>		
2-propanolis	10 ± 2	8 ± 0,58
Etanolis	8 ± 1	54 ± 0,11
Metanolis	59 ± 6	58 ± 0,10
Acetonas	131 ± 2	54 ± 0,34
<i>n</i> -heksanas	116 ± 1	73 ± 0,21
DMSO	34 ± 4	49 ± 0,03

Fermentinių reakcijų vyksmas organiniuose tirpikliuose, susidarant įvairiems pramonei svarbiems produktams, šiuo metu yra viena naujausių ir pažangiausių lipolizinių fermentų tyrimo sričių. Organiniuose tirpikliuose veikiančių ir jiems atsparių lipolizinių fermentų paieška dažnai yra pigesnis metodas nei žinomų fermentų modifikavimas taikant baltymų inžinerijos metodus. Be to, nors termofilinės lipazės dažnai pasižymi didesniu atsparumu įvairiems organiniams tirpikliams, didėja psichrofilinių ir mezofilinių lipolizinių fermentų paklausa (Kumar ir kt., 2016). Dėl to, šiame darbe, be jau aptartų veiksmų, buvo tiriamas ir įvairiais atžvilgiais svarbus organinių tirpiklių poveikis tiksliniam LipBST fermento aktyvumui. LipBST stabilumo įvairiuose organiniuose tirpikliuose įvertinimas atskleidė, kad tikslinis fermentas po inkubavimo pasižymėjo skirtingu liekamuoju aktyvumu, vertinant gebėjimą katalizuoti *p*-NPB ir *p*-NPC hidrolizę. Įdomu

tai, kad acetonas ir *n*-heksanas pagerino LipBST gebėjimą hidrolizuoti *p*-NPB: nustatytas $116 \pm 1\%$ ir $131 \pm 2\%$ liekamasis aktyvumas, atitinkamai. Yra žinoma, kad kai kurios cheminės medžiagos geba moduluoti lipolizinių fermentų savitumą substratui ir kitas savybes (Mateo ir kt., 2007), dėl to, gavus rezultatus, kuriuose nustatytas tam tikrų organinių tirpiklių hiperaktyvuojantis poveikis *p*-NPB esterio atžvilgiu, buvo padaryta prielaida, kad dėl tam tikros fermento sąveikos su acetonu ir *n*-heksanu, LipBST konformacija galėjo tapti palankesnė trumpesnę anglies atomų grandinę turinčio substrato hidrolizei. Po inkubavimo su metanolium, matuojant aktyvumą tiek su *p*-NPB bei *p*-NPC, buvo nustatytas ~ 60 % liekamasis lipolizinis aktyvumas, o po poveikio etanolium, fermentas buvo aktyvesnis *p*-NPC substrato atžvilgiu. Išsamūs LipBST stabilumo organiniuose tirpikliuose tyrimo rezultatai pateikti lentelėje 3.7.

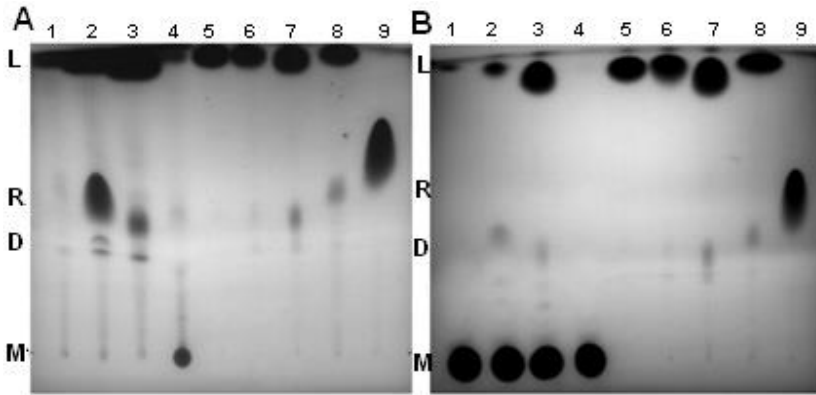
Esterinimo ir peresterinimo reakcijos paprastai vykdomos mažai vandens turinčiuose reakcijos mišiniuose su nepoliniais tirpikliais, kurie naudojami atvirkštinės, netikslinės hidrolizės reakcijos ir spontaninės nefermentinės produktų hidrolizės supresijai. Daugelyje peresterinimo reakcijų, vykdomų norint gauti naujus esterius, *n*-heksanas yra vienas palankiausių tirpiklių. Literatūros duomenimis, daugelis *Bacillus* sp. lipazių yra pakankamai stabilios hidrofobiniuose (nepoliniuose) organiniuose tirpikliuose ir netgi gali būti jų hiperaktyvinamos. Lipolizinių fermentų stabilumas hidrofobiniuose tirpikliuose gali būti susijęs su tuo, kad šie tirpikliai palaiko baltymų hidratacinį karkasą (sluoksnį), o didesnis liekamasis aktyvumas šiuose tirpikliuose gali būti paaiškinamas tuo, kad jie sukelia lipolizinių fermentų, esančių tirpale, uždaro konformacijos perėjimą į atvirą ir gali padidinti substratų ir produktų tirpumą reakcijos mišinyje. Lipolizinių fermentų stabilumas hidrofiliuose (poliniuose) tirpikliuose taip pat turi praktinės reikšmės, nes šie tirpikliai (tokie kaip metanolis) dažnai naudojami įvairių trumpagrandžių, vertingų esterių, kaip biodyzelinas, gamyboje (Guncheva ir Zhyriakova, 2011, Kamarudin ir kt., 2014). Visgi, hidrofiliiniai tirpikliai yra labiau destabilizuojantys, nes pašalina vandens molekules iš baltymų solvatacijos (hidratacinio) sluoksnio. Pastarasis reiškinys galėtų paaiškinti 2-propanolio ir kitų polinių, tyrime naudotų tirpiklių, slopinanti poveikį LipBST. LipBST aktyvavimas acetonu galėtų būti priskirtas prie gana retai sutinkamo šio tirpiklio poveikio fermentui. Acetonui tolerantiški lipoliziniai fermentai yra pageidaujami specifinėse oleochemijos pramonės srityse. Vienas tokių pavyzdžių - ekologiška askorbilo oleato gamyba (Stojanovic ir kt., 2013). Lipolizinių fermentų

stabilumas organiniuose tirpikliuose koreliuoja su įkrautų a.r. liekanų pasiskirstymu baltymo paviršiuje ir kitomis paviršiaus savybėmis. Tačiau, tikslus fermentų sąveikos ir adaptacijos skirtinguose organiniuose tirpikliuose mechanizmas yra mažai žinomas ir reikalauja daugiau tyrimų (Kamarudin ir kt., 2014). Taip pat, šiuo metu lipolizinių fermentų stabilumo organiniuose tirpikliuose gerinimui sėkmingai taikomas imobilizavimo metodas (Guncheva ir Zhyriakova, 2011).

3.5.4 LipBST natūralių riebalinių medžiagų hidrolizės tyrimas

Nors tiriant LipBST substratinį savitumą, didžiausias aktyvumas buvo nustatytas *p*-NPC sintetinio esterio atžvilgiu, tai neparodo, kokių substratinių savitumu fermentas pasižymės tikrųjų lipolizinių fermentų substratų (ilgas ar trumpas RR grandines turintiems TAG) atžvilgiu. Nors teoriškai yra tiksliai apibrėžta, kuo skiriasi lipazės ir esterazės, praktikoje šių teorinių sąlygų arba ribų pritaikymas (panaudojimas) yra ribotas, nes, kaip jau buvo minėta, tam tikras lipolizinis fermentas (lipazė/esterazė) gali turėti tiek lipazėms, tiek esterazėms priskiriamą aktyvumą. Pavyzdžiui, lipoliziniai fermentai, kurie hidrolizuoja trioleiną, dažniausiai katalizuos ir *p*-NPB bei *p*-NPP sintetinių esterių hidrolizę, bet *p*-NPB ar *p*-NPP hidrolizė dar negarantuoja, kad bus katalizuojama trioleino, tikrojo lipazių substrato, hidrolizė.

Dėl to, šiame darbe buvo tirta LipBST lipolizinio fermento geba katalizuoti ir natūralių riebalinių medžiagų (trioleino, rapsų, linų sėmenų aliejų bei kiaulių taukų) hidrolizę. Gauta pastarųjų medžiagų hidrolizės chromatograma pateikta 3.9 pav., A. Kokybiškai vertinant nustatyta, kad LipBST geriausiai katalizavo rapsų ir linų sėmenų aliejų hidrolizę. Nuo plonasluoksnės chromatografijos plokštelės apačios į viršų matomi išsidėstę hidrolizės produktai. Vieni ryškiausiai matomų buvo rapsų aliejaus hidrolizės produktai. Gyvūninių (kiaulių) taukų hidrolizės produktų chromatogramoje ryškiai nesimatė dėl to, kad šioje riebalinėje medžiagoje yra daug sočiųjų RR, kurios gali būti prastai vizualizuojamos ryškinant jodo garuose.



3.9 pav. (A) Rekombinantinio LipBST lipolizinio fermento skirtingų natūralių riebalinių substratų hidrolizės produktų chromatograma. 1 – trioleino, 2 – rapsų, 3 – linų sėmenų aliejų ir 4 – kiaušių taukų hidrolizės produktai; 5, 6, 7, 8 – trioleino, rapsų, linų sėmenų ir kiaušių taukų, atitinkamai, kontroliniai takeliai (riebalai nepaveikti LipBST), 9 – oleino rūgštis (kontrolė). (B) Kontrolinė chromatograma, kuriuose vaizduojami hidrolizės produktai iš vandeninio reakcijos mišinio sluoksnio (dietilo eteryje neištirpę produktai); 1-9 – atitinka 1-9 takelius (A) paveiksle. L – TAG, F – RR, D – DAG, M – MAG.

Tarp kiaušių taukų hidrolizės produktų gerai matėsi susidarę MAG. Lyginant tiriamųjų ir kontrolinių LipBST nepaveiktų mėginių TAG dydžius, matomas ryškus kokybinis skirtumas, kuris taip pat patvirtino, kad LipBST pakankamai aktyviai katalizavo pasirinktų riebalinių medžiagų hidrolizę. Paveiksle 3.9 (B) vaizduojami trioleino, rapsų ir linų sėmenų aliejų bei kiaušių taukų hidrolizės produktai, kurie neištirpo dietilo eteryje (mėginio vandens frakcija liekanti po dietilo eterio pridėjimo) ir atitinkamos kontrolės.

Be lipolizinių fermentų panaudojimo vertingų esterių gavimui esterinimo ir peresterinimo reakcijų metu, didelės praktinės reikšmės taip pat turi įvairių natūralių lipidų hidrolizė, kurios metu yra atpalaiduojamos vertingos RR. Pastarieji produktai (RR) gali būti naudojami įvairių aukštos kokybės produktų gavimui. Iš sočiųjų RR sintetamos arba natūraliai iš tam tikrų lipidų fermentinės lipolizės metu atpalaiduojamos nesočiosios RR yra vertingomis maistinėmis savybėmis pasižyminčios medžiagos, kurios turi teigiamas reikšmes žmogaus sveikatai. Kai kurios vertingos RR gali būti atpalaiduojamos iš natūralių TAG katalizuojant išimtinai lipoliziniams fermentams (Stransky ir kt., 2007, Hasan ir kt., 2009, Moharana ir kt., 2016).

Dėl gebos katalizuoti natūralių, ilgas RR turinčių TAG hidrolizę, LipBST šiame darbe priskirtas lipazėms (EC 3.1.1.3). Taip pat dėka nustatyto didelio hidrolizinio aktyvumo ir efektyvaus skirtingų aliejų ir gyvulinių taukų skaidymo, šiame darbe atrasta, išgryninta ir biochemiškai charakterizuota LipBST lipazė pasirodė labai perspektyvi ir buvo sėkmingai

išbandyta šalinant žuvies riebalus nuo jais užterštų polietileninių paviršių (MITA: Taikomųjų mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros darbų sutarties Inovacinis čekis Nr. VP2-1.3-ŪM-05-K, 2014).

3.6 LipBST imobilizavimas ir gebos katalizuoti peresterinimo reakcijas įvertinimas

LipBST imobilizavimas ant hidrofobinio oktilsfearozės nešiklio leido pagerinti tam tikras laisvam fermentui nustatytas biochemines savybes (3.8 lentelė). Lyginant laisvą *Bacillus* sp. L1 LipBST fermentą su imobilizuotu, buvo nustatytas imobilizuoto fermento santykinio aktyvumo padidėjimas visame tirtame temperatūrų diapazone. Imobilizuoto LipBST temperatūrinis optimumas padidėjo net 15 °C. Tiriant LipBST imobilizuotų fermentų veikimo priklausomybę nuo vandenilio jonų koncentracijos, nustatyta, kad imobilizuoto LipBST veikimui optimalus pH - 10, kas yra vienetu daugiau už laisviems fermentams nustatytą optimalų pH.

3.8 lentelė. Laisvo ir imobilizuoto ant oktilsfearozės LipBST optimalių veikimui temperatūros ir pH.

Laisvas LipBST		Imobilizuotas LipBST	
Optimali temperatūra	Optimalus pH	Optimali temperatūra	Optimalus pH
35 °C	9	50 °C	10

LipBST imobilizavimas ant oktilsfearozės taip pat pagerino fermento termostabilumą visose tirtose temperatūrose (nuo 25 °C iki 65 °C). Didžiausias teigiamas poveikis nustatytas 35 - 45 °C ribose: lyginant su laisvais fermentais (3.4 lentelė), 35, 40 ir 45 °C temperatūrose, inkubavimo valandomis nustatytas ~20 %, 33 % ir 15 %, atitinkamai, didesnis liekamasis aktyvumas.

Didesnės nustatytos imobilizuoto LipBST temperatūrinio, pH optimumo bei stabilumo aukštesnėse temperatūrose reikšmės gali būti aiškinamos tuo, kad ant oktilsfearozės adsorbavęs fermentas buvo fiziškai stabilizuotas ir dėl to tapo atsparesnis ryšius destabilizuojančiam, baltymus dažnai denatūruojančiam aukštesnių temperatūros ir pH, poveikiui (Robinson, 2015). Kadangi imobilizavimui naudotas hidrofobinis nešiklis, labiausiai tikėtina, kad tarp fermento ir nešiklio susidarė LipBST prisijungimą ir stabilizavimą įgalinę hidrofobiniai ryšiai, nors neatmetama ir kitų ryšių (vandenilinių, joninių, Van der Valso jėgų ir kt.) susidarymo galimybė. Imobilizavimo teigiamas efektas gali būti pasiekiamas ir dėl nešiklio savybės keisti fermento mikroaplinką bei mažinti difuzijos

sukeliamus apribojimus. Dažnai hidrofobinis nešiklis pritraukia imobilizuoto fermento aplinkoje esantį substratą, dėl ko, lyginant su likusia supančios terpės faze, padidėja jo koncentracija ir nustatomas didesnis fermentinis aktyvumas. Panašiai gali būti pritraukiami ir kiti terpėje esantys jonai, kurie keisdami fermento ir jo mikroaplinkos jonizaciją, lyginant su laisvu fermentu, gali keisti imobilizuoto fermento optimalų pH ir kitus veiksnius (Robinson, 2015).

3.9 lentelėje pateikti rezultatai gauti vertinant imobilizuoto LipBST preparato liekamąjį aktyvumą po inkubavimo su įvairiais cheminiais agentais. Lyginant su laisvu LipBST, daugeliu atveju, aukštesnio liekamojo aktyvumo po poveikio metalų jonais, detergentais, organiniais tirpikliais, gauti nepavyko. Tiriant metalų jonų ir organinių tirpiklių poveikį, šios medžiagos slopino imobilizuoto fermento veikimą labiau negu laisvo. Šiek tiek didesnis liekamasis aktyvumas nustatytas po poveikio Pefabloc-SC ir įvairiais nejoniniais detergentais.

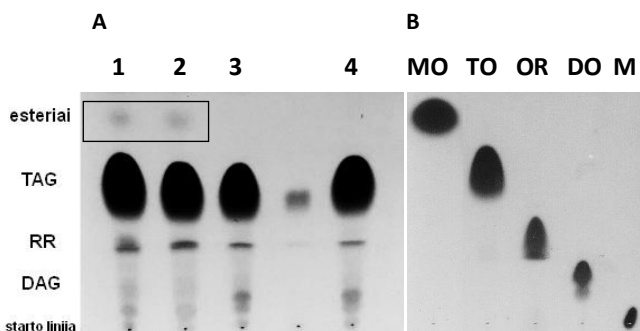
3.9 lentelė. Įvairių metalų jonų, slopiklių, detergentų, chaotropikų ir organinių tirpiklių poveikis imobilizuotam ant oktilsefarozės LipBST fermento aktyvumui hidrolizuojant *p*-NPC.

Medžiaga	Liekamasis aktyvumas, %	Medžiaga	Liekamasis aktyvumas, %
<i>Metalu jonai</i>		<i>Detergentai</i>	
K ⁺	64±0,003	Tween 60	24±0,005
Li ⁺	63±0,008	Tween 80	8±0,003
Ca ²⁺	64±0,001	Tritonas X-100	24±0,0009
Mg ²⁺	65±0,002	Karbamidas	181±0,001
Co ²⁺	50±0,006	NDS	37±0,004
Mn ²⁺	54±0,01	CTAB	94±0,003
Ba ²⁺	68±0,006	<i>Organiniai tirpikliai</i>	
Cd ²⁺	66±0,007	2-propanolis	4±0,002
Ni ²⁺	43±0,006	Etanolis	29±0,003
Fe ³⁺	12±0,002	Metanolis	45±0,002
<i>Slopikliai</i>		Acetonas	41±0,003
EDTA	79±0,003	<i>n</i> -heksanas	59±0,007
Pefabloc-SC	14±0,002	DMSO	29±0,0007
<i>Detergentai</i>		1,4-dioksanas	8±0,001
Tween 40	5±0,005	<i>Tert</i> -butanolis	18±0,002

Imobilizuotas LipBST išliko pakankamai stabilus tiriant CTAB poveikį (laisviems fermentams šio detergento poveikis nebuvo tirtas). Taip pat, įdomu tai, kad laisvo LipBST veikimą slopinęs karbamidas,

imobilizuotą LipBST fermentą aktyvino ir buvo nustatytas jo $181 \pm 0,001$ % liekamasis aktyvumas.

Tiriant imobilizuoto LipBST gebą katalizuoti peresterinimo reakcijas, jau 2 val. nuo fermento inkubavimo su atitinkamais reakcijos komponentais (2.19 metodų skyrius) pradžios, plonasluoksniėje chromatogramoje buvo nustatomas naujas, susidaręs rapsų aliejaus RR metilo esteris (3.10 pav.).



3.10 pav. Ant oktilsfearozės imobilizuoto LipBST katalizuojamo rapsų aliejaus peresterinimo metanoliu reakcijos produktų chromatograma: 1 – peresterinimo produktų profilis 2 val. po inkubavimo, 2 – peresterinimo produktų profilis 4 val. po inkubavimo; 3, 4 – 2 ir 4 val. iš kontrolinio reakcijos mišinio be LipBST preparato paimtų mėginių riebalinių medžiagų profiliai; (B) Grynų cheminių junginių, kaip galimų lipazių katalizuojamų riebalų virsmų reakcijos produktų, chromatograma (kontrolės). MO - oleino rūgšties metilo esteris; TO – trioleinas; OR - oleino rūgštis; DO – 1,3, 1,2 – dioleinų mišinys; M – monooleinas.

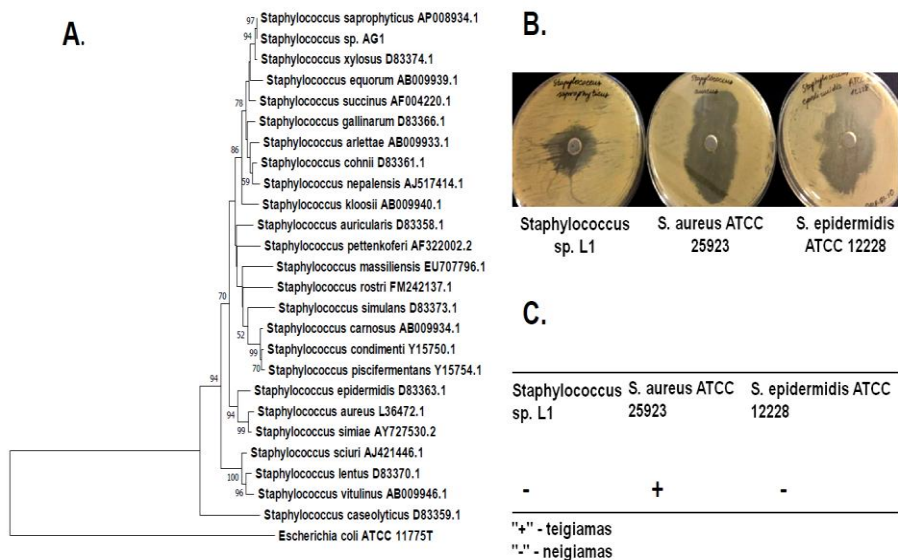
Paveiksle 3.10 parodyti imobilizuoto LipBST preparato peresterinimo produktai, susidarę po 2 ir 4 val. nuo inkubavimo pradžios. Reakcijos metu naujai susidarę esteriai buvo nustatomi iki 26 inkubavimo val. Galima daryti išvadą, kad ant oktilsfearozės imobilizuotas LipBST preparatas geba katalizuoti peresterinimo reakcijas bevandenėje arba labai nedidelį kiekį vandens turinčioje aplinkoje. Papildomi tyrimai, naudojant kitus aliejus ir alkilo akceptorius bei proceso optimizavimas galėtų leisti plačiau įvertinti peresterinimo reakcijas katalizuojamas LipBST ir reakcijų metu gaunamus produktus – įvairius pridėtinės vertės esterius, kurie gali būti naudojami įvairiuose biotechnologinės pramonės šakose – kosmetikos, maisto, biokuro gamybos ir farmacijos sektoriuose.

Dėl specifinių fizikinių savybių, preparatai gauti LipBST imobilizavus ant CFAPP, aktyvumo matavimams nebuvo tinkami. Vykdam rapsų aliejaus peresterinimo metanoliu reakcijas su pastaruoju preparatu teigiamų rezultatų taip pat gauti nepavyko. Visgi, tiriant komercinę Resinase 2X lipazę, imobilizuotą ant minėto sorbento, gauti fermentiniai preparatai pasižymintys

dideliu specifiniu aktyvumu ir sėkmingai panaudoti organinei kvapiojo junginio 2-feniletilbutanoato sintezei, gaunant 90 % konversiją optimaliomis fermento veikimui sąlygomis (Gricajeva ir kt., 2018, nepateikti rezultatai).

3.7 AG1 kultūros identifikavimas

AG1 kultūros 16S rDNR (GeneBank prieigos nr.: MK120203) sekoskaita ir analizė, atliekant homologiškų sekų paiešką NCBI BLASTn, atskleidė 100 % panašumą (su 100 % persidengimu) *Staphylococcus saprophyticus* 16S rDNR. Gauti rezultatai leido priskirti AG1 kultūrą *Staphylococcus* genčiai. Šiuo metu yra žinomos 54 *Staphylococcus* rūšys (bacterio.net/staphylococcus.html). 16S rDNR paremta filogenetinė *Staphylococcus* sp. AG1 analizė, leido nustatyti, kad kamienas yra artimiausias *Staphylococcus saprophyticus* AP008934.1 (3.11 pav., A).



3.11 pav. (A) Filogenetinis medis iliustruojantis *Staphylococcus* sp. AG1 evoliucinę padėtį remiantis tipinių genties kamienų dalinių 16S rDNR sekų analize. Šalia medžio šakų nurodyti medžių atsikartojimų, kai susiję taksonai atliekant „bootstrap“ testą (1000 pakartojimų) susigrupavo šalia sudarydami vieną klasterį, procentinės tikimybės. Šakų ilgis proporcingas evoliuciniam atstumui tarp mazgų. Kodai parašyti po kiekvieno rūšies pavadinimo nurodo 16S rDNR prieigos numerį GenBank. Filogenetinis medis redukuotas atsižvelgiant į kai kurių tipinių kamienų tolimą filogenetinį giminingumą tiriamam kamieniui (neiškraipant tiriamo *Staphylococcus* sp. AG1 filogenijos). **(B)** novobiocino ir **(C)** ir koaguliazės testų rezultatai.

Sekvenuoto *Staphylococcus* sp. AG1 kamieno (GenBank prieigos nr.: SAYP00000000) filogenominė analizė, naudojant Genomo-Genomo

Atstumo Skaičiuotuva (GGAS) skaitmeninei DNR-DNR hibridizacijai atlikti (Meier-Kolthoff ir kt., 2013), parodė, kad didžiausia tikimybė, kad tiriamieji genomai priklauso tai pačiai rūšiai (tikimybė, kad DDH > 70 %) buvo nustatyta tarp *Staphylococcus* AG1 ir *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305 (97.79 % tikimybė). Tikimybė, kad *Staphylococcus* sp. AG1 ir *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305 yra vienas kamienas (DDH > 79 %) sudarė 76,56 %. G+C % sąstato skirtumas *Staphylococcus* sp. AG1 ir *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305 sudarė 0.26 (Meier-Kolthoff ir kt., 2014a, b). Remiantis GGAS rekomendacijomis šis skirtumas tarp tai pačiai rūšiai priklausančių organizmų negali būti didesnis nei 1. Genomo-genomo skaičiuotuvo nustatyta *Staphylococcus* sp. AG1 ir kitų palyginimui pasirinktų tipinių kamienų tikimybė priklausyti vienai rūšiai (t.y. DDH > 70 %) buvo praktiškai lygi 0. Išsamūs skaitmeninės DNR-DNR hibridizacijos rezultatai pateikti 3.10 lentelėje.

3.10 lentelė. Skaitmeninės DNR-DNR hibridizacijos rezultatai gauti remiantis antra GGAS rekomenduojama formule.

Tiriamasis / užklauso genomas	Lyginamieji genomai	DDH	Tikimybė, kad DDH > 70 %	G + C skirtumai
	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305-NCTC 7292 ^T	97,7	97,79	0,26
<i>Staphylococcus</i> sp. AG1	<i>S. saprophyticus</i> NCTC 7666	92,1	96,46	0,19
	<i>S. saprophyticus</i> 1A	92,1	96,46	0,25
	<i>S. xylosus</i> ATCC 29971 ^T	24,2	0,01	0,29
	<i>S. equorum</i> NCTC 12414 ^T	23,3	0	0,13
	<i>S. succinus</i> DSM 14617 ^T	22,5	0	0,04

S. saprophyticus rūšis nuo kitų stafilokokų taip pat gali būti atskiriama pagal neigiamą koaguliazės testą ir atsparumą antibiotikui novobiocinui. Šiame darbe atlikti pastarieji biocheminiai testai patvirtino, kad *Staphylococcus* sp. AG1 būdinga neigiama koagulazės reakcija ir atsparumas novobiocinui (Petri lėkštelėse nustatytos mažesnės nei 12 mm (riba dar leidžianti teigti, kad kamienas nejautrus novobiocinui) slopinimo novobiocinu zonos). Kontroliniai (3.11 pav., B) *S. aureus* ATCC 25932 ir *S. epidermidis* ATCC 12228 kamienai atliekant koagulazės testą pasižymėjo teigiama reakcija (neigiama kontrolė) ir neigiama reakcija (teigiama kontrolė), atitinkamai. Be to, abu kontroliniai kamienai buvo jautrūs

novobiocinui: Petri lėkštelėse susidarė 16-27 mm novobiocino slopinimo zonos (3.11 pav., C).

3.8 EstAG1 a.r. sekos analizė, geno klonavimas, raiška ir gryninimas

Po *S. saprophyticus* AG1 genomo sekoskaitos BaseClear (Nyderlandai) ir jo anotacijos pagal Prokka (Seemann, 2014) genome nustatyti 6 numanomi lipolizinius fermentus (karboksilesterazes ir lipazes) koduojantys regionai (angl., *CDS*) / genai (3.11 lentelė). *Staphylococcus* gentyje žinomi ir plačiai aprašyti lipoliziniai fermentai, kurie sudaro pre-pro-fermentus, didžioji dauguma kurių yra lipazės. Taip pat *S. saprophyticus* rūšyje aprašyta ne visiems kamienams būdinga paviršinė Ssp lipazė (Sakinc ir kt., 2005, Szabados ir kt., 2013), o apie šios ne tik rūšies, bet ir bakterijų genties karboksilesterazes (EC 3.1.1.1), duomenų visiškai nėra.

Atlikus *S. saprophyticus* AG1 gDNR anotuotų numanomų lipolizinių fermentų išsamesnę analizę, tolimesniems eksperimentiniams tyrimams (klonavimui, raiškai, gryninimui ir apibūdinimui) buvo pasirinktas *est_1* geno koduojamas 903 bp/300 a.r. baltymas – numanoma tikroji esterazė (karboksilesterazė, EC 3.1.1.-), kuriai šiame darbe suteiktas *estAG1* (EstAG1) (GeneBank prieigos nr.: MK336172) pavadinimas. EstAG1 pasirinktas tolimesniems tyrimams dėl priklausomybės neaprašytoms esterazėms, sekoje nustatyto netradicinio, lipoliziniams fermentams nebūdingo konservatyvaus GDGTG pentapeptido motyvo, kuriame nenustatyta absoliučiai daugumai lipolizinių fermentų būdinga itin konservatyvi nukleofilinė Ser a.r. liekana.

3.11 lentelė. *S. saprophyticus* AG1 genome nustatyti numanomi lipoliziniai fermentai.

Geno pav. Savybės	<i>lip_1</i>	<i>est_1</i>	<i>est_2</i>	<i>est_3</i>	<i>est_4</i>	<i>MIMI_R526</i>
Geno dydis, bp	2259	903	975	735	741	1032
Numanomas produktas	lipazė	esterazė arba lipazė	esterazė arba lipazė	esterazė	esterazė	numanoma α/β – hidrolazė
Pirmtakas, a.r.	753	300	324	245	246	343
Subrendęs baltymas, a.r.	716 / ?	300 arba ?	324 arba ?	245 arba ?	246 arba ?	343 / ?
Signalinė seka ir jos kirpimo vieta (pagal SignalP 5.0)	Sec/SPP AQA ₃₇ - ₃₈ TE	nėra /neklasikinė	nėra/ neklasikinė	nėra/ neklasikinė	nėra/ neklasikinė	neklasikinė nuo Sec nepriklausoma sekrecija

Numanoma pirtakų ir subrendusių baltymų molekulinė masė, kDa	83,2 ir 79,33 ⁱⁱ	35 / ?	36,7 / ?	27,4 ?	28 / ?	39,6 ir ?
Numanoma lokalizacija	Užląstelinė terpė	Viduląstelinė terpė	Viduląstelinė terpė	Viduląstelinė terpė	Viduląstelinė terpė	Užląstelinė terpė
Antšeimis	α/β – hidrolazės					
Numanoma šeima pagal Hitch ir Clavel (2019) bei ESTHER duomenų bazę	I.6 / Bacterial_lip_FamI.6	IV šeima / Hormone-sensitive_lipase-like (bHSL)	IV šeima / bHSL	XIII šeima / CarbLipBact_1	XIII šeima / CarbLipBact_1	IV šeima / bHSL
Numanomas EC numeris	EC 3.1.1.3 ⁱⁱⁱ	EC 3.1.1.-	EC 3.1.1.-	EC 3.1.1.1	EC 3.1.1.1	EC 3.1.1.1 / 3

ⁱ – Sec/SPI: Sec sekrecijos sistemos translokuojamas baltymas N-gale turintis “standartinį” signalinį peptidą atpažįstama ir nukerpama signalinės peptidazės I; ⁱⁱ - manoma tai yra pre-pro-peptidą formuojantis lipolizinis fermentas, čia po signalinio peptido pašalinimo, specifinių peptidazių užląstelinėje terpėje pašalinamas ir propeptidas. Po pre-pro-peptido pašalinimo lieka ~46 kDa subrendęs baltymas. lip_1 atveju vienas plačiausiai naudojamų propeptidų prognozavimo internetinių įrankių šioje sekoje propeptido nenustatė, tačiau lip_1 homologijos tyrimas parodė, kad seka yra itin panaši į minėtą potransliacinę modifikacija pereinančius stafilokokinius lipolizinius fermentus; ⁱⁱⁱ – artimiausi charakterizuoti šios numanomos lip_1 homologai be lipolizinio pasižymi ir fosfolipazės A1 aktyvumu; * - subrendusio baltymo a.r. sekos ilgis/molekulinė masė nežinomi dėl nenustatytos, galimai šalinamos signalinės sekos.

ESTHER duomenų bazėje atliktas BLASTp atskleidė, kad numanomas lipolizinis EstAG1 fermentas pagal homologiją priklauso bakterinei hormonams jautrių lipolizinių fermentų šeimai (bHJL, angl., *bacterial hormone-sensitive lipase-like, bHSL*), kuri pagal Kovacic ir kt. (2019) bei Hitch ir Clavel (2019) naujausias klasifikacijas atitinka IV šeimą (Kovacic ir kt., 2019, Hitch ir Clavel, 2019). Atliekant „nepasikartojančių baltymų sekų“ (angl., *non-redundant, nr*) paiešką NCBI BLASTp, nustatytas EstAG1 fermento 100 % sekų identiškumas *S. saprophyticus* prieinamuose genomuose koduojamiems neaprašytiems numanomiems lipoliziniams fermentams, taip pat nuo 76 iki 72 % homologija nustatyta *S. xylosus*, *S. gallinarum*, *S. succinus* ir *S. edaphicus* numanomiems lipoliziniams fermentams (prieigos nr. nepateikti). Naudojant ESTHER duomenų bazę nustatyta EstAG1 sekos homologija *S. haemolyticus* JSSC1435 esterazei (59 % panašumas, 74 % persidengimas GenBank prieigos nr. AP006716 + 63 GenBank identiškos įvestys), *S. aureus* numanomai lipazei/esterazei (54 % panašumas, 75 % persidengimas, GG749056), *S. epidermidis* ATCC 12228 numanomai esterazei (54 % panašumas, 74 % persidengimas, AE015929), *Streptococcus pyogenes* serotipo M28 esterazei (29 % panašumas, 48 % persidengimas, CP000056), *S. aureus* α/β -hidrolazinę klostę turinčiam baltymui (37 % panašumas, 54 % persidengimas, AAPL01000001 + 64 GeneBank įvestys). Tačiau visi išvardinti ESTHER/NCBI duomenų bazėse

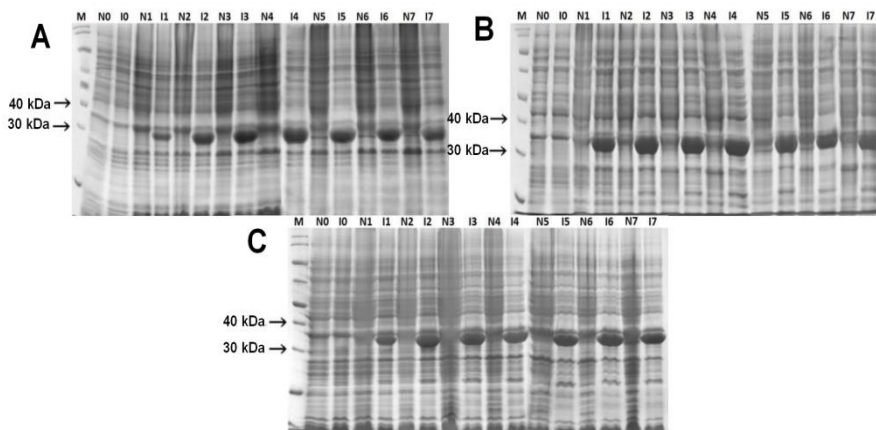
rasti homologai neturi jokių egzistavimo įrodymų eksperimentiniame lygyje. Lyginant su artimiausiais funkciškai ištirtais homologais, kurių sekos buvo nustatytos UniProt/SwissProt/I-TASSER (prieigos nr. nurodyti 2.20 poskyryje), ir analizuojant mokslinę literatūrą (prieigos nr.: AB029896, SC07131, FN985096, BAB05967, AAW62260, AAZ67909, 4Q3O.1, 3K6K.1, 3DNM.1, 4Q05, 4XVC.1) (Kulakova ir kt., 2004, Deb ir kt., 2006, Ko ir kt., 2012, Huang ir kt., 2016, Petrovskaya ir kt., 2016, Zafareta ir kt., 2016, Dua ir kt., 2017), jų ir EstAG1 identiškumas tesiekė $\leq 30\%$. Remiantis Hitch ir Clavel (2019) siūlomos atnaujintos bakterinių lipolizinių fermentų klasifikacijos tokios homologijos nepakanka fermento priskyrimui IV arba bHJL bakterinių lipolizinių fermentų šeimai (Hitch ir Clavel, 2019).

Toliau atliekant EstAG1 a.r. sekos analizę, pre-pro-peptidinės fermentų organizacijos požymių nenustatyta, taip pat sekoje nenustatyta “klasikinių” signalinių peptidų (pavyzdžiui, Sec) ar sekrecijos be lyderinės sekos požymių, kas nurodo galimą viduląstelinę fermento prigimtį arba, kad fermentas yra sekretuojamas pasitelkianti nežinomus signalus.

Nuo *S. saprophyticus* AG1 gDNR pagausintas 903-bp, EstAG1 koduojantis produktas buvo klonuotas į pET-26b(+) raiškos vektorių, atlikta įterpto geno sekoskaita. Sekoskaita patvirtinus įterptą seką, konstruktas perkeltas į padidintai fermento sintezei skirtą *E. coli* BL21 (DE3). Teoriškai nustatyta molekulinė subrendusio EstAG1 fermento masė (su 6×His inkaru) ir izoelektrinis taškas lygūs 36,1 kDa ir 6,613, atitinkamai. Po EstAG1 sintezės indukcijos, naudojant IPTG (galutinė konc. 1 mM) bei rekomenduojamas pirmines sąlygas (LB terpė, indukuojamų ląstelių OT=0,6, 37 °C), indukuotų *E. coli* BL21 (DE3) rekombinantinių (bei kontrolinių neindukuotų) ląstelių bendri baltymų profiliai analizuoti NDS-PAGE. Nustatyta, kad minėtomis sąlygomis, indukuotose ląstelėse jau pirmą val. po indukcijos ties ~36 kDa molekulinio žymeniu matomas gana gausiai sintetinas baltymas (3.12 pav.).

Atliekant EstAG1 lokalizacijos analizę, nustatyta, kad tikslinis baltymas rekombinantinių bakterijų citoplazmoje formuoja netirpius kūnelius. Norint nustatyti, ar EstAG1 tirpumas galėtų pagerėti pakeitus indukcijos sąlygas, sintezę buvo indukuojama M9 terpėje bei mažinant indukuotų ląstelių augimo temperatūrą iki 27 °C ar 17 °C (auginant tiek M9, tiek LB terpėje). Taip pat buvo keičiamos indukuojamų ląstelių OT₆₀₀ ir IPTG koncentracijos. Pasirinktos žemesnės indukcijos temperatūros reikšmingai prailgindavo rekombinantinių ląstelių augimą iki indukcijai

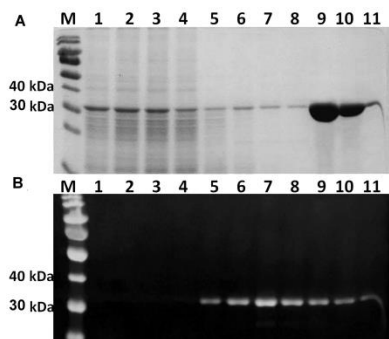
tinkamo OT₆₀₀ bei fermento raiškos, gaunant padidintą sintezę, pradžia, kurios metu buvo gaunamas vis tiek netirpus baltymas.



3.12 pav. *E. coli* BL21 (DE3) su pET-26b(+)*_estAG1* ląstelių auginių LB, 37 °C, bendrų baltymų kiekių profiliai, indukuojant iki skirtingos galutinės IPTG koncentracijos: a) 0,1 mM, b) 0,4 mM, c) 1 mM. N0 – N7 – neindukuotų transformantų baltymų profiliai, ląstelių mėginius renkant 0 – 7 val.; I0 – I7 – indukuotų transformantų baltymų profiliai, ląstelių mėginius renkant 0 – 7 val. po indukcijos. 0 val. atitinka bakterijų pasiektą OT₆₀₀=0,8. M – baltymų molekulinės masės žymuo PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder.

Tirpaus EstAG1 taip pat nepavyko gauti atliekant indukciją *E. coli* Rosetta (DE3)/C41 (DE3) ląstelėse. Dėl šios priežasties, EstAG1 padidintai sintezei buvo pasirinktos tokios sąlygos: *E. coli* BL21 (DE3), LB terpė, 37 °C temperatūra, galutinė 0,4 mM IPTG koncentracija, indukuojant ląsteles, kai jų OT₆₀₀=0,8. Didžiausias minėtomis sąlygomis baltymo kiekis ląstelėse gautas 2-4 val. po indukcijos (pav. 3.12, B).

Tikslinio baltymo grynimui *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės buvo surenkamos 2 val. nuo indukcijos pradžios. Grynimas taikant IMAC denatūruojančiomis sąlygomis leido EstAG1 fermentą išgryninti tik dalinai (3.13 pav., A). Norint gauti didesnę grynumą ir pašalinti naudotų IMAC buferinių tirpalų druskų, EstAG1 fermentas papildomai grynintas, pasitelkiant gelfiltraciją ir dializuojant. Gelfiltracijos gryninimo frakcijos parodytos paveiksle 3.13 (B).



3.13 pav. IMAC (A) ir gelfiltracijos gryninimo frakcijų (B) NDS-PAGE. (A) 1–2 – neprisijungę (pratekėję) baltymai; 3–6: plovimo frakcijos; 7–11: eliuacijos frakcijos. (B) 1–4: neprisijungę baltymai, 5–11: EstAG1 eliuacijos frakcijos. M - baltymų molekulinės masės žymuo, PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder.

Pasirinkta EstAG1 gryninimo strategija leido pilnai išgryninti ir gauti tirpų, renatūruotos formos tikslinį baltymą, tinkamą tolimesnei analizei.

3.9 EstAG1 charakterizavimas

3.9.1 EstAG1 temperatūrinis, pH optimumas ir termostabilumas

EstAG1 veikimas, kaip ir tirta LipBST, pirmiausiai, buvo optimizuotas įvertinant bendrą temperatūros ir pH įtaką fermento aktyvumui, taikant PAM. Eksperimentinis planas ir gauti rezultatai (atsakas) bei atliktos dispersinės analizės (ANOVA) duomenys pateikti 3.12 ir 3.13 lentelėse.

3.12 lentelė. Eksperimentinis planas ir atsako vertės gautos atliekant bendro temperatūros ir pH poveikio įvertinimą optimaliam EstAG1 veikimui.

<i>Nr.</i>	<i>Veiksny 1 A: Temperatūra</i>	<i>Veiksny 2 B: pH</i>	<i>Atsakas 1 Aktyvumas, U/mg</i>
1	47,5	7,5	1,54539 ± 0,2827
2	47,5	7,5	1,68295 ± 0,1208
3	80	12	0,507139 ± 0,0207
4	47,5	1,1	0,0756 ± 0,0464
5	47,5	7,5	1,8806 ± 0,0324
6	1,5	7,5	0,060873 ± 0,0226
7	47,5	13,9	0,743678 ± 0,1064
8	93,5	7,5	0,003956 ± 0,0022
9	80	3	0,00139 ± 0,0007
10	15	12	0,004598 ± 0,0086
11	47,5	7,5	1,5067 ± 0,0429
12	47,5	7,5	1,53034 ± 0,0433
13	15	3	0,000768 ± 0,0041

Nustatyta, kad pasirinkti tyrimui kintamieji turėjo reikšmingos įtakos EstAG1 aktyvumui ir nustatytos preliminarios optimalios fermento veikimui

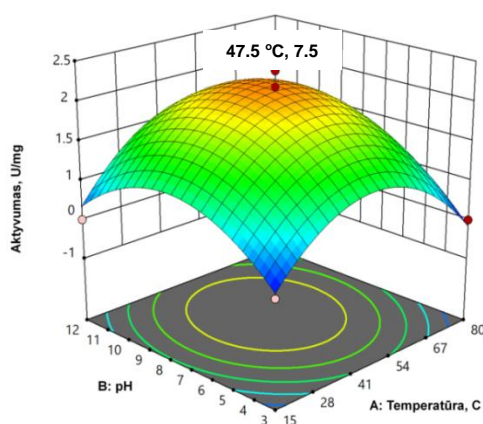
temperatūros ir pH reikšmės lygios 47,5 ir 7,5, atitinkamai. Optimizacijos atsako paviršiaus plotas parodytas 3.14 paveiksle.

3.13 lentelė. EstAG1 aktyvumo skirtingose temperatūrose ir pH optimizacijos modelio ANOVA.

	Kvadratų suma	df ⁱ	Vidutinis kvadratas	F- reikšmė	p- reikšmė	
Modelis	7.00	5	1.40	54.05	< 0.0001	<i>reikšminga</i>
A-Temperatūra	0.0223	1	0.0223	0.8621	0.3841	
B-pH	0.2644	1	0.2644	10.21	0.0152	
AB	0.0630	1	0.0630	2.43	0.1629	
A ²	4.70	1	4.70	181.25	<0.0001	
B ²	2.79	1	2.79	107.58	<0.0001	
Likutinė paklaida	0.1813	7	0.0259			
Atitikimo nebuvimas	0.0834	3	0.0278	1.14	0.4355	<i>nereikšmingas</i>
Teorinė paklaida	0.0979	4	0.0245			
R²: 0.9748						

ⁱ – laisvės laipsniai (angl., *degrees of freedom*)

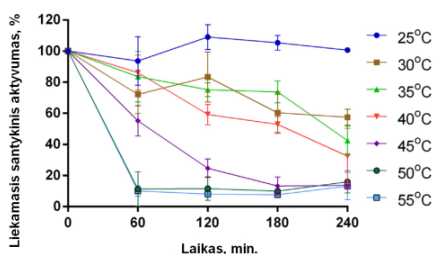
Sudaryto modelio F- ir p-reikšmės buvo 54,05 ir 0,0001, atitinkamai. Tai parodo, kad modelis yra reikšmingas, t.y., statistiškai tinkamas aprašyti ryšį tarp nepriklausomų kintamųjų (temperatūros ir pH) bei atsako. Apskaičiuotas determinacijos koeficientas (R^2) - 0,9748. Tokia šio koeficiento reikšmė parodo, kad 97,48 % atsako priklauso nuo pasirinktų kintamųjų, o likę 2,52 % nėra aprašomi sudaryto statistinio modelio.



3.14 pav. Atsako paviršiaus plotas apibūdinantis bendrą temperatūros ir pH poveikį optimaliam EstAG1 aktyvumui. Optimizavimo rezultatai: 47,5 °C, pH 7,5. Naudotas substratas: *p*-NPC, aktyvumas 2 U/mg.

Temperatūros ir pH įtaka EstAG1 aktyvumui buvo papildomai analizuojama 40-55 °C ir pH 7-9 ribose, atliekant šių aplinkos veiksnių įtakos fermento veikimui analizę, vertinant juos atskirai. Rezultatai parodė, kad optimalūs EstAG1 veikimui temperatūra ir pH yra 45 °C ir pH 8, atitinkamai. Tokie rezultatai sutampa su analize atlikta taikant PAM. Be to, nustatyta, kad 45-50 °C temperatūrų ribose EstAG1 pasižymi beveik vienodu aktyvumu, tačiau mažinant ir didinant temperatūrą bei keičiant aplinkos pH, fermento aktyvumas reikšmingai sumažėja. Taip pat nustatyta, kad bendrai EstAG1 išlaiko aktyvumą 20-70 °C temperatūrose ir pH 4-11 ribose. EstAG1 pagal būdingas temperatūras ir optimalaus veikimui pH reikšmes galėtų būti priskirtas prie nežymiai karščiui atsparaus, šarminio lipolizinio fermento. EstAG1 būdingos temperatūrose ir pH veikimo ribos nėra neįprastos įvairių bakterijų lipazėms/esterazėms. Visi toliau šiame darbe vykdyti EstAG1 aktyvumo matavimai buvo atliekami nustatytomis optimaliomis sąlygomis: 45 °C temperatūroje, pH 8.

Po EstAG1 inkubavimo 240 min. skirtingose temperatūrose, kas 60 min. matuojant liekamąjį fermento aktyvumą, buvo nustatyta, kad EstAG1 yra jautrus aukštai temperatūrai. EstAG1 aktyvumas per pirmąsias inkubavimo 50-55 °C temperatūroje minutes reikšmingai nukrito ir po 180 min. inkubavimo šiose temperatūrose išlaikė tik 10 % aktyvumo. Nors 45 °C temperatūra EstAG1 aktyvumui nustatyta kaip optimali, ilgesnį laiką šioje temperatūroje inkubuojamas fermentas jau po 60 min. išlaikė tik 60 % maksimalaus nustatyto savitojo aktyvumo ir iki inkubacijos laiko pabaigos fermentas laipsniškai kas 60 min. prarado po 10 % aktyvumo. Panaši tendencija nustatyta ir 40, 35 bei 30 °C temperatūrose, bet išlaikant didesnę liekamąjį aktyvumą negu 45 °C (3.15 pav.).



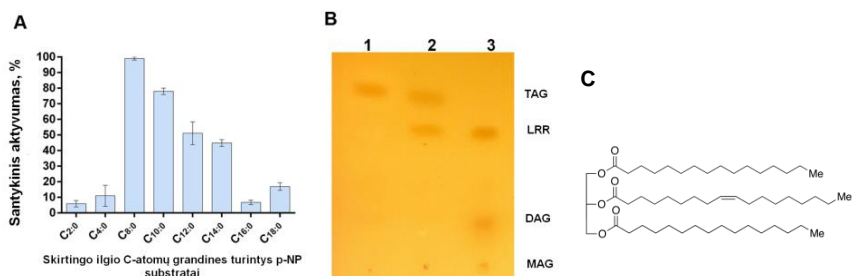
3.15 pav. EstAG1 termostabilumas.

Vienintelė nustatyta temperatūra, kurioje EstAG1 pasižymėjo 100 % ar net aukštesniu liekamuojų aktyvumu visą inkubavimo laiką buvo 25 °C temperatūra. Stabilumas tokioje temperatūroje gali turėti praktinės reikšmės. Remiantis termostabilumo charakteristika, EstAG1 lipolizinis fermentas

galėtų būti naudingas šiuo metu aktualiose gamtai draugiškose (ekologiškose) pramonės srityse, kur procesų vykdymas, gaunant tam tikrus produktus, nereikalauja didelio energijos įnašo, pavyzdžiui, temperatūrai jautrių itin grynų organinių junginių sintezė, detergentų pramonė, bioremediacija ir biokonversija (Panda ir Gowrishankar, 2005, Kavitha, 2016).

3.9.2 EstAG1 substratinis savitumas ir regiosavitumas

Norint išsamiau charakterizuoti EstAG1 lipolizinį fermentą, buvo įvertintas jo gebėjimas hidrolizuoti skirtingo ilgio anglies atomų grandines turinčius sintetinius *p*-NP substratus (nuo C_{2:0} iki C_{18:0}), nustatyti tam tikrų substratų hidrolizės kataliziniai parametrai (konstantos) ir EstAG1 regiosavitumas. Didžiausias EstAG1 aktyvumas nustatytas *p*-NPC (C_{8:0}) atžvilgiu (3.16 pav., A). Tačiau 3.16 (A) paveiksle taip pat matoma, kad EstAG1 bendrai yra aktyvesnis vidutinę ir ilgą anglies atomų grandinę turintiems *p*-NP substratams, o trumpesnę nei C_{8:0} turinčių substratų atžvilgiu fermentas yra beveik neaktyvus (3.16 pav., A).



3.16 pav. Substratinio savitumo diagrama (A) ir (B) plonasluoksnė 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerolio (1,3-DP-2-OG) hidrolizės produktų chromatograma: 1 – kontrolė (fermentais nepaveiktas 1,3-DP-2-OG), 2 – po EstAG1 katalizės gauti 1,3-DP-2-OG hidrolizės produktai, 3 – po Lipolase 100 L katalizės gauti 1,3-DP-2-OG hidrolizės produktai. LRR - laisvosios RR, TAG – triacilglicerolis, DAG – diacilglicerolis, MAG – monoacilglicerolis. (C) 1,3-DP-2-OG molekulės schema.

Lipolizinių fermentų savitumo *p*-NP substratų atžvilgiu nustatymas – bendrai priimtas standartinis testas, preliminariai leidžiantis tiriamąjį lipolizinį fermentą priskirti lipazei arba esterazei. Gauti rezultatai parodė, kad EstAG1 lipoliziniam fermentui būdingas tarpinis tarp esterazių ir lipazių savitumo *p*-NP substratams profilis. Toks neryškiai išreikštas savitumas substratui pastaruoju metu nustatomas dažnai. Dėl šių ir kitų panašių nustatytų charakteristikų, plačias substratinio savitumo ribas turinčias esterazes ir lipazes netgi siūloma klasifikuoti kaip “universalias lipazes” (EC

3.1.1.X), priskiriant joms vieną EC numerį (Bariuso ir kt., 2016). Lipolizinių fermentų platus substratinis savitumas taip pat gali būti susijęs su tuo, kad fermentai, lyginant su *in vivo* aplinka, *in vitro* aplinkoje tampa mažiau saviti, „neišrankūs“ substratui ir geba katalizuoti įvairių panašių (ir visai nebūdingų / nenustatytų) substratų virsmus (Pandya ir kt., 2014). Taip, vis dažniau, tiriant lipolizinius fermentus, nustatyti ribas tarp kai kurių esterazių ir lipazių remiantis vien tik jų geba katalizuoti tam tikrus *p*-NP ar trumpas / ilgas RR TAG turinčių molekulių hidrolizę, tampa vis sudėtingiau. Visgi, kokybiškai vertinant EstAG1 gebą katalizuoti natūralių riebalinių medžiagų hidrolizę, buvo nustatyta tributirino hidrolizė (3.17 pav.), bet aktyvumu alyvuogių aliejaus atžvilgiu (tikrųjų lipazių substratas) fermentas nepasižymėjo. Apibendrinant rezultatus, gautus tiriant EstAG1 substratinį savitumą su *p*-NP esteriais ir natūraliais TAG, galima daryti preliminarią išvadą, kad EstAG1 yra karboksilesterazė (EC 3.1.1.1).



3.17 pav. EstAG1 tributirino hidrolizės zona.

Tiriant EstAG1 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerolio hidrolizės ypatumus, buvo nustatyta, kad lyginant tiriamojo fermento atpalaiduotus produktus su produktais, gautais paveikus substratą žinomo savitumo (*sn*-1,3) lipaze, buvo padaryta išvada, kad EstAG1 regiosavitumu nepasižymėjo. EstAG1 katalizavo esterinio ryšio hidrolizę visuose substrato *sn*- pozicijose, tuo tarpu katalizuojant Lipolase L100 susidarė MAG (2-oleoilglicerolis) ir DAG (3-palmitoil-2-oleoilglicerolis, 1-palmitoil-2-oleoilglicerolis), patvirtinantys žinomą fermento *sn*-1,3 pozicinį savitumą (3.16 pav., B). Pozicinis neatrankumas yra pakankamai dažnai pasitaikanti lipolizinių fermentų ypatybė (Lanser ir kt., 2002), nors yra nustatyta, kad *Staphylococcus* sp. pre-pro-peptidinės struktūros lipazės dažnai pasižymi regiosavitumu (Horchani ir kt., 2012). Dažnai lipolizinių fermentų regiosavitumas gali būti įvairias būdais moduluojamas (Silveira ir kt., 2017).

Kinetiniai EstAG1 parametrai nustatyti tiriant skirtingas geriausiai fermento hidrolizuojamų *p*-NP substratų koncentracijas. Nustatytas linijinis EstAG1 hidrolizės reakcijos greičio atsakas į skirtingas *p*-NPC substrato koncentracijas, naudojamas reakcijoms vykdyti. Nustatyta, kad EstAG1 V_{max} , K_M , k_{kat} bei k_{kat}/K_M reikšmės (katalizuojant *p*-NPC hidrolizę) lygios $2,068 \pm 0,64 \mu M \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, $2,054 \times 10^{-10} \pm 0,056 \mu M$, $1,969 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ir $9568 \times 10^{12} \text{ s}^{-1} \cdot \mu M^{-1}$, atitinkamai.

3.9.3 Metalų jonų, detergentų ir organinių tirpiklių įtaka EstAG1 aktyvumui

Fermentų atsparumo įvairiems metalų jonams, detergentams ir organiniams tirpikliams tyrimas yra svarbus norint suprasti fermento veikimo principus bei svarstyti fermento pritaikymo galimybes. Norint nustatyti minėtų medžiagų poveikį EstAG1 aktyvumui, visos fermentinės reakcijos buvo vykdomos EstAG1 nustatytomis standartinėmis reakcijos sąlygomis (2.16.5).

Pirma, buvo tirtas įvairių vien- ir divalenčių metalų jonų (naudoti pasirinktų metalų chloridai) poveikis. Visų tyrime naudotų metalų jonų, išskyrus Mg^{2+} ir K^+ , kurie beveik neturėjo įtakos fermento aktyvumui, 5 mM koncentracijos visiškai inaktyvavo fermentą. Fermentinės reakcijos mišinyje esantis 1 mM Ca^{2+} jonų hiperaktyvino EstAG1, o po inkubacijos su 1 mM Ni^{2+} , Mn^{2+} jonais, fermentas pasižymėjo ≥ 50 % liekamuuju aktyvumu (3.14 lentelė).

3.14 lentelė. Įvairių metalų jonų ir EDTA poveikis EstAG1 aktyvumui fermentinės reakcijos metu. Paryškintas ≥ 50 % liekamasis EstAG1 aktyvumas.

Metalų jonai	Koncentracija fermentinės reakcijos mišinyje (mM)	Liekamasis aktyvumas, %
Ca^{2+}	1	149,04 ± 28,88
	5	0
Mg^{2+}	1	94,89 ± 19,36
	5	11,45 ± 11,04
Ni^{2+}	1	71,09 ± 3,80
	5	0
Ba^{2+}	1	38,09 ± 14,44
	5	0
Cd^{2+}	1	49,41 ± 6,59
	5	0
Co^{2+}	1	47,83 ± 13,98
	5	0
Mn^{2+}	1	55,16 ± 9,76
	5	0
Fe^{3+}	1	33,90 ± 9,38
	5	0
K^+	1	70,68 ± 15,13
	5	9,87 ± 8,70
EDTA	1	135,1 ± 12,2
	5	86,35 ± 6,8

Inkubuojant (25 °C, 30 min.) terpėje su tam tikrais metalų jonais (1 mM Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ ir K⁺ - inkubavimui atrinkti dėl nustatyto aktyvuojančio arba nestipriai slopinančio poveikio) (3.17 lentelė) nustatyta, kad EstAG1 aktyvumas, lyginant su rezultatais gautais nepaveikus fermento, praktiškai nesumažėjo arba sumažėjo tik iki ~80 % (veikiant su Ca²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, K⁺ katijonais). Po inkubavimo su Mn²⁺, EstAG1, atliekant reakciją standartinėmis sąlygomis, pasižymėjo hiperaktyvumu – nustatytas aktyvumas buvo >3 kartus didesnis lyginant su nepaveikto fermento aktyvumu. Ba²⁺ taip pat aktyvavo EstAG1, tačiau nustatytas mažesnis aktyvumas nei naudojant Mn²⁺ jonus.

Metalų jonus chelatuojančio EDTA agento poveikis skirtingomis tyrimo sąlygomis (pridedant jo į reakcijos mišinį bei inkubuojant 30 min. su EstAG1) neturėjo didelės reikšmės liekamajam EstAG1 aktyvumui. Apibendrinant rezultatus, galima teigti, kad EstAG1 yra tam tikrų metalų jonų aktyvinamas fermentas. EstAG1 aktyvinimas tam tikrais metalų jonais reiškia, kad fermentas yra „skatinamas“ geriau veikti (būti aktyvesniu), kai jo išorinėje aplinkoje yra specifinių metalų jonų. Lipolizinių fermentų atveju jų aktyvinimas į terpę pridėjus tam tikrų metalų jonų nėra reta savybė: dažnai nustatoma, kad tiek stafilokokų, tiek kitų mikroorganizmų lipazių/esterazių aktyvumas didėja aplinkoje esant Ca²⁺ arba kitų divalenčių jonų (numanoma, kad Ca²⁺ savitai stabilizuoja šių fermentų struktūrą, kas savo ruožtu skatina didesnę aktyvumą).

Pramoniniu požiūriu detergentų / paviršiaus aktyvių medžiagų poveikiui atsparūs lipoliziniai fermentai gali būti naudojami kaip natūralūs, ekologiški ir gamtai nekenkiantys papildomi plovimo agentai bei kai kurių cheminių junginių, esančių detergentuose, pakaitalai. Be to, dažnai nustatoma, kad detergentai gali būti naudojami lipolizinių fermentų aktyvinimui ir taip vadinamam lipolizinių fermentų, turinčių dangtelio domeną, molekuliniam bioimprintingui (fermentų užlaikymui aktyvioje būsenoje), kuris turi teigiamos įtakos funkcinėms fermento savybėms (Mukherjee ir Gupta, 2015, Mukherjee ir Gupta, 2016). Visų naudotų nejoninių Tween ir Triton X-100 detergentų skirtingų koncentracijų tirpalai, pridėti į fermentinės reakcijos mišinį veikė EstAG1 slopinančiai (3.15 lentelė). Atliekant fermentinę reakciją su NDS (0,02 % ir 0,05 %), fermento aktyvumas reikšmingai nesumažėjo, tačiau padidinus koncentraciją iki 0,5 % fermento liekamasis aktyvumas tesiekė 12,46 ± 7,5 %. Katijoninio detergento CTAB 0,02 % koncentracija neturėjo didelės įtakos EstAG1 katalizuojamos reakcijos greičiui, tačiau didesnės tirtos koncentracijos

fermento aktyvumą *p*-NPC substrato atžvilgiu slopino. Dėl nustatyto tam tikrų naudotų NDS ir CTAB koncentracijų (% v/v) (3.15 lentelė) poveikio fermentui, pridėjus jų į reakcijos mišinį, nuspręsta atlikti NDS ir CTAB poveikio EstAG1 tyrimą inkubuojant fermentą su šiomis (1 %, v/v) medžiagomis 30 min. Nustatyta, kad po 30 min. inkubavimo su CTAB, fermento aktyvumas, atliekant reakciją standartinėmis sąlygomis, padidėjo 1,5 karto, lyginant su reakcija, katalizuojama pastarąja chemine medžiaga nepaveikto fermento. Po poveikio NDS, fermentinis liekamasis aktyvumas sudarė tik 33 %. Apibendrinant galima teigti: 1) detergentai gali padidinti lipolizinių fermentų (turinčių dangtelių domeną) aktyvumą padidindami vandens-lipido paviršiaus plotą; 2) stabilizuoti fermentus atviroje, aktyvioje konfirmacijoje; 3) padidinti substrato tirpumą ir 4) neleisti lipoliziniams fermentams agreguoti (lipoliziniai fermentai dėl natūraliai turimų hidrofobinių molekulių dalių, tokių kaip dangtelio domenai, dažnai linkę agreguoti) (Guncheva ir Zhyriakova, 2011). Detergentų poveikis neleidžiant lipoliziniams fermentams agreguoti dažniausiai aiškinamas šių medžiagų geba sumažinti hidrofobinių ryšių susidarymą tarp fermento molekulių, o tai, savo ruožtu, gali padidinti substrato prieigą prie aktyvaus fermento centro (Kaur ir kt., 2016).

3.15 lentelė. Įvairių detergentų poveikis EstAG1 aktyvumui fermentinės reakcijos metu. Didelis negu 50 % liekamasis santykinis EstAG1 aktyvumas paryškintas.

Detergentas	Liekamasis EstAG1 aktyvumas (%) naudojant skirtingas detergentų koncentracijas (%) reakcijos mišiniuose			
	0.02	0.05	0.1	0.5
	Tween 80	12,98 ± 4,0	6,45 ± 1,4	4,11 ± 3,9
Tween 60	11,11 ± 1,4	8,31 ± 2,2	3,44 ± 2,5	0
Tween 20	7,76 ± 0,7	10,69 ± 0,7	7,72 ± 2,0	1,31 ± 1,2
Triton X-100	8,71 ± 2,4	15,26 ± 3,0	5,72 ± 5,9	2,49 ± 0
NDS	95,93 ± 7,3	74,79 ± 7,1	52,24 ± 19,2	12,46 ± 7,5
CTAB	89,9 ± 15,8	0	0	0

Kita vertus, neigiamas detergentų poveikis EstAG1 aktyvumui, kaip jau minėta, gali būti susijęs, fermento aktyvaus centro blokavimu detergentų molekulėmis, užkertant kelią substrato patekimui.

Lipolizinių fermentų katalizuojamos sintezės reakcijos, vykdomos norint išgauti naujus, didelę pridėtinę vertę turinčius esterius, sudaro naują ir sparčiai besivystančią šių fermentų tyrimo sritį. Dažniausiai tokios reakcijos katalizuojamos mažai vandens turinčiuose arba bevandeniuose reakcijos mišiniuose (organiniuose tirpikliuose), taip pat minėtų produktų gavimui, be

tam tikrų riebalinių medžiagų, kaip substratai, įdedami ir įvairūs trumpagrandžiai bei ilgagrandžiai alkoholiai ar kiti organiniai tirpikliai. Tačiau, nemažai lipolizinių fermentų organiniuose tirpikliuose yra nestabilūs ir greitai denatūruoja (Alnoch ir kt., 2015), dėl to nenutrūksta ir vis didėjantis, nuolatinis naujų, organiniuose tirpikliuose stabilių lipazių ir esterazių paieškos poreikis. Nustatyta, kad EstAG1 yra ne tik stabilus hidrofobiniuose ir hidrofiliiniuose organiniuose tirpikliuose, bet taip pat daugelio jų hiperaktyvuojamas (3.16 lentelė).

3.16 lentelė. Organinių tirpiklių poveikis EstAG1 aktyvumui fermentinės reakcijos metu. Didesnis negu 50 % liekamasis santykinis EstAG1 aktyvumas paryškintas.

Organinis tirpiklis	Liekamasis EstAG1 aktyvumas (%) naudojant skirtingas organinių tirpiklių koncentracijas (%) reakcijos mišiniuose				
	0,5	1	5	10	20
Etanolis	119,24 ± 14,3	127,09 ± 21,4	92,45 ± 9,5	80,46 ± 12,8	66,06 ± 29,7
Metanolis	22,07 ± 3,4	33 ± 2,7	4,67 ± 2	0	0
DMSO	134,44 ± 13,6	147,63 ± 1,0	128,3 ± 24,4	143,82 ± 29,0	139,17 ± 45,0
Dioksanas	99,47 ± 20,3	79,26 ± 16,7	74,52 ± 14,7	55,33 ± 1,0	72,41 ± 15,8
<i>n</i> -heksanas	89,48 ± 20,3	45,25 ± 22,7	52,62 ± 29,1	63,93 ± 43,7	0
<i>tert</i> -butanolis	71,32 ± 13,9	69,49 ± 19,5	32,33 ± 12	2,58 ± 4	0
Acetonas	37,2 ± 2,9	32,6 ± 3,4	61,82 ± 5,5	151,49 ± 4,9	167,99 ± 6,2
2-propanolis	65,99 ± 10,7	59,6 ± 3,5	0	0	0

Pažymėtina, kad skirtingai EstAG1 veikė trumpagrandžiai alkoholiai – etanolis ir metanolis: pirminės tirtos į reakcijos mišinį pridėto etanolio koncentracijos (0,5 % ir 1 %, v/v) nežymiai hiperaktyvavo fermentą (nustatytas 119,24 ± 14,3 % ir 127,09 ± 21,4 %, atitinkamai, aktyvumas), tačiau didinant koncentraciją, buvo išlaikytas tik ≥60 % liekamasis EstAG1 aktyvumas. Pridėjus 0,5 % ir 1 % metanolio (v/v) į reakcijos mišinį, nustatyti, atitinkamai, 22,07 ± 3,4 % ir 33 ± 2,7 % liekamieji EstAG1 aktyvumai (3.16 lentelė). Taip pat aktyvinančiai EstAG1 fermentą veikė visos tirtos dipolinio aprotinio tirpiklio DMSO koncentracijos. Įdomūs rezultatai gauti tiriant acetono poveikį: aukštos (10 %, 20 %, v/v) pastarojo tirpiklio koncentracijos turėjo EstAG1 aktyvumą didinantį efektą, o mažesnės buvo labiau slopinančios. Nėpoliniai arba hidrofobiniai organiniai tirpikliai turėjo bendrą EstAG1 aktyvumą slopinantį poveikį.

3.17 lentelė. EstAG1 pirminio stabilumo aktyvuojančiuose agentuose tyrimo rezultatai. Didėnis negu 50 % liekamasis santykinis EstAG1 aktyvumas paryškintas.

Aktyvuojantis reagentas	Koncentracija	EstAG1 liekamasis aktyvumas, %
<i>Metalu jonai</i>	<i>1 mM</i>	
Ca ²⁺		79,92 ± 9,3
Mg ²⁺		333,28 ± 45
Ba ²⁺		158,85 ± 21,1
Ni ²⁺		99,88 ± 9
Mn ²⁺		92,83 ± 21,7
K ⁺		85,08 ± 13,6
<i>Detergentai</i>	<i>1 % (v/v)</i>	
CTAB		146,64 ± 23,1
NDS		33,76 ± 12,6
<i>Organiniai tirpikliai</i>	<i>50% (v/v)</i>	
Etanolis		99,68 ± 10,7
DMSO		163,42 ± 16,2
Dioksanas		124,18 ± 12,3
<i>Kiti</i>	<i>1 mM</i>	
EDTA		126,36 ± 18,1

Remiantis daugeliu atliktų tyrimų, yra nustatyta, kad skirtingi lipoliziniai fermentai, dažnai dėl nenustatytų arba pakankamai įrodymų neturinčių priežasčių, gali pasižymėti labai skirtingu jautrumu įvairiems organiniams tirpikliams. Kaip jau buvo minėta, paprastai, lipazės/esterazės yra nestabilios poliniuose, vandenyje tirpiuose organiniuose tirpikliuose. Išsamūs rezultatai, kurie buvo gauti tiriant įvairių organinių tirpiklių poveikį EstAG1 pateikti 3.16 lentelėje. EstAG1 inkubavimo su aktyvuojančiais organiniais tirpikliais rezultatai parodyti 3.17 lentelėje. Pastarojo eksperimento rezultatai parodė, kad visuose pasirinktuose organiniuose tirpikliuose (etanolis, DMSO, dioksanas), fermentas ne tik išliko stabilus, bet ir buvo aktyvinamas (po inkubavimo su DMSO ir dioksanu). Taigi, EstAG1 yra stabilus įvairių organinės sintezės pramonėje naudojamų reagentų atžvilgiu.

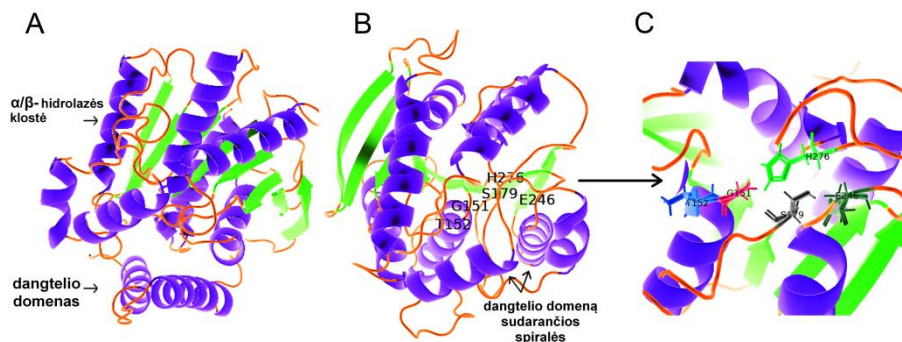
3.10 EstAG1 erdvinės struktūros modeliavimas

EstAG1 įgyjamos tretinės baltymo struktūros prognozavimui buvo pasitelkti struktūrinės homologijos modeliavimo serveriai ir juose siūlomi standartiniai protokolai. Tolimesnei analizei pasirinkti Iterative ASSEMBLY Refinement (I-TASSER) serverio siūlomi modeliai, nes tai yra viena

tiksliausių ir šiuo metu plačiausiai naudojamų simuliacijos programų (Roy ir kt., 2010, Yang ir Zhang, 2015, Zafareta ir kt., 2016).

I-TASSER EstAG1 modeliavimui atrinktus artimiausios tretinės struktūros šablonus sudarė: *S. aureus* numanoma esterazė (PDB 3D7R), bHJL (bHSL) E40 esterazė iš jūros sedimentų metagenominės bibliotekos (PDB 4XVC), hipertermofilinė karboksilesterazė iš *Archeoglobus fulgidus* archėjos (PDB 1JJI) ir bHJL EstE5 iš metagenominės bibliotekos (PDB 3 FAK). Pastarųjų ir EstAG1 a.r. sekų panašumas siekė nuo 54 % iki 21-23 %, su 99 – 79 % persidengimu. Iš 5 geriausių I-TASSER sistemoje sumodeliuotų EstAG1 galimų erdvinų struktūrų, tik viena buvo sukurta su patikimais prognozavimo įvertinimais (balais): C-balas sudarė 0,68 ir TM-balas sudarė $0,81 \pm 0,09$ (3.18 pav.).

Numanomoje EstAG1 modelio struktūroje nustatyta lipoliziniams fermentams ir kitiems α/β -hidrolazių antšeimio atstovams būdingas α/β -hidrolazės klostės domenas. EstAG1 α/β -hidrolazės klostė sudaryta iš tipišku 8 β -juostų (su 2 juosta antilygiagrečia) sujungtų 6 α -spiralėmis, kurios kartu sudaro EstAG1 fermento katalizinį domeną.



3.18 pav. EstAG1 tretinės struktūros modelis su matomais kataliziniu (α/β -hidrolaziniu) ir dangtelio domenais (A, B). (B) EstAG1 molekulės su numanomomis aktyvaus centro a.r. liekanomis, galimai tiesiogiai dalyvaujančiomis katalizėje. (C) padidintas aktyvaus centro ir galimai tiesiogiai katalizėje dalyvaujančių a.r. liekanų išsidėstymo vizualizavimas (numanoma, kad S179 (išsidėstantis netradicinėje GX SXG sekoje), E246 ir H276 – tiesiogiai katalizėje dalyvaujančios ir galimai katalizinę triadą sudarančios a.r. liekanos, G151 – GDGTG pentapeptide, būdingame EstAG1 Ser vietoje išsidėstanti a.r. liekana, T152 – galimai katalizėje tiesiogiai dalyvaujanti arba oksianijoninę angą formuojanti a.r. liekana.

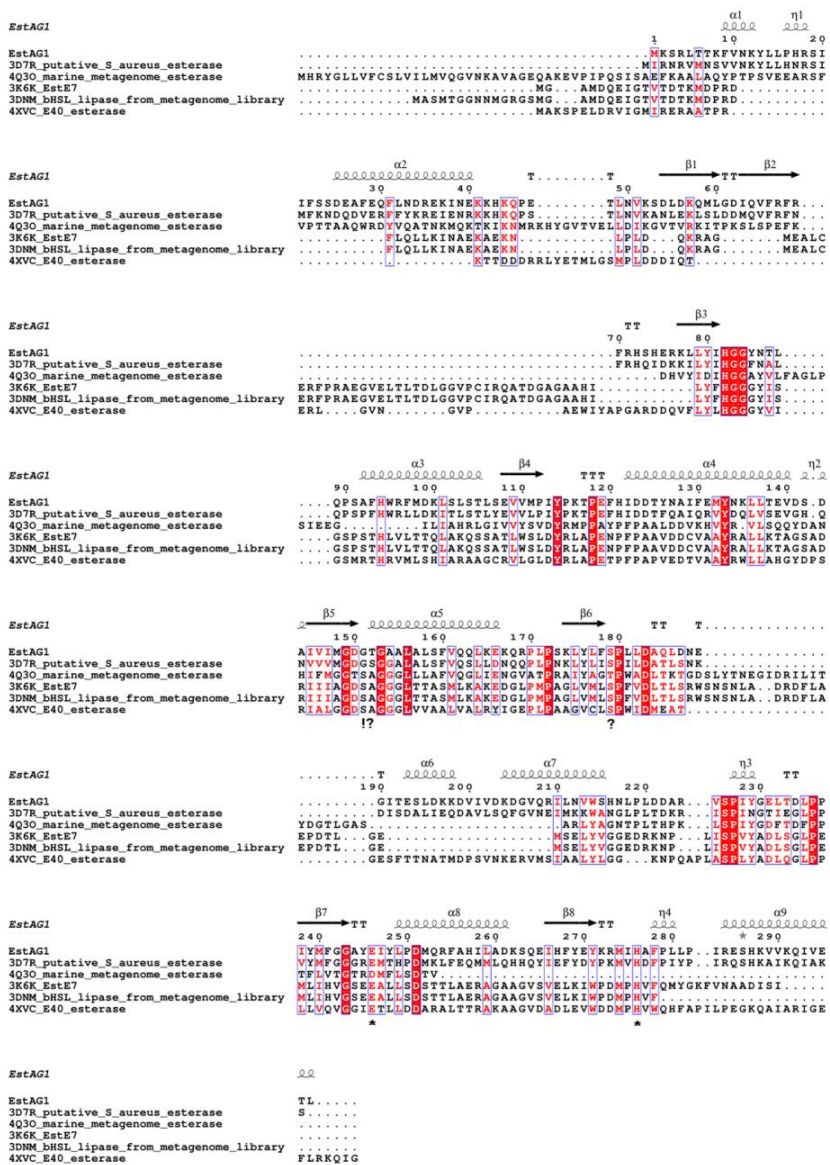
Be to, remiantis EstAG1 sudarytu modeliu, šiam lipoliziniam fermentui yra būdingas dangtelio domenas – struktūra, būtina kai kurių lipolizinių fermentų katalizei (3.18 pav., A, B). EstAG1 molekulės tretinės struktūros modelyje nustatytas dangtelio domenas savo struktūra panašus į

bHJL šeimos ir mikromicetų lipoliziniams fermentams būdingus dangtelio domenų: iš dviejų atskirų α -spiralinių regionų sudaryta struktūra, dengianti numanomą EstAG1 aktyvųjį centrą (3.18 pav., B, C). Tokia dangtelio struktūra visiškai skiriasi nuo „tikrųjų“ lipazių šeimai (I šeimai pagal Kovacic ir kt., 2019) (Kovacic ir kt., 2019) ir kt. nustatytų dangtelio domenų, kurie struktūriškai dažniausiai sudaryti iš kelių kilpų arba vienos α -spiralės (Khan ir kt., 2017).

3.11 Daugybinis sekos palyginimas ir analizė

Daugybinis EstAG1 a.r. sekos palyginys (3.19 pav.) su aprašytų struktūrinių homologų, absoliuti daugumą kurių priklauso bHJL šeimai, sekomis (Robert ir Gouet, 2014) atskleidė, kad lyginant su dažniausiai akcentuojamais bHJL šeimai būdingais konservatyviais (Kovacic ir kt., 2019, Kim, 2017) a.r. sekų motyvais, EstAG1 sekoje nustatyti šie motyvai: 1) HGGY^[82-85] seka dalinai sudaranti oksianijoninę angą (dažniausiai bHJL šeimai būdinga HGGG); 2) netradicinis GDGTG^[149-153] pentapeptidas, neturintis charakteringos ir absoliučiai konservatyvios Ser a.r. liekanos (kuri, remiantis daugeliu literatūros šaltinių apie lipolizinius fermentus duomenimis, EstAG1 turėtų išsidėstyti 151 pentapeptido pozicijoje: vidurinė pentapeptido a.r. liekana); 3) LPP seka, po kurios seka pakankamai konservatyvus motyvas su Asp/Glu ir His a.r. liekanomis, kurios tipiniu atveju, kartu su pentapeptide esančiu Ser, sudaro katalizinę fermento triadą. Taigi, daugybinio EstAG1 palyginio rezultatai atskleidė, kad šiam fermentui būdingi pakankamai atipiniai konservatyvių sekų, sutinkamų bHJL, motyvai.

Viena įdomiausių atradimų EstAG1 sekoje sudarė daugeliui bakterinių lipazių/esterazių būdingame konservatyviajame pentapeptide (GDGTG^[149-153]) vietoje Ser, 151 pozicijoje išsidėstantis Gly. Pažymėtina, kad GDGTG^[149-153] pentapeptidą sudarantis motyvas EstAG1 sekoje buvo nustatytas tiek sekvenuoto *S. saprophyticus* AG1 gDNR, tiek po pET-26b(+) klonuoto *estAG1* geno sekoje, atliekant rekombinantinio plazmidinio vektoriaus konstrukto sekoskaitą.



3.19 pav. Daugybinis EstAG1 a.r. sekos palyginys su artimiausiai eksperimentiškai aprašytais homologais: nuanoma esteraze (PDB kodas 3D7R), jūros metagenomo esterazė (PDB kodas 4Q30), bHJL homologas EstE7 (PDB kodas 3K6K), bHJL lipazė iš metagenomo (PDB kodas 3DNN), E40 esterazė (PDB kodas 4XVC). α -spiralės, β -juostos, atsitiktinės spiralės ir β -linkiai pažymėti α , β , η ir T, atitinkamai. Identiškos ir itin konservatyvios a.r. liekanos žymimos raudona ir balta spalvomis, atitinkamai. * pažymėtos katalizinės triados Glu-246 ir His-276 a.r. Šauktuku (!) pažymėta vieta, kur tipišku atveju konservatyviame GX SXG išsidėsto katalizinės triados nukleofilinė Ser a.r. liekana, klausukas (?) žymi Ser-179 - neįprastoje vietoje išsidėstanti, galimai katalizėje dalyvaujančią nukleofilinę Ser a.r. liekaną, ir Thr-152 – konservatyviajame GDTGG išsidėstančią a.r. liekaną, kuri nors ir mažai tikėtina, bet hipotetiškai galėtų atlikti katalizinės a.r. liekanos funkciją.

Neįprasto pentapeptido atradimas privertė iškelti klausimą, kur sekoje išsidėsto lipoliziniams fermentams itin konservatyvus, katalizėje dalyvaujantis nukleofilinis Ser ir, ar apskritai tokia a.r. liekana sekoje yra ir dalyvauja katalizėje, ar fermentas veikia pagal kitokį, lipoliziniams fermentams dar neaprašytą katalizės mechanizmą, naudojant netradicinę katalizinių a.r. diadą/triadą. Vieną iš iškeltų hipotezių katalizinio Ser atžvilgiu sudarė prielaida, kad galbūt EstAG1 katalizėje dalyvauja ir nukleofilinio Ser funkciją atlieka Thr-152 (išsidėstantis GDGTG^[149-153] pentapeptide, bet ne paprastai būdingoje katalizinio Ser pozicijoje (EstAG1 atvėju tai Gly-151)). Tokią prielaidą paskatino tai, kad Thr a.r. liekana nukleofilinės katalizinės a.r. vaidmenį atlieka kai kuriose α/β -hidrolazių antšeimiiui priklausančiose peptidazėse (treonino peptidazės), o šių fermentų katalizės mechanizmas yra identiškas lipolizinių fermentų katalizės mechanizmui. Tačiau, žinoma, kad Thr-152 vietoje (X₂), lipolizinių ir susijusių fermentų GX SXG struktūros pentapeptiduose, dažniausiai išsidėsto oksianijoninę angą su papildomomis, arčiau N-galo išsidėstančiomis a.r. liekanomis, formuojanti a.r.

Tretinės EstAG1 struktūros modelio išsami analizė atskleidė, kad be Thr-152, kuris labiau tikėtina, kad EstAG1 aktyviajame centre sudaro oksianijoninės angos dalį, netoli kitų katalizėje tikėtinai dalyvaujančių a.r. liekanų (Glu-246 ir His-276), erdvėje išsidėsto Ser-179 (pirminėje sekoje išsidėstantis SPLL^[179-182] motyve) (3.18 pav., C; 3.19 pav.). Tai, kad galimai būtent Ser tiesiogiai dalyvauja EstAG1 vykdomoje katalizėje, palaikė rezultatai gauti fermentą paveikus Pefabloc-SC slopikliu, kuris būdamas sulfonilinančiu agentu, veikia specifiškai į Ser hidroksigrupę, sukeldamas negrįžtamą slopinimą. Po poveikio slopikliu, EstAG1 aktyvumas sumažėjo daugiau negu trečdaliu: nustatytas 26 ± 2.2 % liekamasis aktyvumas.

Atliekant analizę, taip pat nustatyta, kad EstAG1 a.r. sekoje vietoje į katalizinės triados sudėtį dažniausiai įeinančios rūgštinės Asp a.r. liekanos, išsidėsto analogiška Glu (Glu-246) am.r liekana. Nuo Glu-246 link C-galo pasroviui išsidėsto His-276, kuri remiantis literatūros ir sekų analizės duomenimis greičiausiai sudaro trečiąją EstAG1 katalizinę funkciją atliekančią a.r. Ser/His/Glu katalizinės triados yra būdingos tiek lipazėms, tiek esterazėms, bet Ser/Asp/His yra jų tarpe dažniau sutinkamas triados variantas (Schrag ir kt., 1991, Nachon ir kt., 2005, Li ir kt., 2015).

3.12 EstAG1 katalizei svarbių a.r. identifikavimas

Norint eksperimentiškai nustatyti, kokios aktyviajame EstAG1 centre esančios a.r. liekanos yra svarbios katalizei, buvo pasitelkta visos pET-26b(+)_*estAG1* plazmidės taikiniui specifinė mutagenėzė. Kaip mutacijų taikiniai pasirinkta preliminariai nustatyta EstAG1 numanoma katalizinė triada – neįprastoje vietoje (SPLL^[179-182] motyve) išsidėstantis Ser-179, Glu-246 ir His-276, bei EstAG1 GDGTG^[149-153] pentapeptido Gly-151, kurios vietoje tipiniuose pentapeptiduose (GX SXG) išsidėsto Ser; bei Thr-152. Gly-151 pasirinkti kaip mutacijos taikiniai, norint įvertinti, ar Gly151Ser galėtų padidinti fermento aktyvumą, nes įvykus mutacijai, būtų atstatytas klasikinis, katalizinį Ser turintis GX SXG (GDSTG). Mutantinių pET-26b(+)_*estAG1* plazmidžių tikslinės, į *estAG1* įvestų mutacijų teisingos vietos patvirtinamos atliekant plazmidžių mutantinių insertų sekoskaitą.

Mutantinių *estAG1* genų raiška vykdyta *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse, mutantiniai fermentai gryninti iš netirpios citoplazminės ląstelių frakcijos, nes formavo netirpius kūnelius. Gryninimui ir rentūracijai taikyti IMAC denatūruojančiomis sąlygomis bei gelfiltracija/dializė, atitinkamai. Atliekant gautų rekombinantinių mutantinių fermentų NDS-PAGE, gryo natyvaus EstAG1 ir mutantinių fermentų molekulinės masės sutapo ir buvo lygios ~36 kDa (rezultatai nepateikti).

Išgrynintų mutantinių baltymų aktyvumo tyrimai, atliekant standartinę reakciją (2.9 poskyris), parodė, kad tiek Ser179Gly, tiek Ser179Ala EstAG1 mutantai, lyginant su laukinio tipo EstAG1 fermento aktyvumu, buvo visiškai inaktyvuoti (3.18 lentelė).

3.18 lentelė. Santykiniai specifiniai mutantinių EstAG1 fermentų, su atitinkamomis a.r. pakaitomis, aktyvumai.

Lipolizinis fermentas	Santykinis aktyvumas, %
laukinis tipas	100
S179G mutacija	0
G151S mutacija	80 ± 5,9
T152A mutacija	56,76 ± 1,7
S179A mutacija	0
E246A mutacija	6,45 ± 2,4
H279A mutacija	23,15 ± 1,42
S179A / E246A / H279A mutacijos	0

Pastarieji rezultatai patvirtino preliminarius spėjimus, kad EstAG1 yra unikalus fermentas, kurio nukleofilinė Ser a.r. liekana išsidėsto iki šiol

nenustatyta, lipoliziniams fermentams netipiniame SPL^[179-182] a.r. sekos motyve. Kaip jau buvo minėta, daugumos žinomų lipolizinių fermentų katalizinės triados nukleofilinis Ser išsidėsto itin konservatyviame GX SXG pentapeptide, rečiau GDSL a.r. sekos motyve. Vienintelis į šiame darbe aprašomą atvejį panašus, žinomas katalizinio Ser išsidėstymo motyvas yra SXXK (1.1 lentelė), kuris yra būdingas VIII bakterijų lipolizinių fermentų (esterazių) šeimai (Kovacic ir kt., 2019), tačiau šios šeimos atstovai pasižymi ypatingu struktūriniu tapatumu su β -laktamazėmis ir DD-peptidazėmis (Wagner ir kt., 2002) ir yra mažai panašūs į α/β -hidrolazes.

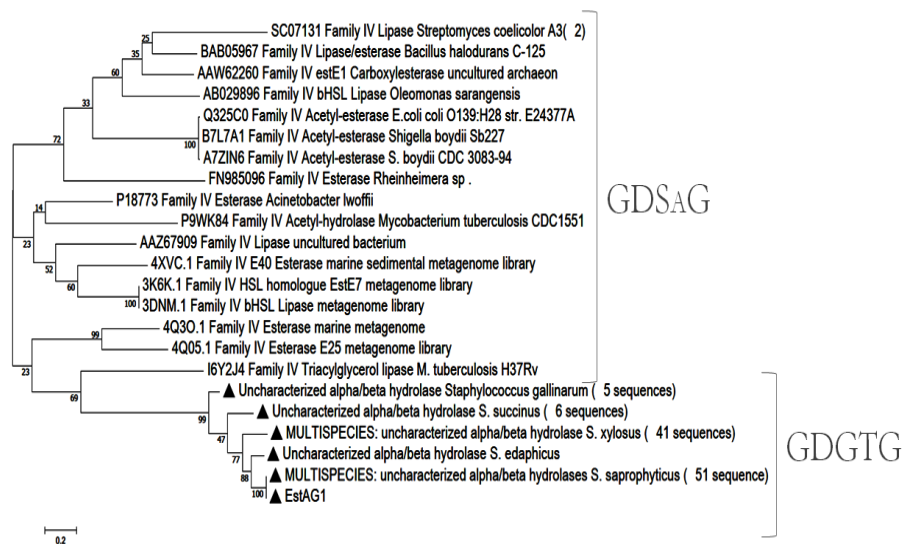
Taip pat reikšmingas fermentinio aktyvumo sumažėjimas nustatytas EstAG1 Glu246Ala bei His276Ala mutantuose. Triguba EstAG1 Ser179Ala:Glu246Ala:His276Ala mutacija taip pat lėmė visišką lipolizinio aktyvumo praradimą (lentelė 3.18). Tokie rezultatai leidžia teigti, kad Ser179, Glu246 ir His276 sudaro EstAG1 katalizinę triadą. Gly151Ser mutaciją turintis EstAG1, lyginant su laukinio tipo fermentu, pasižymėjo $80 \pm 5,9$ % santykinu aktyvumu. Tokie rezultatai rodo, kad nenatūraliai įvedant Ser į EstAG1 fermento GDGTG^[149-153], atstatant klasikinių GX SXG pentapeptidą, nepagerino katalizinio aktyvumo, ir, kad pentapeptide esanti Gly-152 nėra katalizei esminė a.r., kadangi šią mutaciją turinčio baltymo aktyvumas išlieka pakankamai aukštas. Taip pat galima teigti, kad Gly151Ser mutacijos nulemtas aktyvumo sumažėjimas yra susijęs su tuo, kad pakeitus aktyviajame centre netoli katalizinių a.r. išsidėstančią nepolinę Gly-151 a.r. liekaną polinę Ser151 a.r., vis dėlto sutrikdomas katalizei vykti tinkamas aktyviojo fermento centro a.r. liekanų jonizacijos balansas.

Fermento su Thr152Ala mutacija lipolizinis aktyvumas, lyginant su laukinio tipo EstAG1, sumažėjo beveik 50 %. Tai nurodo, kad Thr-152 yra pakankamai svarbi EstAG1 katalizei a.r., ir, remiantis literatūros duomenimis sudaro oksianijoninės angos, stabilizuojančios katalizės metu susidarančią pereinamąją būseną, suteikiant papildomus vandenilinius ryšius, dalį. Jeigu, kaip buvo kelta hipotezė, Thr-152 tiesiogiai dalyvautų katalizėje kaip nukleofilinė a.r. liekana, jos mutacija sukeltų visišką arba žymiai drastiškesnę aktyvumo praradimą. Tačiau, oksianijoninę angą formuojančios a.r. liekanos lipoliziniuose fermentuose taip pat yra itin svarbios katalizei ir jų mutacijos dažnai nulemia reikšmingą, daugiau negu 80 % siekiantį aktyvumo sumažėjimą, tam tikrais atvejais ir visišką aktyvumo praradimą (Choi ir kt., 2016). Bendrai įvertinus gautus Thr-152 mutacijos rezultatus, padaryta prielaida, kad Thr152Ala mutacijos atveju nustatytas pakankamai aukštas fermento aktyvumas, nes Ala a.r. pakaita gali

dalinai atlikti Thr funkciją. Bendrai paėmus, įvairių bakterinių lipolizinių fermentų GX₁SX₂G pentapeptiduose X₂ pozicijoje, gana dažnai sutinkama Ala a.r. liekana (1.1 lentelė), sudaranti vieną iš oksianijoninės angos a.r.

3.13 EstAG1 filogenetinė analizė

Filogenetinė fermento analizė parodė, kad EstAG1 a.r. seka su artimiausiais homologais formuoja vieną klasterį (atskirą kladą) (paveiksle pažymėtos juodais trikampiais) – tai bakterinės kilmės *Staphylococcus* genčiai priklausančių necharakterizuotų, numanomų lipazių arba karboksilesterazių, galimai lipolizinį aktyvumą turinčių α/β -hidrolazių, sekos (3.20 pav.).



3.20 pav. Neįsaknydintas didžiausio panašumo (angl., *Maximum-Likelihood*) EstAG1 ir IV šeimos homologų filogenetinis medis. Bootstrap įverčiai parodyti prie šakų. Medžio šakų ilgio vienetai atitinka evoliucinio atstumo vienetus naudotus filogenetinio medžio gavimui. Galutinį duomenų rinkinį filogenetinio medžio gavimui sudarė 122 sekos. Juodais trikampiais (▲) pažymėta klada, kurią sudaro EstAG1 ir eksperimentinių egzistavimo įrodymų neturintys, necharakterizuoti artimiausi homologai. Filogenetinio medžio dešinėje nurodyti IV šeimos fermentų ir EstAG1 bei homologų (▲) sekose dažniausiai nustatomi konservatyvieji pentapeptidai.

Apibendrinant, visi charakterizuoti IV/bHJL šeimos atstovai, kurių a.r. sekos, atliekant BLASTp, buvo nustatytos kaip homologiškos EstAG1 ir naudotos filogenetinei analizei, sudarė atskiras kladas, kas parodo ir patvirtina pakankamą evoliucinį tiriamosios fermentų grupės atsiskyrimą nuo bHJL / IV šeimos.

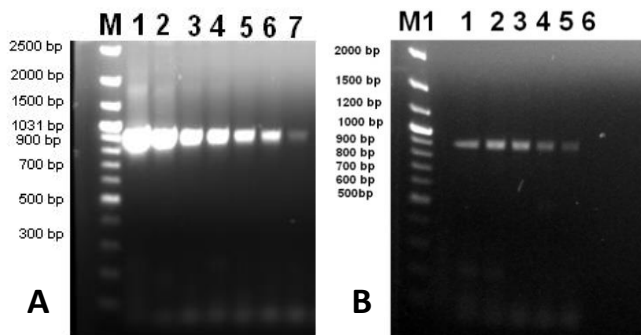
Vienas svarbiausių EstAG1 ir *Staphylococcus* rūšyse sutinkamų jo homologų skiriamųjų bruožų – a.r. sekoje nustatyta GDGTG. Šis motyvas iki šiol nebuvo aprašytas nei vienoje šiai dienai žinomoje bakterinių lipolizinių fermentų šeimoje.

Tokiu būdu, šiame darbe gauti rezultatai: žema EstAG1 homologija ($\leq 30\%$) aprašytiems artimiausiems homologams, netipinis konservatyvusis GDGTG pentapeptidas, iki šiol neaprašytas konservatyvaus nukleofilinio Ser išsidėstymo motyvas ir filogenetinė fermento padėtis leidžia daryti tvirtą prielaidą, kad EstAG1 priklauso naujai, iki šiol neaprašytai lipolizinių fermentų šeimai, kurią, remiantis Hitch ir Clavel (2019) naujausia siūloma bakterinių lipolizinių fermentų klasifikacija, galima priskirti XXXVI šeimai.

3.14 EstAG1 geno transkripcijos analizė

Nustačius, kad EstAG1 yra artimų, funkciškai charakterizuotų pakankamai artimų homologų neturintis bakterinis lipolizinis fermentas, iškilo klausimas, ar vyksta šio fermento raiška jo natyviame *S. saprophyticus* AG1 kamieno ir, kokia yra šio fermento raiškos prigimtis / pobūdis. Šiam tikslui buvo tirtos *S. saprophyticus* AG1 augimui tinkamos terpės su riebalinėmis medžiagomis ir be jų. Riebalinėmis medžiagomis papildytos terpės, remiantis mokslinės literatūros žiniomis, gali sąlygoti ir padėti nustatyti indukuojamą fermento raiškos prigimtį (Casas-Godoy ir kt., 2018). Tačiau, kaip buvo nustatyta šiame darbe, mM9, mM9 su tributirinu kaip vieninteliu anglies šaltiniu bei LB ir CASO terpėse su šiuo taip pat papildomai pridėtu TAG, kultūra neaugo. Dėl šios priežasties, suminės RNR išskyrimui ir tolimesniam kokybiniam EstAG1 raiškos (transkripcijos įvertinimui) buvo naudojami biomasės mėginiai, surinkti iš kompleksinėse CASO ir LB terpių augusios *S. saprophyticus* AG1 kultūros ankstyvosios / vidurinėsios / vėlyvosios eksponentinės, stacionariosios bei žūties augimo fazių.

Iš visų biomasės mėginių sėkmingai išskyrus suminę RNR, buvo atlikta vieno žingsnio AT-PGR, naudojant EstAG1 genui specifinius pradmenis ir nustatyta, kad fermento transkriptas atitinkamose terpėse yra randamas visose tirtose *S. saprophyticus* AG1 augimo fazėse, išskyrus LB terpėje augusios kultūros žūties fazę (3.21 pav.).



3.21 pav. Atliekant AT-PGR su sumine RNR, išskirta iš *S. saprophyticus* AG1 bakterijų ląstelių biomasės, surinktos (A): 1- 6 val., 2- 10 val., 3- 12 val. (ankstyvoji, vidurinioji ir vėlyvoji eksponentinės fazės, atitinkamai), 4- 22 val., 5- 32 val., 6- 42 val. (stacionarioji), 7- 48 augimo val. (žūties fazė) iš CASO terpės ir (B): 1- 6 val., 2- 8 val., 3- 10 val. (ankstyvoji, vidurinioji ir vėlyvoji eksponentinės fazės, atitinkamai) 4- 14 val., 5- 20 val. (stacionarioji) 6- 26 val. (žūties fazė) LB terpės, pagausintas *estAG1* (903 bp); M, M1 – molekulinės masės žymenys: MassRuler DNA Ladder Mix ir GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific), atitinkamai.

Teigti, kad fermento raiška CASO ir LB terpėse vyksta konstitutyviai, nes juose nebuvo riebalinių raiškos induktorių, negalima. Dėl mitybinių terpių kompleksiško ir turtingo maisto medžiagomis, *estAG1* transkripciją CASO ir LB terpėse gali indukuoti ir kiti neriebalinės prigimties komponentai. Norint tiksliai pasakyti, ar fermentas yra ekspresuojamas konstitutyviai, ar yra indukuojamas, reikėtų atlikti papildomus augimo tyrimus bei įvertinti įvairių abiotinių veiksnių įtaką *estAG1* transkripcijai.

Vis dėlto pagrindinis transkripcijos tyrimo tikslas buvo pasiektas ir pagrindinė išvada – *estAG1* geno raiška, natūraliai fermentą koduojančio *S. saprophyticus* AG1 ląstelėse vyksta, kas patvirtina *estAG1* egzistavimą transkripcijos lygyje.

Įvertinus tai, kad EstAG1 nenustatytos klasikinės signalinės sekrecijos sekos ir, darant prielaidą, kad EstAG1 vis dėlto yra ekspresuojamas konstitutyviai, galima spėti, kad fermentas turi reikšmės natyvių riebalinių medžiagų apykaitoje, pavyzdžiui, svarbus nuolat vykstančiai membranos pertvarkai, lipidų modifikacijoms ir kt. ir nesusijęs su aplinkos anglies šaltinių tiesioginiu asimiliavimu, t.y. riebalinių medžiagų skaidymu už ląstelės ribų.

4. APIBENDRINIMAS

Lipoliziniai fermentai (lipazės ir esterazės) sudaro itin svarbių, visuose gyvybės domenuose paplitusių gamtinių katalizatorių grupę. Šių fermentų natūrali, fundamentali funkcija visuose organizmuose yra susijusi su didelės grupės gamtinių makromolekulių – lipidų, katabolizmu. Prokariotiniuose mikroorganizmuose lipoliziniai fermentai leidžia ne tik gauti energijos iš platesnio anglies šaltinių spektro, užtikrinant fenotipinį plastiškumą ir gebą prisitaikyti, bet taip pat dažnai yra svarbūs užtikrinant natyvių ląstelių membranines adaptacijas, tinkamas ląstelės lipidų modifikacijas bei apsprendžia tam tikrų patogeninių bakterijų virulentiškumą.

Šiuo metu randamas mokslinės literatūros kiekis apie bakterinius lipolizinius fermentus nepalieka abejonių, kad šie fermentai yra vieni paklausiausių biotechnologijoje. Šie fermentai yra vertinami dėl savo visapusiškai vertingų pramonei savybių: lengvo išgavimo, veikimo plačiame temperatūrų ir pH diapazone, plataus substratinio savitumo, atsparumo organiniams tirpikliams ir detergentams bei efektyvaus regio- ir enantioatrankių sintezės reakcijų katalizavimo, leidžiančio šių lipolizinių fermentų panaudojimą šiuo metu itin aktualioje organinės sintezės pramonėje. Norint išlaikyti sparčiai besivystančios biotechnologinės pramonės dinamiką, naujų lipolizinių fermentų atradimas ir jų gerinimas cheminiais bei molekuliniais metodais išlieka didelės mokslininkų grupės šių dienų užduotimi. Šiuo metu pagrindines naujų fermentų atradimo strategijas sudaro metagenomų funkcinė atranka ir genomų analizė, remiantis sekų homologija, ir tolimesnė fermentų sintezė. Taip pat, labai svarbiais fermentų tobulinimo metodais yra tapę baltymų evoliucija *in vitro* ir racionalus dizainas, fermentų cheminė modifikacija ir imobilizavimas.

Šis darbas apėmė dviejų lipolizinių fermentų – LipBST ir EstAG1, identifikuotų, atliekant *Bacillus stratosphericus* ir *Staphylococcus saprophyticus* AG1 genomų analizę, klonavimą, heterologinę sintezę ir išsamų charakterizavimą.

Pirmasis analizuotas fermentas – lipolizinio bakterijų kamieno, identifikuoto kaip *B. stratosphericus* artima rūšis, sekretuojama, minimalią α/β -hidrolazės klostę be dangtelio domeno turinti LipBST lipazė. Fermentą natūraliai sintetinantis kamienas buvo identifikuotas remiantis 16S rDNR analizės rezultatais, filogenetine analize, bei pagausintų nuo chromosominės DNR trijų lipolizinių fermentų genų sekų homologija *B. stratosphericus* genome anotuotiems numanomiams lipolizinius fermentus koduojantiems

genams. Pastarųjų pavienių genų homologų rasta ir kituose *Bacillus* sp. anotuotuose genomuose, tačiau visų trijų genų rinkinys buvo nustatytas tik *B. stratosphericus* anotuotuose genomuose, kas leido *Bacillus* sp. L1 preliminariai priskirti *B. stratosphericus* L1.

Atlikus pirminę *in silico* analizę, remiantis a.r. sekų homologija ir struktūriniais ypatumais, LipBST priskirtas prie tikrųjų lipazių I.4 pošeimio. Kiti genome nustatyti numanomai lipolizinius fermentus koduojantys genai priklausė II (GDLS/SGNH) ir XI lipolizinių fermentų šeimoms. Nors LipBST fermentas turėjo artimų homologų kituose *Bacillus* anotuotuose genomuose, dėl savo itin didelio aktyvumo (6244,5 U/mg) buvo pasirinktas tolimesnei analizei ir pritaikymo galimybių įvertinimui. Šiame darbe buvo sukurta LipBST fermento heterologinės raiškos sistema *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse. LipBST susintetintas tirpioje formoje ir heterologiniam šeiminiui atpažinus LipBST natūralų signalinį peptidą, didžiausias fermento aktyvumas ir kiekis nustatytas užląstelinėje terpėje, iš kurios, taikant koncentravimą amonio sulfatu ir giminingumo chromatografiją, jis buvo išgrynintas.

Taikant paviršiaus atsako metodologiją (PAM), nustatyta, kad išgrynintos, subrendusios, 19 kDa LipBST lipazės veikimo optimumas pasiekiamas 35 °C, pH 9. Mezofilinis fermentas buvo pakankamai stabilus 35-55 °C temperatūrose: pasižymėjo didesniu negu 60 % liekamuuju aktyvumu visą inkubavimo laiką (4 val.). Tirti divalenčiai metalų jonai ir EDTA, vertinant LipBST gebėjimą hidrolizuoti *p*-NPB, slopino fermentą, o kaip substratą naudojant *p*-NPC – slopinančio poveikio, tiriant tuos pačius cheminius agentus, nenustatyta (išimtį sudarė tik Fe³⁺ poveikis). Remiantis metalų jonų ir EDTA poveikio LipBST lipazei tyrimo rezultatais, buvo padaryta prielaida, kad tai nėra metalais aktyvinamas fermentas. Detergentai ir organiniai tirpikliai LipBST veikė slopinančiai, vienintelę išimtį sudarė acetonas ir *n*-heksanas, kurie fermentą hiperaktyvino. Nustačius regiosavitumu nepasižyminčio LipBST fermento didelį aktyvumą įvairių natūralių riebalinių substratų atžvilgiu, fermentas buvo pritaikytas eksperimentuose valant riebalais užterštus polietileningus paviršius. Tokie rezultatai apibūdina LipBST kaip perspektyvų biokatalizatorių pramonės srityse, kur yra aktualūs efektyvūs įvairių riebalinių medžiagų hidrolizės procesai, - tai detergentų kūrimas, RR gavimas bei aplinkosauga.

Beveik neįmanomas laisvų fermentų pakartotinas panaudojimas bei reakcijos mišinio užsiteršimas reakcijos katalizatoriais, lemia didelę tokių fermentų ir jų panaudojimo kainą. Tokias natūralių katalizatorių

panaudojimo problemas leidžia apeiti jų imobilizavimas, kuris taip pat gali pagerinti ir kai kurias svarbias fermentų savybes bei moduluoti jų veikimą. Kadangi lipazių ir esterazių imobilizavimas ant hidrofobinių paviršių dažnai naudojamas kaip šiems fermentams savitas ir efektyvus metodas, tolimesni LipBST tyrimai apėmė fermento imobilizavimą ant hidrofobinio oktilsefarozės nešiklio. Nustatyta, kad pasirinktas adsorbicinio hidrofobinio imobilizavimo metodas padidino optimalią LipBST veikimui temperatūrą iki 50 °C, o optimalaus pH reikšmė pakilo nuo 9 iki 10. Imobilizuotas preparatas, lyginant su laisvu LipBST, 35-65 °C temperatūrų ribose pasižymėjo didesniu termostabilumu ir aukštesniu liekamučiu aktyvumu. Įvairių cheminių agentų (metalų jonų, detergentų ir organinių tirpiklių) poveikis fermentiniam preparatui, su keliomis išimtimis, buvo neigiamas – imobilizuoto fermento veikimas slopinamas. Norint iširti imobilizuoto LipBST galimybes katalizuoti sintezės reakcijas bevandenėje aplinkoje, tirta preparato geba katalizuoti rapsų aliejaus peresterinimo metanolio arba biodyzelino gavimo reakciją. Naudojant imobilizuotą LipBST fermentą, rapsų aliejaus metilo esterį pavyko gauti jau 2 val. po organinės reakcijos inicijavimo.

Taigi, šiame darbe pirmą kartą aprašomi *B. stratosphericus* lipoliziniai fermentai. LipBST fermento identifikavimas, nutatyti fizikiniai ir cheminiai fermento veikimo parametrai papildė mokslines žinias apie *Bacillus* genčiai būdingus lipolizinius fermentus, jų veikimo ypatybes ir pritaikymo galimybes.

Šiame darbe taip pat identifiкуotas, heterologinėje sistemoje susintetintas ir išsamiai charakterizuotas naujas, artimų, funkciškai aprašytų homologų neturintis *S. saprophyticus* AG1 lipolizinis EstAG1 fermentas, pirmą kartą suteikiant eksperimentinių šio baltymo veikimo ypatybių duomenų ir egzistavimo įrodymų.

Analizuojant šio darbo ribose nuskaitytą ir pagal sekų homologijas anotuotą *S. saprophyticus* AG1 genomą, identifiкуoti numanomo lipolizinio EstAG1 ir dar penkių galimai lipidų metabolizme dalyvaujančių numanomų lipazių ir esterazių genai. Dėl nustatytų išskirtinių sekos ypatybių, tolimesniam darbui ir analizei, šios disertacijos ribose, pasirinktas EstAG1: fermento sekoje nustatyti IV-ai arba bHJL fermentų šeimai homologiški sekos regionai, tačiau identiškumas su artimiausiu charakterizuotu IV-os šeimos atstovu siekė tik $\leq 30\%$. EstAG1 a.r. sekoje vietoje didžiajai daugumai lipolizinių fermentų šeimų būdingo itin konservatyvaus GX SXG pentapeptido su kataliziniu Ser, buvo nustatytas GDGTG^[149-153] motyvas,

kuriame vietoje minėto nukleofilinio Ser išsidėsto Gly. Atlikus išsamesnius pirminės EstAG1 a.r. sekos tyrimus bei erdvinės struktūros modelio analizę, preliminariai nustatyta, kad nukleofilinis katalizinis Ser, EstAG1 sekoje galimai išsidėsto netipiniame, toliau nuo GDGTG^[149-153] pasroviui išsidėstančiame SPLL^[179-182] a.r. motyve. Pastarasis a.r. motyvas iki šiol nebuvo žinomas, kaip seka, kurioje gali išsidėstyti bakterijų lipolizinių fermentų katalizinė Ser a.r. liekana. Remiantis EstAG1 homologijos tyrimais ir literatūros duomenimis, preliminariai nustatyta, kad kitos katalizėje dalyvaujančios EstAG1 a.r. liekanos yra Glu-246 ir His-276. Hipotezę, kad katalizinis Ser išsidėsto SPLL^[179-182] taip pat paskatino gautas EstAG1 erdvinės struktūros modelis: Ser-179 modelio aktyviajame centre išsidėstė prie Glu-246 ir His-276 a.r. liekanų, erdviškai preliminariai sudarant fermento katalizinę triadą. Taip pat, aliekant EstAG1 sekos analizę, fermentą koduojančioje a.r. sekoje nenustatyta fermento sekreciją į užląstelinę terpę lemiančių a.r. sekos motyvų, kas leido padaryti prielaidą, kad fermentas *S. saprophyticus* AG1 gali būti viduląstelinis arba yra sekretuojamas naudojant neklasikinius sekrecijos kelius, kurių neįmanoma nustatyti šiuo metu prieinamais signalinių peptidų nustatymo įrankiais. Rekombinantinis EstAG1 gautas jį klonavus pET-26b(+) ir optimizavus raišką heterologinio *E. coli* BL21 (DE3) šeimininko ląstelėse. Fermentas heterologinėje sistemoje buvo sintetinamas susidarant netirpiems kūneliams, dėl to, jo grynimui naudota rekombinantinių *E. coli* netirpi citoplazminė frakcija. Funkcionalų, dalinai renatūruotą EstAG1 pavyko gauti po jo grynimu taikant imobilizuotų Ni²⁺ jonų giminingumo chromatografiją denatūruojančiomis sąlygomis, gelfiltraciją ir dializę. Atliekant fermento biocheminę analizę, nustatyta, kad grynas EstAG1 veikimo optimumą pasiekia 45–47,5 °C, pH 7,5–8, fermentas savitas vidutinio ilgio acilo grandinę turinčiam *p*-NPC substratui, bet taip pat katalizuoja ilgą anglies atomų grandinę turinčių *p*-NP substratų hidrolizę. Remiantis šiuo standartiniu *p*-NP testu, parodytas fermento tarpinis (tarp lipazių ir esterazių) specifiškumas, be to fermentas buvo nežymiai aktyvus natūralaus TAG tributirino atžvilgiu. Nenustatyta aktyvumo vandenyje netirpaus alyvuogių aliejaus atžvilgiu, kuo remiantis fermentas priskirtas esterazėms.

EstAG1 termostabilumo tyrimas parodė, kad fermentas yra sąlyginai termolabilus, bet iki 4 val. išlieka stabilus 25 °C temperatūroje. Taip pat nustatyta, kad EstAG1 yra kai kurių divalenčių metalų jonų (Mg²⁺, Ba²⁺) aktyvinamas fermentas. Nors EstAG1 aktyvumas buvo slopinamas visų tirtų detergentų (išskyrus CTAB), fermentas pasižymėjo ypatingu tolerantiškumu

ir netgi hiperaktyvumu reakcijos mišinyje esant organinių tirpiklių (etanolio, dioksano, DMSO, acetono). Pefabloc-SC slopino EstAG1, nurodant, kad fermento katalizės mechanizme katalizėje dalyvauja Ser a.r. liekana. Šiuolaikinėje žmogaus supratimo apie didelių energijos sąnaudų padarinius ekologijai eroje, fermentai, kurie yra stabilūs ir maksimaliai veikia 25-30 °C temperatūroje yra vieni paklausiausių. Šiame darbe nustatytas naujo EstAG1 tolerantiškumas ir stabilumas organiniuose tirpikliuose gali būti toliau tiriamas, norint vystyti organinės sintezės procesus, kurie šiuo metu yra itin paklausūs pramonėje.

Taip pat, norint identifikuoti EstAG1 katalizei svarbias, aktyviame centre išsidėstančias a.r.: patvirtinti, kad katalizėje dalyvauja Ser-179, Glu-246 ir His-276 a.r. liekanos bei nustatyti netipiniame GDGTG^[149-153] pentapeptide išsidėstančių Gly-151, Thr-152 a.r. svarbą katalizei, buvo pasitelkta visos rekombinantinės plazmidės su *estAG1* (pET-26b(+)_{*estAG1*}) taikiniui specifinė mutagenėzė. Tyrimo rezultatai leido patvirtinti Ser-179, išsidėstančio netipiniame SPL^[179-182] motyve svarbą katalizei, nes tiek Ser179Ala, tiek Ser179Gly įvestos mutacijos lėmė visišką fermento lipolizinio aktyvumo praradimą. Glu-246 ir His-276 pakaitos taip pat slopino fermento veiklą. Remiantis tuo, padaryta išvada, kad EstAG1 katalizinę triadą sudaro Ser-179, Glu-246 ir His-276 a.r. liekanos. Į rekombinantinės pET-26b(+) su EstAG1 fermentą koduojančią sritį įvesta Gly151Ser pakaita, norint atstatyti klasikinį GX SXG pentapeptidą, lyginant su laukinio tipo EstAG1 aktyvumu, parodė, kad tokią mutaciją turinčio fermento aktyvumas nepadidėja. Thr152Ala mutacija sukėlė 50 % fermento aktyvumo mažėjimą. Remiantis šiais rezultatais ir žiniomis apie tai, kad Thr-152 vietoje lipolizinių fermentų pentapeptiduose išsidėsto oksianijoninę angą formuojančios a.r. liekanos, kurios dažniausiai yra būtinos katalizei ir jų mutacijos sukelia visišką fermentų aktyvumo slopinimą, padaryta prielaida, kad Ala gali pakeisti Thr-152, dalinai atliekant jo funkciją.

Maža EstAG1 homologija, lyginant su artimiausiais nustatytais bakteriniais lipolizininiais fermentais (IV šeimos atstovai), EstAG1 filogenetinė padėtis, taip pat tokię atradimai kaip netipinis GDGTG pentapeptidas ir katalizinio Ser išsidėstymas iki šiol nenustatyta a.r. sekų motyve, leidžia EstAG1 išskirti kaip naujos lipolizinių fermentų šeimos atstovą. Sekant Hitch ir Clavel (2019) šiais metais atnaujintos Arpigny ir Jaeger (1999) klasifikacijos nomenklatūrą, EstAG1 priskirtinas prie XXXVI bakterinių lipolizinių fermentų šeimos. Šeima taip pat gali būti papildyta ir

kitų *Staphylococcus* rūšių genomuose nustatytais, bet dar necharakterizuotais numanomais lipoliziniais fermentais, homologiškais EstAG1.

Norint transkripcijos lygyje patvirtinti EstAG1 egzistavimą natūraliame, šį baltymą produkuojančiame *S. saprophyticus* AG1 kamienne, buvo taikytas raiškos tyrimas atliekant AT-PGR, kokybiškai įvertinant tiriamo fermento transkripto egzistavimą. Žinant, kad bakterijų lipolizinių fermentų raiška dažniausiai yra indukuojama į terpę pridėjus riebalinių medžiagų, taip pat norėta nustatyti, ar EstAG1 yra indukuojamas baltymas. Nenustačius *S. saprophyticus* AG1 augimo terpėse su riebalinėmis medžiagomis, EstAG1 natūralios prigimties, jo raiškos indukavimo atžvilgiu, nustatyti nepavyko, tačiau EstAG1 transkriptas nustatytas auginant bakteriją turtingose terpėse.

Šiame darbe identifikuotas ir aprašytas EstAG1 fermentas, bei kiti *S. saprophyticus* AG1 genome nustatyti numanomi lipoliziniai fermentai, kurie taip pat turi homologų kitose *Staphylococcus* rūšyse, bet nėra eksperimentiškai ištirti, praplečia ir papildo duomenis apie *Staphylococcus* genties ir bendrai visus bakterijų lipolizinius fermentus. Daugiausiai iki šiol tirti *Staphylococcus* sp. lipoliziniai fermentai - pre-pro-peptidinės sandaros lipazės, spėjamai veikiančios kaip tam tikrų šios genties rūšių virulentiškumo veiksniai, o *S. saprophyticus* AG1 atveju tirta tik paviršinė, ne visiems kamienams būdinga Ssp lipazė. Taigi, šiame darbe pateikti eksperimentiniai rezultatai apie naują, dėl savo sekos ypatybių netipinį bakterinį lipolizinį fermentą – esterazę, yra ypatingai vertingi mokslinė prasme. Naujo fermento, priskirtino naujai šeimai atradimas bei kitų, identifikuotų netirtų fermentų gausa skatina tolimesnius ne tik *S. saprophyticus* AG1, bet ir kitų bakterijų sintetinamų lipolizinių fermentų tyrimus, norint praplėsti, o galbūt ir kurti bendrą lipolizinių fermentų evoliucijos sampratą.

IŠVADOS

- 1) Taikant *B. stratosphericus* ir *S. saprophyticus* AG1 genomų analizę, identifikuoti tiek homologiški jau aprašytiems fermentams artimi, tiek aprašytų homologų neturintys ir numanomai lipolizinius fermentus koduojantys genai, iš kurių detaliau tirti du - *lipBST* ir *estAG1*.
- 2) Darbe identifikuoto *Bacillus* sp. L1 (*B. stratosphericus* L1) lipolizinis LipBST fermentas – tai mezofilinė, funkciškai nuo metalų jonų nepriklausoma lipazė, pasižyminti plačiu įvairių sintetinių ir natūralių substratų hidrolizės profiliu ir yra perspektyvi pritaikymui biotechnologijoje svarbių riebalų hidrolizės procesų biokatalizėje.
- 3) Adsorbcinis LipBST imobilizavimas ant hidrofobinio oktilsefarozės nešiklio leido pagerinti fermento optimaliam veikimui reikalingus temperatūros ir pH parametrus bei termostabilumą; imobilizuoto LipBST preparatas preliminariai įvertintas kaip tinkamas peresterinimo reakcijų bevandenėje aplinkoje katalizei.
- 4) *S. saprophyticus* AG1 genome koduojamas EstAG1 lipolizinis fermentas – tai termolabilus mezofilinis, divalenčių Mg^{2+} jonų aktyvinamas bei organiniams tirpikliams tolerantiškas fermentas, pagal savo substratinio savitumo profilį priskirtinas karboksilesterazėms (tikrosioms esterazėms).
- 5) EstAG1– naujas, artimų homologų neturintis, unikalus bakterinis lipolizinis fermentas, kuriam būdingas netradicinis GDGTG konservatyvusis pentapeptidas, o katalizinis Ser išsidėsto iki šiol neaprašytoje fermento a.r. sekoje; fermento katalizinę triadą sudaro Ser-179/Glu-246/His-276 ir bet kurios iš šių a.r. pakeitimas Ala/Gly a.r., sukelia reikšmingą fermentinio aktyvumo praradimą.
- 6) Remiantis EstAG1 fermento unikaliais pirminės a.r. sekos ypatumais ir homologija, EstAG1 priklauso naujai, iki šiol neaprašytai XXXVI bakterinių lipolizinių fermentų šeimai.
- 7) *estAG1* geno, koduojamo *S. saprophyticus* AG1 genome raiška, patvirtinanti *estAG1* natūralų egzistavimą transkripcijos lygyje, vyksta riebalais nepraturtintose terpėse, kas leidžia tik preliminariai spręsti apie fermento raiškos prigimtį.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Darbo rezultatai paskelbti publikacijose:

1. **Gricajeva A.**, Bendikienė V., Kalėdienė L. Lipase of *Bacillus stratosphericus* L1: Cloning, expression and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 92 (2016) 96-104.
2. **Gricajeva A.**, Bikutė I., Kalėdienė L. Atypical organic-solvent tolerant bacterial hormone sensitive lipase-like homologue EstAG1 from *Staphylococcus saprophyticus* AG1: Synthesis and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 130 (2019) 253-265.

Kitos publikacijos:

1. Gudiukaitė R., **Gricajeva A.** Microbial lipolytic fusion enzymes: current state and future perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 33(12) (2017). DOI: 10.1007/s11274-017-2381-8.
2. **Gricajeva A.**, Kazlauskas S., Kalėdienė L., Bendikienė V. Analysis of *Aspergillus* sp. lipase immobilization for the application in organic synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 108 (2018) 1165-1175.

Disertacijos rezultatai taip pat pristatyti tarptautinėse konferencijose:

1. **Gricajeva A.**, Kalėdienė L. Biochemical characterization of novel *Bacillus stratosphericus* L1 lipase. Vita Scientia, Vilnius, Lietuva, 2016.01.04.
2. **Gricajeva A.**, Kalėdienė L. Lipase-secreting *Bacillus* species: from soil bacteria to promising strains for a variety of applications in biotechnology. European Biotechnology Congress 2016, Ryga, Latvija, 2016.05.05-2016.05.07.
3. **Gricajeva A.**, Kareivaitė G., Kalėdienė L. GTC1 lipase of the urinary tract infections-causing *Staphylococcus saprophyticus*. 3rd Congress of Baltic Microbiologists, Vilnius, Lietuva, 2016.10.18-2016.10.21.
4. **Gricajeva A.**, Kalėdienė L. Modulation and Analysis of the Activity of *Staphylococcus saprophyticus* GTC1 Lipolytic Enzymes. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), Valensija, Ispanija, 2017.07.09-2017.07.13.

5. **Gricajeva A.**, Gudiukaitė R., Malūnavičius V., Kalėdienė L. Biochemical analysis of *Staphylococcus saprophyticus* GTC1 natively secreted lipase. 46th World congress on Microbiology, Dublinas, Airija, 2017.09.18-2017.09.19.
6. **Gricajeva A.**, Kalėdienė L. Biochemical characterization of novel *Staphylococcus saprophyticus* AG1 esterase belonging to prokaryotic hormone sensitive lipase-like enzyme family. 4th Congress of Baltic Microbiologists 2018 (CBM 2018), Gdanskas, Lenkija, 2018.09.10-2018.09.12.

Kitos konferencijos:

1. **Gricajeva A.**, Kazlauskas S., Kalėdienė L., Bendikienė V., Analysis of immobilized *Aspergillus* sp. lipase for the application in organic synthesis. 12th International Conference on Protein Stabilization (ProtStab2018), Vilnius, Lietuva, 2018.05.16-2018.05.18.
2. Malunavicius V., **Gricajeva A.**, Lastauskiene E., Sadauskas M., Gegeckas A., Gudiukaite R. Lipolytic enzymes of *Geobacillus* sp. 95: potential for industrial application. 46 th World congress on Microbiology, Dublinas, Airija, 2017.09.18-2017.09.19.

FINANSINĖ PARAMA

Lietuvos mokslo tarybos (LMT) stipendija už akademinis pasiekimus (2018 m.).

Europos mikrobiologų draugijų federacijos (angl., *Federation of European Microbiological Societies, FEMS*) finansinė parama dalyvauti konferencijoje (4th Congress of Baltic Microbiologists 2018 (CBM 2018)).

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei **prof. Lilijai Kalėdienei** už suteiktą galimybę atlikti darbą ir tobulėti, už patarimus ir pagalbą rengiant disertaciją.

Taip pat ypatingai dėkoju **dr. Renatai Gudiukaitei** už palaikymą, vertingus pasiūlymus, pagalbą ir pataisymus padedant redaguoti disertaciją; taip pat už tai labai dėkoju **dr. Arnoldui Kauniečiui**.

Dėkoju visiems publikacijų bendraautoriams, ypatingai **dr. Vidai Bendikienei**.

Dėkoju **visam Mikrobiologijos ir Biotechnologijos katedros kolektyvui** už draugišką atmosferą ir palaikymą.

Taip pat norėčiau padėkoti savo šeimai ir artimiesiems, kurie mane labai palaikė ir suprato viso doktorantūros kelio ir disertacijos ruošimo metu.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdelmoez W, Mustafa A. 2014. Oleochemical industry future through biotechnology. *J Oleo Sci* 63(6): 545-554;
2. Abdou L, Han-Ting Chou, Dieter H, Chung-Dar L. 2011. Promoter recognition and activation by the global response regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 193(11): 2784–2792;
3. Aburto J, Alric I, Borredon E. 1999. Preparation of long-chain esters of starch using fatty acid chlorides in the absence of an organic solvent. *Starch* 51(4): 132-135;
4. Adlercreutz P. 2013. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem Soc Rev* 42(15): 6406–6436;
5. Adrio JL, Demain AL. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomol* 4(1): 117–139;
6. Aharoni A. 2009. Mining for new enzymes. *Microb Biotechnol* 2:128–129;
7. Akbulut N, Merve TO, Tjaad P, Saliha IO, Fusun G. 2013. Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution. *J Biotechnol* 164(1): 123-129;
8. Allen WJ, Phan G, Waksman G. Structural biology of periplasmic chaperones. In: Eisenberg DS, McPherson A, editors. *Advances in protein chemistry and structural biology*. Maryland, U.S.: Academic Press Inc., 2009. p. 51-98;
9. Alnoch RC, Martini VP, Glogauer A, Costa ACdS, Piovan L, Muller-Santos M, Maltempi de Souza E, Pedrosa FdO, Mitchell DA, Krieger N. 2015. Immobilization and characterization of a new regioselective and enantioselective lipase obtained from a metagenomic library. *PLoS One* 10(2): e0114945. DOI: 10.1371/journal.pone.0114945;
10. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403–410;
11. Andualema B, Gessesse A. 2012. Microbial lipases and their industrial applications: review. *Biotechnol* 11(3): 100–118;
12. Angkawidjaja C, Kanaya S. 2006. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cell Mol Life Sci* 63(23): 2804–2817;
13. Ansorge-Schumacher MB, Thum O. 2013. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chem Soc Rev* 42(15): 6475-6490;
14. Aouf C, Durand E, Lecomte J, Figueroa- Espinoza M-C, Dubreucq E, Fulcrand H, Villeneuve P. 2014. The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. *Green Chem* 16(4):1740–1754;

15. Aravindan R, Anbumathi P, Viruthagiri T. 2007. Lipase applications in food industry. *Ind J of Biotechnol* 6: 141-158;
16. Arpigny JL, Jaeger K-E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343(Pt1): 177-183;
17. Bajpai P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Prog* 15: 147-157;
18. Bajpai P. Recycling and deinking of recovered paper. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands, 2013;
19. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelskij AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its application to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 199(5): 455-477;
20. Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. 2015. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnol Adv* 33(5): 435-456;
21. Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. 2014. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a usefull crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv* 4: 1583-1600;
22. Barriuso J, Vaquero ME, Prieto A, Martínez MJ. 2016. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: a review. *Biotechnol Adv* 34(5): 874-885;
23. Bassegoda A, Pastor FI, Diaz P. 2012. *Rhodococcus* sp strain CR-53 LipR, the first member of a new bacterial lipase family (family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the *Candida antarctica* lipase clan. *Appl Environ Microbiol* 78(6): 1724-1732;
24. Beatty AL, Malloy JL, Wright JR. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* degrades pulmonary surfactant and increases conversion in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 128-134;
25. Bender J, Rydzewski K, Broich M, Schunder E, Heuner K, Flieger A. 2009. Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* represents a novel lipase family. Protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity and hemolysis. *J Biol Chem* 284(40): 27185-27194;
26. Bendikienė V, Surinėnaitė B, Juodka B, Safarikova M. 2004. Insights into catalytic mechanism of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase. *Enzyme Microb Technol* 34(6): 572-577;

27. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, von Heijne G, Brunak S. 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 17(4): 349–356;
28. Bendtsen JD, Kiemer L, Fausbøl A, Brunak S. 2005. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol* 5: 58 DOI: 10.1186/1471-2180-5-58;
29. Bendtsen JD, Nielsen H, Widdick D, Palmer T, Brunak S. 2005. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinf* 6: 167 DOI: 10.1186/1471-2105-6-167;
30. Berger R, Hoffmann M, Keller U. 1998. Molecular analysis of a gene encoding a cell-bound esterase from *Streptomyces chrysomallus*. *J Bacteriol* 180: 6396–6399;
31. Bezerra RM, Neto DMA, Galvao WS, Rios NS, de M. Carvalho SCL, Correa MA, Bohn F, Fernandez-Lafuente R, Fachine PBA, de Mattos MC, dos Santos JCS, Goncalves LRB. 2017. Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. *Biochem Eng J* 125: 104–115;
32. Bhardwaj KK, Gupta R. 2017. Synthesis of chirally pure enantiomers by lipase. *J Oleo Sci* 66(10): 1073-1084;
33. Boekema BKHL, Beselin A, Breuer M, Hauer B, Koster M, Rosenau F, Jaeger K-E, Tommassen J. 2007. Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 73: 3838–3844;
34. Boekema BKHL, Beselin A, Breuer M, Hauer B, Koster M, Rosenau F, Jaeger K-E, Tommassen J. 2008. Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 73(12): 3838-3844;
35. Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W. 2011. Scaffolding preassembled contigs using SSPACE, *Bioinformatics* 27(4): 578–579;
36. Boetzer M, Pirovano W. 2012. Toward almost closed genomes with GapFiller. *Genome Biol* 13: R56 DOI:10.1186/gb-2012-13-6-r56;
37. Bora L, Gohain D, Das R. 2013. Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *J Chem Technol Biotechnol* 88(11): 1959–1970;
38. Borda-Molina D, Montana JS, Zambrano MM, Baena S. 2017. Mining lipolytic enzymes in community DNA from high Andean soils using a targeted approach. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110: 1035–1051;
39. Bornscheuer UT. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *Fems Microbiol Rev* 26(1): 73–81;

40. Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(7): 248–254;
41. Brady D, Jordaan J. 2009. Advances in enzyme immobilization. *Biotechnol Lett* 31: 1639–1650;
42. Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Huge-Jensen B, Norskov L, Thim L, Menge U. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343: 767–770;
43. Burkhart CN, Burkhart CG. 2003. Antibiotic-resistant *Propionibacteria acnes* may not be the major issue clinically or microbiologically in acne. *Br J Dermatol* 148: 365–366;
44. Cai H, Li Y, Zhao M, Fu G, Lai J, Feng F. 2015. Immobilization, regiospecificity characterization and application of *Aspergillus oryzae* lipase in the enzymatic synthesis of the structured lipid 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol. *PLoS One* 10(7): e0133857 DOI: 10.1371/journal.pone.0133857;
45. Calero-Rueda O, Plou FJ, Ballesteros A, Martinez AT, Martinez MJ. 2002. Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostomapiceae*. *Biochem Biophys Acta* 1599: 28-35;
46. Cantone S, Ferrario V, Corici L, Ebert C, Fattor D, Spizzo P, Gardossi L. 2013. Efficient immobilization of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilization methods. *Chem Soc Rev* 42(15): 6262–6276;
47. Casas-Godoy L, Duquesne S, Bordes F, Sandoval G, Marty A. 2012. Lipases: an overview. *Methods Mol Biol* 861: 3–30;
48. Casas-Godoy L, Gasteazoro F, Bordes F, Marty A. Lipases: an overview. In: Sandoval G, editor. Lipases and phospholipases. Springer Nature Switzerland AG: Springer International Publishing, 2018. p. 3-30;
49. Castilla A, Panizza P, Rodriguez D, Bonino L, Diaz P, Irazoqui G, Rodriguez Giordano S. 2017. A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII). *Enzyme Microb Technol* 98: 86-95;
50. Cavicchioli R., Charlton T, Ertan H, Mohd Omar S, Siddiqui KS, Williams TJ. 2011. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microb Biotechnol* 4(4): 449-460;
51. Chahiniana H, Sarda L. 2009. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein Pept Lett* 16(10): 1149-1161;
52. Charbonneau DM, Beauregard M. 2013. Role of key salt bridges in thermostability of *G. thermodenitrificans* EstGtA2: distinctive patterns within

the new bacterial lipolytic enzyme subfamily XIII2 [corrected]. *PLoS One* 8(10): e76675 DOI: 10.1371/journal.pone.0076675;

53. Charton E, Macrae AR. 1992. Substrate specificities for lipases A and B from *Geotrichum candidum* CMICC 33546. *Biochim Biophys Acta* 1123(1): 59-64;

54. Chen X, Alonzo III F. 2019. Bacterial lipolysis of immune-activating ligands promotes evasion of innate defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(9): 3764-3773;

55. Cheng M, Angkawidjaja C, Koga Y, Kanaya S. 2014. Calcium-independent opening of lid1 of a family I.3 lipase by a single Asp to Arg mutation at the calcium-binding site. *Protein Eng Des Sel* 27(5): 169-176;

56. Choi Y-H, Lee Y-N, Park Y-J, Yoon S-J, Lee H-B. 2016. Identification of amino acids related to catalytic function of *Sulfobolus solfataricus* P1 carboxylesterase by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *BMB Rep* 49(6): 349-354;

57. Choi Y-J, Lee BH. 2001. Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Bioprocess Biosyst Eng* 24: 59-63;

58. Choong TSY, Yeoh CM, Phuah E-T, Siew W-L, Lee Y-Y, Tang T-K, Abdullah LC. 2018. Kinetic study of lipase-catalyzed glycerolysis of palm olein using Lipozyme TLIM in solvent-free system. *PLoS One* 13(2): e0192375 DOI:10.1371/journal.pone.0192375;

59. Cipolatti EP, Valério A, Henriques RO, Moritz DE, Ninow JL, Freire DMG, Manoel EA, Fernandez-Lafuente R, De Oliveira D. 2016. Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of art and future trends. *RSC Adv* 6(106): 104675–104692;

60. Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, Waksman G. 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev* 13: 343-359;

61. Culligan EP, Sleator RD, Marchesi JR, Hill C. 2014. Metagenomics and novel gene discovery. *Virulence* 5(3): 399–412;

62. Deb C, Daniel J, Sarikova TD, Abomoelak B, Dubey VS, Kolattukudy PE. 2006. A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 281(7): 3866–3875;

63. Degrassi G, Devescovi G, Kim J, Hwang I, Venturi V. 2008. Identification, characterization and regulation of two secreted polygalacturonases of the emerging rice pathogen *Burkholderia glumae*. *FEMS Microbiol Ecol* 65(2): 251–262;

64. Devescovi G, Bigirimana J, Degrassi G, Cabrio L, LiPuma JJ, Kim J, Hwang I, Venturi V. 2007. Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase

secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Appl Environ Microbiol* 73: 4950–4958;

65. Ding J, Yu T, Liang L, Xie Z, Yang Y, Zhou J, Xu B, Li J, Huang Z. 2014. Biochemical characterization of a GDSL-motif esterase from *Bacillus* sp. K91 with a new putative catalytic mechanism. *J Microbiol Biotechnol* 24: 1551–1558;

66. Donaghy JA, Bronnenmeier K, Soto-Kelly PF, McKay AM. 2000. Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercorarium*. *J Appl Microbiol* 88: 458–466;

67. dos Santos JCS, Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. 2015. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. *ChemCatChem* 7(16): 2413–2432;

68. dos Santos JCS, Rueda N, Sanchez A, Villalonga R, Goncalves LRB, Fernandez-Lafuente R. 2015. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. *RSC Adv* 5(45): 35801–35810;

69. Dua A, Gupta R. 2017. Functional characterization of hormone sensitive-like lipase from *Bacillus halodurans*: synthesis and recovery of pNP-laurate with high yields. *Extremophiles* 21(5): 871–889;

70. Eggert T, Brockmeier U, Dröge MJ, Quax WJ, Jaeger K-E. 2003. Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. *FEMS Microbiol Lett* 225(2): 319–324;

71. Eijkmann C. 1901. Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Zentralbl Bakt Parasitenk Infektionsk* 29:841–848;

72. Elbing K, Brent R. 2002. Media preparation and bacteriological tools. *Curr Prot Mol Biol* 59(1): 1.1.1-1.1.7;

73. Elend C, Schmeisser C, Leggewie C, Babiak P, Carballeira JD, Steele HL, Reymond JL, Jaeger KE, Streit WR. 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microbiol* 72: 3637–3645;

74. Elnashar MMM, Mostafa H, Morsy NA, Awad GEA. 2013. Biocatalysts: isolation, identification, and immobilization of thermally stable lipase onto three novel biopolymeric supports. *Ind Eng Chem Res* 52 (42):14760–14767;

75. Ernst RK, Yi EC, Guo L, Lim KB, Burns JL, Hackett M, Miller SI. 1999. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 286: 1561–1565;

- 76.** Ewis HE, Abdelal AT, Lu C-D. 2004. Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases From *Geobacillus stearothermophilus*. *Gene* 329: 187-195;
- 77.** Fang JM, Fowler PA, Tomkinson J, Hill CAS. 2002. The preparation and characterisation of a series of chemically modified potato starches. *Carbohydr Polym* 47(3): 245–252;
- 78.** Feller G, Gerday G. 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol* 1(3): 200–208;
- 79.** Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol* 39(4): 783–791;
- 80.** Fernández J, Mohedano AF, Fernández-García E, Medina M, Nuñez M. 2004. Purification and characterization of an extracellular tributyrin esterase produced by a cheese isolate, *Micrococcus* sp. INIA 528. *Int Dairy J* 14: 135-142;
- 81.** Ferreira AM, Bonesso MF, Mondelli AL, de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha M. 2012. Identification of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infection using a simple set of biochemical tests correlate with 16S-23S interspacere region molecular weight patterns. *J Microbiol Methods* 91(3): 406–411;
- 82.** Ferrer M, Golyshina O, Beloqui A, Golyshin PN, Mining enzymes from extreme environments. *Curr Opin Microbiol* 10:207–214. DOI: 10.1016/j.mib.2007.05.004;
- 83.** Fischer M, Thai QK, Grieb M, Pleiss J. 2006. DWARF-a data warehouse system for analyzing protein families. *BMC Bioinform* 7(495): 495–495;
- 84.** Fojan P, Jonson PH, Petersen MT, Petersen SB. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* 82(11): 1033–1041;
- 85.** Fronzes R, Christie PJ, Waksman G. 2009. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7(10): 703–714;
- 86.** Garlapati VK, Banerjee R. 2013. Solvent-free synthesis of flavour esters through immobilized lipase mediated transesterification. *Enzyme Res* 2013: 367410 DOI: 10.1155/2013/367410;
- 87.** Ghasemi S, Heidary M, Faramarzi MA, Habibi Z. 2014. Immobilization of lipase on Fe₃O₄/ZnO core/shell magnetic nanoparticles and catalysis of Michael-type addition to chalcone derivatives. *J Mol Catal B Enzym* 100: 121–128;
- 88.** Ghosh D, Erman M, Duax WL. 1991. Crystallization and preliminary diffraction analysis of cholesterol esterase from *Candida cylindracea*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38: 663-665;

- 89.** Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, Yadav R, Davidson S. 1996. Microbial lipases: production and applications. *Sci Prog* 79(2): 119-157;
- 90.** Giuliani S, Piana C, Setti L, Hochkoeppler A, Pifferi PG, Williamson G, Faulds CB. 2001. Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. *Biotechnol Lett* 23: 325-330;
- 91.** Goda SK, Elsayed IE, Khodair TA, Elayed W, Mohamed ME. 2010. Screening for and isolation and identification of malathion-degrading bacteria: cloning and sequencing a gene that potentially encodes the malathion-degrading enzyme, carboxylesterase in soil bacteria. *Biodegradation* 21(6): 903-913;
- 92.** Götz F, Verheij HM, Rosenstein R. 1998. Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion and processing. *Chem Phys Lipids* 93(1-2): 15-25;
- 93.** Gricajeva A, Bikutė I, Kalėdienė L. 2019. Atypical organic-solvent tolerant bacterial hormone sensitive lipase-like homologue EstAG1 from *Staphylococcus saprophyticus* AG1: synthesis and characterization. *Int J Biol Macromol* 130: 253-265;
- 94.** Gricajeva A, Kazlauskas S, Kalėdienė L, Bendikienė V. 2018. Analysis of *Aspergillus* sp. lipase immobilization for the application in organic synthesis. *Int J Biol Macromol* 108: 1165-1175;
- 95.** Gudiukaitė R, Gegeckas A, Kazlauskas D, Čitavičius D. 2014. Influence of N- and/or C-terminal region on activity, expression, characteristics and structure of lipase from *Geobacillus* sp. 95. *Extremophiles* 18(1): 131-145;
- 96.** Gudiukaite R, Gricajeva A. 2017. Microbial lipolytic fusion enzymes: current state and future perspectives. *World J Microbiol Biotechnol* 33:216. DOI: 10.1007/s11274-017-2381-8;
- 97.** Guncheva M, Zhyriakova D. 2011. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *J Mol Catal B: Enzym* 68(1): 1-21;
- 98.** Gupta R, Gupta N, Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64(6): 763-781;
- 99.** Gupta R, Kumari A, Syal P, Singh Y. 2015. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. *Prog Lipid Res* 57: 40-54;
- 100.** Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bradoo S. 2003. Lipase assay for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol Appl Biochem* 37: 63-71;
- 101.** Guzik U, Hubert-Kocurek K, Wojcieszynska D. 2014. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties – application to oxidoreductases. *Molecules* 19(7): 8995-9018;

- 102.** Hajjghasemi M, Boguslaw PC, Tchigvintsev A, Brown G, Flick R, Xu X, Cui H, Hai T, Joachimiak A, Golyshin PN, Savchenko A, Edwards EA, Yakunin AF. 2016. Biochemical and structural insights into enzymatic depolymerization of polylactic acid and other polyesters by microbial carboxylesterases. *Biomac* 17(6): 2027-2039;
- 103.** Handrick R, Reinhardt S, Focarete ML, Scandola M, Adamus G, Kowalczyk M, Jendrossek D. 2001. A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain length hydroxyalkanoic acids. *J Biol Chem* 276(39): 36215-36224;
- 104.** Hasan F, Shah AA, Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 39(2): 235–251;
- 105.** Hasan F, Shah AA, Hameed A. 2009. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnol Adv* 27(6): 782–798;
- 106.** Hatzakis NS, Daphnomili D, Smonou I. 2003. Ferulic acid esterase from *Humicola insolens* catalyzes enantioselective transesterification of secondary alcohols. *J Mol Catal B: Enzym* 21: 309-311;
- 107.** Hausmann S, Jaeger K-J. Lipolytic enzymes from bacteria. In: Timmis KN, editor. Handbook of hydrocarbons and lipid microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. p. 1100-1117;
- 108.** Heinze T, Talaba P, Heinze U. 2000. Starch derivatives of high degree of functionalization. 1. Effective, homogeneous synthesis of *p*-toluenesulfonyl (tosyl) starch with a new functionalization pattern. *Carbohydr Polym* 42(4): 411-420;
- 109.** Helisto P, Korpela T. 1998. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme Microb Technol* 23(1-2):113-117;
- 110.** Hitch TCA, Clavel T. 2019. A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes. *PeerJ* 7: e7249. DOI: 10.7717/peerj.7249;
- 111.** Horchani H, Aissa I, Ouertani S, Zarai Z, Gargouri Y, Sayari A. 2012. Staphylococcal lipases: biotechnological applications, *J Mol Catal B Enzym* 76: 125–132;
- 112.** Horchani H, Ouertani S, Gargouri Y, Sayari A. 2009. The N-terminal His-tag and the recombination process affect the biochemical properties of *Staphylococcus aureus* lipase produced in *Escherichia coli*. *J Mol Catal Enzym* 61(3-4): 194-201;
- 113.** Houde A, Kademi A, Leblanc D. 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotechnol* 118(1-3): 155-170;

- 114.** Hsieh YT, Chen KC, Cheng CM, Cheng TL, Tao MH, Roffiler SR. 2015. Impediment to enhancement of CPT-11 anticancer activity by *E.coli* directed beta-glucuronidase therapy. *PLoS One* 10(2): e0118028 DOI: 10.1371/journal.pone.0118028;
- 115.** Hu Y, Fu C, Huang Y, Cheng G, Lei F, Lu NA, Li J, Ashforth EJ, Zhang L, Zhu B. 2010. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 72(2): 228-237;
- 116.** Huang j, Huo YY, Ji R, Kuang S, Ji C, Xu X-W, Li J. 2016. Structural insights of a hormone sensitive lipase homologue Est22. *Sci Rep* 6: 28550. DOI: 10.1038/srep28550;
- 117.** Hwang ET, Gu MB. 2013. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Eng Life Sci* 13(1): 49–61;
- 118.** Yadav AN, Sachan SG, Verma P, Kaushik R, Saxena AK. 2016. Cold active hydrolytic enzymes production by psychrotrophic Bacilli isolated from three subglacial lakes of NW Indian Himalayas. *J Basic Microbiol* 56(3): 294-307;
- 119.** Yalçın HT, Çorbacı C, Uçar FB. 2014. Molecular characterization and lipase profiling of the yeasts isolated from environments contaminated with petroleum. *J Basic Microbiol* 54(SUPPL.1): 1–8;
- 120.** Yang J, Zhang Y. 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res* 43(W1): W174–W181. DOI: 10.1093/nar/gkv342;
- 121.** Yokozeki K, Yamanaka S, Takinami K, Hirose Y, Tanaka A, Sonomoto, Fukui KS. 1982. Application of immobilized lipase to regiospecific interesterification of triglyceride in organic solvent. *European J Appl Microbiol Biotechnol* 14(1): 1-5;
- 122.** Jaeger K-E, Dijkstra BW, Reetz MT. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53: 315–351;
- 123.** Jaeger K-E, Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotech* 13(4): 390-397;
- 124.** Jaeger K-E, Reetz M. 1998. Microbial lipases form versatile tool for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16(9): 396-403;
- 125.** Jayanath G, Mohandas SP, Kachiprath B, Solomon S, Sajeevan TP, Singh ISB, Philip R. 2018. A novel solvent tolerant esterase of GDSGG motif subfamily from solar saltern through metagenomic approach: recombinant expression and characterization. *Int J Biol Macromol* 119: 393–401;

- 126.** Jallouli R, Othman H, Amara S, Parsiegla G, Carriere F, Srairi-Abid N, Gargouri Y, Bezzine S. 2015. The galactolipase activity of *Fusarium solani* (phospho)lipase. *Biochim Biophys Acta* 1851(3): 282-289;
- 127.** Javed S, Azeem F, Hussain S, Rasul I, Siddique MH, Muhammad R, Muhammad A, Kouser A, Nadeem H. 2018. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Prog Biophys Mol Biol* 132:23-34;
- 128.** Jegannathan KR, Nielsen PH. 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production — a literature review. *J Cleaner Prod* 42: 228-240;
- 129.** Jeon JH, Kim JT, Lee HS, Kim SJ, Kang SG, Choi SH, Lee J-H. 2011. Novel lipolytic enzymes identified from metagenomic library of deep-sea sediment. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 271419. DOI: 10.1155/2011/271419;
- 130.** Kademi A, Leblanc D, Houde A. Lipases. In: Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C, editors. *Enzyme Technology*. Springer ASIATECH PUBLISHERS, Inc., New Delhi 2008. p. 297–316;
- 131.** Kamarudin NH, Rahman RN, Ali MS, Leow TC, Basri M, Salleh AB. 2014. A new cold-adapted, organic solvent stable lipase from mesophilic *Staphylococcus epidermidis* AT2. *Protein J* 33(3): 296–307;
- 132.** Kang H-Y, Kim JF, Kim MH, Park S-H, Oh T-K, Hur C-G. 2006. MELDB: a database for microbial lipases and esterases. *FEBS Lett* 580(11): 2736-2740;
- 133.** Kapoor M, Gupta MN. 2012. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem* 47(4): 555–569;
- 134.** Kasprzyk-Hordern B, Baker DR, 2012a. Enantiomeric profiling of chiral drugs in wastewater and receiving waters. *Environ Sci Technol* 46(3): 1681-1691;
- 135.** Kaur G, Singh A, Sharma R, Sharma V, Verma S, Sharma P. 2016. Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India. *3 Biotech* 6(1): 49. DOI: 101007/s13205-016-0369-y;
- 136.** Kavitha M. 2016. Cold active lipases – an update. *Front Life Sci* 9(3): 226–238;
- 137.** Kazlauskas S, Kiriliauskaitė V, Kalėdienė L, Bendikienė V. 2015. High performance protein-coated microcrystals of *Rhizomucor miehei* lipase: preparation and application for organic synthesis. *Appl Biochem Biotechnol* 176(2): 321–332;
- 138.** Khan FI, Lan D, Durrani R, Huan W, Zhao Z, Wang Y. 2017. The lid domain in lipases: structural and functional determination of enzymatic properties. *Front Bioeng Biotechnol* 5:16. DOI: 10.3389/fbioe.2017.00016;

- 139.** Khan S, Zaffar H, Irshad U, Ahmad R, Khan AR, Shah MM, Bilal M, Iqbal M, Naqvi T. 2016. Biodegradation of malathion by *Bacillus licheniformis* strain ML-1. *Arch Biol Sci Belgrade* 68(1): 51-59;
- 140.** Kim C, Lee J, Cho J, Oh Y, Choi YK, Choi E, Park J, Kim M-J. 2013. Kinetic and dynamic kinetic resolution of secondary alcohols with ionic surfactant-coated *Burkholderia cepacia* lipase: substrate scope and enantioselectivity. *J Organomet Chem* 78(6): 2571–2578;
- 141.** Kim EY, Oh KH, Lee MH, Kang CH, Oh TK, Yoon JH. 2009. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 75(1): 257-260;
- 142.** Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, Choe S, Yoo OJ, Suh SW. 1997. Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an α/β -hydrolase with broad substrate specificity. *Structure* 5(12): 1571-1584;
- 143.** Kim TD. 2017. Bacterial hormone-sensitive lipases (bHSLs): emerging enzymes for biotechnological applications. *J Microbiol Biotechnol* 27(11): 1907-1915;
- 144.** Kiriliauskaitė V. Extended investigation of lipases for biotechnological application. Ph. D. thesis, Vilnius University, Lithuania, 2015;
- 145.** Kishore JP, Manojkumar ZC, Raghunath TM. 2011. Lipase biodiversity. *Indian J Sci Technol* 4(8): 971-982;
- 146.** Ko KC, Rim SO, Han Y, Shin BS, Kim GJ, Choi JH, Song JJ. 2012. Identification and characterization of novel cold-adapted esterase from a metagenomic library of mountain soil. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39(5): 681–689;
- 147.** Konkit M, Choi WJ, Kim W. 2016. Aldehyde dehydrogenase activity on *Lactococcus chungangensis*: application in cream chereuse to reduce aldehyde on alcohol metabolism. *J Dairy Sci* 99(3): 1755-1761;
- 148.** Kouker G, Jaeger K-E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 53(1): 211-213;
- 149.** Kouwen TRHM, Nielsen AK, Denham EL, Dubois JYF, Dorenbos R, Rasmussen MD, Quax WJ, Freudl R, van Dijk JM. 2010. Contributions of the pre- and pro-regions of a *Staphylococcus hyicus* lipase to secretion of a heterologous protein by *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 76(3): 659–669;
- 150.** Kovacic F, Babic N, Krauss U, Jaeger K-J. Classification of lipolytic enzymes from bacteria. In: Rojo F, editor. *Aerobic utilization hydrocarbons, oils, and lipids*. Springer Nature Switzerland AG: Springer International Publishing, 2019. p. 255-289;

- 151.** Krzeslak J, Gerritse G, Merkerk R, Cool RH, Quax W J. 2008. Lipase Expression in *Pseudomonas alcaligenes* is under the control of a two-component regulatory system. *Appl Environ Microbiol* 74(5): 1402-1411;
- 152.** Kuisienė N. Molekulinė taksonomija. Technologija, Kaunas, Lietuva. 2008. p. 29;
- 153.** Kulakova L, Galkin A, Nakayama T, Nishino T, Esaki N. 2004. Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly→Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochim Biophys Acta* 1696(1): 59–65;
- 154.** Kumar A, Dhar K, Kanwar SS, Arora PK. 2016. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biol Proced Online* 18: 2. DOI: 10.1186/s12575-016-0033-2;
- 155.** Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7): 1870–1874;
- 156.** Kumar V, Yedavalli P, Gupta V, Rao NM. 2014. Engineering lipase A from mesophilic *Bacillus subtilis* for activity at low temperatures. *Protein Eng Des Sel* 27(3): 73-82;
- 157.** Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685;
- 158.** Lanser AC, Manthey LK, Hou CT. 2002. Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein. *Curr Microbiol* 44(5): 336–340;
- 159.** Lee LP, Karbul HM, Citartan M, Gopinath SCB, Lakshmi Priya T, Tang T-H. 2015. Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. *BioMed Res Int* 2015: 820575 DOI: 10.1155/2015/820575;
- 160.** Lee MH, Hong KS, Malhotra S, Park JH, Hwang EC, Choi HK, Kim YS, Tao W, Lee SW. 2010. A new esterase EstD2 isolated from plant rhizosphere soil metagenome. *Appl Microbiol Biotechnol* 88(5): 1125-1134;
- 161.** Lee MH, Lee CH, Oh TK, Song JK, Yoon JH. 2006. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 72(11): 7406-7409;
- 162.** Lenfant N, Hotelier T, Velluet E, Bourne Y, Marchot P, Chatonnet A. 2013. ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Res* 41(D1):423–429;
- 163.** Lescic I, Ivic N, Kovacic F, Schell S, Knorr J, Krauss U, Wilhelm S, Kojic-Prodic B, Jaeger K-E. 2010. Probing enzyme promiscuity of SGNH hydrolases. *Chembiochem* 11(15): 2158-2167;

- 164.** Leung DYC, Wu X, Leung MKH. 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy* 87(4): 1083–1095;
- 165.** Levisson M, Van der Oost J, Kengen SWM. 2007. Characterization and structural modeling of a new type of thermostable esterase from *Thermotoga maritima*. *FEBS J* 274: 2832–2842;
- 166.** Li PY, Chen XL, Ji P, Li CY, Wang P, Zhang Y, Xie BB, Qin QL, Su HN, Zhou BC, Zhang YZ, Zhang XY. 2015. Interdomain hydrophobic interactions modulate the thermostability of microbial esterases from the hormone-sensitive lipase family. *J Biol Chem* 290(17): 11188–11198;
- 167.** Li Q, Zheng J, Yan Y. 2010. Biodiesel preparation catalyzed by compound-lipase in co-solvent. *Fuel Process Technol* 91(10): 1229–1234;
- 168.** Li XL, Zhang WH, Wang YD, Dai YJ, Zhang HT, Wang Y, Wang H-K, Lu F-P. 2014. A high-detergent performance, cold-adapted lipase from *Pseudomonas stutzeri* PS59 suitable for detergent formulation. *J Mol Catal B Enzym* 102: 16–24;
- 169.** Lian X, Fang Y, Joseph E, Wang Q, Li J, Banerjee S, Lollar C, Wang X, Zhou H-C. 2017. Enzyme-MOF (metal organic framework) composites, *Chem Soc Rev* 46(11): 3386–3401;
- 170.** Lineweaver H, Burk H. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 56(3): 658–666;
- 171.** Litantra R, Lobionda S, Yim JH, Kim HK. 2013. Expression and biochemical characterization of cold-adapted lipases from antarctic *Bacillus pumilus* strains. *J Microbiol Biotechnol* 23(9): 1221–1228;
- 172.** Liu Y, Lai Q, Dong C, Sun F, Wang L, Li G, Shao Z. 2013. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS One* 8(11): e80097. DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0080097;
- 173.** Lomolino G, Rizzi C, Spetoli P, Curioni A, Lante A. 2003. Cell vitality and esterase activity of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by increasing calcium concentration. *Agro Food Industry Hi Tech* 14(6): 32–35;
- 174.** Lopes DB, Fraga LP, Fleuri LF, Macedo GA. 2011. Lipase and esterase – to what extent can this classification be applied accurately? *Cienc Tecnol Aliment* 31(3): 603–613;
- 175.** Lopez-Gallego F, Abian O, Guisan JM. 2012. Altering the interfacial activation mechanism of a lipase by solid-phase selective chemical modification. *Biochemistry* 51(35): 7028–7036;
- 176.** Lopez-Lopez O, Cerdan M, Siso M. 2014. New extremophilic lipases and esterases from metagenomics. *Curr Protein Pept Sci* 15(5): 445–455;

- 177.** Lotti M, Alberghina L. Lipases: molecular structure and function. In: Polaina J, MacCabe AP, editors. *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, 2007. p. 263–281;
- 178.** Machado H, Sonnenschein EC, Melchiorson J, Gram L. 2015. Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria. *BMC Genomics* 16: 158. DOI: 10.1186/s12864-015-1365-z;
- 179.** Mak WS, Tran S, Marcheschi R, Bertolani S, Thompson J, Baker D, Liao JC, Siegel JB. 2015. Integrative genomic mining for enzyme function to enable engineering of a non-natural biosynthetic pathway. *Nat Commun* 6: 10005. DOI: 10.1038/ncomms10005;
- 180.** Manoel EA, dos Santos JCS, Freire DMG, Rueda N, Fernandez-Lafuente R. 2015. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme Microb Technol* 71: 53–57;
- 181.** Manoel EA, Ribeiro MFP, dos Santos JCS, Coelho MAZ, Simas ABC, Fernandez-Lafuente R, Freire DMG. 2015. Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia*: application to the kinetic resolution of myo-inositol derivatives. *Process Biochem* 50(10): 1557–1564;
- 182.** Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* 40(6): 1451-1463;
- 183.** Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60. DOI: 10.1186/1471-2105-14-60;
- 184.** Meier-Kolthoff JP, Göker M, Klenk H-P. 2014. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(Pt 2): 352-356;
- 185.** Meier-Kolthoff JP, Hahnke RL, Petersen J, Scheuner C, Michael V, Fiebig A, Rohde C, Rohde M, Fartmann B, Goodwin LA, Chertkov O, Reddy T, Pati A, Ivanova NN, Markowitz V, Kyrpides NC, Woyke T., Göker M, Klenk H-P. 2014. Complete genome sequence of DSM 30083^T, the type strain (U5/41^T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Stand Genomic Sci* 9: 2. DOI: 10.1186/1944-3277-9-2;
- 186.** Meng X, Guo L, Xu G, Wu JP, Yang LR. 2014. A new mechanism of enantioselectivity toward chiral primary alcohol by lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J Mol Catal B Enzym* 109: 109–115;
- 187.** Messaoudi A, Belguith H, Ghram I, Ben HJ, 2011. LIPABASE: a database for true lipase family enzymes. *Int J Bioinform Res Appl* 7: 390-401;

- 188.** Messaoudi A, Belguith H, Gram I, Ben Hamida J. 2010. Classification of 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *Afr J Biotechnol* 9(48): 8243-8247;
- 189.** Michael GPF, Voulhoux R. Type II secretory system (T2SS) in gram-negative bacteria: a molecular nanomachine for secretion of Sec and Tat-dependent extracellular proteins. In: Wooldridge K, editors. Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press, 2009. p. 79;
- 190.** Moh'd AS, Juergen W. 2010. Effects of detergents on activity, thermostability and aggregation of two alkalithermophilic lipases from *Thermosintropha lipolytica*. *Open Biochem J* 4: 22–28;
- 191.** Moharana TR, Byreddy AR, Puri M, Barrow C, Rao NM. 2016. Selective enrichment of omega-3 fatty acids in oils by phospholipase A1, *PLoS One* 11(3) : e0151370. DOI: 10.1371/journal.pone.0151370;
- 192.** Mukherjee J, Gupta MN. 2015. Molecular bioimprinting of lipases with surfactants and its functional consequences in low water media, *Int J Biol Macromol* 81: 544–551;
- 193.** Mukherjee J, Gupta MN. 2016. Dual bioimprinting of *Thermomyces lanuginosus* lipase for the synthesis of biodiesel. *Biotechnol Rep* 10: 38–43;
- 194.** Nachon F, Asojo OA, Borgstahl GE, Masson P, Lockridge O. 2005. Role of water in aging of human butyrylcholinesterase inhibited by echothiophate: the crystal structure suggests two alternative mechanisms of aging. *Biochem* 44(4): 1154–1162;
- 195.** Nagarv M, Dwivedi SK, Shrivastava D. 2013. A review on industrial application in microbial lipases. *Int J Pharm Res Sci* 2: 631–641;
- 196.** Niyonzima FN, More S. 2015. Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. *Prep Biochem Biotechnol* 45(3): 233–58;
- 197.** Nikolenko S, Korobeynikov A, Alekseyev MA. 2013. BayesHammer: Bayesian clustering for error correction in single cell sequencing, *BMC Genomics* 14(Suppl. 1): S7 DOI: 10.1186/1471-2164-14-S1-S7;
- 198.** Nishimura M, Inouye S. 2000. Inhibitory effects of carbohydrates on cholesterol esterase biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* H646SY2. *J Biosci Bioeng* 90(5): 564- 566;
- 199.** Ollis DL, Eong C, Cygler M, Dijkstra B, Frolof F, Franken SM, Harel M. 1992. The α / β hydrolase fold. *Protein Eng Des Sel* 5(3): 197–211;
- 200.** Palmer T, Bergs BC. 2012. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev* 10: 483-496;
- 201.** Panda T, Gowrishankar BS. 2005. Production and applications of esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 67(2): 160–169;

- 202.** Pandya C, Farelli JD, Dunaway-Mariano D, Allen KN. 2014. Enzyme promiscuity: engine of evolutionary innovation. *J Biol Chem* 289(44): 30229–30236;
- 203.** Parapouli M, Foukis A, Stergiou P-Y, Koukouritaki M, Magklaras P, Gkini OA, Papamichael E M, Afendra A-S, Hatziloukas E. 2018. Correction to: Molecular, biochemical and kinetic analysis of a novel, thermostable lipase (LipSm) from *Stenotrophomonas maltophilia* Psi-1, the first member of a new bacterial lipase family (XVIII). *J Bio Res* 25: 4. DOI: 10.1186/s40709-018-0074-6;
- 204.** Peng Q, Xu Wang, Meng S, Huang J, Guohua G, Li Y, Bo S. 2014. Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. *Microb Cell Fact* 13(1): 1-9;
- 205.** Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SIGNALP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785–786;
- 206.** Petrovskaya LE, Novototskaya-Vlasova KA, Spirina EV, Durdenko EV, Lomakina GY, Zavialova MG, Nikolaev EN, Rivkina EM. 2016. Expression and characterization of a new esterase with GCSAG motif from a permafrost metagenomic library. *FEMS Microbiol Ecol* 92(5): fiv046. DOI: doi.org/10.1093/femsec/fiv046;
- 207.** Phuah E-T, Lai O-M, Choong TS-Y, Tan C-P, Lo S-K. 2012. Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. *J Mol Catal B Enzym* 78: 91–97;
- 208.** Pleiss J, Fischer M, Peiker M, Thiele C, Schmid RD. 2000. Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence– structure– function relationships. *J Mol Catal B Enzym* 10(5): 491–508;
- 209.** Pleiss J, Fischer M, Schmid RD. 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem Phys Lipids* 93(1-2): 67–80;
- 210.** Prim N, Bofill C, Pastor FIJ, Diaz P. 2006. Esterase EstA6 from *Pseudomonas* sp. CR-611 is a novel member in the utmost conserved cluster of family VI bacterial lipolytic enzymes. *Biochimie* 88: 859-867;
- 211.** Rabbani G, Ahmad E, Khan MV, Ashraf MT, Bhat R, Khan RH. 2015. Impact of structural stability of cold adapted *Candida antarctica* lipase B (CalB): in relation to pH, chemical and thermal denaturation. *RSC Adv* 26: 20115–20131;
- 212.** Ray A. 2012. Application of lipase in industry. *Asian J Pharm Tech* 2(2): 33-37;
- 213.** Ramnath L, Sithole B, Govinden R. 2017. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. *Can J Microbiol* 63(3): 179-192;

- 214.** Rao L, Xue Y, Zhou C, Tao J, Li G, Lu JR, Ma Y. 2011. A thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* opening up a new family of bacterial lipolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1814(12): 1695-1702;
- 215.** Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, Atomi H, Imanaka T. 2001. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl Environ Microb* 67(9): 4064–4069;
- 216.** Rauwerdink A, Kazlauskas RJ. 2015. How the same core catalytic machinery catalyzes 17 different reactions: the serine-histidine-aspartate catalytic triad of α/β -hydrolase fold enzymes. *ACS Catalysis* 5(10): 6153-6176;
- 217.** Raz R, Colodner R, Kunin CM. 2005. Who are you – *Staphylococcus saprophyticus*? *Clin Infect Dis* 40: 896–898;
- 218.** Rehm S, Trodler P, Pleiss P. Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study. *Protein Sci* 19(11): 2122–2130;
- 219.** Ribeiro BD, Machado de Castro A, Coelho MAZ, Guimaraes FDM. 2011. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res* DOI: doi.org/10.4061/2011/615803;
- 220.** Robert X, Gouet P. 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 42: W320–W324. DOI: 10.1093/nar/gku316;
- 221.** Robinson PK. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* 59: 1-41;
- 222.** Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5: 725–738;
- 223.** Rosenau F, Jaeger K-E. 2000. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* 82(11): 1023-1032;
- 224.** Rosenstein R, Götz F. 2000. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie* 82(11): 1005-1014;
- 225.** Rossetti S, Tomei MC, Nielsen PH, Tandoi V. 2005. “*Microthrix parvicella*”, a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge. *FEMS Microbiol Rev* 29(1): 49-64;
- 226.** Rueda N, Albuquerque TL, Bartolome-Cabrero R, Fernandez-Lopez L, Torres R, Ortiz C, dos Santos JCS, Barbosa O, Fernandez-Lafuente R. 2016. Reversible immobilization of lipases on heterofunctional octyl-amino agarose beads prevents enzyme desorption. *Molecules* 21(5): 1–18;
- 227.** Rueda N, dos Santos CS, Rodriguez MD, Albuquerque TL, Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R. 2016. Reversible immobilization of

lipases on octyl-glutamic agarose beads: a mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. *J Mol Catal B Enzym* 128: 10–18;

228. Ruiz C, Falcocchio S, Pastor FI, Saso L, Diaz P. 2007. *Helicobacter pylori* EstV: identification, cloning, and characterization of the first lipase isolated from an epsilon-proteobacterium. *Appl Environ Microbiol* 73: 2423–2431;

229. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4): 406–425;

230. Sakinç T, Woznowski M, Ebsen M, Gatermann SG. 2005. The surface-associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase. *Infect Immun* 73(10): 6419–6428;

231. Sambrook J, Russel DW, Molecular Cloning: A laboratory manual, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2011;

232. Sangeetha R, Arulpandi I, Geetha A. 2011. Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: an overview. *Res J Microbiol* 6: 1–24;

233. Santarossa G, Pietro GL, Alquati C, DeGioia L, Alberghina L, Fantucci P, Lotti M. 2005. Mutations in the ‘lid’ region affect chain length specificity and thermostability of a *Pseudomonas fragi* lipase. *FEBS Lett* 579(11): 2383–2386;

234. Sarkar P, Yamasaki S, Basak S, Bera A, Bag PK. 2012. Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from *Arachis hypogaea* rhizosphere. *Process Biochem* 47 (5): 858–866;

235. Sarmah N, Dhanashekar R, Sheelu G, Rani KY, Sridhar S, Mehtab V, Sumana C. 2018. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol Prog* 34(1): 5–28;

236. Saxena RK, Misra S, Rawat I, Gupta P, Dutt K, Parmar VS. 2011. Production of 1, 3 regiospecific lipase from *Bacillus* sp. RK-3: its potential to synthesize cocoa butter substitute. *Malays J Microbiol* 7(1): 41–48;

237. Schmidt R, Markart P, Ruppert C, Wygrecka M, Kuchenbuch T, Walmrath D, Seeger W, Guenther A. 2007. Time-dependent changes in pulmonary surfactant function and composition in acute respiratory distress syndrome due to pneumonia or aspiration. *Respir Res* 8: 55. DOI: 10.1186/1465-9921-8-55;

238. Schrag JD, Li YG, Wu S, Cygler M. 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* 351: 761–764;

239. Secundo F. 2013. Conformational changes of enzymes upon immobilization. *Chem Soc Rev* 42(15): 6250–6261;

240. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation, *Bioinformatics* 30(14): 2068–2069;

- 241.** Shabtai Y. 1991. Isolation and characterization of a lipolytic bacterium capable of growing in a low water-content oil-water emulsion. *Appl Environ Microbiol* 57: 1740–1745;
- 242.** Shah KR, Bhatt SA. 2012. Purification and Characterization of Lipase from *B. subtilis* Pa2. *J. Biochem Tech* 3(3): 292–95;
- 243.** Shao W, Wiegel J. 1995. Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. *Appl Environ Microbiol* 61: 729-733;
- 244.** Sharma D, Sharma B, Shukla AK. 2011. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnol* 10(1): 23–40;
- 245.** Sharma S, Kanwar SS. 2014. Organic solvent tolerant lipases and applications. *Sci World J* 2014: 625258. DOI: 10.1155/2014/625258;
- 246.** Sheldon RA, Van Pelt S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev* 42(15): 6223–6235;
- 247.** Shinohara M, Nakajima N, Uehara Y. 2007. Purification and characterization of a novel esterase (betahydroxypalmitate methyl ester hydrolase) and prevention of the expression of virulence by *Ralstonia solanacearum*. *J Appl Microbiol* 103: 152–162;
- 248.** Silveira EA, Moreno-Perez S, Basso A, Serban S, Mamede RP, Tardioli PW, Farinas CS, Rocha-Martin J, Fernandez-Lorente G, Guisan CM. 2017. Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the methanolysis of oil in fully anhydrous media. *BMC Biotechnol* 17(1): 88;
- 249.** Singh B, Kaur J, Singh K. 2012. Biodegradation of malathion by *Brevibacillus* sp. strain KB2 and *Bacillus cereus* strain PU. *World J Microbiol Biotechnol* 28(3): 1133-1141;
- 250.** Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* 6: 174. DOI: 10.1007/s13205-016-0485-8;
- 251.** Skals PB, Krabek A, Nielsen PH, Wenzel H. 2008. Environmental assessment of enzyme assisted processing in pulp and paper industry. *Int J Life Cycle Assess* 13: 124-132;
- 252.** Sood S, Sharma A, Sharma N, Kanwar SS. 2016. Carboxylesterases: sources, characterization and broader applications. *Insights Enzyme Res* 1(1). DOI : 10.21767/2573-4466.100002;
- 253.** Soror SH, Rao R, Cullum J. 2009. Mining the genome sequence for novel enzyme activity: characterization of an unusual member of the hormone-sensitive lipase family of esterases from the genome of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Protein Eng Des Sel* 22: 333–339;

- 254.** Stergiou PY, Foukis A, Filippou M, Koukouritaki M, Parapouli M, Theodorou LG, Hatziloukas E, Afendra A, Pandey A, Papamichael EM. 2013. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol Adv* 31(8): 1846–1859;
- 255.** Stojanovic M, Velickovic D, Dimitrijevic A, Milosavic N, Knezevic-Jugovic Z, Bezbradica D. 2013. Lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl oleate in acetone: optimization of reaction conditions and lipase reusability. *J Oleo Sci* 62(8): 591–603;
- 256.** Stransky K, Zarevucka M, Kejik Z, Wimmer Z, Macková M, Demnerová K. 2007. Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp. *Biochem Eng J* 34(3): 209–216;
- 257.** Svendsen A, editor. Enzyme functionality: design: engineering, and Screening. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2003;
- 258.** Szabados F, Mohner A, Kleine B, Gatermann SG. 2013. *Staphylococcus saprophyticus* surface-associated protein (Ssp) is associated with life span reduction in *Caenorhabditis elegans*. *Virulence* 4(7): 604-611;
- 259.** Šinkūnienė D, Bendikienė V, Juodka B. 2011. Response surface methodology-based optimization of lipase-catalyzed triolein hydrolysis in hexane. *Rom Biotechnol Lett* 16(1): 5891-5901;
- 260.** Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673–4680;
- 261.** Topakas E, Kalogeris E, Kekos D, Macris BJ, Christakopoulos P. 2003. Production and partial characterisation of feruloyl esterase by *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation. *Process Biochem* 38: 1539-1543;
- 262.** Tserovska L, Dimkov R, Rasheva T, Yordanova T. 2006. Extra- and intracellular esterases involved in dimethylterephthalate catabolism by *Pseudomonas* sp. *J Culture Collections* 5: 35-37;
- 263.** Tsuji M, Yokota Y, Shimohara K, Kudoh S, Hoshino T. 2013. An application of wastewater treatment in a cold environment and stable lipase production of Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. *PLoS One* 8(3): e59376. DOI: 10.1371/journal.pone.0059376;
- 264.** Tsuji T, Kawasaki Y, Takeshima S, Sekiya T, Tanaka S. 1995. A New Fluorescence staining assay for visualizing living Mžmicroorganisms in Sžsoil. *Appl Environ Microbiol* 61: 3415–3421;
- 265.** Umlauf BJ, McGuire MJ, Brown KC. 2015. Introduction of plasmid encoding for rare tRNAs reduces amplification bias in phage display biopanning. *BioTechniques* 58(2): 81–84;

- 266.** Vaghari H, Jafarizadeh-Malmiri H, Mohammadlou M, Berenjian A, Anarjan N, Jafari N, Nasiri S. 2016. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. *Biotechnol Lett* 38(2): 223–233;
- 267.** van Pouderooyen G, Eggert T, Jaeger K-E, Dijkstra BW. 2001. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J Mol Biol* 309(1): 215–226;
- 268.** Vaquero ME, Barriuso J, Martínez MJ, Prieto A. 2016. Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(5): 2047–2061;
- 269.** Verma N, Thakur S, Bhatt A K. 2012. Microbial Lipases: industrial applications and properties. *Inter Res J Biol Sci* 1(8): 88-92;
- 270.** Virgen-Ortíz JJ, Tacias-Pascacio VG, Hirata DB, Torrestiana-Sanchez B, Rosales-Quintero A, Fernandez-Lafuente R. 2017. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports, *Enzyme Microb Technol* 96: 30–35;
- 271.** Wagner UG, Petersen EI, Schwab H, Kratky C. 2002. EstB from *Burkholderia gladioli*: a novel esterase with β -lactamase fold reveals steric factors to discriminate between esterolytic and β -lactam cleaving activity. *Protein Sci* 11(3): 467–478;
- 272.** Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CS, Zeng Q, Wortman J, Young SK, Earl AM. 2014. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* 9: e112963. DOI: 10.1371/journal.pone.011 (https://doi.org/63);
- 273.** Wall T, Bath K, Britton RA, Jonsson H, Versalovic J, Roos S. 2007. The early response to acid shock in *Lactobacillus reuteri* involves the ClpL chaperone and a putative cell wall-altering esterase. *Appl Environ Microbiol* 73: 3924–3935;
- 274.** Wang BZ, Gou P, Hang BJ, Li L, He J, Li SP. 2009. Cloning of a novel pyrethroid hydrolyzing carboxylesterase gene from *Sphingobium sp.* *Appl Environ Microbiol* 75(17): 5496-5500;
- 275.** Wang G, Wang Q, Lin X, Ng TB, Yan R, Lin J, Ye X. 2016. A novel cold-adapted and highly salt-tolerant esterase from *Alkalibacterium sp.* SL3 from sediment of a soda lake. *Sci Rep* 6:19494. DOI: 10.1038/srep19494;
- 276.** Wang X, Geng X, Egashira Y, Sanada H. 2004. Purification and characterization of a feruloyl esterase from the intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 70: 2367–2372;
- 277.** Wei Y, Schottel JL, Derewenda U, Swenson L, Patkar S, Derewenda ZS. 1995. A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nat Struct Biol* 2(3): 218-23;

- 278.** Whitehead K, Versalovic J, Roos S, Britton RA. 2008. Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Appl Environ Microbiol* 74: 1812–1819;
- 279.** Wi AR, Jeon SJ, Kim S, Park HJ, Kim D, Han SJ, Yim JH, Kim HW. 2014. *Bacillus* sp. W130-35 isolated from a tidal mud flat. *Biotechnol Lett* 36: 1295–1302;
- 280.** Widmann M, Juhl PB, Pleiss J. 2010. Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A. *BMC Genomics* 11:123. DOI: 10.1186/1471-2164-11-123;
- 281.** Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE. 2007. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol* 189: 6695–6703;
- 282.** Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343(6260): 771–774;
- 283.** Xie Z, Xu B, Ding J, Liu L, Zhang X, Li J, Huang Z. 2013. Heterologous expression and characterization of a malathion-hydrolyzing carboxylesterase from a thermophilic bacterium, *Alicyclobacillus tengchogensis*. *Biotechnol Lett* 35(8): 1283-1289;
- 284.** Xu Y, Zhang C, He W, Liu D. 2016. Regulations of xenobiotics and endobiotics on carboxylesterases: a comprehensive review. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 41(4): 321-330;
- 285.** Zafareta D, Moschidi D, Ladoukakis E, Gavrilov S, Chrysinia ED, Chatziioannou A, KublanovI, Skretas G, Kolisis FN. 2016. Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases. *Sci Rep* 6: 38886. DOI: 10.1038/srep38886;
- 286.** Zhai Y, Li K, Song J, Shi Y, Yan Y. 2012. Molecular cloning, purification and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Ochrobactrum anthropi* YZ-1. *J Hazard Mater* 221-222: 206-212;
- 287.** Zhang M, Wang JD, Li ZF, Xie J, Yang YP, Zhong Y, Wang HH. 2005. Expression and characterization of the carboxyl esterase Rv3487c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Exp Purif* 42: 59–66;
- 288.** Zhang W, Xu H, Wu Y, Zeng J, Guo Z, Wang L, Shen C, Qiao D, Cao Y. A new cold adapted, alkali-stable esterase from *Bacillus licheniformis*, *Int J Biol Macromol* 111: 1183–1193. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.152;
- 289.** Zheng C, Sun X, Li L, Guan N. 2012. Scaling up of ethanol production from sugar molasses using yeast immobilized with alginate-based MCM-41 mesoporous zolite composite carrier. *Bioresour Technol* 115: 208-214;

290. Zhu Y, Li J, Cai H, Ni H. 2013. Characterization of a new thermostable esterase from metagenomic library. *Microbiol Res* 168(9): 589-597;

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 12 egz.