

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Nevena S. Kaličanin

Sinteza amino derivata steroida rekombinantnim
transaminazama i dehidrogenazama

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Nevena S. Kaličanin

Synthesis of steroid amino derivatives by
recombinant transaminases and dehydrogenases

Doctoral dissertation

Belgrade, 2025

Mentor, član komisije:

dr Radivoje Prodanović
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Marija Gavrović-Jankulović
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Suzana Jovanović-Šanta
Redovni profesor
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane:

Posvećeno...

Mojoj deci, Duletu i Lenki, koji su oplemenili moj život i dali mu poseban smisao. Vi ste moja pokretačka sila! Vaši osmesi, pogledi i poljupci ispunjavaju moje dane zadovoljstvom i daju mi volju, snagu i podsticaj da prevaziđem svaki izazov kako bismo vam tata i ja pružili kvalitetniji život. Trenutci provedeni sa vama su nešto najsavršenije što imam priliku da iskusim, i znajte da ću uvek biti uz vas, da vas bodrim na svakom koraku i pružim vam безусловnu ljubav. Voli vas mama bezgranično, do crne rupe kako oko moje najlepše kaže!

Zahvaljujem se...

Svom mentoru, redovnom profesoru dr Radivoju Prodanoviću, na svim savetima, idejama i kritikama koje mi je uputio tokom izrade ove disertacije, a koji su neizmerno doprineli tome da danas budem izuzetno ponosna na ono što sam postigla. Hvala mu što mi je pružio priliku i dao slobodu da razvijam svoje naučne kapacitete i što mi je pomogao da shvatim da sam ja ta od koje zavisi, kao i da mogu da postignem mnogo ukoliko verujem i ne odustajem. Pored svega, hvala mu i na životnim savetima koji su doprineli tome da sazrim kao ličnost.

Redovnom profesoru dr Mariji Gavrović – Jankulović, šefu katedre za Biohemiju, na pruženom znanju od osnovnih studija pa do danas, na svim naučnim i životnim savetima koje mi je tokom godina davala, na tome što sam uvek bila rado prihvaćena u njenoj laboratoriji i što je pristala da bude deo komisije za odbranu i ocenu ove doktorske disertacije.

Redovnom profesoru dr Suzani Jovanović-Šanti sam neizmerno zahvalna na svojoj podršci koju mi je pružila na ovom putu, na sjajnoj saradnji, na vremenu koje mi je nesebično posvećivala kad god je nešto zapelo, na tome što me je podsticala da radim predanije i postanem bolja verzija sebe i naposljetku što je pristala da bude deo komisije za odbranu i ocenu ove doktorske teze.

Mojim roditeljima i sestrama dugujem ogromnu zahvalnost za svu ljubav i podršku koju su mi pružili ne samo tokom doktorata već i u svim drugim sferama života i što su mi omogućili da ostvarim svoje ambicije! Hvala vam što ste me naučili šta znači imati otvoreno srce i kako se u životu mogu prevazići sve poteškoće. Maka hvala ti što si uvek tu za nas, što si nas bodrila i poturala leđa da bismo dogurale ovde gde smo sad. Hvala ti što si mi se našla kad god je zatrebalo i kao ispomoć i da me saslusaš, a ponekad i da istrpiš moju nervozu kao kolateralna šteta. Sekići moji, hvala vam za svaki momenat ludačkog smeha, za rasprave koje mislim da su nam svima koristile, za svaki zagrljaj utehe, za to što od rođenja znam šta znači imati nekoga ko je deo tebe zauvek i ko će uvek biti tu da me podrži. Volim vas beskrajno! Jejice tebi posebno hvala što si me naučila šta znači ne posustajati, voleti bezuslovno, praštati i živeti po principu živi i pusti druge da žive. Hvala ti što si tu da me saslusaš kad je najteže i da me vratiš u realnost i podsetiš koliko je sve u suštini baš tamo gde treba da bude u datom trenutku i da se kockice poslože kad dođe pravo vreme.

Nemerljivu zahvalnost dugujem svojim bakama i deki Momčilu, sa kojima sam imala zadovoljstvo da provedem veliki deo svog života. Oni su umnogome zaslužni za sva postignuća u mom životu i za to što sam izrasla u čoveka kakav sam danas. Oni su mi pokazali značenje reči dom, безусловna ljubav, istrajnost, upornost i uvek su bili moja sigurna luka. Hvala vam za sve savete, kafice, krompiriće, krofne i listiće, džakove za sankanje, vožnje na prilikolici punoj slame, svako srećno na ispitu, spremanje pijace i još nebrojeno prelepih momenata koji su moje odrastanje učinili nezaboravnim u najlepšem mogućem smislu! Neizmerno mi nedostajete i nadam se da ste ponosni na mene!

Hvala tebi ljubavi, uz kog zimim evo već dvanaestu zimu, uz kog sam sazrela, postala samouverenija u svakom smislu, koji si me naučio da na život gledam racionalnije, da ne shvatam sve lično, što mi je umnogome pomoglo kako na ovom putu tako i na drugim poljima i međuljudskim odnosima. Hvala ti što si mi uvek bio podrška i vetar u leđa, što me voliš bezuslovno, što me ne ograničavaš već

podstičeš da budem preduzimljivija i da razvijam svoje potencijale. Hvala ti što mogu da se oslonim na tebe u svakom trenutku, što znaš da prepoznaš moje potrebe i neretko ih stavljaš ispred svojih. Hvala ti na strpljenju i što trpiš moje bubice, a ima ih ne zna im se broj. Hvala što si me pustio u svoje srce i baš ti osvojio moje i što odolevamo zajedno svim izazovima, uz dva savršena izdanka naše ljubavi!

Nema mnogo ljudi privilegiju da stekne i održi u životu prava prijateljstva, a ja sam imala tu sreću da u trenutku dok sam bila još nezreli devojčurak u najizazovnijim godinama upoznam četiri divna bića, moju proširenu porodicu, uz koju sam sazrevala, formirala stavove o životu, sa kojima delim i dobro i loše, koje su uvek tu da me podrže, da moje emocije proživljavaju kao da su njihove, da me savetuju, a i da me otrezne kad se zanesem. Jelo, Tašo, Bekac i Rule hvala vam što postojite u mom životu, bez vas bih mnogo teže izlazila na kraj sa svim poteškoćama koje život ume da nametne, ali pre svega bez vas sigurno ne bih proživela toliko prelepih momenata i dobila ove bore smejalice koje čuvaju naše dogodovštine!

Ana Marija, Dunja, Nikola, Bojane, Biljana, Andrijana i Gorane, moji prijatelji od prvih fakultetskih dana pa do danas, hvala na svim godinama podrške, ljubavi, smeha, suza, učenja i sređivanja rezultata uz pauze za dugu kafu, društvene igre, pa i poneku raspravu. Hvala vam što ste bili uvek tu da jedni druge motivišemo da istrajemo i pregrmimo zajedno mnoge izazovne trenutke!

Sjajnim ljudima koje sam imala priliku da upoznam od početka doktorata, od kojih neki više nisu deo laboratorije, ali su postali neizostavan deo moje slagalice i bliski prijatelji uz koje se grohotom smejem, sa kojima delim svoje male ludosti, koji slušaju moje žalopojke, koji su mi uvek pružali podršku, davali motivaciju i nisu mi dozvoljavali da posustanem, sa kojima mogu da se ne čujem i ne vidim dugo, a kad se sretnemo osećaj je kao da se nismo odvajali. Goco, Marija, Aleks, Zeki, Micka i Jelice hvala vam što ste mi ovu avanturu olakšale i što ste donele veliku dozu pozitivnosti i humora u moj život!

Veliku zahvalnost dugujem i ostalim divim ljudima sa kojima sam imala i imam zadovoljstvo da provodim radne dane, delim izazove, družim se i smejem, razmenjujem znanje i ideje, da se ponekad nerviramo ali da zajedno rešavamo probleme. Hvala vam što ste doprineli i doprinosite tome da uživam u vremenu koje provodim na poslu jer nema svako tu privilegiju.

Hvala kolegama i prijateljima iz kako je mi zovemo sestrinske laboratorije 429 na svoj pomoći, podršci i divnom druženju tokom svih ovih godina. Hvala i kolegama iz laboratorije 403 i svim kolegama sa katedre za organsku hemiju na ukazanoj pomoći, savetima i lepom druženju. Miloše, tebi dugujem posebnu zahvalnost za dobru volju i pomoć u kriznim situacijama dok sam imala ograničene resurse, hvala za strpljenje sa kojim si slušao moje jadikovanje i iskreno radovanje mojim uspesima.

Ivana i Kole, bez vas bi ovaj put bio značajno izazovniji jer je organizacija mojih eksperimenata često zavisila od vaše pomoći. Hvala vam na безусловnom pružanju podrške, na mnogim pozajmicama, na divnoj saradnji tokom držanja vežbi, na kafama i savetima i prijateljskom odnosu koji smo razvili tokom godina.

I naposljetku, hvala svim studentima kojima sam imala priliku da držim laboratorijske vežbe. Bilo je zadovoljstvo biti deo vašeg razvojnog puta i jedno od najlepših iskustava u mom naučnom rastu.

Sinteza amino derivata steroida rekombinantnim transaminazama i dehidrogenazama

Sažetak

Upotreba enzima je važna za razvoj ekološki prihvatljivih i efikasnih procesa u sintezi hiralnih amina i amino steroida. Cilj ovog rada je bio dobijanje biokatalizatora pogodnog za sintezu amino derivata steroida, kao i drugih sekundarnih amina. Prvo je određena specifičnost transaminaze ArRMut11 (mutirane varijante enzima poreklom iz *Arthrobacter sp.*) ka različitim steroidima. Imobilizacijom na makroporoznom metakrilatnom polimeru dodatno je povećana stabilnost transaminaze ArRMut11. Imobilizovani enzim se mogao upotrebiti u više uzastopnih ciklusa sinteze 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ola uz neznatan gubitak aktivnosti nakon 10 ciklusa upotrebe. Imobilizovani enzim je zadržao 75% početne aktivnosti nakon 2 h inkubacije u 35% dimetilformamidu na 70 °C, dok je aktivnost rastvornog enzima pri ovim uslovima pala na 19%.

Razvoj biokatalizatora za sintezu sekundarnih amina obuhvatao je rekombinantu ekspresiju, prečišćavanje i karakterizaciju pretpostavljene opin dehidrogenaze iz halofilnog organizma *Desulfohalobium retbaense* u *E. coli*. Pokazano je da enzim predstavlja alanopin dehidrogenazu, da kao supstrate preferira L-alanin i piruvat, i druge manje voluminozne aminokiseline kao što su L-valin, L-serin i L-cistein. Enzim je pokazao izuzetnu stabilnost u opsegu pH od 6,0-11,0, u prisustvu NaCl do 3,0 M, kao i u 30% dimetil sulfoksidu. Navedene karakteristike čine ovaj enzim potencijalnim kandidatom za primenu u sintezi hiralnih sekundarnih amina i dalje unapređenje aktivnosti proteinskim inženjeringom. Enzim je podvrgnut nasumičnoj mutagenezi, i pretrazi biblioteka visokoefikasnom metodom zasnovanom na promeni fluorescencije NADH. Uočeno je nekoliko potencijalnih transformanata opin dehidrogenaze sa povećanom aktivnošću ili promenjenom specifičnošću u odnosu na divlji tip enzima.

Ključne reči: hiralni amini, amino steroidi, transaminaze, opin dehidrogenaza, biokataliza, imobilizacija, halofili, metagenomika, proteinski inženjering

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

Synthesis of steroid amino derivatives by recombinant transaminases and dehydrogenases

Abstract

Enzymes are important tools for the development of environmentally acceptable and efficient processes in the synthesis of chiral amines and amino steroids. The aim of this work was to obtain a biocatalyst suitable for the synthesis of steroid amino derivatives, as well as other secondary amines. First, the specificity of transaminase ArRMut11 (a mutated variant of the enzyme originating from *Arthrobacter sp.*) towards different steroids was determined. Immobilization on a macroporous methacrylate polymer additionally increased the stability of transaminase ArRMut11. The immobilized enzyme could be used in several consecutive cycles of 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ol synthesis with a slight loss of activity after 10 cycles. The immobilized enzyme retained 75% of the initial activity after 2 h of incubation in 35% dimethylformamide at 70 °C, while the activity of the soluble enzyme under these conditions dropped to 19%.

The development of a biocatalyst for the synthesis of secondary amines involved the recombinant expression, purification and characterization of a putative opine dehydrogenase from the halophilic organism *Desulfohalobium retbaense* in *E. coli*. It was shown that the enzyme is an allanopine dehydrogenase, that prefers L-alanine and pyruvate, and other less voluminous amino acids such as L-valine, L-serine and L-cysteine as substrates. The enzyme showed exceptional stability in the pH range of 6,0-11,0, in the presence of NaCl up to 3.0 M, as well as in 30% dimethyl sulfoxide. The mentioned characteristics make this enzyme a potential candidate for application in the synthesis of chiral secondary amines and further improvement of activity by protein engineering. The enzyme was subjected to random mutagenesis, and library screening using a high-throughput method based on NADH fluorescence change. Several potential opine dehydrogenase transformants with increased activity or altered specificity relative to the wild-type enzyme were observed.

Keywords: chiral amines, amino steroids, transaminases, opine dehydrogenase, biocatalysis, immobilization, halophiles, metagenomics, protein engineering

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Lista skraćenica

AIBN	azobisisobutironitril
APS	amonijum persulfat
BAC	<i>eng.</i> bacterial artificial chromosome
BFP	Brom Fenol Plavo
CAA	<i>eng.</i> casamino acids (kazaminokiseline)
CBB	<i>eng.</i> Comasie Brilliant Blue
CENDH	N-(1-D-karboksietil)-L-norvalin dehidrogenaza
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamin tetrasirćetna kiselina
EGDMA	etilen - glikol - dimetakrilat
ESI	<i>eng.</i> electrospray ionization
FACS	<i>eng.</i> Fluorescence Activated Cell Sorting
Gal	galaktoza
GFP	<i>eng.</i> green fluorescent protein (zeleni fluorescentni protein)
Glc	glukoza
GMA	glicidil - metakrilat
HA	hemaglutinin
HEPES	<i>eng.</i> 4-(2-hidroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HL-60	<i>eng.</i> human leukemia-60
HSE	<i>eng.</i> heat-shock consensus elements
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
LB	Luria - Bertani
LncaP	<i>eng.</i> Lymph Node Carcinoma of the Prostate
NADH	<i>eng.</i> nicotinamide adenine dinucleotide (nikotinamid adenin dinukleotid)
NAD(P)H fosfat)	<i>eng.</i> nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat)
Ni-NTA	<i>eng.</i> Ni-nitrilotriacetic acid

NMR	nuklearna magnetna rezonanca
NOESY	<i>eng.</i> Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
MALDI-TOF	<i>eng.</i> matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MATa	<i>eng.</i> mating-type a
MBA	metilbenzil amin
α-MF	<i>eng.</i> α -mating factor
MMS-NF	<i>eng.</i> magnetic mesoporous silica nanoflowers
OpDH	oktopin dehidrogenaza
OVCAR-3	<i>eng.</i> human ovarian carcinoma
PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza
PBS	<i>eng.</i> phosphate buffered saline (puferisani fiziološki rastvor)
PCR	<i>eng.</i> polymerase chain reaction
PEG	polietilen glikol
PLP	<i>eng.</i> pyridoxal 5'-phosphate
PMP	<i>eng.</i> pyridoxamine phosphate
PVDF	poliviniliden difluorid
PVP	polivinilpirolidon
SDM	<i>eng.</i> site-directed mutagenesis
SDS	<i>eng.</i> sodium dodecil sulfat
TEMED	1,2 - bis(dimetilamino)etan
TFA	<i>eng.</i> trifluoroacetic acid
TLC	<i>eng.</i> thin-layer chromatography (hromatografija na tankom sloju)
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan
tRNK	transportna ribonukleinska kiselina
wt	<i>eng.</i> wild type
YNB	<i>eng.</i> yeast nitrogen base
YPD	<i>eng.</i> yeast peptone dextrose
YSD	<i>eng.</i> yeast surface display

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski deo	4
2.1. Enzimi kao biokatalizatori i strategije za dobijanje enzima sa poboljšanim karakteristikama	4
2.1.1. Enzimski kataliza	4
2.1.2. Strategije za dobijanje enzima željenih karakteristika	5
2.1.2.1. Izolovanje enzima iz ekstremofila	5
2.1.2.1.1. Enzimi poreklom iz halofila	6
2.1.2.2. Imobilizacija enzima	7
2.1.2.3. Proteinski inženjering	9
2.1.2.3.1. Dirigovana evolucija proteina	10
2.1.2.3.2. Racionalni dizajn	11
2.1.3. Metagenomika	11
2.2. Ekspresioni sistemi	13
2.2.1. <i>Escherichia coli</i> kao ekspresioni sistem	14
2.2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kao ekspresioni sistem	17
2.2.2.1. Prikaz proteina na površini ćelija kvasca	18
2.3. Hiralni amini	19
2.3.1. Amino steroidi	21
2.4. Transaminaze	23
2.4.1. Opšte strukturne karakteristike ArRMut11 i ω -transaminaze iz <i>Chromobacterium violaceum</i>	24
2.4.1.1. Opšte karakteristike ω -transaminaze ArRMut11	24
2.4.1.2. Opšte karakteristike ω -transaminaze iz <i>Chromobacterium violaceum</i>	25
2.4.2. Mehanizam reakcije katalizovane transaminazama	27
2.4.3. Enzimski eseji za visokoeфикасну pretragu novih varijanti transaminaza i određivanje supstratne specifičnosti	29
2.4.4. Značaj i upotreba omega transaminaza	30
2.4.4.1. Pristupi u sintezi posredovanoj ω -transaminazama, ograničenja i metode za prevazilaženje	30
2.4.4.2. Upotreba transaminaza divljeg soja i enzima modifikovanih primenom proteinskog inženjeringa	31
2.4.4.3. Uticaj imobilizacije na aktivnost i stabilnost transaminaza	33
2.4.4.4. Transaminaze izolovane iz ekstremofila	37
2.4.4.5. Transaminaze identifikovane metagenomskim pristupom	38
2.5. Opin dehidrogenaze	39
2.5.1. Opšte karakteristike i mehanizam opin dehidrogenaza	40

2.5.2. Značaj i upotreba opin dehidrogenaza	43
2.5.2.1. Proteinski inženjering opin dehidrogenaza	43
2.5.2.2. Opin dehidrogenaze identifikovane metagenomikom	44
3. Ciljevi	45
4. Materijal i metode	46
4.1. Materijal	46
4.1.1. Oprema	46
4.1.2. Reagensi i potrošni materijal	46
4.1.3. Izvor gena za ArRMut11, ω -transaminazu iz <i>Chromobacterium violaceum</i> i opin dehidrogenazu iz <i>Desulfohalobium retbaense</i>	47
4.1.4. Vektori i sojevi	47
4.2. Mikrobiološke metode	47
4.2.1. Medijumi za gajenje bakterija	47
4.2.1.1. Super optimalni tečni medijum za gajenje bakterija (SOC medijum)	47
4.2.1.2. Luria Bertani medijum (LB)	48
4.2.1.3. NZY Broth medijum	48
4.2.2. Medijumi za gajenje kvasaca	48
4.2.2.1. YPD medijum za gajenje kvasaca	48
4.2.2.2. 2xYPAD tečni medijum za gajenje kvasaca	48
4.2.2.3. Selektivni medijum za gajenje kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100	48
4.2.2.4. Tečni selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100	49
4.2.3. Priprema kompetentnih ćelija	49
4.2.3.1. Hemijski kompetentne ćelije bakterije <i>Escherichia coli</i>	49
4.2.3.2. Hemijski kompetentne ćelije kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soja	49
4.2.3.3. Transformacija kompetentnih ćelija <i>Escherichia coli</i>	49
4.2.3.4. Transformacija kompetentnih ćelija <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100	50
4.3. Molekularno-biološke metode	50
4.3.1. Kloniranje gena za ArRMut11 u pCTcon2 vektor	50
4.3.1.1. Umnožavanje gena za ArRMut11 PCR reakcijom	50
4.3.1.2. Dvostruka digestija umnoženog gena za ArRMut11 i pCTcon2 vektora restrikcijom enzimima	51
4.3.1.3. Defosforilacija pCTcon2 vektora	52
4.3.1.4. Ligacija dvostruko digestovanih proizvoda	52
4.3.1.5. Provera uspešnosti kloniranja restrikcijom	52
4.3.1.6. Provera uspešnosti kloniranja PCR reakcijom	53
4.3.2. Kreiranje mesto specifičnih mutanata ArRMut11 u pET29a vektoru	53
4.3.3. Kreiranje nasumično mutiranih biblioteka opin dehidrogenaze u pET22b vektoru	54

4.3.3.1. Uvođenje mutacija u gen za opin dehidrogenazu	54
4.3.3.2. Umnožavanje celog plazmida primenom mega prajmera	55
4.3.4. Prečišćavanje PCR proizvoda.....	55
4.3.5. Izolovanje plazmida iz bakterija	55
4.3.6. DNK elektroforeza na agaroznom gelu.....	56
4.4. Izolovanje i karakterizacija rastvorne i imobilizovane ArRMut11.....	56
4.4.1. Preparativne metode	56
4.4.1.1. Proizvodnja ArRMut11 u <i>Escherichia coli</i> (DE3) pLySs soju	56
4.4.1.2. Metal-afinitetna hromatografija ArRMut11	56
4.4.1.3. Imobilizacija ArRMut11	57
4.4.1.3.1. Sinteza nosača za imobilizaciju enzima	57
4.4.1.3.2. Imobilizacija enzima.....	57
4.4.1.4 Sinteza 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ola primenom ArRMut11.....	57
4.4.2. Analitičke metode	58
4.4.2.1. Određivanje supstratne specifičnosti ArRMut11 reverzno faznom hromatografijom...	58
4.4.2.2. Merenje enzimске aktivnosti ArRMut11	58
4.4.2.3. Određivanje koncentracije proteina	58
4.4.2.4. Tankoslojna hromatografija na silika gelu (TLC)	58
4.4.2.5. Denaturišuća poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	59
4.4.3. Karakterizacija rastvorne i imobilizovane ArRMut11.....	59
4.4.3.1. Određivanje pH optimuma	59
4.4.3.2. Određivanje temperaturne stabilnosti.....	59
4.4.3.3. Ispitivanje stabilnosti enzima u organskom rastvaraču.....	59
4.4.3.4. Određivanje temperaturne stabilnosti enzima u organskom rastvaraču	60
4.4.3.5. Određivanje stepena višestruke upotrebe imobilizovane ArRMut11 u sintezi 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ol	60
4.5. Proizvodnja ArRMut11 u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soju i merenje enzimске aktivnosti	60
4.6. Proizvodnja mesto-specifičnih mutanata ArRMut11 u <i>Escherichia coli</i> i određivanje enzimске aktivnosti	61
4.7. Proizvodnja Cv-2025 u <i>Escherichia coli</i> (DE3) pLySs soju	61
4.7.1. Preparativne metode	61
4.7.1.1. Proizvodnja Cv-2025 u <i>Escherichia coli</i> (DE3) pLySs soju.....	61
4.7.2. Analitičke metode	61
4.7.2.1. Merenje enzimске aktivnosti Cv-2025 i određivanje koncentracije proteina	61
4.8. Izolovanje i karakterizacija opin dehidrogenaze	62
4.8.1. Preparativne metode	62
4.8.1.1. Proizvodnja opin dehidrogenaze u <i>Escherichia coli</i>	62

4.8.1.2. Prečišćavanje opin dehidrogenaze	62
4.8.2. Analitičke metode	62
4.8.2.1. Merenje aktivnosti opin dehidrogenaze i određivanje koncentracije proteina	62
4.8.2.2. Određivanje supstratne specifičnosti enzima i kinetičkih parametara	63
4.8.2.3. Ispitivanje uticaja pH i koncentracije NaCl na enzimsku aktivnost	63
4.8.2.4. Ispitivanje uticaja pH, temperature i koncentracije NaCl na stabilnost enzima	63
4.8.2.5. Ispitivanje stabilnosti enzima u prisustvu organskog rastvarača	63
4.8.2.6. Dvodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza (2D PAGE)	64
4.8.2.7. Ispitivanje uticaja prisustva jona na enzimsku aktivnost	64
4.8.2.8. Ispitivanje uslova za skladištenje enzima	64
4.9. Razvoj fluorescentnog esaja za detekciju aktivnosti opin dehidrogenaze u mikrotitar ploči	64
4.9.1. Produkcija nasumičnih mutanata opin dehidrogenaze u mikrotitar ploči	64
4.9.2. Određivanje aktivnosti divljeg tipa opin dehidrogenaze merenjem fluorescencije NADH i skeniranje nasumičnih mutanata u mikrotitar ploči	65
5. Rezultati i diskusija	66
5.1. Heterologna ekspresija, prečišćavanje i skrining supstratne specifičnosti ω -transaminaze ArRMut11	66
5.1.1. Heterologna ekspresija ArRMut11 u <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLySs soju i prečišćavanje proteina afinitetnom hromatografijom	66
5.1.2. Skeniranje supstratne specifičnosti ArRMut11 ka steroidima	67
5.1.3. Sinteza i karakterizacija 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ola	68
5.2. Karakterizacija solubilnog i imobilizovanog enzima	71
5.2.1. Imobilizacija ArRMut11	71
5.2.2. Određivanje pH optimuma rastvorne i imobilizovane ArRMut11	72
5.2.3. Određivanje temperaturne stabilnosti rastvorne i imobilizovane ArRMut11	72
5.2.4. Ispitivanje stabilnosti rastvorne i imobilizovane ArRMut11 u organskom rastvaraču	73
5.2.5. Određivanje temperaturne stabilnosti rastvorne i imobilizovane ArRMut11 u organskom rastvaraču	74
5.2.6. Višestruka upotreba imobilizovane ArRMut11 u sintezi 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ola ..	75
5.3. Ekspresija ω -transaminaze ArRMut11 na površini ćelija <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 ...	76
5.3.1. Kloniranje ArRMut11 u pCTcon2 ekspresioni vector	76
5.3.2. Ekspresija ArRMut11 na površini ćelija kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100	79
5.4. Mesto-dirigovana evolucija proteina	79
5.4.1. Kreiranje mesto-dirigovanih mutanata ArRMut11 u pET29a vektoru	79
5.4.2. Ekspresija prirodnog oblika i mutiranih varijanti ArRMut11 u <i>Escherichia coli</i> i određivanje enzimске aktivnosti	80
5.5. Heterologna ekspresija ω -transaminaze iz <i>Chromobacterium violaceum</i> u <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLyS i detekcija enzimске aktivnosti	84

5.6. Heterologna ekspresija i karakterizacija pretpostavljene opin dehidrogenaze iz metagenomske sekvence <i>Desulfohalobium retbaense</i>	85
5.6.1. Heterologna ekspresija i prečišćavanje opin dehidrogenaze	85
5.6.2. Određivanje supstratne specifičnosti i kinetičkih parametara opin dehidrogenaze	86
5.6.3. Uticaj pH i rastuće koncentracije NaCl-a na enzimsku aktivnost	88
5.6.4. Uticaj pH, temperature i NaCl-a na stabilnost enzima	88
5.6.5. Stabilnost opin dehidrogenaze u organskom rastvaraču	90
5.6.6. 2D elektroforeza	91
5.6.7. Efekat prisustva jona na aktivnost enzima	92
5.6.8. Uslovi za skladištenje enzima	93
5.7. Razvoj fluorescentnog esaja za detekciju aktivnosti opin dehidrogenaze u mikrotitar ploči	93
5.7.1. Priprema nasumično mutiranih biblioteka gena opin dehidrogenaze	93
5.7.2. Ekspresija prirodnog oblika i nasumičnih mutanata opin dehidrogenaze u mikrotitar ploči i detekcija enzimске aktivnosti promenom fluorescencije NADH	95
6. Zaključci	97
7. Literatura	99
8. Prilog	112

1. Uvod

Enzimi su visoko efikasni biokatalizatori koji ubrzavaju biohemijske reakcije, a čiji se potencijal za primenu u industriji stalno istražuje i unapređuje zahvaljujući prednostima enzimima katalizovanih reakcija kao što su visoka katalitička efikasnost, enantio-, hemo i regioselektivnost, delovanje u blagim reakcionim uslovima, i niska toksičnost. Veća selektivnost i blaži uslovi reakcije omogućavaju sintetisanje proizvoda veće čistoće od proizvoda dobijenih primenom konvencionalnih postupaka hemijske sinteze. Za razliku od hemijske katalize koja podrazumeva upotrebu organskih rastvarača, enzimske reakcije obezbeđuju održivu sintezu jedinjenja u manjem broju koraka uz smanjenje štetnih efekata na životnu sredinu, čime se umanjuje potreba za sanacijom i odlaganjem otpada. Ove prednosti dovode do nižih troškova proizvodnje prilikom upotrebe enzima u hemijskim procesima. Smanjen utrošak energije, smanjenje stvaranja štetnih sporednih proizvoda i pojednostavljeni reakcioni uslovi i skraćeni putevi proizvodnje čine enzime primamljivim izborom za industrije koje su u potrazi za ekološki svesnim i ekonomski održivim rešenjima.^[1-5]

Razvoj rekombinantne DNK tehnologije izazvao je revoluciju u oblasti biotehnologije. Ranije je za izolovanje malih količina željenog proteina bilo potrebno iskoristiti kilograme životinjskog i biljnog tkiva ili velike zapremine bioloških tečnosti. Rekombinantna DNK tehnologija omogućila je proizvodnju i prečišćavanje željenih proteina u dovoljnim količinama potrebnim za karakterizaciju i upotrebu u komercijalne svrhe.^[6] Pored toga omogućena je i proizvodnja korisnih enzima poreklom iz patogena ili vrsta koje proizvode određene toksine u organizmima koji su bezbedni za zdravlje. Postoji veliki broj ekspresionih sistema, kao što su bakterije, kvasci, biljke, insekti i sisari, a izbor domaćina zavisi od potrebe za kvalitetom, prinosem, funkcionalnošću i brzinom proizvodnje željenih proteina. Kada su u pitanju enzimi za primenu u industriji bakterije proizvode oko 30%, dok više od polovine čine enzimi produkovani u kvascima i plesnima.^[7]

Upotreba enzima u industriji ograničena je nedovoljnom stabilnošću u primenjenim uslovima kao što su povišena temperatura, primena toksičnih organskih rastvarača i promene u protoku u sistemu u kom se odvija reakcija. Osim toga troškovi proizvodnje i prečišćavanja enzima predstavljaju jednu od mana s obzirom na to da je teško regenerisati aktivni enzim nakon industrijske primene da bi se omogućilo njegovo ponovno korišćenje. Upravo su stabilnost enzima i mogućnost višestruke upotrebe ključni faktori koji određuju primenu u industriji s obzirom na to da je cilj biokatalize, između ostalog, smanjenje troškova procesa proizvodnje.^[1, 2, 8]

Napredak u razvoju tehnika molekularnog kloniranja i usmerene evolucije omogućio je kreiranje velikog broja enzima i mikroorganizama sa povećanom stabilnošću u operativnim uslovima, povećanom aktivnošću ka određenom supstratu i promenama u selektivnosti.^[5] Racionalni dizajn se zasniva na upotrebi poznatih informacija o strukturi proteina i molekulskog modelovanja da bi se predvideo uticaj zamene određene aminokiseline na strukturu. Napredak u kompjuterskim tehnologijama pomogao je u kreiranju tačnijih modela proteina, ali odnos strukture i funkcije proteina i dalje predstavlja nepoznanicu. Dirigovana evolucija sa druge strane podrazumeva nasumično uvođenje mutacija čime se kreiraju velike biblioteke mutanata koje se nakon toga skeniraju za određenu osobinu i najbolje varijante se podvrgavaju daljim ciklusima evolucije. Danas se često upotrebljava semi-racionalni dizajn, koji podrazumeva kombinaciju ove dve metode.^[9]

Razvojem različitih tehnika imobilizacije enzima došlo je do poboljšanja produktivnosti, ekonomske efikasnosti i tehničkih performansi industrijskih procesa. Imobilizacijom enzima dobija se biokatalizator koji ima povećanu operativnu stabilnost sa mogućnošću višestruke upotrebe, smanjuje se šansa za kontaminaciju proizvoda reakcije, omogućava se lakša kontrola uslova reakcije, lakše odvajanje proizvoda reakcije i lakši razvoj reakcionih sistema koji zahtevaju upotrebu većeg broja enzima.^[1, 8, 10-12]

Pored laboratorijske evolucije, rešenja za povećanu stabilnost enzima možemo naći i u prirodnoj evoluciji, odnosno u proizvodnji enzima poreklom iz ekstremofila. Ovi organizmi su razvili različite mehanizme adaptacije na ekstremne uslove, pa njihovi produkti mogu biti dragoceni za primenu u biotehnologiji zbog njihove stabilnosti i aktivnosti u širokom opsegu reakcionih uslova kao što su povećana koncentracija soli, ekstremne vrednosti pH i temperature i prisustvo organskih rastvarača.^[13, 14]

Pomenuti načini stabilizacije enzima kao i napredak u tehnikama skeniranja divljih sojeva mikroorganizama, uporedo sa razumevanjem mehanizama rada enzima, doveli su do naglog porasta njihove primene u različitim granama industrije.^[1, 9, 15-18]

Jedna od njih je upravo farmaceutska industrija. Hiralni amini i amino-kiseline imaju važnu ulogu u farmaceutskoj, hemijskoj i agrohemijskoj industriji. Često se koriste kao prekursori za sintezu farmaceutski aktivnih sastojaka i agrohemikalija, ali i kao komponente za dobijanje hiralnih karboksilnih kiselina. Približno 40-45% kandidata za lekove sadrži amino funkcionalnu grupu, dok je analiza baze podataka Američke agencije za hranu i lekove pokazala da 84% odobrenih niskomolekularnih lekova (*engl.* small molecule drugs) sadrži bar jedan atom azota.^[12, 19, 20] S obzirom na to da kovencionalni načini sinteze hiralnih amina često uključuju upotrebu jona toksičnih prelaznih metala kao katalizatora, zaštitu funkcionalnih grupa, procedure koje uključuju sintezu u više koraka, kao i primenu oštih reakcionih uslova, prednost upotrebe biokatalizatora se ponajviše ogleda u tome što za razliku od hemijskih katalizatora obezbeđuju održivu proizvodnju hiralnih amina. U početku je proces enzimske sinteze hiralnih amina uključivao upotrebu hidrolaza, međutim tokom godina su se razvili putevi koji uključuju primenu drugih klasa enzima kao što su transaminaze, monoamino oksidaze, imin reduktaze i amino dehidrogenaze.^[19, 21-24]

Transaminaze su veoma raznovrsni biokatalizatori, čija je primarna uloga u prirodi transfer amino grupe sa α -aminokiseline na α -keto kiselinu, a njihova široka rasprostranjenost među različitim organizmima pokazuje vitalnu ulogu koju imaju u metabolizmu azota. Katalitička funkcija transaminaza omogućava njihovu primenu u sintezi optički aktivnih amina i aminokiselina putem transfera amino grupe sa donora na akceptor (aldehid ili keton) uz upotrebu kofaktora piridoksal-5'-fosfata (PLP). Dok α -transaminaze zahtevaju prisustvo karboksilne grupe u α položaju u odnosu na keto ili amino grupu, ω -transaminaze mogu prihvatiti niz različitih supstata, a nude visoku enantioselektivnost, unutrašnju regeneraciju kofaktora i iz tog razloga su korisnije za sintezu hiralnih amina.^[12, 21, 25] Sa ekonomske tačke gledišta i u pogledu očuvanja životne sredine transaminaze predstavljaju dobru alternativu za sintezu velikog broja (*R*) i (*S*)-prekursora farmaceutika ili biološki aktivnih jedinjenja kao što su sitagliptin (lek za dijabetes), vernakalant (antiaritmik), suvoreksant (za lečenje nesanice) i brojni drugi.^[5, 22, 26-28] Najveće ograničenje upotrebe transaminaza je to što mogu da se koriste samo za sintezu primarnih amina, što ih dovodi u nepovoljan položaj u odnosu na klase enzima čiji se potencijal za sintezu hiralnih amina još uvek istražuje, kao što su dehidrogenaze aminokiselina i imin reduktaze koje ne poseduju ovu vrstu ograničenja.^[22]

Opin dehidrogenaze pripadaju familiji proteina koji katalizuju reverzibilnu reduktivnu kondenzaciju α ili ω -amino funkcije α -aminokiseline sa α -keto kiselinom, u prisustvu NAD(P)H kao ko-supstrata, što rezultuje formiranjem N-(karboksialkil) aminokiselina (sekundarnih amina dikarboksilnih kiselina opinskog tipa).^[29-31] Ovi enzimi su jedinstvena i uglavnom neistražena klasa biokatalizatora koji vrše reduktivno aminovanje, a proizvodi reakcija koje katalizuju imaju različite strukturne i fiziološke uloge u prirodi. Organizmi koji sintetišu opine su tokom evolucije razvili specijalizovane opin dehidrogenaze, koje bez obzira na evolutivnu udaljenost i malu sličnost u sekvencama imaju slične strukturne i katalitičke karakteristike. Opin dehidrogenaze mogu biti dobra dopuna imin reduktazama i reduktivnim aminazama u oblasti sinteze hiralnih amina.^[32, 33] Potencijal za biotehnošku primenu opin dehidrogenaza pokazan je na primeru enzima poreklom iz

Arthrobacter sp. 1C (CENDH) upotrebom proteinskog inženjeringa za konstruisanje varijante enzima koja može da katalizuje sintezu sekundarnih i tercijernih amina korisnih u farmaceustkoj industriji kao što je antiaritmik vernakalant.^[33, 34]

Steroidi predstavljaju raznoliku klasu sekundarnih metabolita koji učestvuju u kontroli brojnih fizioloških procesa. S obzirom na fiziološke aktivnosti koje ispoljavaju imaju veliki potencijal kao farmaceutici, što potvrđuje i činjenica da su prirodni steroidi i njihovi derivati činili 13% od 200 najprodavanijih lekova u 2010. godini. Amino steroidi predstavljaju jedne od ključnih intermedijera u sintezi biološki aktivnih steroidnih jedinjenja.^[35] Potencijal za terapijsku primenu amino steroida je širok. Neka jedinjenja ispoljavaju antitumorsku,^[36] antiaritmiju^[37] i antimikrobnu^[38] aktivnost, dok su neka prekursori u sintezi antimalarika.^[39]

Glavni cilj ovog rada je bio dobijanje biokatalizatora pogodnih za sintezu amino derivata steroida i drugih sekundarnih amina.

U tu svrhu je prvo postavljena ekspresija, prečišćavanje, karakterizacija i imobilizacija rekombinantne transaminaze ArRMut11 iz *Arthrobacter sp.* i ω -transaminaze iz *Chromobacterium violaceum* eksprimiranih u *E. coli* i *S. cerevisiae* u cilju dobijanja biokatalizatora sa mogućnošću višestruke upotrebe u sintezi potencijalno fiziološki aktivnih amino derivata steroida sa što većim prinosom reakcije.

Drugi deo teze je obuhvatao razvoj biokatalizatora sa mogućnošću upotrebe za sintezu sekundarnih amina koji bi bio stabilan u prisustvu organskih rastvarača i pri povišenoj temperaturi, što predstavlja uslove koji se često primejuju u industrijskim sintezama. U tu svrhu opin dehidrogenaza iz halofilnog organizma *Desulfohalobium retbaense* proizvedena je u *E. coli*, prečišćena i okarakterisana. Dodatni cilj je bio i kreiranje biblioteka gena rekombinantne opin dehidrogenaze, kao i razvoj visokoefikasne metode pretraživanja dobijenih biblioteka gena fluorescentnim enzimskim esejem.

2. Teorijski deo

2.1. Enzimi kao biokatalizatori i strategije za dobijanje enzima sa poboljšanim karakteristikama

2.1.1. Enzimski kataliza

Enzimi su proteini koji katalizuju skoro sve reakcije koje se odigravaju u živim sistemima i imaju veliki potencijal za upotrebu u sintezi i degradaciji velikog broja jedinjenja.^[40] Sačinjeni su od uvijenih polipeptidnih lanaca aminokiselina, čiji redosled određuje trodimenzionalnu strukturu proteina na osnovu geometrije molekula i intramolekulskih interakcija. Raznolikost i funkcionalni diverzitet predstavljaju najvažnije karakteristike enzima koja je posledica razlika u osobinama funkcionalnih grupa bočnih ostataka aminokiselina, kao i razlika u mogućnostima za uvijanje polipeptidnog lanca.^[9] U prisustvu enzima brzina reakcije se povećava više od milion puta, čime se vreme odigravanja reakcija za koje su potrebne godine u odsustvu katalizatora skraćuje na delić sekunde.^[41] Prednosti enzimske u odnosu na hemijsku katalizu ogledaju se u tome što enzimi predstavljaju stereoselektivne, hemoselektivne, regioselektivne, biodegradabilne, netoksične makromolekule, koji katalizuju hemijske reakcije u relativno blagim uslovima pH, temperature i pritiska, bez potrebe za koracima aktivacije, zaštite i uklanjanja zaštite sa funkcionalnih grupa koji se rutinski koriste prilikom hemijske sinteze, smanjujući na ovaj način utrošak energije i formiranje neželjenih produkata.^[4, 40, 42] Izvrsna stereohemijska kontrola omogućava sintezu čistih enantiomera, povećavajući efikasnost proizvodnje i olakšavajući proces prečišćavanja, što je od izuzetnog značaja u razvoju lekova. Enzimi mogu da katalizuju kompleksne transformacije u jednom koraku čime se skraćuje vreme i troškovi proizvodnje, čineći ih ekonomičnim izborom u proizvodnji farmaceutika i drugih proizvoda.^[4] Od velikog značaja je i mogućnost adaptacije enzima da sa visokom aktivnošću i selektivnošću obavljaju reakcije koje ne obavljaju u prirodi na taj način omogućavajući proizvodnju širokog spektra jedinjenja, što ima veliki značaj u farmaceutskoj i drugim industrijama.^[4, 40] Na osnovu svih navedenih prednosti, enzimi su postali značajne alatke u različitim granama industrije kao što su farmaceutska, hemijska, tekstilna, industrija hrane i pića, industrija deterdženata i druge.^[1]

Potražnja za industrijskim enzimima stalno raste. U 2021. godini globalno tržište enzima bilo je procenjeno na 6,4 milijarde dolara, a predviđa se da će uz kombinovanu godišnju stopu rasta od 6,3% dostići 8,7 milijardi dolara u 2026. godini.^[13]

Prilikom proizvodnje, skladištenja i primene u industriji enzimi podležu denaturaciji, što podrazumeva narušavanje tercijerne strukture na takav način da ključni aminokiselinski ostaci nisu više dovoljno blizu da bi ostvarivali interakcije koje stabilizuju strukturu ili su ključne za obavljanje funkcije. Čak i male konformacione promene nastale usled promene spoljašnjih uslova mogu za posledicu da imaju gubitak aktivnosti ili agregaciju proteina.^[9] Uslovi u kojima se odigravaju reakcije u industriji razlikuju se od prirodnog okruženja u kom enzimi obavljaju svoju funkciju, i često podrazumevaju primenu visokih temperatura, pritisaka, ekstremnih pH vrednosti, prisustvo organskih rastvarača i inhibitora.^[40, 43] Upotreba jonskih ili amfoternih surfaktanata, izbeljivača, oksidujućih agenasa, stabilizatora, jonskih tečnosti, alkalija, organskih rastvarača i ultrazvučnih talasa u industriji dovela je do novih izazova prilikom upotrebe enzima u biotehnologiji.^[44] Dodatak organskih rastvarača u reakciji često je neophodan zbog niske rastvorljivosti hidrofobnih supstrata u vodenoj sredini, prevazilaženja sporednih reakcija koje se dešavaju u vodi i pomeranje termodinamičke ravnoteže ka sintezi u odnosu na hidrolizu.^[44, 45] Uzimajući u obzir sve navedeno, može se zaključiti da bez obzira na prednosti upotrebe biokatalizatora u odnosu na hemijsku sintezu, za uspešnu primenu enzima na industrijskom nivou neophodno je proces katalize učiniti isplativim, što zahteva upotrebu

enzima visoke aktivnosti, specifičnosti i stabilnosti, koji bi doveo do poboljšanja procesa proizvodnje pri primenjenim uslovima uz smanjenje troškova.^[43] Pored toga idealni biokatalizator bi trebalo da bude efikasan i da omogući proizvodnju ciljanog jedinjenja u što kraćem vremenskom roku uz nastanak malo ili nimalo sporednih produkata i uz minimalnu inhibiciju enzima nastalim proizvodom.^[13]

2.1.2. Strategije za dobijanje enzima željenih karakteristika

Strategije za dobijanje biokatalizatora stabilnih u nekonvencionalnim reakcionim uslovima i medijumima mogu se podeliti u 3 kategorije:

1. Izolovanje enzima koji mogu da deluju pri ekstremnim uslovima.
2. Modifikovanje strukture enzima da bi se povećala njihova stabilnost i aktivnost.
3. Modifikovanje okruženja u kom se reakcija odigrava da bi se smanjio denaturišući efekat na enzim.^[45]

2.1.2.1. Izolovanje enzima iz ekstremofila

Mikroorganizmi koji mogu da opstanu u ekstremnim uslovima (prežive i umnožavaju se), kao što su staništa sa visokom koncentracijom soli, ekstremne pH sredine, niske ili visoke temperature, predstavljaju važan izvor industrijski značajnih enzima.^[45] Populacije mikroorganizama koje mogu da žive i da se reprodukuju u ovim staništima se nazivaju ekstremofili i njihove osobine se ispituju širom sveta s obzirom na to da proizvode enzime koji mogu da obavljaju funkciju u ekstremnim uslovima i kao takvi potencijalno nalaze primenu u biotehnologiji i industriji.^[14] Ekstremofilni mikroorganizmi su izvor ekstremozima sa širokom industrijskom upotrebom zbog njihove biorazgradivosti i visoke stabilnosti.^[46] Sa antropogene tačke gledišta uslovi u kojima ekstremofili preživljavaju i napreduju smatraju se neprijateljskim. Ekstremna staništa mogu biti prirodna, kao što su slana jezera, hidrotermalni izvori, vulkani, pustinje i okeani ili veštačka kao što su operacione sale i svemirske letelice.^[13] Ovi organizmi su tokom evolucije razvili različite mehanizme adaptacije na ekstremne uslove, a u odnosu na prirodu staništa mogu se klasifikovati kao halofili, alkalofili, termofili, acidofili, psihrofili, barofili i drugi.^[9, 13] Adaptacija na ekstremne uslove rezultovala je proizvodnjom enzima sa jedinstvenih karakteristika koje ih čine superiornim u odnosu na enzime poreklom iz mezofila.^[9] Raznovrsnost ekstremofila i ekstremnih uslova otvara mogućnost za pronalaženje biokatalizatora koji sa većom efikasnošću može da izdrži teške industrijske uslove. Ekstremozimi mogu biti poliekstremofilni, odnosno aktivni i stabilni u višestruko ekstremnim uslovima kao što su visoka temperatura, visoka koncentracija soli i alkalno pH, zatim visok salinitet i niske temperature, ili visoka temperatura i ekstremne pH vrednosti.^[13] U industrijskim procesima koji istovremeno zahtevaju visoke koncentracije soli i prisustvo hidrofobnih rastvarača mogu se koristiti ekstracelularni halofilni enzimi visoke tolerancije na organske rastvarače. Prilikom proizvodnje ekstremozima često se primenjuje kloniranje gena iz ekstremofila u odgovarajući mezofilni organizam, s obzirom na poteškoće u izolovanju ekstremofila.^[45] Jedan od pristupa koji se uspešno primenjuje prilikom identifikacije novih biokatalizatora poreklom iz ekstremofila jeste metagenomika. Lipaze i esteraze tolerantne na organske rastvarače poreklom iz zemljišta i morskih staništa su neki od primera ekstremozima izolovanih primenom metagenomike.^[47, 48]

Ekstremozimi imaju široku primenu u brojnim sferama, kao što su molekularna biologija i genetički inženjering (primena DNK polimeraza poreklom iz termofilnih organizama),^[49, 50] enzimsko procesovanje skroba (primena termostabilnih α -amilaza, pulanaza, glukoamilaza i ksilanaza),^[51] proizvodnja papira (primena termostabilnih ksilanaza, kao što su na primer endo-1,4-beta ksilanaze iz *Thermotoga maritima* i *Geobacillus stearothermophilus*),^[13] razdvajanje alkohola i amina tokom sinteze blokatora kanala za jone kalcijuma (lipaza B iz *Candida antarctica*),^[52] reakcije

esterifikacije prilikom proizvodnje finih hemikalija i optički čistih jedinjenja (Novozim 435),^[53] u molekularnoj biologiji za uklanjanje proteina koji onečišćavaju preparate DNK i RNK (proteaze poreklom iz psihrofila),^[54] prilikom konstruisanja mikrobnih gorivnih ćelija za proizvodnju bioelektrične energije i bioremedijaciju otpadnih voda (acidofilne bakterije koje oksiduju gvožđe),^[55] obrada kože (alkalne proteaze)^[57] i brojne druge (slika 1).



Slika 1. Ekstremozimi i njihove potencijalne primene. Slika je preuzeta iz reference [13].

2.1.2.1.1. Enzimi poreklom iz halofila

Halofilni mikroorganizmi mogu da opstanu u širokom rasponu koncentracija soli i predstavljaju potencijalan izvor ekstremozima (halozima), kao što su proteaze, amilaze, nukleaze, lipaze, celulaze, ksilanaze i drugi. Ekstremozimi izolovani iz halofila su sposobni da funkcionišu pri visokim koncentracijama soli, u širokom opsegu pH i na temperaturama pri kojima najčešće dolazi do taloženja ili denaturacije drugih proteina.^[58] Enzimi poreklom iz halofila najčešće najveću aktivnost ispoljavaju pri koncentracijama jona natrijuma većim od 1,5 M, pri čemu je izvor jona natrijuma uglavnom NaCl, a mnogi halofilni enzimi mogu tolerisati i molarne koncentracije jona kalijuma.^[13] Halozimi imaju identične enzimске karakteristike kao i njihovi nehalofilni dvojници, s tim što pokazuju značajne razlike u strukturnim karakteristikama koje im omogućavaju da funkcionišu u teškim uslovima.^[58] Strukturne adaptacije na visok salinitet uključuju veću zastupljenost kiselih aminokiselina na površini enzima (aspartat i glutamat), nizak sadržaj ostataka lizina, relativno nizak sadržaj hidrofobnih ostataka izloženih rastvaraču kao i u unutrašnjosti proteina, i više sonih mostova. Između karboksilnih grupa kiselih aminokiselina na površini proteina i molekula vode formiraju se vodonične veze koje održavaju protein rastvorljivim u uslovima dehidratacije izazvanim visokim koncentracijama soli. Ovaj adaptivni mehanizam halofila je kritičan za održavanje stabilne hidratacione ljuske.^[13, 44, 58-60] Halofilni proteini sadrže i relativno visok udeo serina i treonina, kao i manjih hidrofobnih aminokiselina kao što su alanin, glicin i valin.^[44] Strukturne karakteristike halofilnih proteina su u korelaciji sa niskom izoelektičnom tačkom.^[13, 44]

Halozimi primenu nalaze u enzimskim transformacijama koje zahtevaju prisustvo organskih rastvarača, visokih koncentracija soli i ekstremnih temperatura.^[58] U principu u prisustvu organskih

rastvarača dolazi do uklanjanja esencijalnog sloja vode sa površine proteina i posledično do njegove denaturacije.^[44] S obzirom na to da je količina vode u prisustvu visokih koncentracija soli ograničena, ovi uslovi imitiraju mešavinu vodenog-organskih rastvarača omogućavajući halozimima da zadrže aktivnost u organskim medijumima što ih čini potencijalno korisnim biokatalizatorima.^[44, 60] Prednost enzima koji su otporni na organske rastvarače ogleda se u tome što ne zahtevaju posebne metode stabilizacije kao što su imobilizacija, hemijska modifikacija i hvatanje enzima u obrnute micele.^[44]

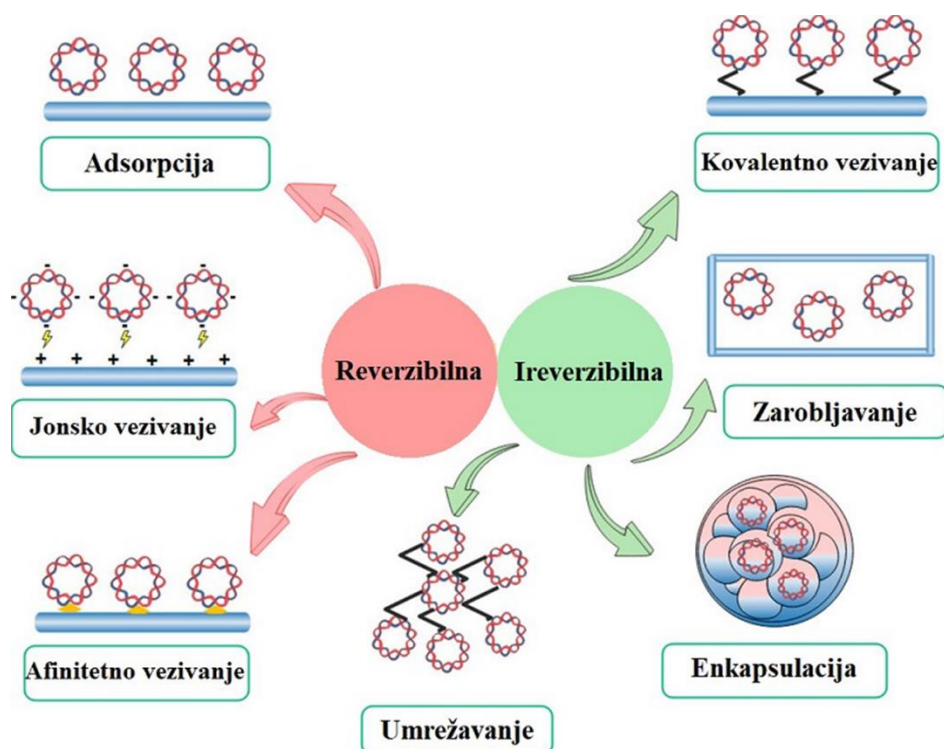
Halofilni enzimi imaju veliki potencijal za upotrebu u različitim biotehnološkim i industrijskim procesima, kao što su farmaceutska i hemijska industrija, industrija hrane, tekstila, deterdženata, kože, papira i celuloze, tretman otpadnih voda i proizvodnja biogoriva.^[61-69]

2.1.2.2. Imobilizacija enzima

Imobilizacija je proces u kom se enzimi fiksiraju za/ili u različitim tipovima nosača koji dovode do stabilizacije njihove strukture čime im se održava aktivnost tokom primene.^[9, 70] Prednosti enzimske imobilizacije ogledaju se u stabilizaciji strukture, omogućavanju višestruke upotrebe, poboljšanoj kontroli procesa, lakom odvajanju proizvoda reakcije i razvoju multienzimskih sistema,^[8, 71] a uz to je bezbedna za upotrebu, ekološki prihvatljiva i isplativa.^[71] Stabilizacija strukture enzima je posledica rigidnije konformacije koju enzim zauzima u imobilizovanoj formi.^[45] Jednostavno uklanjanje enzima iz reakcione smeše i mogućnost višestruke upotrebe dovode do smanjenja troškova procesa.^[41, 45] Ipak, imobilizacijom enzima može doći do konformacione promene, denaturacije, smanjenja aktivnosti, ograničenog prenosa mase i smanjene efikasnosti kada se koriste slabo rastvorni supstrati.^[71] Pored navedenog, prednost upotrebe imobilizovanih enzima ogleda se i u mogućnosti korišćena biokatalizatora u protočnom reaktoru, čime se smanjuje mogućnost inhibicije proizvodom i omogućava kontinuirano uklanjanje proizvoda iz reakcione smeše.^[72, 73]

Kao nosači u imobilizaciji proteina se najčešće upotrebljavaju inertni polimeri i neorganski materijali. Pored toga što određeni nosač treba da bude pristupačne cene, on treba da poseduje i druge osobine koje uključuju inertnost, stabilnost, fizičku jačinu, mogućnost regeneracije, sposobnost smanjenja mikrobiološke kontaminacije, inhibicije enzima proizvodom i nespecifičnog vezivanja. Za imobilizaciju se koristi nekoliko tehnika: adsorpcija, kovalentno vezivanje, zarobljavanje i umrežavanje (slika 2). Odgovarajuća procedura za određeni enzim podrazumeva da dobijeni imobilizat ima visoku stopu konverzije supstrata, uz zadržavanje katalitičke aktivnosti i stabilnosti tokom vremena.^[9, 74]

Metode imobilizacije se dele na fizičke i hemijske, pri čemu se fizičke metode karakterišu ostvarivanjem nekovalentnih interakcija kao što su vodonične veze, Van der Valsove sile, hidrofobne interakcije, afinitetno ili jonsko vezivanje sa nosačem ili mehaničkim zadržavanjem enzima unutar nosača. Kada su u pitanju hemijske metode one uključuju formiranje kovalentnih veza (etarskih, tioetarskih, amidnih ili karbamatnih) između enzima i nosača.^[41]



Slika 2. Prikaz najzastupljenijih metoda imobilizacije. Slika je preuzeta iz reference [70].

Jedna od najčešće korišćenih metoda je kovalentna imobilizacija, koja podrazumeva formiranje stabilnih veza između funkcionalnih grupa enzima i matrice nosača. Kovalentno vezivanje se postiže u dve faze, a to su aktivacija matriksa uz dodatak reaktivnih molekula kao što su glutaraldehyd ili karbodiimid i zatim kovalentno povezivanje enzima sa aktiviranom podlogom.^[2, 8] Kao nosači se najčešće koriste hidrofilni polisaharidni polimeri.^[70] Nekoliko funkcionalnih grupa aminokiselina je pogodno za upotrebu u ovom pristupu, kao što su karboksilna grupa asparaginske kiseline, hidroksilna grupa treonina, amino grupa arginina i sulfhidrilna grupa tiola, kao i imidazolna i indol grupa.^[2, 8, 70, 74] Grupa na enzimu preko koje se uspostavlja kovalenta veza sa nosačem ne bi smela da bude od značaja za enzimsku funkciju.^[2, 8] Prednost kovalentnog vezivanja je u tome što se proizvode stabilni enzimski preparati, veće specifične aktivnosti, koji se mogu lako regenerisati za ponovnu upotrebu, uz malu verovatnoću curenja enzima. Ograničenja kovalentne imobilizacije su dužina trajanja procesa, uglavnom mala količina enzima koja se vezuje za nosač, može doći do ograničene pokretljivosti enzima, što može uticati na potrebne konformacione promene prilikom katalize i dovesti do smanjenja aktivnosti, kao i moguća denaturacija ukoliko je potrebno dodatno modifikovati enzim da bi se ostvarilo kovalentno vezivanje.^[70]

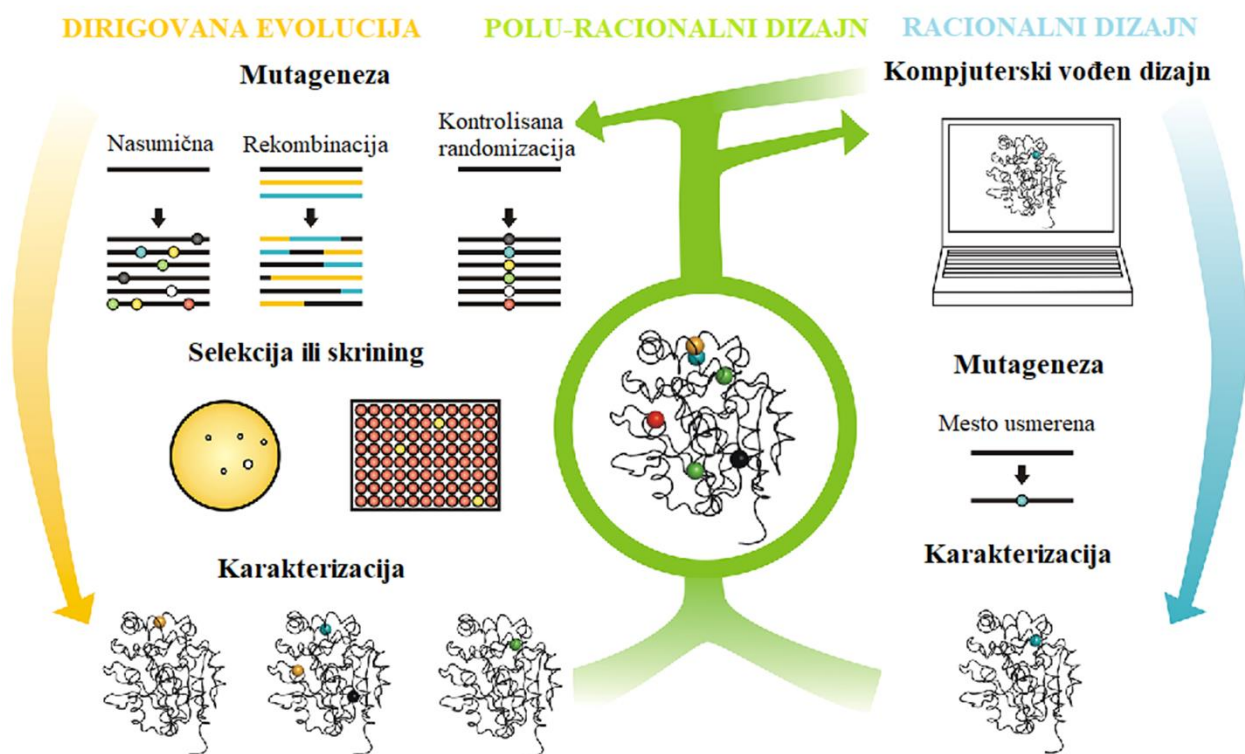
Jedan od najpoznatijih primera upotrebe imobilizovanih enzima je primena lipaze B iz *Candida antarctica* (Novozim 435), imobilizovane na Levatit jonoizmenjivačkoj smoli za industrijsku sintezu poliol akrilata, metoda razvijena od strane kompanije BASF. Tehnologija uključuje reakciju koja se odvija u čistom organskom rastvaraču.^[75] Pfizer je patentirao sintezu enantiomerno obogaćenog 3-aminopentan nitrila koristeći različite imobilizovane komercijalno dostupne lipaze.^[76] Alkalna proteaza imobilizovana na mezoporoznom zeolitu upotrebljena je za proizvodnju sira u kratkom periodu (90 minuta). Nakon 16 dana skladištenja enzim je zadržao 74% aktivnosti, za razliku od slobodnog enzima koji je zadržao 50% aktivnosti.^[77] Proteaza imobilizovana umrežavanjem sa hitozanom iskorišćena je za eliminisanje glutena u pivu. Imobilizacijom je postignuto da se sadržaj glutena u pivu redukuje sa 65 mg/kg na 15 mg/kg.^[78] Imobilizacija enzima koji se dodaju formulacijama deterdženata poboljšava efikasnost čišćenja, čuva katalitičku aktivnost enzima i ne

oštećuje tkanine na bazi vune. Proteaze hidrolizuju prirodna proteinska vlakna (npr. svilu i vunene keratine), što dovodi do nepovratnih oštećenja kvaliteta odeće.^[79] Proteaza kovalentno imobilizovana sa Eudragitom nije pokazala oštećenja vlakana vune.^[80] Imobilizovana inulinaza koristi se za transformaciju inulina u visoko fruktozni sirup.^[81] Glukoza oksidaza se upotrebljava u izradi biosenzora za merenje koncentracije glukoze.^[82] Imobilizovani enzimi našli su primenu i u brojnim drugim oblastima.^[41, 70]

2.1.2.3. Proteinski inženjering

Napredak u tehnologiji rekombinantne DNK, metodama selekcije mutanata, genomici i proteomici podstakao je razvoj novih biokatalizatora i biokatalitičkih procesa.^[71] Kao što je već bilo reči, za razliku od ekstremozima većina enzima je evoluirala da obavlja funkciju u određenom opsegu uslova koji postoje kod mezofilnih kopnenih organizama. Da bi se prevazišla ova ograničenja mogu se upotrebiti metode proteinskog inženjeringa sa ciljem da se od divljeg tipa enzima napravi enzim određenih karakteristika.^[45] Dizajn proteina uključuje kreiranje ili modifikaciju proteina da bi se poboljšala njihova aktivnost, specifičnost ka supstratu, stabilnost i druga svojstva za različite biokatalitičke primene.^[4] Ovo uključuje optimizaciju hemo-, regio-, i naročito stereoselektivnosti biokatalizatora, kao i osobina vezanih za uslove u kojima se odigrava proces, kao što je stabilnost na određenim temperaturama, pH vrednostima, u prisustvu visoke koncentracije supstrata i organskih rastvarača.^[71]

Dva osnovna pristupa u proteinskom inženjeringu podrazumevaju racionalni dizajn i dirigovanu evoluciju, a često se koristi kombinovanje ova dva pristupa u polu-racionalnom dizajnu (slika 3).^[43] Izbor metode zavisi od dostupnih informacija o strukturi, koju osobinu želimo da menjamo kao i od dostupnosti sistema za visoko efikasnu pretragu mutiranih proteinskih varijanti.^[71]

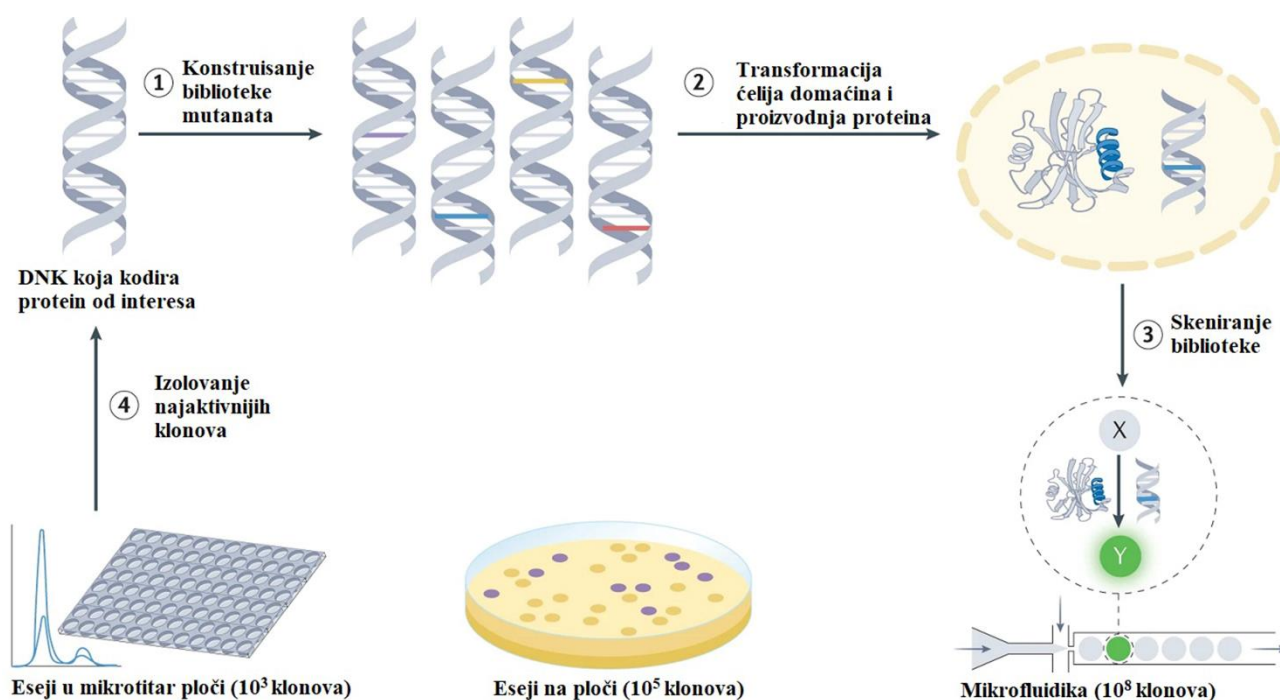


Slika 3. Pristupi u proteinskom inženjeringu. Slika je preuzeta iz reference [45].

Dok je za racionalni dizajn potrebno detaljno razumevanje odnosa strukture i funkcije proteina, pri čemu informacije o strukturi proteina nisu uvek dostupne, dirigovana evolucija zahteva razvoj visokoefikasnih metoda pretrage mutiranih varijanti što ne predstavlja uvek lak zadatak.^[43] Da bi se kreirala željena varijanta enzima za upotrebu u određenom procesu najčešće je potrebno modifikovati i aktivnost i stabilnost^[45] pa je samim tim uobičajeno koristiti više tehnika mutageneze tokom evolucije enzima za ciljanje različitih regiona strukture proteina.^[83]

2.1.2.3.1. Dirigovana evolucija proteina

Usmerena evolucija oponaša prirodnu selekciju u laboratorijskim uslovima, omogućavajući stvaranje varijanti enzima sa poboljšanim osobinama kroz kontrolisane mutacije i procese selekcije.^[4] Na ovaj način se kreira velika molekularna raznovrsnost na nivou nukleinske kiseline i pomoću funkcionalnog testa se identifikuju pozitivne varijante u biblioteci mutiranih gena.^[45] U poređenju sa racionalnim dizajnom, usmerena evolucija dozvoljava relativno brzu modifikaciju enzima i ne zahteva detaljnije informacije o odnosima strukture i funkcije.^[84] Strategija usmerene evolucije razvijena je početkom 1990-ih godina i sastoji se od ponavljajućih ciklusa kreiranja biblioteke korišćenjem tehnika nasumične mutageneze, uključujući PCR sklon greškama koji koristi DNK polimeraze niske vernosti, DNK „shuffling” i mutagenezu zasićenja specifičnu za lokaciju.^[40] Uvođenje nasumičnih mutacija se postiže stvaranjem niza tačkastih mutacija počevši od roditeljske sekvence i transformacijom nastale genomske biblioteke u ćeliju domaćina da bi se poboljšani enzim prekomerno ekspimirao. Nastali mutanti koji nose izabrani atribut se prepoznaju korišćenjem odgovarajuće metode skrininga (slika 4).^[84]



Slika 4. Koraci u dirigovanoj evoluciji proteina. Slika je preuzeta iz reference [83].

Prilikom konstruisanja manjih više fokusiranih biblioteka često se primenjuju računarsko modelovanje i bioinformatički alati da bi se odabrali aminokiselinski ostaci za mutagenezu. Ove biblioteke se generišu korišćenjem tehnika kao što je mutageneza zasićenja. Kada se konstruišu biblioteke veće raznolikosti koriste se tehnike poput PCR-a sklonog greškama ili DNK „shuffling”. Transformacija ćelija dovodi do prostornog razdvajanja članova biblioteke i uspostavlja vezu između genotipa i fenotipa, koja se mora održavati tokom proizvodnje proteina i skrininga da bi se omogućila

karakterizacija pojedinačnih članova. Za skeniranje velikih biblioteka, mogu se koristiti testovi zasnovani na kolonijama (tzv. agar plate esaji), sortiranje ćelija aktivirano fluorescencijom, ćelijski displej, mikrofluidika, metode zasnovane na selekciji i pretraga u mikrotitar pločama.^[83]

2.1.2.3.2. Racionalni dizajn

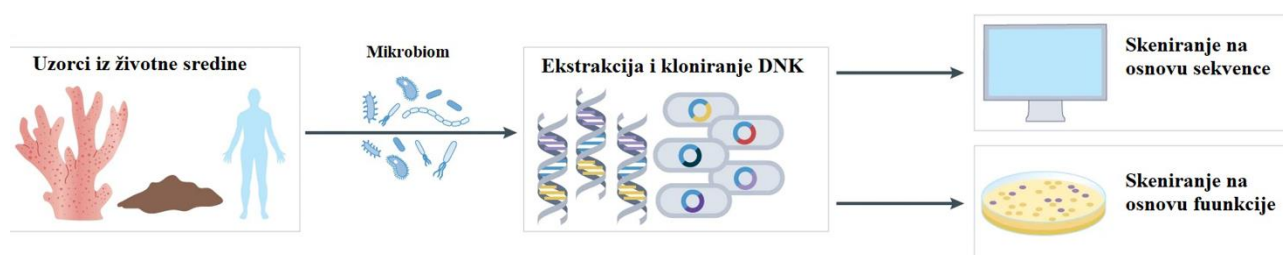
Tehniku mutageneze DNK usmerene na mesto (SDM) razvio je Majkl Smit 1978. godine.^[40] Racionalni dizajn podrazumeva razumevanje odnosa između strukture i funkcije proteina, a uključuje konstruisanje i karakterizaciju malog broja mutanata.^[45] Ova metoda omogućava preciznu modifikaciju za ciljanu primenu.^[4] Na osnovu strukturnih karakteristika u protein se uvode kontrolisane promene važne za ispitivanje uticaja pojedinačnih aminokiselina na strukturu, uvijanje, stabilnost i funkciju proteina.^[43] Metode koje se primenjuju za odabir aminokiselinskih ostataka za mutagenezu uključuju ispitivanje strukture enzima, poravnanje sekvenci i upotrebu računarskih alata.^[84] S obzirom na to da racionalni dizajn počiva na poznavanju trodimenzionalne strukture proteina, tehnologije kao što su rendgenska kristalografija, nuklearna magnetna rezonanca ili kriogena elektronska mikroskopija su važne za pružanje uvida u konformaciju, strukturu aktivnog mesta i supstrat vezujuće regione enzima.^[4] Višestruko poravnanje sekvenci i filogenetska analiza homologih proteina su značajni za proučavanje ostataka aminokiselina i susptitucija koje bi bile korisne za povećanje efikasnosti vezivanja supstrata i biokatalizu. Da bi se uvele mutacije u protein sintetišu se kratki degenerisani oligonukleotidni prajmeri za ciljani aminokiselinski ostatak nakon čega se gen umnožava i uvodi u ekspresioni vektor da bi se omogućila sinteza željenog mutanta.^[84] Racionalni dizajn se često fokusira na aktivno mesto da bi se optimizovala njegova geometrija, afinitet vezivanja prema supstratu ili promenila specifičnost ka supstratu. Računarsko modelovanje enzima pri tome predstavlja dragoceno sredstvo za razjašnjavanje reakcionih mehanizama i predviđanja uticaja strukturnih promena na funkciju. Među ovim alatima, simulacije molekulske dinamike (MD) i proračuni energije vezivanja pružaju informacije o dinamičkom ponašanju enzima, uključujući konformacione promene, fleksibilnost i simulaciju interakcija između enzima i supstrata u realnom okruženju. Upotreba navedenih tehnika olakšava dizajn novih enzima ili modifikaciju postojećih enzima za različite primene u industriji.^[4]

Enzimi kreirani upotrebom proteinskog inženjeringa imaju široku primenu, a neke od njih uključuju upotrebu hidantoinaze iz *Arthrobacter sp.* modifikovane saturacionom mutagenezom u proizvodnji L-metionina,^[85] upotrebu ciklodekstrin glukanotransferaze iz *Bacillus stearothermophilus ET1* modifikovane primenom racionalnog dizajna u proizvodnji hleba,^[86] ksiloza izomeraze iz *Thermotoga neapolitana* modifikovane primenom slučajne mutageneze u proizvodnji fruktoznog sirupa,^[87] proteaze BYA iz *Bacillus sp.* Y modifikovane primenom racionalnog dizajna u formulaciji deterdženata^[88] i brojne druge.^[1, 71, 84]

2.1.3. Metagenomika

Eksploatacija prirodne mikrobne raznolikosti za identifikaciju i izolaciju novih enzima je trenutno izuzetno aktivno polje u istraživanjima koje omogućava genomsku analizu mikrobnih zajednica na način nezavisan od kulture.^[3] Prokariotski mikroorganizmi poseduju izuzetnu metaboličku, fiziološku i funkcionalnu raznovrsnost i predstavljaju najbogatiji izvor genetske raznovrsnosti.^[89] Procenjeno je da se više od 99% mikroorganizama iz prirodnog okruženja ne može efikasno uzgajati u laboratorijskim uslovima usled poteškoća u obogaćivanju ili izolovanju čiste kulture. Metagenomika je tehnologija koja zaobilazi potrebu za izolovanjem ili uzgojem mikroorganizama.^[89, 90] Ona predstavlja naprednu metodologiju, koja se pojavila kasnih 1990-ih, a podrazumeva ekstrakciju svih mikrobnih genomskih DNK u određenom ekološkom staništu, nakon čega sledi konstruisanje metagenomskih biblioteka i skrining za traženje novih funkcionalnih gena i/ili biološki aktivnih jedinjenja.^[91] Upotrebom metagenomike za identifikaciju potentnih biokatalizatora iz

prirodnih izvora, novoidentifikovani enzimi mogu poslužiti kao idealna polazna tačka za dalja poboljšanja primenom tehnika usmerene evolucije.^[3] Skeniranje metagenomske biblioteke zasnovano na funkciji i sekvenci su dve osnovne metode koje metagenomska tehnologija koristi prilikom identifikacije biomolekula iz materijala dobijenog iz životne sredine. Metagenomske biblioteke se kreiraju kloniranjem fragmenata genomske DNK u odgovarajuće ekspresione vektore, kao što su plazmidi, kozmidi, lambda fagi ili fosmidi (u zavisnosti od predviđene veličine ciljnog gena) i koriste za transformaciju domaćina koji omogućava ekspresiju neophodnih gena (slika 5).^[3, 89, 92]



Slika 5. pristupi u skeniranju metagenomskih biblioteka. Prvi korak podrazumeva ekstrakciju ukupne DNK uzorka iz životne sredine. Izolovana DNK zatim služi za konstruisanje metagenomske biblioteke, koja se potom skenira primenom metoda zasnovanih na sekvenci ili na funkciji proteina. Slika je preuzeta iz reference [83].

Strategije za pristup novim biokatalizatorima iz metagenoma uključuju: predtretman željenog gena, ekstrakciju nukleinske kiseline, izbor vektora i sistema domaćina i skrining metagenomske biblioteke.^[91]

Predtretman uzoraka uključuje neobogaćivanje ili obogaćivanje genima od interesa. U većini eksperimentalnih istraživanja koristi se metoda neobogaćivanja zbog njihove poboljšane sposobnosti da održe raznovrsnost mikrobnih zajednica, dok metode obogaćivanja poboljšavaju specifičnost izolovane genomske DNK uzorka.^[91]

Najveći izazov predstavlja ekstrakcija DNK visokog kvaliteta iz uzoraka životne sredine, koji su često kontaminirani huminskom kiselinom, inhibitorom procedura kloniranja kada je prisutna na nivoima iznad 1 ng. U mnogim slučajevima ukupna DNK ekstrahovana iz uzoraka životne sredine ne sadrži čak ni reprezentaciju genoma populacije, s obzirom na to da bibliotekom dominiraju najzastupljeniji organizmi. Ovo zahteva prilagođavanje metoda ekstrakcije DNK i strategija kloniranja.^[3] U principu se primenjuju dve vrste ekstrakcije, na osnovu veličine gena i metode skrininga, a to su direktna i indirektna ekstrakcija. Direktna ekstrakcija podrazumeva upotrebu deterdženata, enzima, fenola i hloroforma, pri čemu se dobijaju manji fragmenti DNK sa većim sadržajem nečistoća i nepogodna je za konstruisanje biblioteka velikih genskih klastera. Indirektna ekstrakcija, sa druge strane podrazumeva ekstrakciju lizom bez primene jake mehaničke sile čime se dobijaju veći fragmenti DNK.^[91]

Izbor vektorskih sistema zavisi od kvaliteta ekstrahovanih uzoraka DNK i ciljeva istraživanja, koji zahtevaju razmatranje veličine fragmenata umetanja, potrebnog broja kopija vektora, korišćenog domaćina i metode skrininga. Plazmidi, bakterijski veštački hromozomi (BAC), kozmidi i fosmidi su primeri često korišćenih vektora.^[91]

E. coli se najčešće koristi za skrining metagenomskih biblioteka, iako u mnogim slučajevima mašinerija za transkripciju i translaciju gena kod *E. coli* nije kompatibilna sa ekspresijom gena izolovanih iz mikroorganizama iz životne sredine.^[3, 91]

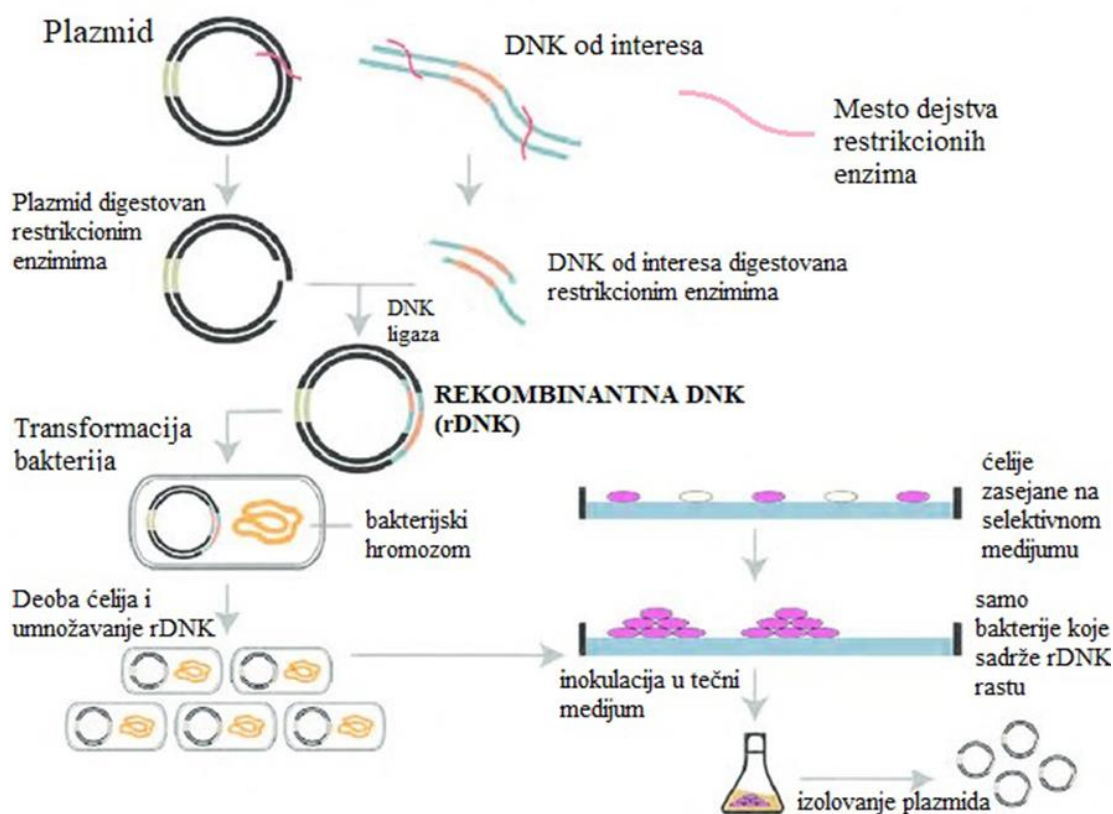
Skeniranje zasnovano na sekvenci je široko korišćena strategija za analizu metagenomskih biblioteka. Ova tehnika podrazumeva skeniranje metagenomskih klonova upotrebom oligonukleotidnih prajmera ili genskih proba korišćenjem tehnike hibridizacije ili umnožavanja PCR-om i kloniranja u odgovarajući ekspresioni vektor.^[89] Međutim, pomenuta strategija ograničena je na izolovanje novih članova iz poznate porodice gena ili gena koji sadrže visoko konzerviran region, pošto je potrebno razumevanje genskih sekvenci kojima se manipuliše.^[91] Strategija sekvenciranja zavisi od složenosti metagenomskih zajednica. Pojava novih tehnologija sekvenciranja kao što je 454 pirosekvenciranje omogućila je analizu većeg broja vrsta u metagenomskoj zajednici.^[89] Tzv. shotgun sekvenciranje podrazumeva direktno sekvenciranje izolovane DNK bez potrebe za domaćinom kao što je *E. coli* i daje podatke sekvenciranja mnogo brže nego kada se konstruišu biblioteke i manje je radno zahtevno. Ipak, ovaj način sekvenciranja ne pruža informacije o fenotipu, pa su koraci kloniranja i ekspresije neophodni za karakterizaciju enzima. Izazov prilikom primene ove tehnike predstavlja izolovanje DNK dovoljne čistoće i u dovoljnoj količini.^[93]

Skrining zasnovan na funkciji, odnosno skrining biološke aktivnosti uključuje identifikaciju pozitivnih klonova koji ispoljavaju željene karakteristike na osnovu analize upotrebom visokopropusnih tehnologija skeniranja.^[91] Strategije fenotipskog hromogenog skeniranja podrazumevaju upotrebu boja i supstrata ciljnih enzima ugrađenih u ploču na kojoj se gaje određene kulture. Ove metode najčešće uključuju testove enzimskih aktivnosti na agar pločama, kao što su skrobno-jodni test za amilazu i test za skrining aktivnosti celulaze. Heterologna komplementacija sojeva domaćina uključuje upotrebu komplementiranih sojeva domaćina koji zahtevaju prisustvo ciljnog gena za rast pod selektivnim uslovima. Glavni nedostatak ovog skrininga su šanse za neuspeh u ekspresiji gena, uglavnom zbog poteškoća u prepoznavanju promotera, neefikasnosti translacije, pogrešnog savijanja proteina, defektne post-translacione modifikacije željenih proteina, itd.^[89] Treća metoda funkcionalnog skeniranja je skeniranje ekspresije gena izazvane supstratom, pri čemu dolazi do selektivne ekspresije gena u prisustvu određenih supstrata.^[91] U ovoj metodi se, na primer, upotrebljava GFP kao reporterski gen, a čija je ekspresija indukovana prisustvom specifičnog metabolita koji proizvode testirani organizmi.^[89] Pored navedenih standardno korišćenih metoda, u upotrebi je i skeniranje na osnovu prisustva novih jedinjenja koja proizvode skenirani mikroorganizmi, a koja se razlikuju od ćelija domaćina, pri čemu se identifikacija vrši na osnovu položaja signala u hromatogramu.^[91] Međutim, postoji niz nedostataka koji su povezani sa skeniranjem zasnovanim na aktivnosti za biosintetičke enzime, koji često zahtevaju specijalizovane supstrate ili kofaktore, i malo je verovatno da će se upotrebom opštih testova razvijenih za primarne metaboličke enzime otkriti nove aktivnosti.^[93]

2.2. Ekspresioni sistemi

Heterologna ekspresija proteina se široko upotrebljava kako u industriji tako i u akademskim istraživanjima. Ova tehnika podrazumeva upotrebu genetski modifikovanih organizama u proizvodnji velikih količina proteina čija je zastupljenost u prirodnim izvorima niska, čineći proces izolovanja neisplativim ili je prečišćavanje iz istih otežano usled mogućnosti kontaminacije patogenima. Mnogi proteini i enzimi imaju komercijalnu važnost, dajući na značaju razvoju poboljšanih procesa za njihovu proizvodnju na industrijskoj skali. Količina proteina je bitan faktor, uzimajući u obzir da je potrebno dosta vremena i truda da bi se određeni protein izolovao iz prirodnog izvora u dovoljnim količinama, a da se često vrlo lako može dobiti iz prokariotskih ili eukariotskih ekspresionih sistema.^[94-96] Kvalitet proizvoda je od izuzetne važnosti, naročito ukoliko se koristi u medicinske svrhe za proizvodnju farmaceutika, koja je regulisana striktnim pravilnikom bezbednosti. Upotreba rekombinantne DNK tehnologije za kloniranje i ekspresiju određenog gena omogućava produkciju željenog proteina u nativnoj formi u zadovoljavajućoj količini. Razvoj rekombinantne DNK tehnologije doveo je do brzog rasta biotehnoloških kompanija koje se bave proizvodnjom produkata u oblasti brige o zdravlju ljudi i životinja.^[97] Prvi odobreni lek kreiran primenom genetskog

inženjeringa je bio humani insulin, 1982. godine.^[98] U osnovi rekombinantne DNK tehnologije je manipulacija genetskim materijalom od interesa van ćelija domaćina, da bi se potom u živom sistemu proizveo produkt sa željenim karakteristikama. Gen od interesa se insertuje u odgovarajući vektor uz pomoć restrikcionih endonukleaza i DNK ligaze, a nakon toga se dobijeni konstrukt uvodi u ćeliju domaćina, u kojoj se pokreće proizvodnja željenog proteina i na kraju se izoluju klonovi koji sadrže relevantni proizvod (slika 6). Ćelije domaćina su genetski modifikovane uvođenjem odgovarajućih gena ili regulatornih elemenata tako da budu pogodne za proizvodnju željenog proteina.^[99]



Slika 6. Koraci u rekombinantnoj DNK tehnologiji. Slika je preuzeta iz reference [100].

S obzirom na to da se proteini međusobno značajno razlikuju po strukturi i po biohemijskim karakteristikama, razvoj različitih platformi za ekspresiju proteina i odabir odgovarajućeg ekspresionog sistema su od fundamentalnog značaja, kako u bazičnim istraživanjima tako i na industrijskom nivou.^[95] Kada su u pitanju mikroorganizmi za ekspresiju proteina su dostupni različiti sistemi koji uključuju bakterije, kvasce, filamentozne gljive i jednoćelijske alge.^[6] Svaki ekspresioni sistem nudi jedinstven set karakteristika, a da bi se postigla uspešna proizvodnja heterolognog proteina potrebno je prilagoditi proces proteinu koji se proizvodi kao i ekspresionom sistemu koji se koristi.^[95]

2.2.1. *Escherichia coli* kao ekspresioni sistem

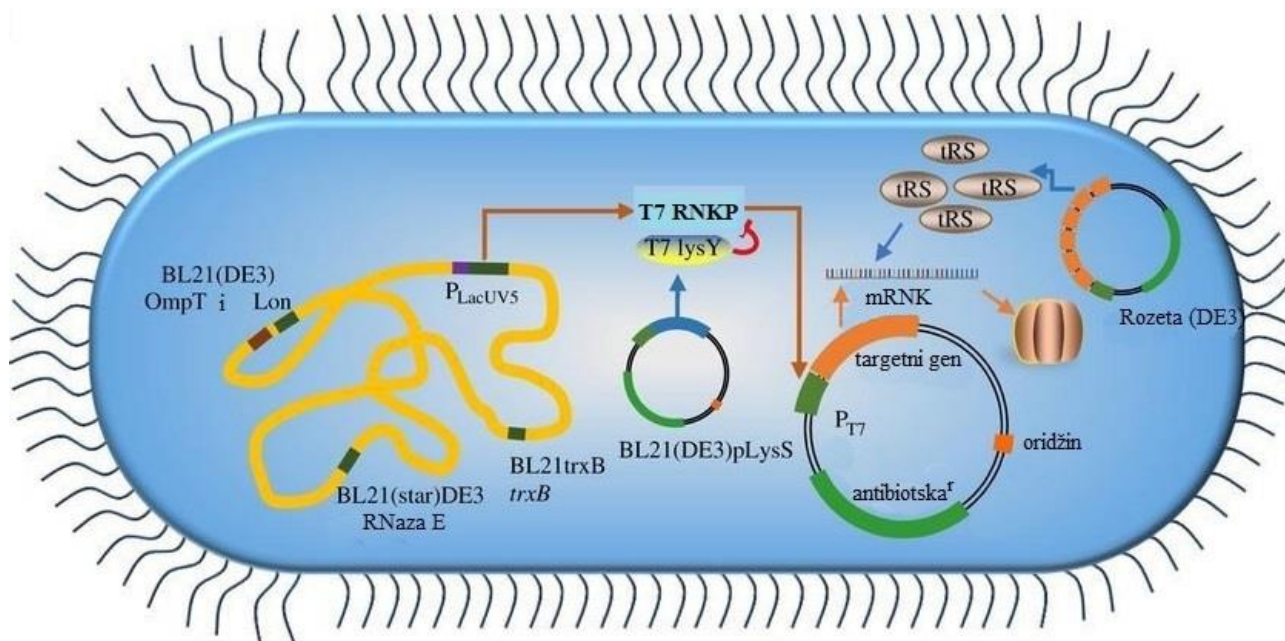
Escherichia coli je Gram negativna bakterija sa cirkularnim genomom od 4.6 Mb, koja ima široku primenu u proizvodnji rekombinantnih proteina. U bogatom medijumu pri optimalnim uslovima tokom logaritamske faze rasta, *E. coli* se duplira svakih 20-30 minuta.^[96] Generaciono vreme može biti promenjeno prilikom produkcije rekombinantnih proteina koji imaju uticaj na metabolizam bakterije.^[6] Medijumi za rast ćelija se prave od dostupnih i jeftinih komponenti, pri čemu se postiže umnožavanje do velike gustine ćelija. Još jedna od prednosti upotrebe *E. coli* u odnosu na više organizme je i laka genetska manipulacija, odnosno jednostavno, efikasno i ekonomično uvođenje

strane DNK u bakterijske ćelije.^[6, 101, 102] Intenzivna zastupljenost *E. coli* u produkciji rekombinantnih proteina rezultirala je razvojem tehnologija za usmeravanje ekspresije u različite delove ćelije (kompartimente). Prednost ovoga je što okruženja ovih kompartimenata mogu obezbediti uvijanje željenog proteina.^[96] Međutim, postoje određena ograničenja prilikom upotrebe *E. coli* kao što je intracelularna akumulacija heterolognih proteina, nepravilno uvijanje, nedostatak post-translacionih modifikacija, mogućnost degradacije proteina usled prisustva proteaza, produkcija endotoksina, nestabilnost iRNK i razlika u preferencijalnim kodonima između organizama.^[97, 101, 103] Nedostatak post-translacionih modifikacija može imati uticaj na aktivnost, strukturu, rastvorljivost, stabilnost i povećanje imunogenosti sintetisanog proteina.^[97, 102, 104] Neki od načina za prevazilaženje ograničenja ovog ekspresionog sistema podrazumevaju upotrebu različitih sojeva *E. coli* koji sadrže različite promotore, snižavanje temperature ekspresije, sekretovanje proteina u periplazmatski prostor, dodavanje različitih tagova i simultanu proizvodnju rekombinantnih proteina sa šaperonima koji obezbeđuju pravilno uvijanje.^[7, 101]

Najčešće upotrebljavani komercijalno dostupni vektori za proizvodnju rekombinantnih proteina su pET vektori zasnovani na ekspresiji regulisanoj prisustvom T7 promotora. Ovi vektori poseduju pMB1 „oridžin” replikacije (derivat ColE1), a ima ih od 15-60 kopija po ćeliji. Za T7 promotor koji reguliše ekspresiju stranog gena vezuje se fagna T7 RNK polimeraza, čija je ekspresija pod kontrolom lacUV5 promotora čime se obezbeđuje indukcija ekspresije laktozom ili njenim analogom izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozidom (IPTG). Nivo bazalne ekspresije RNK polimeraze regulisan je postojanjem lacIQ represora ili ko-ekspresijom T7 lizozima čiji je gen lociran na kompatibilnim pLysS ili pLysE plazmidima. Nakon indukcije količina proizvedene T7 RNK polimeraze prevazilazi nivo koji T7 lizozim može da inhibira.^[6]

Vektori koji se upotrebljavaju za ekspresiju sadrže i selektabilne markere koji služe da spreče rast ćelija koje ne nose plazmid od interesa. U ove svrhe se najčešće koriste geni koji obezbeđuju rezistenciju na antibiotike kao što je ampicilin, a od nedavno se razvijaju sistemi koji su plazmid zavisni, odnosno koji podrazumevaju da se neki od gena esencijalnih za rast bakterija ukloni iz bakterijskog genoma i insertuje u okviru plazmida.^[6]

Neki sojevi *E. coli* kao što su RosettaTM i derivati BL21 dizajnirani su tako da u okviru dodatnog plazmida kompatibilnog sa vektorom u koji se insertuje gen sadrže dodatne tRNK za kodone koji se retko koriste u *E. coli*, čime se pospešuje ekspresija eukariotskih proteina. Osim toga, sojevi kao što su BL21 (DE3), (DE3) pLysS i pLysE su dizajnirani tako da ne sadrže Lon i OmpT proteaze, čime se redukuje procenat degradacije heterolognih proteina u ovim sojevima (slika 7).^[104]



Slika 7. Prikaz karakteristika sojeva *E. coli* koji se najčešće upotrebljavaju u proizvodnji rekombinantnih proteina. Gen od interesa se nalazi pod kontrolom T7 promotora u ekspresionom vektoru. U okviru genoma *E. coli* nalazi se gen za T7 RNK polimerazu pod kontrolom lacUV5 promotora. Soj BL21 (DE3) je deficijentan u *OmpT* i *Lon* proteazama, čime se smanjuje mogućnost za degradaciju rekombinantnih proteina. BL21STAR (DE3) soj ima mutaciju u genu za *Rnazu E*, čime se smanjuje procenat degradacije mRNK. BL21trxB soj promoviše produkciju disulfidnih mostova. U okviru BL21(DE3)pLysS soja postoji dodatni plazmid koji kodira ekspresiju T7 lizozima, čime se sprečava bazalna ekspresija T7 RNK polimeraze. Rozeta soj je dizajniran tako da povećava ekspresiju proteina kodiranih genima koji sadrže retke kodone. Slika je modifikovana iz reference [103].

Dodatak određenih tagova koji će se eksprimirati zajedno sa proteinom često olakšava ekspresiju proteina u solubilnoj formi (veliki polipeptidni lanci) ili prečišćavanje proteina (peptidni tagovi). Tagovi ove vrste mogu i ne moraju uticati na strukturu i aktivnost proteina. Najpoznatiji peptidni tagovi su poli His, c-Myc, FLAG i StrepII tagovi od kojih se svi mogu detektovati imunoblotom uz pomoć dostupnih antitela kada nivo ekspresije nije dovoljan za detekciju pomoću SDS-PAGE. Poli his tag omogućava prečišćavanje proteina u jednom koraku afinitetnom hromatografijom, što je jedna od prednosti iskorišćena prilikom prečišćavanja enzima tokom izrade ove disertacije.^[6, 104] Da bi se povećala rastvorljivost sekretovanog proteina mogu se dodati nepeptidni tagovi kao što su maltoza vezujući protein ili glutation S transferaza koji se moraju odvojiti od eksprimiranog proteina ukoliko je potrebno obavljati strukturne eksperimente ili biohemijsku karakterizaciju. Tagovi se mogu ukloniti enzimskim ili hemijskim isecanjem.^[6] Heterologni proteini mogu se eksprimirati u periplazmi čime se olakšava prečišćavanje i redukuje stepen potencijalne degradacije. Osim ova dva načina protein se može sintetisati u formi inkluzionih tela koja su zaštićena od proteolitičke degradacije, ali se protein sintetise kao nerastvoran i često pogrešno uvijen, pa je potrebna solubilizacija i renaturacija.^[104] Da bi se dobio aktivan protein potrebno je ukloniti inkluzionu tela iz ćelije, upotrebiti denaturante koji dovode do razvijanja proteina da bi se isti solubilizovao, eliminisati pogrešno formirane disulfidne veze upotrebom redukujućih agenasa i na kraju ukloniti iskorišćena sredstva i renaturisati protein. Mogućnost za formiranje inkluzionih tela smanjuje se snižavanjem temperature ekspresije ili fuzionisanjem gena od interesa sa genom za tioredoksin.^[7]

2.2.2. *Saccharomyces cerevisiae* kao ekspresioni sistem

Kvasci su jednoćelijski eukarioti koji pripadaju carstvu gljiva, a često se koriste u proizvodnji rekombinantnih proteina čije je sinteza u *E. coli* otežana usled problema sa uvijanjem proteina ili potrebom za post-translacionim modifikacijama, pre svega glikozilacijom.^[7] Kao ekspresioni sistem kvasac kombinuje prednosti kako prokariota (visok nivo ekspresije, brz rast, niski troškovi proizvodnje proteina i lako uspostavljanje procesa fermentacije), tako i eukariota (mogućnost obavljanja većine post-translacionih modifikacija). Bezbednost sistema usled nedostatka endotoksina i onkogena je zagarantovana. Genetska manipulacija u odnosu na ćelije insekata i sisara je lakša, a može se postići velika gustina ćelija prilikom fermentacije.^[97] Kvasac takođe poseduje i obogaćen endomembranski sistem koji omogućava ekstracelularnu sekreciju proteina, a ovo se obezbeđuje insertovanjem signala za sekreciju koji potiču ili od signalne sekvence samog sintetisanog proteina ili signalnih sekvenci proteina poreklom iz *S. cerevisiae*.^[95]

Obrazac glikozilacije u *S. cerevisiae* često ne odgovara proteinima iz viših organizama s obzirom na to da O-vezani oligosaharidi sadrže isključivo ostatke manoze, dok kod viših eukariota sadrže pored manoze i galaktozu i sijalinsku kiselinu. Osim toga kvasac često vrši hiperglikozilaciju, odnosno dodavanje većeg broja ostataka manoze na N-mestima glikozilacije, čime se menja aktivnost, obrazac vezivanja za receptore i može uticati na imunogenost produkovanog proteina.^[7, 95, 97]

Za ekspresiju heterolognih proteina u kvascima dostupni su brojni vektori koji sadrže različite vrste promotora i auktotrofne ili dominante selektabilne markere, a omogućavaju konstitutivnu ili regulisanu ekspresiju gena. Pored toga razvijeno je i nekoliko efikasnih metoda transformacije kojom se strana DNK uvodi u ćeliju domaćina.^[95] Vektori koji se koriste za ekspresiju u kvascima uglavnom omogućavaju propagaciju i selekciju pozitivnih klonova i u *E. coli* i u *S. cerevisiae*. U tom kontekstu *E. coli* se upotrebljava za selekciju konstrukata koji sadrže gen pravilno insertovan u vektor, čime se olakšava genetska manipulacija u kvascima. Pored toga, ovaj sistem omogućava inserciju više kopija gena koji kodira željeni protein ili ekspresiju multimernih proteina sa subjedinicama različite strukture.^[104] Bakterijski deo plazmida sadrži „oridžin” replikacije u *E. coli* i selektabilni marker gen koji najčešće nosi rezistenciju na antibiotik. Insertovanje gena od interesa odigrava se u regionu koji sadrži sekvence za delovanje različitih restrikcioni enzima. Deo plazmida koji je potreban za propagaciju u kvascima sadrži, pored elemenata potrebnih za replikaciju ili integraciju u genom kvasca, dodatne selektivne markere koji omogućavaju selekciju pozitivnih transformanata na medijumu. U ove svrhe se često koriste geni koji kodiraju β -izopropilmalat dehidrogenazu ili orotidin-5'-fosfat dekarboksilazu (URA3). Za transformaciju se koriste sojevi kvasca kojima nedostaju ovi geni i ne mogu rasti u medijumu u koji nije dodat leucin ili uracil ukoliko ne sadrže plazmide u okviru kojih su dodati geni za sintezu ovih komponenti.^[105]

Na osnovu načina replikacije razlikuju se dva tipa vektora, a to su epizomalni i integrišući vektori. Epizomalni vektori se razlikuju prema broju kopija, načinu replikacije i stabilnosti. Najčešće se upotrebljavaju vektori poreklom od plazmida koji se prirodno javlja u *S. cerevisiae*, a imaju visoku stabilnost i javljaju se u približno 40 kopija po ćeliji. Integrišući vektori ne sadrže sekvence koje omogućavaju autonomnu replikaciju, veoma su stabilni, ali uglavnom prisutni u malom broju.^[95]

Jedna od prednosti upotrebe kvasca jeste postojanje jakih konstitutivnih promotora koji kontrolišu ekspresiju gena kao što su gliceraldehid-3-fosfat hidrogenaza (GAP), fosfoglicerat kinaza-1 (PGK1), alkohol dehidrogenaza-1 (ADH1) i drugi. Pored konstitutivnih promotora, postoje i inducibilni promotori koji služe za otpočinjanje ekspresije proteina u određeno vreme, što je posebno značajno kod proteina koji su toksični za ćeliju. Ovi promotori uključuju GAL-1 (indukuje se dodatkom galaktoze), PHO5 (indukuje se prisustvom male koncentracije neorganskog fosfata u medijumu) i HSE elemente (indukuju se povećanjem temperature na 37 °C).^[105]

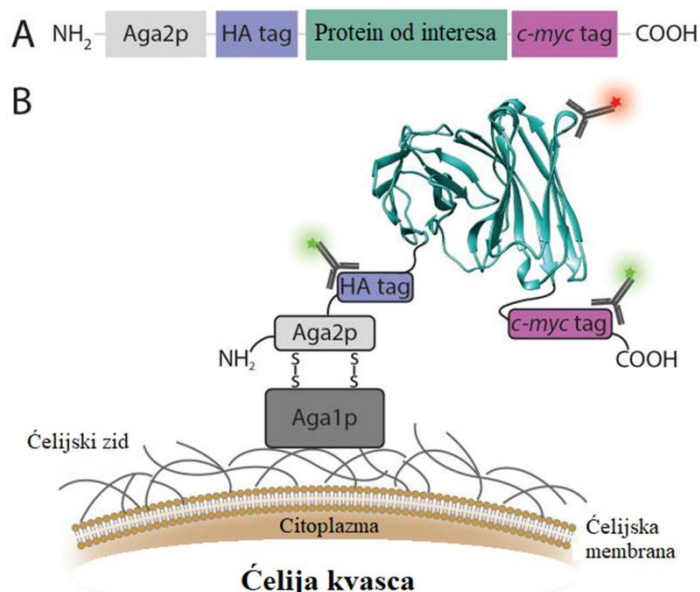
Uzimajući u obzir navedene prednosti, i s obzirom na to da *S. cerevisiae* zadovoljava ekonomske kriterijume kao i bezbedonosne standardne za proizvodnju komponenti koje imaju primenu u raznim oblastima života, na tržištu su dostupni brojni proizvodi sintetisani u ovom sistemu, kao što su insulin, glukagon i neki faktori rasta.^[7, 106] *S. cerevisiae* se uspešno koristi za pravljenje vakcina za Hepatitis B, Hantavirus i humani papiloma virus.^[97, 104]

2.2.2.1. Prikaz proteina na površini ćelija kvasca

Da bi se očuvala veza između genotipa i fenotipa proteina razvijene su različite metode prikaza proteina na površini ćelije, uključujući fagni, bakterijski, prikaz ribozoma, prikaz kvasca i sisarskih ćelija. Kvašćev displej predstavlja jednu od osnovnih tehnologija za *in vitro* inženjering proteina, koji se može postići sa dva različita pristupa: usmerenom evolucijom ili racionalnim dizajnom. Prikaz proteina na površini kvasca ima nekoliko prednosti za dirigovanu evoluciju proteina u odnosu na druge sisteme prikaza. Ovaj sistem sadrži mašineriju za produkciju eukariotskih proteina koja je neophodna za posttranslacione modifikacije kao što su glikozilacija i izomerizacija disulfidnih veza, čime se omogućava uvijanje i sekrecija složenih glikozilovanih proteina koji mogu sadržati veći broj disulfidnih veza. Vreme i način izvođenja procesa su jednostavniji u odnosu na prikaz proteina primenom drugih eukariotskih sistema. Protein od interesa se može eksprimirati zajedno sa odgovarajućim tagom koji pomaže kvantifikaciju ekspresije upotrebom fluorescentno obeleženih antitela. Pored navedenog, upotreba kvasca za ekspresiju proteina na površini ćelija često uključuje i korak sortiranja protočnom citometrijom, čime se olakšava selekcija mutanata u odgovarajućoj biblioteci.^[107-110]

Kada je u pitanju prikaz proteina na površini ćelije, svaka ćelija je transformisana vektorom koji kodira pojedinačnu varijantu željenog proteina, genetski fuzionisanu sa proteinom usidrenim u membranu ćelije. Protein koji omogućava usidranje heterolognog proteina sadrži signalnu sekvencu koja omogućava njegov transport do membrane gde dolazi do usidravanja (imobilizacije) i protein postaje dostupan vanćelijskoj sredini.^[110]

Postoji veliki broj proteina koji se koriste za usidranje heterolognih proteina u ćelijsku membranu, a jedan od najčešće primenjivanih sistema uključuje fuzionisanje proteina od interesa sa C krajem Alfa aglutinin 2 (aga2) proteina. Konstrukt dizajnisan za ovaj vid ekspresije uključuje prisustvo dva taga, a to su hemaglutinin (HA) tag lociran između Aga2 proteina i N-terminusa proteina od interesa, i c-myc tag lociran na C-terminusu eksprimiranog proteina. Nakon indukcije ekspresije Aga2 protein formira disulfidne veze sa Aga1 proteinom usidrenim u membranu, što rezultuje prikazom željenog proteina na površini ćelije.^[110] Gen koji kodira Aga1 protein integrisan je u okviru hromozoma kvasca, dok se gen za Aga2 protein klonira zajedno sa proteinom od interesa i pripadajućim tagovima u epizomalni plazmidni vektor. Ekspresija Aga1 i Aga2 proteina je pod kontrolom inducibilnog GAL promotora (indukuje se u prisustvu galaktoze) (slika 8).^[109]



Slika 8. Šematski prikaz ekspresije proteina na površini ćelija kvasca. (a) Protein od interesa je fuzionisan sa dva taga (hemaglutinin antigen tagom i c-myc tagom) i fuzionisan je za C-terminus α -aglutinin Aga2p subjediniice. (b) Protein ekspimiran na površini vezuje se preko Aga2p subjediniice za Aga1p subjedinicu posredstvom disulfidnih veza. Aga1p je ukotvljen u ćelijski zid kvasca preko kovalentnih veza sa β 1,6-glukanima. Tagovi omogućavaju da se normalizuje proteinska funkcija u odnosu na nivo ekspresije upotrebom antitela. Slika je preuzeta iz reference [110].

Sojevima koji se koriste za ekspresiju proteina na površini ćelije modifikuju se karakteristike kao što su sastav ćelijskog zida ili putevi sekrecije proteina, da bi se omogućila efikasnija produkcija proteina. Ovo je omogućeno postojanjem sintetske biologije i tehnika genetske manipulacije kao što je CRISPR/Cas (*engl.* clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) sistem.^[111] Kao domaćini za ekspresiju proteina na površini kvasaca se najčešće koriste EBY100 i BY4741 sojevi, čije su glavne genotipske karakteristike MATa i nedostatak gena *ura3*, koji se koristi kao auksotrofni marker.^[111, 112]

Proteini vezani za površinu ćelije imaju prednosti koje u rastvornom obliku ne poseduju, kao što su lakoća regeneracije, kontrola prostorne orijentacije proteina, usklađene interakcije proteina sa proteinima koji su zajedno ekspimirani sa njima i jednostavne tehnike za sortiranje ćelija. Još jedna važna prednost ovog sistema je mogućnost spajanja metabolizma kvasca sa funkcijom proteina na površini kvasca.^[111]

2.3. Hiralni amini

S obzirom na činjenicu da različiti enantiomeri mogu ispoljavati potpuno drugačiju biološku aktivnost ili toksičnost, potreba za sintezom hiralnih jedinjenja koja nalaze primenu u farmaceutskoj industriji je u stalnom porastu. Enantiomeri mogu ispoljavati različita farmakokinetička (distribucija, izlučivanje, apsorpcija), farmakološka i toksikološka dejstva. U ovom smislu proizvodi koji se koriste u farmaceutskoj industriji treba da budu dobro okarakterisani u pogledu kvaliteta i čistoće.^[5] Enantiomerno čisti intermedijeri koji se mogu koristiti kao gradivni blokovi, hiralne pomoćne supstance ili agensi za razdvajanje čine otprilike 15% tržišta.^[113]

Od velikog značaja za farmaceutsku i agrohemijску industriju gde su potrebne visoka hemijska (99,5 %) i enantiomerna čistoća (obično 99 %) predstavljaju enantiomerno čisti amini, aminokiseline i amino alkoholi koji se koriste kao gradivni blokovi za sintezu bioaktivnih jedinjenja u pomenutim

industrijama.^[113] Prema procenama hiralni amini su prisutni u 40-45% aktivnih farmaceutskih sastojaka i u oko 20% agrohemikalija.^[114] Procenjeno je da je ukupan prihod od prodaje ovih specijalnih aktivnih farmaceutskih sastojaka (API) na početku novog milenijuma premašio 30 milijardi dolara sa godišnjom stopom rasta od oko 7–8 %.^[113]

Klasične metode za asimetričnu sintezu hiralnih amina uključuju diastereoizomernu kristalizaciju, enantioselektivnu redukciju imina ili enamina, C–H inserciju i nukleofilnu adiciju.^[113, 114] Kristalizacija diastereomernih soli se i dalje široko koristi za klasično razdvajanje racemskih amina.^[114] Nedostatak ove tehnike je u tome što je prinos željenog enantiomerno čistog proizvoda 50%, dok se ostalih 50% početnog racemata u principu odbacuje.^[113]

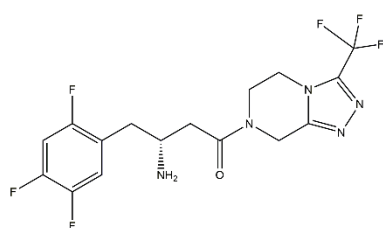
Većina industrijski proizvedenih amina se sintetiše primenom reduktivne aminacije, što podrazumeva reakciju jedinjenja koje sadrži karbonilnu grupu sa amonijakom ili aminom u prisustvu redukcionog sredstva. Ova tehnika uglavnom podrazumeva primenu organometalnih katalizatora na bazi prelaznih metala, kao što su rutenijum, rodijum i iridijum, i vodonika ili drugih redukcionih agenasa.^[31, 33] Upotreba prelaznih metala i gasa vodonika, često pod visokim pritiscima, postavlja pitanja bezbednosti i očuvanja životne sredine.^[31]

Alternativni pristup za sintezu enantiočistih amina je asimetrična hidrogenacija odgovarajućeg imina upotrebom katalizatora na bazi prelaznih metala. Najveća mana ove metode je u tome što je obično potrebno aktivirati imin (koristeći grupe kao što su fenil, benzil, supstituisani fenil ili sulfonil), a zatim na kraju ukloniti pomoćne grupe da bi se dobilo čisto jedinjenje. Pored toga nedostatak je i visoka cena iridijuma koji se pokazao kao najkorisniji metal za acikličnu redukciju imina, što ograničava njegovu primenu u industriji.^[113, 115]

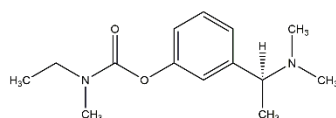
Biokataliza je postala ključna tehnologija za razvoj ekološki prihvatljivih i efikasnih proizvodnih procesa u farmaceutskoj industriji, nudeći visoku hemo-, regio- i stereoselektivnost, uz visoku katalitičku aktivnost u relativno blagim uslovima i uz mogućnost za modifikaciju svojstava biokatalizatora da bi odgovarali zahtevima željenog procesa.^[114] Jedna od glavnih prednosti biokatalize je unutrašnja hiralnost enzima, usled čega su često u stanju da razlikuju enantiomere racemskog supstrata i da obezbede visoku stereoselektivnost tokom transformacije.^[33]

Među prvim biokatalizatorima za sintezu hiralnih amina i aminokiselina bile su aminokiselinske dehidrogenaze i α -transaminaze, koje su našle široku industrijsku primenu u proizvodnji L- i D-aminokiselina reduktivnom aminacijom odgovarajućih α -keto kiselina.^[114, 116] Dopunu navedenim enzimima u sintezi aminokiselina predstavljaju amonijum lijaze.^[117] Kinetička rezolucija racemskih amina enantioselektivnom acilacijom uz pomoć lipaza je dugo bila jedina opcija za sintezu amina.^[118] U današnje vreme, najšire upotrebljavan biokatalitički pristup za sintezu primarnih amina je upotreba transaminaza u reakciji reduktivne aminacije za konverziju supstrata koji sadrže karbonilnu funkciju u ciljani amin.^[28] Jedan od najpoznatijih primera koji pokazuje potencijal katalize transaminazama je primena ω -transaminaze u proizvodnji antidijabetičkog leka sitagliptina^[26] koji je zamenio proces hidrogenacije baziran na prelaznim metalima. Od tada se dosta radilo na pronalaženju novih transaminaza i puteva sinteze intermedijera sitagliptina.^[119-121] Omega-transaminaze su, između ostalog, našle primenu i u asimetričnoj sintezi antiaritmika vernakalanta.^[122] Amini se mogu sitetisati i primenom deracemizacije korišćenjem kombinacije monoamin oksidaza i reduktivnog agensa borazana ($\text{BH}_3\text{-NH}_3$).^[123, 124] Monoamino oksidaza iz *Aspergillus niger* primenjena je u hemoenzimskoj kaskadi za sintezu nekoliko farmaceutski aktivnih sastojaka,^[123] uključujući hiralni sekundarni amin, intermedijer za lek boceprevir (proteazni inhibitor za tretman hepatitisa C), kompanije Merck & Co. i Codexis.^[125, 126] Posebno primamljivu opciju za biokatalitičku sintezu hiralnih amina predstavlja asimetrična redukcija imina upotrebom NAD(P)H zavisnih enzima. Teorijski ova reakcija može omogućiti pristup skoro svakom primarnom, sekundarnom ili tercijskom aminu, a supstrat imin ili iminijum jon se može prethodno formirati ili generisati *in situ*

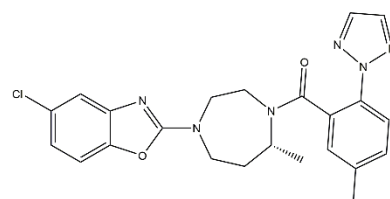
kondenzacijom amina i karbonilnih jedinjenja.^[114] Naučnici kompanije *Pfizer* koriste ove enzime da bi sintetisali (*S,S*)-sertralin (antidepresiv) iz odgovarajućeg imina.^[127] Enzim koji bi katalizovao formiranje veze između ketona i amina, kao i naknadnu redukciju intermedijera iminijum jona, korišćenjem nikotinamidnog kofaktora da generiše proizvod hiralnog amina, istovremeno sprečavajući redukciju keto prekursora u alkohol bi bio izuzetno koristan dodatak izboru biokatalitičkih agenasa za proizvodnju hiralnih amina.^[31] Jedan takav enzim razvila je kompanija *Codexis* metodama proteinskog inženjeringa počevši od opin dehidrogenaze i ispitana je njegova primena u sintezi pretnodno pomenutog antiaritmika vernakalanta.^[33, 34] Reduktivna aminaza upotrebljena je prilikom razvoja inhibitora LSD1 (GSK2879552). Inhibicijom ovog enzima postiže se povećana ekspresija tumor-supresornih gena. U tri kruga evolucije razvijena je varijanta enzima potrebna za sintezu glavnog intermedijera u prinosu od 84%, sa odličnom hemijskom i optičkom čistoćom.^[28, 128] Na slici 9 dat je prikaz nekoliko enzimski sintetisanih hiralnih amina uz navedenu primenu.



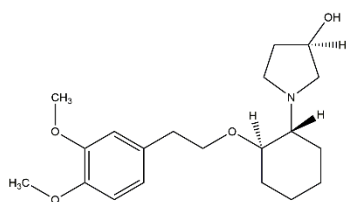
Sitagliptin-antidijabetik



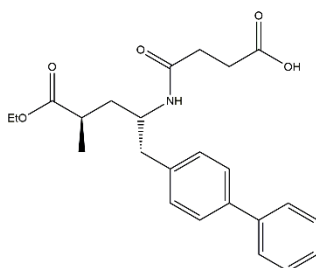
Rivastigmin-lek za Alchajmerovu bolest



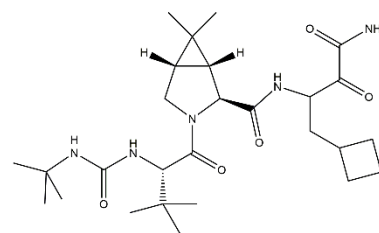
Suvoreksant-tretman nesanice



Vernakalant-antiaritmik



Sakubitril-tretman srčane insuficijencije



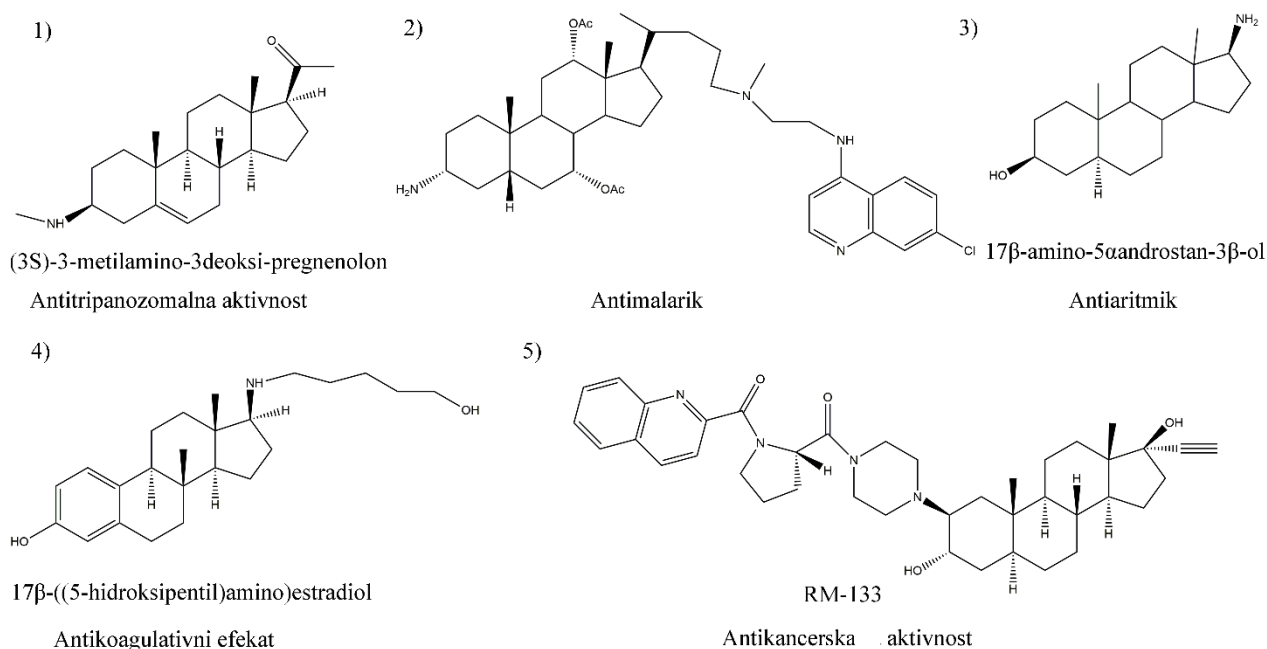
Boceprevir-tretman hepatitisa C

Slika 9. Primer nekoliko enzimski sintetisanih hiralnih amina sa primenom u farmaceutskoj industriji. Strukture su kreirane upotrebom ChemDraw programa.

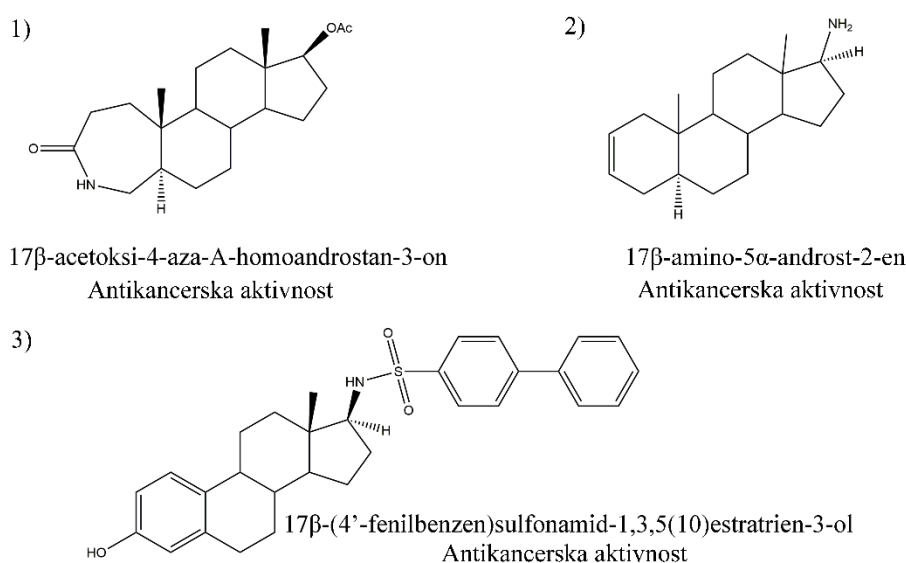
2.3.1. Amino steroidi

Steroidi obuhvataju veliku grupu strukturno srodnih prirodnih jedinjenja dobro poznatih po ulogama koje ispoljavaju u brojnim procesima u ljudskom organizmu, kao što su fiziološki regulatori, hormoni i provitamini.^[36] Širok spektar bioloških aktivnosti čini steroide i njihove derivate perspektivnim za otkrivanje novih efikasnih lekova.^[129] Sa ove tačke gledišta aminosteroidi su od velikog interesa. Postoje brojne publikacije u okviru kojih je ispitivan širok spektar aktivnosti koje ispoljavaju derivati amino steroida. Neki od njih kao što su steroidni 4-aminohinolini pokazali su se kao potencijalni antimalarici i inhibitori botulinskog neurotoksina.^[130] Drugi pak iskazuju antitripanozomalnu aktivnost kao što se pokazalo na primeru 3-amino steroidnih derivata.^[131] Pored navedenih i drugi amino steroidi pokazali su se kao potencijalni antimikrobni agensi.^[38, 39, 129, 132, 133] Osim antimikrobne aktivnosti, amino derivati steroida pokazuju i potencijal za sprečavanje razvoja aritmije, kao što je pokazano za 17 β -amino-5 α -androstan-3 β -ol^[134] i druge.^[37, 135] Neki od njih ispoljavaju antidijabetičku aktivnost^[136] ili antikoagulativni efekat, kao što je pokazano za 17 β -amino derivate estrogenih hormona u studijama rađenim na glodarima.^[137] Jedna od najznačajnijih upotreba derivata aminosteroida ogleda se u tome što oni predstavljaju novu porodicu pro apoptotičkih molekula koji pokazuju visoku i selektivnu citotoksičnost na više vrsta kancera *in vitro* i *in vivo*.^[36]

^{138-140]} Pokazano je da neki od ovih molekula indukuju stres na nivou endoplazmatičnog retikuluma koji vodi do apoptoze ćelija, potencijalno preko narušavanja homeostaze holesterola u ćelijama kancera.^[138] Drugi deluju kao inhibitori enzima uključenih u biosintezu steroida neophodnih za razvoj određenih tipova kancera kao što je kancer dojke. Na ovom polju su se kao potencijalni terapeutici pokazali inhibitori aromataze, 17 β -hidroksi steroid dehidrogenaze i steroidne sulfataze. Poslednji u nizu enzima je posebno interesantan s obzirom na to da je njegova ekspresija detektovana u 90% tumora dojke, i da je enzimska aktivnost približno 50 puta veća u tumorskim ćelijama u poređenju sa zdravim tkivom dojke.^[141] Komparativna studija na velikoj seriji derivata aminosteroida pokazala je obećavajući antikancerski efekat na različitim ćelijskim linijama raka, kao što su HL-60 ćelije (leukemija),^[142, 143] MCF-7 ćelije (kancer dojke),^[138, 141] OVCAR-3 ćelije (kancer jajnika),^[144] ćelije tumora pankreasa,^[138, 144] kao i LNcaP ćelije tumora prostate.



Slika 10. Prikaz struktura pojedinih amino steroida uz navedene aktivnosti. Strukture su kreirane upotrebom ChemDraw programa.



Slika 11. Prikaz struktura odabranih amino steroida uz navedene aktivnosti. Strukture su kreirane upotrebom ChemDraw programa.

Na slikama 10 i 11 prikazani su neki od amino derivata steroida sa efektima koje ispoljavaju. Ono što se može uočiti na osnovu struktura prikazanih jedinjenja jeste da ovi steroidni derivati poseduju veliku raznolikost, kako strukturnu tako i funkcionalnu, što ih čini odličnim kandidatima za pronalaženje novih terapijskih agenasa.

2.4. Transaminaze

Transaminaze (EC 2.6.1.X), poznate i kao aminotransferaze, predstavljaju piridoksal fosfat (PLP) zavisne enzime koji vrše transfer amino grupe sa amino donora na akceptor, u reakciji tokom koje se PLP ponaša kao među čuvar amino grupe, formirajući Šifovu bazu sa ostatkom lizina u aktivnom mestu (unutrašnji aldimin).^[145] Transaminaze su otkrivene 30-ih godina prošlog veka od strane *Needham-a*^[146] i *Braunstein-a* i *Kreitzman-a*.^[147] Ovi enzimi su široko rasprostranjeni, pa je njihovo prisustvo identifikovano u organizmima ljudi, bakterija, gljiva i biljaka. Lokalizovane su u citoplazmi i mitohondrijama i igraju vitalnu ulogu u integraciji mnogih metaboličkih procesa.^[148] Metabolitičke uloge reakcija transaminacije uključuju: (a) sintezu i degradaciju aminokiselina, (b) vezu između metabolizma ugljenih hidrata i aminokiselina i (c) sintezu nekoliko specifičnih jedinjenja, uključujući ureu i 7-aminobuternu kiselinu.^[149]

Kao što je već prethodno pomenuto, transaminaze su od izuzetnog značaja za farmaceutsku i industriju finih hemikalija, s obzirom na to da su sposobne za proizvodnju hiralnih amina koji se koriste kao intermedijeri u sintezi lekova, počevši od prohiralnog prekursora u jednom koraku.^[150] Supstratna specifičnost transaminaza u korelaciji je sa sekvencom i načinom uvijanja proteina koji sačinjavaju ovu veliku enzimsku grupu.^[151]

Prema bazi podataka proteinskih porodica, gde proteini koji pripadaju istoj porodici imaju visok procenat sličnosti u sekvenci određenih proteinskih regiona, transaminaze se dele u šest podgrupa^[151]: L-aspartat transaminaze (klasa I), L-alanin transaminaze (klasa II), ω -transaminaze (klasa III), D-amino kiselinske transaminaze i transaminaze aminokiselina razgranatog lanca (klasa IV), L-serin transaminaze (klasa V) i šećerne transaminaze (klasa VI).^[10, 152]

Na osnovu supstratnog spektra transaminaze se mogu klasifikovati kao α ili ω -transaminaze, u zavisnosti od položaja amino grupe koja se prenosi u odnosu na karboksilnu grupu supstrata. Alfa-transaminaze zahtevaju prisustvo karboksilne grupe u α položaju u odnosu na amino ili karbonilnu grupu supstrata, čime je upotreba ovih enzima ograničena na sintezu α -aminokiselina, dok omega-transaminaze predstavljaju sve ostale transaminaze (one kod kojih bar jedan od dva supstrata nije α -aminokiselina ili α -keto kiselina). Omega-transaminaze mogu aminovati različite keto kiseline, aldehide i ketone. U osnovi one mogu prihvatiti bilo koji keton ili amin, što ih čini interesantnim za farmaceutsku industriju.^[21, 145, 148] Važna razlika između α -transaminaza i amin transaminaza je u ravnoteži reakcije, koja je kod amin transaminaza pomerena ka stvaranju proizvoda reakcije.^[151] Prednosti ω -transaminaza u sintezi hiralnih amina nad hidrolazama i dehidrogenazama ogledaju se u širokoj supstratnoj specifičnosti, visokoj enantioselektivnosti i u tome što ne zahtevaju regeneraciju kofaktora. Omega-transaminaze su podeljene u dve podgrupe, a to su β -transaminaze i amin transaminaze, koje često predstavljaju sinonim za sve ω -transaminaze.^[21, 145] Pored navedenih prednosti ovi enzimi poseduju i veliku regioselektivnost, što im omogućava da u okviru kompleksnih molekula koji sadrže više keto grupa konvertuju samo jednu od njih.^[21] Još jedna od prednosti amin transaminaza je što mogu koristiti jeftine ili reciklabilne amino donore, kao što su izopropilamin ili alanin za asimetričnu sintezu hiralnih amina.^[152]

Prema načinu uvijanja PLP zavisni enzimi dele se na 7 velikih grupa.^[153] Transaminaze su identifikovane u okviru grupe I, kojoj pripada većina transaminaza iz klase I, II, III i V, i u okviru grupe IV, kojoj pripadaju transaminaze iz klase IV.^[148] U okviru grupe IV, pored dobro poznate D-alanin transaminaze nalaze se i neke ω -transaminaze koje dele sličnost u sekvenci sa ovom grupom,

kao što je enzim iz *Arthrobacter* sp. (ATA-117) i transaminaza iz *Aspergillus terreus*. Većina transaminaza koje pripadaju grupi I je (*S*)-selektivna i učestvuje u sintezi (*S*)-enantiomera hiralnog amina, dok su transaminaze iz grupe IV (*R*)-selektivne.^[152] Enzimi iz grupa I/IV su aktivni u formi homodimera i sadrže dva aktivna mesta.^[151] U okviru obe enzimske grupe u formiranju aktivnog mesta učestvuju aminokiselinski ostaci iz različitih subjedinica.^[152] U okviru jedne subjedinice se razlikuju dva domena, a kofaktor je, kao što je prethodno pomenuto, kovalentno vezan za ostatak lizina koji se nalazi u okviru većeg domena.^[151]

2.4.1. Opšte strukturne karakteristike ArRMut11 i ω -transaminaze iz *Chromobacterium violaceum*

2.4.1.1. Opšte karakteristike ω -transaminaze ArRMut11

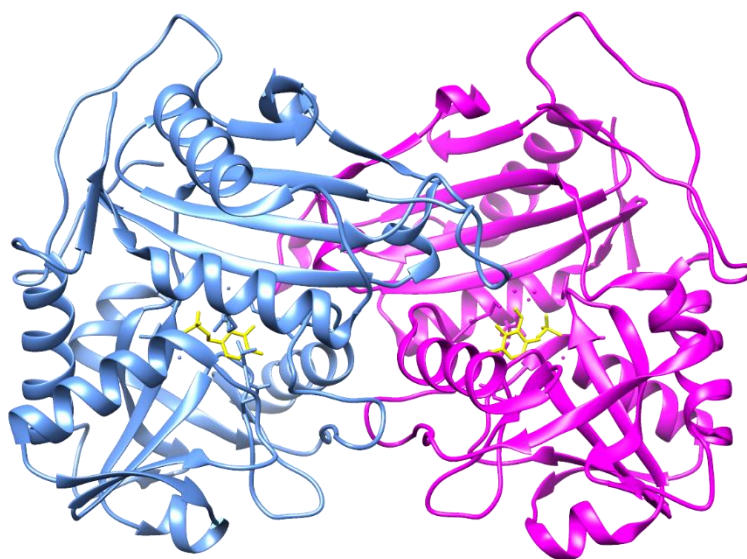
Subjedinica transaminaza klase IV sastoji se, kao što je prethodno pomenuto, iz dva domena koja su povezana interdomenskom petljom. Mali domen nalazi se na N-kraju proteinskog lanca i organizovan je u α/β strukturu, dok je veliki domen lociran na C-kraju lanca i sadrži pseudo- β burence. U udubljenju između domena nalazi se aktivno mesto, a formiraju ga ostaci iz oba domena jedne subjedinice i ostaci koji potiču od manjeg domena druge subjedinice unutar dimera.^[154-156] Pored kovalentne veze koju PLP formira sa ostatkom katalitičkog lizina, drugi konzervirani ostaci u okviru transaminaza klase IV ostvaruju nekovalentne interakcije sa molekulom PLP-a, kao što je veza između ostatka konzerviranog glutamata i N1 atoma piridinskog prstena PLP-a, kao i vodonične veze između fosfata koenzima sa ostatkom arginina, ostacima treonina i molekulima rastvarača.^[157-159]

Molekul PLP-a je okrenut prema proteinskoj globuli *re*-stranom, dok je *si*-strana molekula usmerena ka ulazu u aktivno mesto. Protoni se sa katalitičkog lizina prenose samo na *re*-stranu PLP-a. Karbanjonski intermedijer stabilizovan je interakcijom konzerviranog ostatka glutamata sa N1 atomom piridinskog prstena, pri čemu glutamat povećava efekat privlačenja elektrona, ponašajući se kao ponor elektrona, određujući specifičnost reakcije. Fosfatna i fenolna strana PLP-a nazivaju se P i O strana, redom.^[160] U okviru aktivnog mesta uočavaju se dva džepa, na O-strani PLP-a nalazi se O-džep, dok se na P-strani PLP-a nalazi P-džep. Kovalentno vezan PLP pozicioniran je između džepova. P-džep sačinjavaju ostaci iz β -lanaca koji se nalaze u okviru β -pločice manjeg domena, ostaci koji se nalaze u okviru međudomenske petlje i β -zaokret koji se nalazi u okviru velikog domena prve subjedinice i koji učestvuje i u formiranju ulaza u aktivno mesto enzima. O-džep pored ostataka iz β -lanaca koji se nalaze u okviru β -pločice manjeg domena formiraju i ostaci iz petlje koja potiče od druge subjedinice u okviru dimera. Kod transaminaza koje pripadaju ovoj klasi veličina aktivnog mesta je regulisana dužinom i sastavom aminokiselina fleksibilne petlje između domena i petlje koja učestvuje u formiranju O-džepa.^[159]

P-džep je formiran od hidrofobnih voluminoznih ostataka i njegova zapremina je manja u odnosu na transaminaze D-aminokiselina i transaminaze aminokiselina razgranatog niza, pa se u njega mogu smestiti samo metil i etil grupe supstrata. U okviru β -zaokreta nalazi se strukturno očuvani motiv kod *R*-transaminaza klase IV, 273TTAG276 uzevši kao primer *R*-TA iz *Aspergillus fumigatus*, pri čemu su bočni ostaci alanina i oba ostatka treonina usmereni u šupljinu P-džepa, što čini P-džep ove grupe enzima najmanjim u okviru klase IV transaminaza.^[159]

Kod (*R*)-transaminaza karakteristike O-džepa su slične kao kod transaminaza razgranatog bočnog niza, a čine ga naizmenični hidrofilni i hidrofobni ostaci. U okviru O-džepa vezuju se α -COOH grupa piruvata i hidrofobni deo *R*-(amina). U koordinaciju COOH grupe piruvata uključen je ostatak Arg126 (*R*-TA iz *Aspergillus fumigatus*). O-džepna petlja u *R*-TA je najduža među transaminazama iz klase IV.^[159]

Omega-transaminaza ArRMut11 kreirana je od strane kompanija *Codexis* i *Merck*, polazeći od (*R*)- selektivne ATA-117 (homologa enzima poreklom iz *Arthrobacter* sp.) sa ciljem razvoja enzima za sintezu sitagliptina (leka koji se primenjuje u terapiji dijabetesa tipa 2). Nakon 11 rundi evolucije dobijen je katalizator koji je sadržao 27 mutacija u različitim regionima, dobijenih primenom nasumične mutageneze i racionalnog dizajna. Od 17 katalitički neesencijalnih amino kiselinskih ostataka za koje je predviđeno da ostvaruju interakciju sa supstratom, 10 je mutirano u finalnoj varijanti enzima. Nakon konstruisanja aktivnog mesta u početnim rundama evolucije da bi moglo da prihvati odgovarajući supstrat, dalje značajne modifikacije su se odigravale na mestu interakcije dimera, da bi se ojačale interakcije između dimera u destabilišućim reakcionim uslovima.^[26]



Slika 12. Prikaz trodimenzionalne strukture ω -transaminaze ArRMut11 (PDB kod 3WWj). Molekul piridoksal-5'-fosfata prikazan je žutom bojom. Slika je kreirana korišćenjem programa UCSF Chimera.

U ovoj varijanti enzima petlja O-džepa se nalazi u tzv. zatvorenoj konformaciji, verovatno kao posledica dve mutacije, Gly136Phe i Ser223Pro, koje su dovele do povećanja zapremine O-džepa i pomerile poziciju petlje u odnosu na njegovu poziciju u ATA-117 (PDB ID: 3WWH). Konzervirani Arg*138 u okviru petlje nije promenjen i nije ometao smeštaj voluminozne tetrahidro triazolo(4,3-a)pirazinske grupe ketona pro-sitagliptina. Promena položaja petlje O-džepa kod mutanta Gly136Phe dovela je do smanjenja aktivnosti prema piruvatu u odnosu na roditeljski enzim. Prema postignutim efektima svih 27 mutacija u ArRMut11 se mogu podeliti u tri grupe: (1) uticaj na konformaciju petlje 129–145, (2) menjanje svojstava O i P džepa i (3) poboljšanje enzimске stabilnosti. Smeštaj za trifluorofenil grupu pro-sitagliptina je obezbeđen uvođenjem 4 mutacije u P-džepu (Val69Gly, Phe122Ile, Thr282Ser i Ala284Gly). Ove mutacije su zajedno sa sedam mutacija u O-džepu (His62Thr, Gly136Phe, Glu137Ile, Val199Leu, Thr209Ile, Thr286Ser) dovele do ispoljavanja željene aktivnosti. Mutacije su rezultovale povećanjem aktivnosti za trasaminaciju ketona pro-sitagliptina od 27000 puta, pri koncentraciji supstrata većoj od 250 g/L u 50% DMSO na 50 °C.^[159]

2.4.1.2. Opšte karakteristike ω -transaminaze iz *Chromobacterium violaceum*

Omega-transaminaza izolovana iz patogene bakterije *Chromobacterium violaceum* (Cv-2025) prvi put je pomenuta 2007. godine, a identifikovana je upotrebom PSI BLAST pretrage na osnovu poređenja sa sekvencom ω -transaminaze iz *Vibrio fluvialis* JS17. Enzim je homodimer molekulske

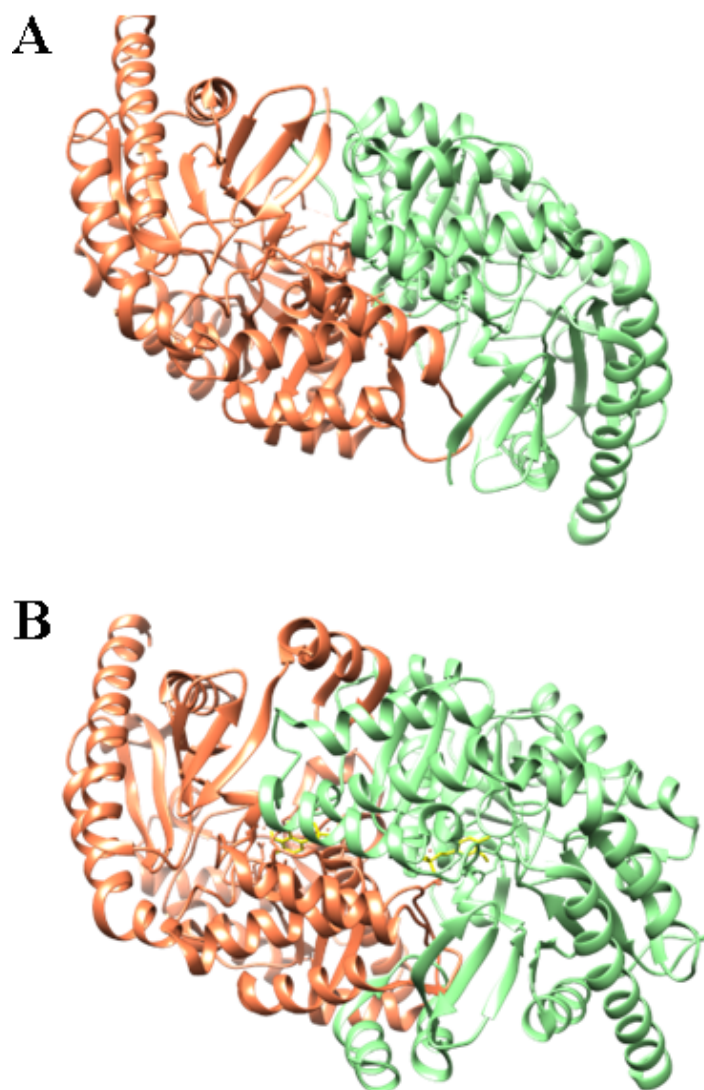
mase od 100 kDa.^[161] Način uvijanja Cv-2025 je tipičan kao kod ostalih transaminaza klase I, kod kojih je monomerna jedinica sačinjena iz dva domena. Veliki domen čine ostatci 93-313 koji formiraju $\alpha/\beta/\alpha$ sendvič sa sedmolančanom β -pločicom u centru, u okviru koje su svi lanci sem β_{10} lanca paralelni, spojen je sa malim domenom koji sadrži aminokiselinske ostatke sa N- i C-kraja proteina i u okviru kojeg se razlikuje dva režnja. Katalitički lizin na poziciji 288 se nalazi u okviru petlje koja prethodni antiparalelnom lancu. Režanj malog domena koji se nalazi na N-kraju proteina sadrži trolančanu antiparalelnu β -pločicu oivičenu sa jedne strane sa dva α -heliksa, a njegova struktura je dodatno stabilizovana interakcijama sa monomerom 2, koje su ključne za formiranje aktivnog mesta. C-terminalni režanj sadrži četvorolančanu antiparalelnu β -pločicu koja je okružena sa 3 heliksa sa jedne strane, dok je druga strana pločice okrenuta ka velikom domenu i formira pukotinu između domena u okviru koje je smešteno aktivno mesto.^[162, 163]

Aktivna mesta sadrže vezujući džep za PLP i supstrat vezujući region, a lokalizovana su na dodirnoj površini između subjedinica i između dva domena, a čine ih aminokiselinski ostaci koji potiču iz obe subjedinice. Piridoksal fosfat je tokom perioda mirovanja enzima kovalentno vezan za ϵ -amino grupu katalitičkog lizina i svojom *re*-stranom je okrenut ka rastvaraču.^[162] Katalitički lizin se nalazi sa *si*-strane PLP-a, koji štiti ovaj ostatak od kontakta sa rastvaračem.^[163] Između protona sa atoma azota piridinskog prstena i Asp259 formira se vodonična veza, a fosfatna grupa PLP-a ostvaruje još osam vodoničnih veza, direktno ili preko molekula vode sa bočnim lancima Ser121 i Tyr153 u okviru istog monomera, kao i sa amidnim atomom azotom ostataka Thr321 i Tyr322, hidroksilnom grupom bočnog lanca Thr321 i amidom iz bočnog lanca ostatka Asn118, koji potiču od drugog monomera. Hidroksilna grupa PLP-a formira vezu posredovanu molekulom vode sa ostatkom Asp226.^[162] Piridoksal fosfat ostvaruje i hidrofobne interakcije sa bliskim hidrofobnim ostacima kao što su ostatak Val261, Ile262, Phe320, Tyr153 i Gly155. Atom kiseonika na aromatičnom prstenu PLP-a ostvaruje interakcije sa ostacima Glu226 i Ala231, posredovane molekulima vode. Na osnovu UV-VIS spektroskopije mogu se dobiti informacije o koracima u katalitičkom ciklusu, s obzirom na to da PLP vezujuća forma ima apsorpcioni maksimum na 420 nm, dok PMP vezujuća forma ima maksimum na 330 nm.^[164]

Kao što je objašnjeno na primeru ω -transaminaze klase IV, i kod Cv-2025 se uočava prisustvo O i P džepa u aktivnom mestu čije prostorne razlike ograničavaju veličinu i orijentaciju funkcionalnih grupa supstrata. Veće funkcionalne grupe supstrata su orijentisane ka velikom džepu, dok su manje funkcionalne grupe okrenute ka malom džepu, čime se zadovoljava strukturna orijentacija i ispunjavaju preduslovi za enantioselektivnost.^[164]

Transaminaze mogu prihvatati i hidrofobne i hidrofilne supstrate u aktivno mesto. Kod (*S*)-selektivnih transaminaza ovo je omogućeno prisustvom fleksibilnog ostatka arginina u petlji koja se nalazi blizu aktivnog mesta, čija guanidino grupa može interagovati ili sa COOH grupom supstrata ili se može pomeriti ka spoljašosti, omogućavajući pristup hidrofobnim voluminoznijim supstratima. Kod (*R*)-selektivnih transaminaza ovaj ostatak arginina prisutan je u samo jednoj konformaciji ali se čitava petlja u okviru koje se on nalazi može pomerati i na taj način određuje supstratnu specifičnost.^[145]

Poređenjem apo (PDB: 4A6U) i holo (PDB: 4A6T) forme Cv-2025 zaključeno je da prilikom vezivanja PLP-a dolazi do strukturne reorganizacije koja je osnova za formiranje kompletnog aktivnog mesta, a s obzirom na to da su u interakciju sa PLP-om uključeni aminokiselinski ostaci iz obe subjedinice implicira da je dimerna forma transaminaza minimalna funkcionalna jedinica potrebna za katalitičku aktivnost (slika 13). U apo formi tri regiona koja obuhvataju 66 aminokiselinskih ostataka (Arg5–Ala33 and Gly152–Pro178 iz lanca A i Ile311–Phe320 iz B lanca) i čine komponente aktivnog mesta su neuređena i veoma fleksibilna, međutim u holo formi ovi regioni postaju uređeni i stabilizovani. Pored toga, i ostaci iz B lanca (Thr321–Ser323) koji učestvuju u formiranju aktivnog mesta pokazuju drugačiju prostornu organizaciju u apo i holo formi.^[164]



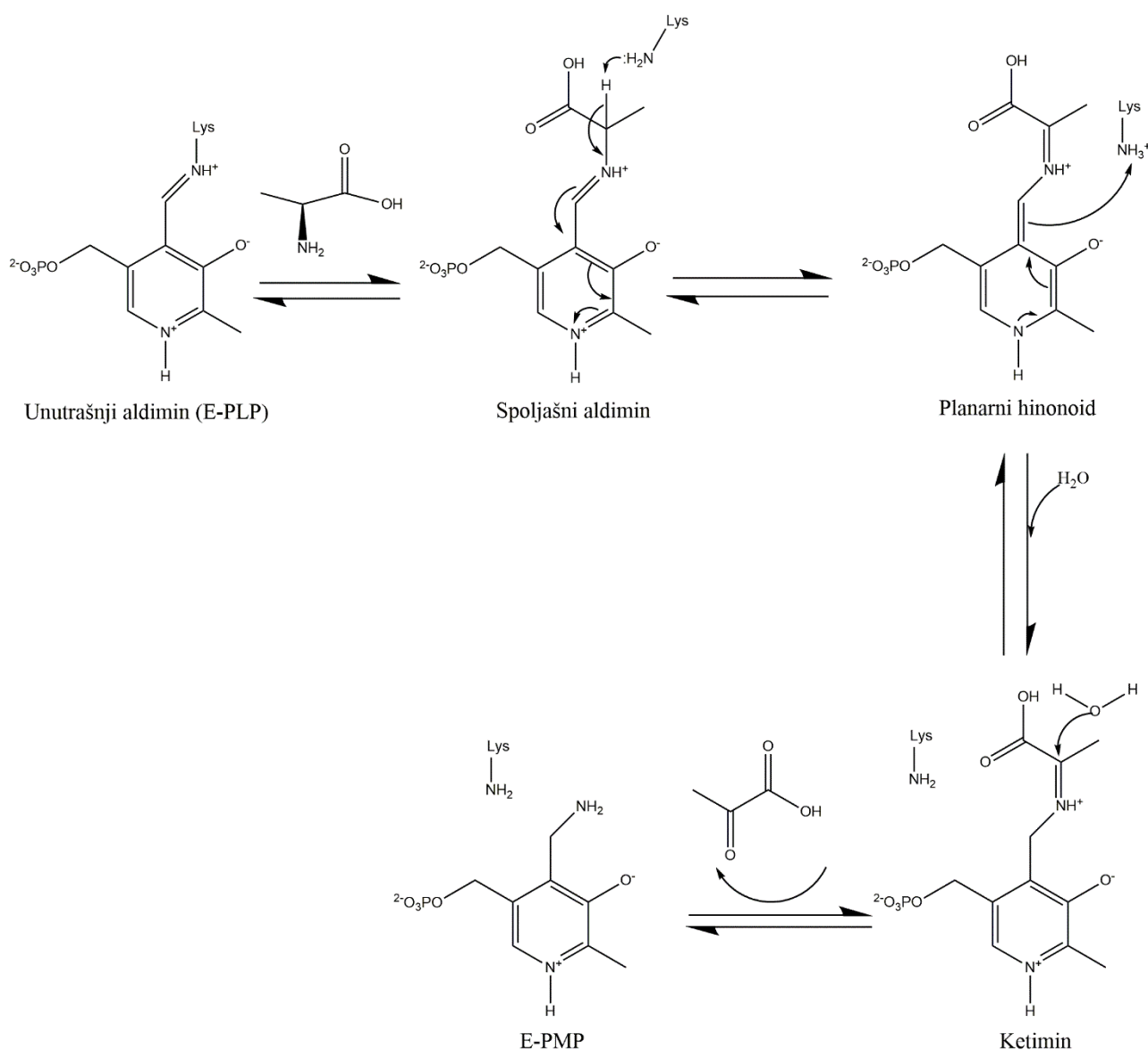
Slika 13. Prikaz trodimenzionalne strukture ω -transaminaze iz *Chromobacterium violaceum*. A) Apo forma enzima (PDB kod 4A6U); B) Enzim u kompleksu sa PLP-om (PDB kod 4A6T). Molekul PLP-a prikazan je žutom bojom. Slike su kreirane upotrebom UCSF Chimera programa.

Puferi koji sadrže boratne ili sulfatne jone imaju negativan uticaj na enzimsku aktivnost. Optimalni reakcioni uslovi su u HEPES puferu (50 mM), na pH 8,3 i 37 °C. Pri ovim uslovima enzim ispoljava aktivnost od 7.2×10^{-3} U/mg kada se koriste 1,2 mM acetofenon i 50 mM izopropilamin kao supstrati. Enzim ima široku supstratnu specifičnost, ali preferira aromatične (*S*)-amino donore kao što su (*S*)- α -benziletilamin ili (*S*)-1-aminoindan i keto jedinjenja kao što su gliksilat ili piruvat.^[162]

2.4.2. Mehanizam reakcije katalizovane transaminazama

Transaminaze prate ping-pong bi-bi reakcioni mehanizam koji se zasniva na dve polu-reakcije čiji je finalni ishod transfer amino grupe na keto jedinjenja. Kao što je prethodno bilo reči u segmentu o strukturi transaminaza, PLP gradi Šifovu bazu (unutrašnji aldimin) sa ϵ -amino grupom katalitičkog lizina. Tokom prve polu-reakcije dolazi do reakcije amino donora sa unutrašnjim aldiminom i do formiranja spoljašnjeg aldimina između amino donora i PLP-a. Katalitički lizin se u tom trenutku nalazi u slobodnoj formi i može izvršiti deprotonovanje spoljašnjeg aldimina. Da bi do ovoga došlo,

proton mora biti pozicioniran vertikalno u odnosu na π -sistem spoljašnjeg aldimina. Tada dolazi do formiranja planarnog hinonoida, koji potom deprotonuje katalitički lizin, nakon čega nastaje intermedijer poznat kao ketimin i molekul postaje podložan hidrolizi. Nakon toga dolazi do nukleofilnog napada od strane molekula vode na formirani ketimin, oslobađanja prvog proizvoda (keto produkt nastao od amino donora) i formiranja piridoksamin-5'-fosfata (PMP). Tokom druge polu-reakcije, koja je suštinski obrnuta prvoj, amino akceptor reaguje sa PMP-om prilikom čega dolazi do oslobađanja molekula vode i formiranja novog ketimina. Nakon apstrakcije protona od strane katalitičkog lizina formira se novi planarni hinonoid, nakon njega unutrašnji aldimin, a zatim se ciklus kompletira oslobađanjem amino proizvoda i regeneracijom PLP-a u formi unutrašnjeg aldimina.^[10, 145, 152, 162, 165, 166] Korak koji ograničava brzinu reakcije je deprotonovanje unutrašnjeg aldimina, sa energetsom barijerom od 19,3 kcal/mol, a koji, kao što je rečeno rezultuje formiranjem planarnog hinonoida.^[145, 165]



Slika 14. Šematski prikaz polu-reakcije katalizovane transaminazama. Kao primer za donora amino grupe dat je alanin koji se konvertuje u piruvat, dok se PLP konvertuje u PMP. Slika je kreirana upotrebom ChemDraw programa.

Tokom katalize interakcija između enzima i kofaktora se zasniva na hidrofobnom pakovanju prstena PLP-a u džepu okruženom aromatičnim i drugim nepolarnim grupama, kao i na elektrostatičnoj interakciji između atoma azota piridinijuma i konzerviranog aspartata ili glutamata u enzimu i vezivanjem fosfatne gupe PLP-a u takozvanu fosfatnu "šolju".^[152]

2.4.3. Enzimski eseji za visokoefikasnu pretragu novih varijanti transaminaza i određivanje supstratne specifičnosti

Do danas su razvijeni brojni enzimski eseji za detekciju novih varijanti transaminaza, njihove supstratne specifičnosti i visokoefikasnu pretragu mutiranih enzimskih varijanti. Kriterijumi koje treba da ispuni određeni esej su: niski troškovi izvođenja, efikasnost, brzina, osetljivost i reproducibilnost.^[148] Ugrubo se eseji za skeniranje aktivnosti transaminaza mogu podeliti na eseje u tečnoj fazi i eseje na čvrstoj podlozi. Prvi pristupi u skeniranju transaminaza zasnivali su se na detekciji aminokiselina kao prirodnih proizvoda reakcije transaminacije kapilarnom elektroforezom, jonoizmenjivačkom hromatografijom ili direktnom spektrofotometrijskom detekcijom nastalog proizvoda.^[10] Jedan od prvih eseja za visokoefikasnu pretragu transaminaza zasnivao se na praćenju formiranja obojenog kompleksa između jona Cu(II) i α -aminokiselina na 595 nm,^[167] koji je zatim modifikovan prilikom karakterizacije glutamat-piruvat transaminaze praćenjem gašenja fluorescencije goveđeg serum albumina na 340 nm nakon njegove interakcije sa jonima Cu(II) oslobođenim iz kompleksa Cu(II)-alanin.^[168] Upotrebom (S)- ili (R)-MBA i piruvata Schatzle i saradnici su razvili brz kinetički esej zasnovan na merenju produkovanog acetofenona na 245 nm.^[169] Aktivnost transaminaza može se pratiti na osnovu promena u fizičkim karakteristikama reakcionog sistema, kao što je na primer praćenje promene pH dodavanjem indikatorske boje u reakciji u kojoj je aktivnost transaminaze kuplovana sa laktat i glukozo dehidrogenazom^[170] ili praćenjem promene konduktiviteta reakcionog medijuma,^[171] što predstavlja još jedan esej razvijen od strane Schatle-a i saradnika. Jedan od najčešće korišćenih eseja zasniva se na polimerizaciji reaktivnih izoidnolskih intermedijera O-kxililendiamina tokom reakcije i formiranju crnog precipitata.^[172] Derivati (S)-2 aminotetralina se takođe mogu upotrebljavati za skeniranje transaminaza, s obzirom na to da se tokom reakcije konvertuju u odgovarajuće derivate 2-tetralona koji postaju obojeni nakon izlaganja vazduhu.^[173] Upotrebom piruvata kao akceptora amino grupe i 2-(4 nitrofenil)etan-1-amina razvijen je spektrofotometrijski esej baziran na formiranju enamina u formi crvenog precipitata pri čemu se reakcija stopira dodatkom DMSO-a koji rastvara precipitat i održava boju postojanom (merenje apsorbance na 465 nm).^[174] Nove varijante enzima i amino donora mogu se skenirati kuplovanjem reakcije transaminacije sa aktivnošću aminokiselinske oksidaze koja deaminuje nastali alanin (piruvat se koristi kao akceptor amino grupe), pri čemu se proizvodi vodonik peroksid čija se koncentracija može odrediti upotrebom peroksidaze rena i boje pirogalol crvene (meri se apsorbancu na 540 nm).^[175] Za skeniranje kolonija na čvrstoj podlozi razvijena je modifikovana verzija ovog eseja koja se bazira na oksidaciji 3,3'-diaminobenzidina (DAB) od strane peroksidaze rena u prisustvu H₂O₂ da bi se formirao lokalizovan crvenkasto-braon talog.^[176] Bornscheuer i saradnici su razvili esej prema sličnom principu, koji se bazira na upotrebi glicin oksidaze i glioksilata kao akceptora amino grupe.^[177] Prilikom skeniranja 2-hidroksil ketona može se primejivati esej baziran na kuplovanju aktivnosti dehidrogenaze aminokiselina sa transaminaznom aktivnošću i upotrebi tetrazolijumovih soli koje u prisustvu datih ketona formiraju talog, pri čemu bezbojni rastvori postaju crveni.^[178] Kada su u pitanju eseji bazirani na merenju fluorescencije nastalog proizvoda dva tipa eseja su u opticaju. Jedan se zasniva na konverziji 1-(6-metoksinaft-2-il)alkilamina u acetonafton, čija se fluorescencija može meriti na 450 nm,^[179] a drugi na fluorescenciji 2-acetil-6-aminonaftalena formiranog nakon transaminacije 6-amino- α -metil-2-naftalenmetanamina (ekscitacija 310 nm, emisija 460 nm).^[180]

2.4.4. Značaj i upotreba omega transaminaza

2.4.4.1. pristupi u sintezi posredovanoj ω -transaminazama, ograničenja i metode za prevazilaženje

U sintezi enantiočistih amina baziranoj na katalizi transaminazama možemo razlikovati tri pristupa, a to su: a) kinetička rezolucija racemskih amina, b) asimetrična sinteza počevši od prohiralnog ketona i c) deracemizacija racemskih amina.^[181]

Prednost asimetrične sinteze ogleda se u tome što je maksimalni teorijski prinos reakcije 100%, za razliku od kinetičke rezolucije gde je maksimalni prinos reakcije 50% i koja je sa te strane ekonomski neisplativija. Da bi se omogućila potpuna konverzija racemata, razvijena je poboljšana varijanta ovog procesa poznata kao dinamička kinetička rezolucija, a podrazumeva konverziju neizreagovalog izomera nazad u racemat, čime se omogućava novi krug rezolucije i proizvodnja željenog enantiomera u prinosu od 100%.^[21]

U izvođenju obe metode postavlja se nekoliko izazova koji se odnose na nepovoljnu termodinamičku ravnotežu, inhibiciju enzima supstratom ili proizvodom i uzak opeg supstrata koji su u upotrebi, i pa je potrebno dodatno prilagoditi procese sinteze zahtevima industrije. Da bi se poboljšala efikasnost reakcija transaminacije razvijeno je nekoliko strategija koje uključuju: a) uklanjanje i/ili recikliranje proizvoda koji ihira ezim putem fizičkog procesa (ekstrakcija inhibitornog proizvoda upotrebom membranskih reaktora, ekstrakcija upotrebom ko-rastvarača u dvofaznom sistemu, evaporacija isparljivog ko-proizvoda ili precipitacija nerastvornog ko-proizvoda) ili hemoenzimske kaskade b) autodegradaciju proizvoda nastalih iz žrtvovanih ko-supstrata i c) upotrebu donora amina u velikom višku da bi se pomerila ravnoteža reakcije ka proizvodima.^[10]

Nedostatak kinetičke rezolucije uglavnom se odnosi na podložnost procesa inhibiciji kako supstratom tako i proizvodom, dok su nepovoljna termodinamička ravnoteža i niska reaktivnost ketona nedostaci asimetrične sinteze.^[10]

Za prevazilaženje ograničenja nastalih kao posledica inhibicije enzima supstratom kao što je na primer piruvat, koji se često koristi kao akceptor amino grupe, ili inhibicije proizvodom (nastalim ketonom), razvijena su dva pristupa koja podrazumevaju ili uklanjanje formiranog ketona ili održavanje koncentracije piruvata niskom što se obezbeđuje recikliranjem piruvata od alanina koji nastaje kao ko-proizvod.^[182]

S obzirom na razliku u polarnosti amina i ketona, razvijene su metode kao što je ekstrakcija korišćenjem dvofaznih reakcionih sistema, bilo tečnost-čvrsta ili tečnost-tečnost, za kontinuirano uklanjanje ketonskih proizvoda ali je metoda ograničena denaturacijom enzima u organskom okruženju i malom razlikom između supstrata i proizvoda. Ukoliko se koristi ovakav sistem da bi se izbegla denaturacija enzima može se primeniti stabilizacija imobilizacijom, upotreba reaktora sa enzimskom membranom ili reaktora sa punim slojem.^[181] Pored navedenih fizičkih metoda može se izvršiti i redukcija ketona do alkohola upotrebom multienzimskog sistema, kao što je kombinacija ω -TA, alkohol dehidrogenaze (ADH) i na primer glukoza dehidrogenaze za recikliranje kofaktora NAD(P)H koji je potreban za aktivnost alkohol dehidrogenaze.^[182]

Ukoliko se piruvat koristi kao akceptor amino grupe, za njegovo recikliranje mogu se upotrebiti multienzimski sistemi kao što je na primer kombinacija ω -TA i α -TA ako se piruvat reciklira transferovanjem amino grupe sa alanina na drugu keto-kiselinu, pri čemu se proizvodi nova aminokiselina, ili kombinacija ω -TA i oksidaze aminokiselina, koja reciklira alanin u piruvat na račun molekulskog kiseonika.^[182]

Kada je u pitanju efektivna asimetrična sinteza počevši od prohiralnog ketona možemo razlikovati dve grupe metoda, a to su: a) upotreba amino donora u višku i b) uklanjanje nastalog ko-produkta. Postoji više tehnika za uklanjanje ko-produkta, a one se mogu podeliti na: a) uklanjanje pod sniženim pritiskom, b) degradaciju ko-produkta i c) recikliranje amino donora.^[182] Jedan od primera upotrebe fizičke ekstrakcije, odnosno vaporizacije, za uklanjanje nastalih ketona i na taj način pomeranje ravnoteže reverzibilne reakcije ka stvaranju proizvoda jeste prilikom korišćenja izopropilamina kao donora amino grupe, koji je identifikovan kao industrijski izbor, jer je lako dostupan i ekonomski isplativ, a njegov proizvod acetone je isparljiv i lako se može ukloniti pod sniženim pritiskom.^[181]

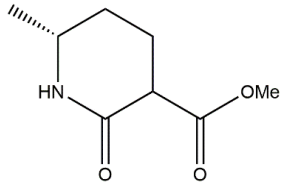
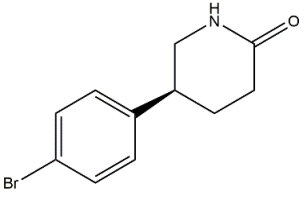
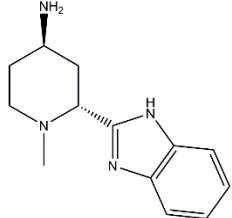
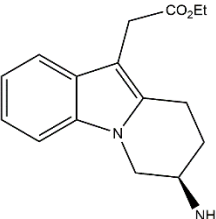
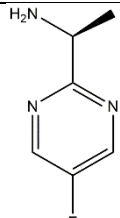
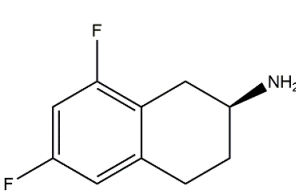
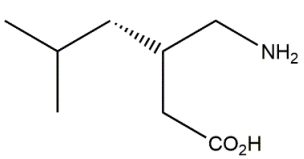
Ukoliko se kao donor amino grupe koristi alanin, koji je prirodni supstat velikog broja transaminaza, kao ko-proizvod reakcije nastaje piruvat, koji, kao što je pomenuto, može inhibirati enzim, pa se iz tog razloga mora ukloniti iz sistema ili reciklirati nazad u alanin. Ukoliko se u ove svrhe upotrebljavaju multienzimski sistemi, potrebno je uskladiti optimalne uslove za rad različitih enzima bez uticaja na aktivnost i selektivnost.^[10] Jedan od sistema koji je najčešće u upotrebi za uklanjanje nastalog piruvata je njegova konverzija do laktata primenom laktat dehidrogenaze, u kombinaciji sa glukozo dehidrogenazom, koja na račun oksidacije glukoze reciklira NADH.^[10, 183, 184] Pored redukcije piruvata do laktata može se upotrebiti i enzim piruvat dekarboksilaza, čijom aktivnošću od piruvata nastaju acetaldehid i CO₂, bez potrebe za recikliranjem kofaktora, što je prednost u odnosu na upotrebu laktat dehidrogenaze. Usled generisanja CO₂ ravnoteža reakcije se nepovratno pomera ka proizvodima.^[21, 182] Kao neželjeni produkt može se javiti aminoetan ukoliko dođe do aminacije acetaldehida od strane ω -TA, što dovodi do potrošnje amino donora.^[182] Ovaj način uklanjanja piruvata iz reakcionog sistema uspešno je primenjen prilikom sinteze različitih 3-aminopirrolidina i piperidina.^[185] Upotrebom alanin dehidrogenaze nastali piruvat može se reciklirati nazad do alanina, a kofaktor se zatim regenerisati primenom format ili glukozo dehidrogenaze.^[10] Kombinacijom alanin racemaze sa alanin dehidrogenazom piruvat se može reciklirati do L-alanina, koji se zatim konvertuje u racemski alanin, čime se od L-alanina dobija D-alanin, koji je skuplji i nakon toga se može upotrebiti za aminaciju katalizovanu (R)- ω -TA.^[186] Još jedna od tehnika za uklanjanje piruvata je primena enzima acetolaktat sintaze, koja uklanja dva molekula piruvata i nakon dekarboksilacije se formira acetoin. S obzirom na to da i u ovom slučaju dolazi do formiranja CO₂, ravnoteža reakcije je nepovratno pomerena ka proizvodima.^[182]

Iako su izopropilamin i alanin najčešće upotrebljavani donori amino grupe u asimetričnoj sintezi posredovanoj ω -TA, postoji potreba za pronalaženjem novih reaktivnijih donora koji će dovesti do pomeranja ravnoteže ka proizvodima reakcije i smanjenja utroška donora u biokatalizi. U skorije vreme otkriveni su diaminski donori, kao što je ksililendiamin koji se konvertuje u amino aldehid koji potom podleže intramolekularnoj ciklizaciji, a zatim tautomerizaciji u izoidnol, čijom se polimerizacijom formira precipitat i lako se može ukloniti iz reakcije precipitacijom.^[181]

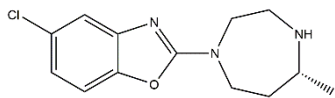
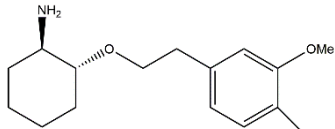
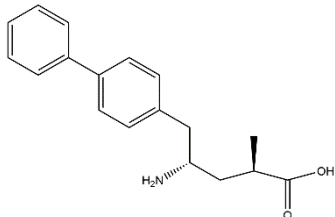
2.4.4.2. Upotreba transaminaza divljeg soja i enzima modifikovanih primenom proteinskog inženjeringa

Transaminaze, divlji tipovi enzima, kao i varijante modifikovane proteinskim inženjeringom, imaju široku upotrebu u sintezi farmaceutski aktivnih sastojaka ili njihovih intermedijera. Struktura i primena nekih od ovih jedinjenja, kao što su sitagliptin, sakubitril, suvoreksant, vernakalant i rivastigmin su već pomenuta, dok je detaljniji pregled određenih aspekata njihove sinteze i sinteze još nekih intermedijera farmaceutski aktivnih sastojaka prikazan u tabeli 1.

Tabela 1. Aktivne farmaceutske supstance i intermedijeri sintetisani primenom transaminaza.¹

	Naziv	Proizvod transaminacije	Prinos/optička čistoća	Enzim	Primena	Ref
1	Filoreksant (MK-6096)		5,5 kg; 74% 99%	ATA-117	Tretman nesanice	[187]
2	Niraparib		84 g; 84% >99%	TA-302	Tretman kancera	[188]
3	SMO inhibitor		5,85 g; 85% >99%	ATA-036	Tretman kancera	[189]
4	MK-7246		2,3 g; 76% >99%	CDX-017	Tretman respiratornih bolesti	[190]
5	AZD1480		451 g; 79% >99%	<i>Vibrio fluvialis</i> ω-TA	Tretman idiopatske mijelofibroze	[191]
6	Inhibitor gama-sekretaze		31 kg; 94% 99,3%	ATA-47	Tretman Alchajmerove bolesti	[192]
7	Pregabalin		1,5 g; 61% 99,8%	/	Tretman epilepsije, fibromijalgija	[193]

¹ Strukture su kreirane upotrebom ChemDraw programa.

8	Suvoreksant		7,08 g; 62% >99%	CDX-017	Tretman nesanice	[194]
9	Vernakalant		46 g; 81% 99,5%	ATA-303	Antiaritmik	[122]
10	Sakubitril		3,6 kg; 89%	CDX-043	Tretman hipertenzije	[195]

2.4.4.3. Uticaj imobilizacije na aktivnost i stabilnost transaminaza

O metodama i pozitivnim stranama imobilizacije u širem smislu bilo je reči u segmentu 2.1.2.2. U okviru ovog segmenta biće detaljnije opisani neki od primera kako imobilizacija utiče na aktivnost i stabilnost transaminaza, dok će o nekima biti reč u okviru rezultata i diskusije. Transaminaze su imobilizovane u potpuno ili delimično prečišćenoj formi, kao i u formi celih ćelija, na različitim tipovima nosača, kao što su magnetne PVA-Fe₃O₄ nanočestice,^[196] 2d zeoliti,^[197] hitozan,^[198] nanovlakna od MnO₂,^[199] polimerne smole,^[200] neorganski nanocvetovi,^[201] funkcionalizovana celuloza,^[202] različiti sol-gel matriksi^[203] i aminske kuglice.^[12]

U okviru jednog od istraživanja uticaja imobilizacije na osobine transaminaze poreklom iz *Chromobacterium violaceum* (koja predstavlja jedan od predmeta istraživanja ove doktorske disertacije), nakon ekspresije u *E. coli* Rosetta (DE3) ćelijama enzim je imobilizovan na magnetnim mezoporoznim silikatnim nanocvetovima funkcionalizovanim sa Ni-NTA (Ni-NTA/MMS-NF), čime je omogućeno istovremena imobilizacija i prečišćavanje enzima iz ćelijskog lizata. Magnetni mezoporozni silikati poseduju niz poželjnih karakteristika kao što je biokompatibilnost, velika specifična površina, lako odvajanje enzima iz reakcione smeše i druge. Nakon karakterizacije rastvornog i imobilizovanog enzima pokazano je da ne postoji razlika u temperaturnom optimumu između slobodne i imobilizovane transaminaze, dok je kod imobilizovane forme došlo do pomeranja pH optimuma na 7,0 u odnosu na slobodnu formu koja je maksimalnu aktivnost ispoljila na pH 7,5. Pomeranje pH optimuma na višu ili nižu vrednost može biti povezano sa površinskim naelektrisanjem nosača za imobilizaciju, odnosno nejednake raspodele H⁺ i OH⁻ jona u mikrokruženju imobilizovanog u odnosu na enzim u rastvoru usled ostvarenih elektrostatičkih interakcija sa podlogom. Da bi se ispitala temperaturna stabilnost enzim je inkubiran na 50 °C i 60 °C u različitim vremenskim intervalima i uočeno je da nakon 1 h inkubacije na ovim temperaturama dolazi do povećanja aktivnosti enzima, verovatno kao posledica temperaturno indukovano uvijanja transaminaza u njihovu prirodnu konformaciju. Sa produženjem vremena inkubacije imobilizovani enzim je ispoljio bolju temperaturnu stabilnost od slobodne forme, odnosno nakon 4 h inkubacije na 60 °C imobilizovani enzim je ispoljio 112% početne aktivnosti, dok je rastvorni enzim zadržao samo 34% aktivnosti. Afinitetno vezivanje između matriksa i transaminaze koja sadrži His-tag čini enzim

manje fleksibilnim za konformacione promene, čime se sprečava termalna denaturacija enzima. Kada je u pitanju pH stabilnost, nakon 5 h inkubacije na pH 4,0 enzim u rastvoru je zadržao samo 11,81% početne aktivnosti, dok je imobilizovani enzim zadržao 44,35% početne aktivnosti. Nakon inkubacije na pH 10,0 u isto vremenskom intervalu, imobilizovani enzim je zadržao 71,83% početne aktivnosti, dok je slobodna forma enzima zadržala 23,71% početne aktivnosti. Imobilizovani enzim je takođe pokazao veću stabilnost prilikom skladištenja, odnosno nakon 15 dana inkubacije na 4 °C imobilizovani enzim je zadržao 85,15% početne aktivnosti, dok je slobodna forma enzima zadržala 53,06% početne aktivnosti. Pored uticaja na stabilizaciju konformacije enzima imobilizacija može sprečiti autolizu enzima do određene mere. Enzimski preparat Cv-TA imobilizovane na Ni-NTA/MMS-NF je uspešno upotrebljen u 12 reakcionih ciklusa koverzije (*S*)-MBA u acetofenon uz upotrebu piruvata kao akceptora amino grupe. Imobilizovani enzim zadržao je 67,38% početne aktivnosti pokazujući odličan potencijal za višestruku upotrebu.^[201]

Modifikovana forma ω -transaminaze iz *Chromobacterium violaceum* CvTAW60C imobilizovana je na aminoalkilnim polimerima (etilamin-EA i heksilamin-HA) aktiviranim hidrofilnim glicerol diglicidil etrom (GD) i primenjena u kinetičkoj rezoluciji 4-fenil-2-butanamina. Zaostali (*R*)-enantiomer nakon reakcije transaminacije predstavlja gradivni blok antihipertenziva dilevalola. Povećanje dužine i hidrofobnosti linkera, upotrebom 1,6-heksandiol diglicidil etra za aktivaciju matriksa, dovodilo je do blagog opadanja stepena konverzije, dok je dalja modifikacija linkera cikloheksilnim prstenovima izazvala dalji pad aktivnosti enzima. Nakon što su nađeni optimalni nosači za imobilizaciju CvTAW60C (EAGD i HAGD) i optimizovani uslovi za kinetičku rezoluciju 4-fenil-2-butanamina, ispitana je mogućnost višestruke upotrebe enzima. Nakon svakog ciklusa preparati enzima su ispirani HEPES puferom i centrifugirani, a pre sledećeg ciklusa imobilizatima je dodat PLP da bi se omogućilo formiranje kompleksa PLP-enzim. Izvedeno je 19 konsekutivnih ciklusa u trajanju od po 1 sat uz zadržavanje početne aktivnosti i selektivnosti enzima. Kao najaktivniji biokatalizator pokazao se preparat enzima imobilizovan na EAGD matriksu, na kom je potom ispitana stabilnost u medijumu koji je sadržao DMSO u različitim koncentracijama (0-50%). Divlji tip transaminaze iz *Chromobacterium violaceum* pokazao je određeni stepen stabilnosti u prisustvu 50% DMSO-a, ali je iznad 30% organskog rastvarača primećen značajan stepen inaktivacije enzima. Imobilizovana mutirana forma enzima je zadržala maksimalnu aktivnost i enantiomernu selektivnost do 50% koncentracije DMSO-a, što je posledica stabilizacije tercijerne strukture enzima usled višestrukog kovalentnog vezivanja za imobilizacioni matriks.^[204]

Polimerni materijali su u principu ekonomski pristupačni, ali mana im je ograničena površina za imobilizaciju enzima. Kao dobra alternativa pokazalo se staklo kontrolisane veličine pora (*engl.* controlled-pore glass (CPG)) koje ima poroznu strukturu, veću površinu za imobilizaciju i omogućava efikasan transfer mase između pora. (*R*)-selektivna ω -transaminaza iz *Arthrobacter sp.* (AsR) eksprimirana u *E. coli* sa His-tagom na C-terminusu imobilizovana je na hibridnom CPG-u (EziG) obloženom funkcionalizovanim polimerom koji nosi helirajuće grupe pogodne za vezivanje metalnih jona (Fe^{3+}). Kapacitet za vezivanje enzima na EziG matriksu iznosi do 30% (w/w) i usled selektivnosti vezivanja omogućena je imobilizacija enzima direktno iz ćelijskog lizata. U mnogim slučajevima na nosačima za imobilizaciju na kojima se može imobilizovati velika količina enzima može doći do smanjenja enzimске stabilnosti usled gomilanja enzima, ali ovaj fenomen nije primećen ni u jednom slučaju gde je imobilizacija rađena na EziG nosačima. U inicijalnim eksperimentima imobilizacija enzima rađena je na tri tipa EziG nosača: EziG¹ (Fe-Opal), obložen hidrofilnom derivatizovanom silikatnom površinom; EziG² (Fe-Coral), obložen hidrofobnim površinskim polimerom; i EziG³ (Fe-Amber) koji je obložen poluhidrofobnom polimernom površinom. Optimalni prinos imobilizacije enzima postignut je primenom EziG³ nosača.

Određena količina EziG³-AsR (10 mg) je korišćena u 16 ponovljenih ciklusa kinetičke rezolucije *rac*- α -MBA (100 mM) uz upotrebu piruvata kao akceptora amino grupe (50 mM). Svaki ciklus je

trajao 15 minuta. Prilikom postavljanja novog ciklusa dodavana je sveža količina PLP-a, što se pokazalo pogodnim za održavanje katalitičke aktivnosti, s obzirom na to da je procenat konverzije u uporednom eksperimentu bez dodatka dodatne količine PLP-a padao za otprilike 3% po ciklusu.

Sistem je opробan i u protočnom reaktoru, gde je 15 mg AsR- ω TA imobilizovano u čeličnoj koloni napunjenoj sa EziG³ matriksom, a zatim je dobijeni imobilizat primenjen pri konstantnom protoku u kinetičkoj rezoluciji *rac*- α -MBA. Reakciona smeša je propušćana kroz kolonu uz pomoć pumpe, a sakupljeni uzorci su analizirani gasnom hromatografijom. Konverzija je trajala 96 časova bez gubitka katalitičke aktivnosti i uz održanje enantioselektivnosti (>49% konverzije i >99% enantiomernog viška neizreagovalog (*S*)- α -MBA).^[11] Uzimajući u obzir stabilnost na ovaj način napravljenog enzimskog preparata u organskim rastvaračima, dobijeni imobilizat je opробan u procesu međusobno povezane kinetičko asimetrične transformacije u čistom organskom rastvaraču (toluen). Ovo podrazumeva kombinovanje dve reakcije u jednom potezu na antiparalelan način. Jedan, ili dva enzima koji rade u tandemu konvertuju dva supstrata u dva ili više korisnih proizvoda putem unutrašnjeg recikliranja kofaktora. Upotreba čistog organskog rastvarača je ključna za primenu ovog koncepta jer omogućava odgovarajuće podešavanje termodinamičke ravnoteže između dve antiparalelne reakcije.^[205]

Među raznim materijalima koji se mogu koristiti za imobilizaciju enzima, silicijum je posebno atraktivan jer je hemijski inertan, netoksičan, ekonomski pristupačan i njegova površina se može lako funkcionalizovati da bi se omogućilo vezivanje enzima. Komercijalna ω -transaminaza (ATA-117, koju je kreirala kompanija *Codexis*), mutirana varijanta enzima poreklom iz *Arthrobacter sp.*, imobilizovana je na Si(HIPE) nosaču (*engl.* “High Internal Phase Emulsion”) primenom tri različite metode.

U metodi (a) rastvor enzima (0,2 g/L) je ostavljen da teče kroz monolit silicijum dioksida i enzim je imobilizovan fizičkom adsorpcijom. Spoljna površina ATA-117 je negativno naelektrisana pri pH 8,0, optimalno radno pH, pa je u metodi (b) silicijum-dioksid funkcionalizovan APTES-om ((3 aminopropil)trietoksisilan) da bi se nosač modifikovao amino grupama koje su pozitivno naelektrisane pri pH 8,0. Adsorpcija enzima je potpomognuta elektrostatičkim interakcijama. Početna količina APTES-a uneta u pripremu nosača je varirana pa su dobijeni katalizatori označeni kao „TA-Ak“, gde A označava APTES, a k je koncentracija APTES-a koja je korišćena za funkcionalizaciju matriksa. I finalno u metodi (c) je iskorišćena karakteristika ATA-117 da na svojoj površini sadrži šest ostataka lizina, pa je glutaraldehid dodat da bi se omogućilo kovalentno vezivanje enzima za nosač funkcionalizovan APTES-om.

Kinetička rezolucija racemskog bromo- α -metilbenzilamina (*rac*-BMBA) u 4'-bromoacetofenon (BAP) je iskorišćena kao model reakcije transaminacije da bi se odredio učinak dobijenih biokatalizatora. Termodinamička ravnoteža za ovu reakciju je veoma povoljna, sa očekivanom konverzijom od ~99% u ravnoteži. Međutim, bez prisustva katalizatora, ova konverzija je veoma spora. Kao najpotentniji biokatalizator pokazao se imobilizat TA-A50-GA, čije su mogućnost višestruke upotrebe i stabilnost prilikom skladištenja testirani. Reakcija je testirana u protočnom reaktoru u periodu od 4 časa. Reaktor je zatvoren na oba kraja i temperatura u reaktoru je održavana na 4 °C tokom 16 h. Zatim je reakcija ponovljena sa svežim reakcionim medijumom. Prinos je bio praktično isti kao pre izlaganja niskoj temperaturi (~5,5% umesto ~6%). Posle 5 h reakcije, reaktor je ponovo uklonjen, zatvoren i čuvan na 4 °C u period od 68 h. Zatim je ponovo testiran sa svežim reakcionim medijumom i konačni prinos je još uvek bio ~4,7%, dakle rezidualna aktivnost jr bila 80% nakon četiri dana skladištenja a hladno, što ukazuje na dobru stabilnost na niskoj temperaturi i mogućnost recikliranja biokatalizatora.^[206]

Ko-imobilizacijom enzima u multienzimskim reakcijama postiže se njihovo međusobno približavanje, čime se smanjuje difuziona distanca supstrata između enzima i povećava brzina reakcije.^[207]

R- ω -transaminaza (RTA) i oksidaza D-aminokiselina (*engl.* D-amino acid oxidase; DAAO) su genetski modifikovane tako da im je dodat fuzioni tag (polipeptid sličan elastinu) sa ciljem pojednostavljenja prečišćavanja proteina. Proizvedeni enzimi su imobilizovani na vlaknima od MnO₂ obloženim polidopaminom i aktiviranim glutaraldehidom. U ovom slučaju je iskorišćena osobina MnO₂ da, pored toga što predstavlja nosač za imobilizaciju, imitira aktivnost katalaze, odnosno da dovodi do dekompozicije H₂O₂ na O₂ i H₂O. Imobilizovani enzimi ELP-RTA/MnO₂-PDA i ELP-DAAO/MnO₂-PDA korišćeni su u transformaciji (*R*)-1-feniletilamina, uz upotrebu relativno male količine piruvata (0,5 mM) poređenju sa (*R*)-1-feniletilaminom (5 mM). Postavljena je kontrolna reakcija korišćenjem ELP-*R*- ω -transaminaze (ELP-RTA), gde je postignut procenat konverzije od samo 9,6 $\pm$ 0,3%, što je maksimalna konverzija koja se može postići bez recikliranja akceptora amina pri ovim reakcionim uslovima. Procenat konverzije (*R*)-MBA kada je reakcija katalizovana sa dva slobodna enzima bio je 69,6 $\pm$ 1,2% posle 11 h. Prilikom katalize imobilizovanim enzimima postignuta je stopa konverzije od 98 $\pm$ 1,8% posle 11 h. Stopa konverzije prilikom upotrebe slobodnih mešanih enzima se smanjila nakon 5 h usled nemogućnosti razgradnje H₂O₂. Nasuprot tome, stopa konverzije prilikom upotrebe imobilizovanih enzima je neznatno smanjena nakon 5 h, zbog razlaganja H₂O₂ pomoću MnO₂ nanovlakana. Nakon 5 ciklusa ponovne upotrebe imobilizovanih enzima zadržano je 87,35 $\pm$ 2,16% enzimске aktivnosti, čime je pokazana stabilnost na ovaj način pripremljenih enzimskih preparata. Upotrebom DAAO ko-proizvod reakcije transaminacije D-alanin je konvertovan nazad u piruvat, a H₂O₂ koji je nastao u ovoj reakciji je razgrađen aktivnošću MnO₂, prilikom čega je formiran molekulski kiseonik koji je iskorišćen za oksidaciju redukovanog kofaktora potrebnog za aktivnost DAAO. Ovako postavljen sistem omogućio je povećanje stepena i brzine konverzije (*R*)-MBA.^[199]

U okviru istraživanja Heinks-a i saradnika ispitan je uticaj ko-imobilizacije (*S*)-selektivne transaminaze iz *Vibrio fluvialis* (ATA-*Vfl*), oksidaze L-aminokiselina iz *Hebeloma cylindrosporum* (hcLAAO4) i humane katalaze (hCAT) na proces kinetičke rezolucije racemskih amina na primeru *rac*-MBA upotrebom L-norleucina kao ko-supstrata. Enzimi su imobilizovani na tri različita tipa nosača koji na površini sadrže amino (HA-kuglice), epoksi (EP-kuglice) ili amino grupe funkcionalizovane glutaraldehidom (HA_{GA}-kuglice). Upotrebom EP- i HA_{GA}-kuglica postiže se višestruka kovalentna imobilizacija, dok se upotrebom HA-kuglica postiže mesto specifična imobilizacija enzima koji sadrže aldehidni tag. Upoređen je uticaj imobilizacije pojedinačnih enzima i ko-imobilizacije na stepen konverzije *rac*-MBA. Ko-imobilizacijom enzima postignuta je veća početna brzina konverzije i potpuna konverzija je postignuta za kraće vreme u odnosu na pojedinačno imobilizovane enzime. Imobilizacijom enzima na HA_{GA}-kuglicama postignuta je veća početna brzina reakcije, što je ukazalo na veću specifičnu aktivnost ovog tipa imobilizata. Kada su korišćeni rastvorni enzimi pokazano je da hCAT ne uklanja efikasno formirani H₂O₂, čime se ne postiže dovoljan stepen recikliranja α -keto kiseline i dolazi do prekida reakcije kada je koncentracija ko-supstrata manja od 1 mol%. Imobilizacijom enzima pojedinačno uz upotrebu samo 0,1 mol% ko-supstrata postignut je nešto veći stepen konverzije *rac*-amina (35%), ali je obrazac katalize bio sličan kao kod rastvornih enzima. Sa druge strane upotrebom ko-imobilizovanih enzima postignuta je potpuna konverzija (50%) nakon 15 časova, indukujući efikasnije uklanjanje H₂O₂ usled kraće difuzione distance supstrata između enzima i samim tim efikasno recikliranje ko-supstrata. Pored kraće difuzione distance, dobijeni rezultati se pripisuju i stabilizaciji hCAT usled imobilizacije, obično na to da enzim ima tendenciju taloženja u rastvornoj formi i indukuje taloženje i drugih enzima. Razvojem ovog sistema postignuto je smanjenje početne koncentracije ko-supstrata, čime se smanjuju troškovi procesa i povećava efikasnost istog.

Da bi se ispitalo da li se imobilizovana kaskada može ponovo koristiti više od tri puta, izvedeno je 12 ponovljenih ciklusa kinetičke rezolucije 15 mM *rac*-MBA. Procenat konverzije svakog ciklusa je praćen nakon određenog vremenskog perioda (3 h), a aktivnost svakog enzima je određena posebno nakon svakog trećeg ciklusa. Efikasnost kaskade se smanjivala sa svakim ciklusom, završavajući se smanjenom konverzijom od 6% u ciklusu 12 u poređenju sa 37% u ciklusu 1. Utvrđeno je da je ATA-*Vfl* bila razlog smanjene efikasnosti, jer se aktivnost ATA-*Vfl* brzo smanjivala (29% aktivnosti je zadržano nakon 3 ciklusa), dok je aktivnost hCAT-a održana, a aktivnost hLAAO4 čak je porasla (142% relativne aktivnosti nakon 3 ciklusa). Mutirana varijanta transaminaze ATA-*Vfl*-8M je korišćena u ko-imobilizovanoj enzimskoj kaskadi za proizvodnju (*R*)-1-(3-etoksi-4-metoksifenil)-2-(metilsulfonyl)etanamina, intermedijera apremilasta koji se koristi u tretmanu psorijaze.^[207]

2.4.4.4. Transaminaze izolovane iz ekstremofila

O prednostima upotrebe enzima izolovanih iz ekstremofilnih organizama već je bilo reči u okviru segmenta 2.1.2.1., a kada se radi o transaminaza izolovanim iz ekstremofila postoji veći broj publikacija u kojima su pokazane superiorne osobine ovih enzima u odnosu na njihove mezofilne analoge. Jedan od primera predstavlja izolovanje i karakterizacija pretpostavljene termostabilne transaminaze iz *Chloroflexi bacterium* (CbTA) od strane Wang-a i saradnika, koji su primenom NCBI BLAST platforme upotrebom ArRMut11 i amin transaminaze iz *Aspergillus terreus* NIH2624 kao templatata identifikovali pomenuti enzim, uklonili ga u *E. coli* i nakon ekspresije odredili kinetičke parametre i supstratnu specifičnost. U lizatu ćelija, izmerena je aktivnost enzima od 0,91 U/mg. Optimalna vrednost pH za rad enzima bila je na 8,5, što je slično drugim poznatim transaminazama, maksimalnu aktivnost na temperaturi od 45 °C, dobru termalnu stabilnost uz povećanje aktivnosti prilikom produženja vremena inkubacije na 45 °C i zadržao je 50% aktivnosti nakon 12 h inkubacije na 55 °C. Pored toga enzim je zadržao aktivnost u prisustvu 20-40% metanola, etanola, DMSO-a i acetonitrila, dok je tek pri dodatku 60% organskih rastvarača aktivnost enzima opala. Nakon poređenja sekvenci pokazano je da je sličnost u sekvenci sa drugim okarakterisanim transaminazama manja od 40%, ali da su ostaci aminokiselina nužni za funkcionalnost (Arg86, Lys188 i Glu221) konzervirani.^[208] Iz umereno halofilne bakterije *Halomonas elongata* uklonirana je i eksprimirana pretpostavljena amin transaminaza (HEWT) u *E. coli* koja je pokazala 38% identičnosti u sekvenci sa ω -TA iz *V. fluvialis* i 55% sa ω -TA iz *C. violaceum*. Maksimalnu aktivnost je enzim pokazao na pH 10, ali je pokazano da je stabilnost enzima veća na nižim pH vrednostima, tako da je optimalna ravnoteža između ova dva parametra nađena na pH 8-9. Najveća izmerena aktivnost je na 50 °C, ali je enzim pokazao dobru termalnu stabilnost na temperaturama do 35 °C tokom 24 časa inkubacije. Dodatak organskih rastvarača mešljivih sa vodom doveo je do smanjenja aktivnosti enzima, ali je zadržana stabilnost enzima. Sa dodatkom različitih koncentracija soli došlo je do pada enzimске aktivnosti sa povećanjem koncentracije soli u odnosu na rastvor enzima u 50 mM fosfatnom puferu, dok prisustvo soli nije dovelo do destabilizacije enzima. Dobijeni rezultati ukazali su na to da se okarakterisani enzim može koristiti u organskim sintezama zavisnim od prisustva organskih rastvarača usled niske rastvorljivosti supstrata.^[209] Adenozilmetionin-8-amino-7-oksononoat aminotransferaza (Ad2-TAm), izolovana iz genoma halotolerantne bakterije roda *Halomonas* iz rudnika soli iz perioda trijasa u Severnoj Irskoj, okarakterisana je primenom testa zasnovanog na detekciji HPLC-om upotrebom (*S*)-MBA i benzaldehida. Enzim je pokazao najveću aktivnost na temperaturi od 30 °C i pH 9,0, ali je visok stepen konverzije detektovan u opsegu pH od 8,0 do 11,0 što je u skladu sa podacima za druge transaminaze iz halotolerantnih bakterija, jer su staništa sa visokom koncentracijom soli često i alkalne prirode. U prisustvu organskog rastvarača (10% DMF) određen je stepen konverzije supstrata od 67%, dok je povećanje koncentracije DMF-a dovelo do značajnog smanjenja stepena konverzije. Kada je u pitanju DMSO, povećanje koncentracije sa 10 na 20% dovelo je do povećanja stepena konverzije, dok je procenat konverzije smanjen pri koncentraciji DMSO-a od 30%, ali je enzim i pri ovoj koncentraciji nastavio da ispoljava značajan stepen

aktivnosti. Bez dodatka ko-rastvarača postignuta je konverzija od samo 14%. Enzim je ispoljivo visoku tolerantnost na prisustvo soli u povišenoj koncentraciji (NaCl i KCl), pri čemu je određen stepen konverzije (S)-MBA u acetofenon od 54% u prisustvu 1,5 M NaCl-a i 55% u prisustvu 0,5 M KCl-a. Stepenn homologije sa poznatim transaminazama (*Vf*-TA i *Cv*-2025) nije veći od 30%, ali je dokazano da su mnogi kritični ostaci konzervirani među datim transaminazama, kao što je ostatak Trp60, koji je bitan za određivanje supstratne specifičnosti, ostatak Tyr153 koji učestvuje u vodoničnom vezivanju hidroksilne grupe fosfata PLP-a i ostatak katalitičkog Lys288.^[210] Okarakterisani enzim je primenjen u konverziji furfurala u reakcionom medijumu baziranom na morskoj vodi. Furfurilamini se koriste u proizvodnji pesticida, parfema i vlakana, kao i intermedijeri u proizvodnji aktivnih farmaceutskih sastojaka (diuretika, antiseptika i antihipertenziva). Ova osobina pomenutog enzima može da smanji potražnju za slatkim vodom u velikim industrijskim procesima, čime se obezbeđuje značajna ekološka i ekonomska korist.^[211] Još jedan od primera izolovanja transaminaza iz ekstremofila jeste (S)-selektivna termostabilna ω -transaminaza iz *Sphaerobacter thermophilus*, koja je pokazala visoku termostabilnost, uz neznatan gubitak aktivnosti do 60 °C, dok je daljim povećanjem temperature aktivnost enzima značajno opala. Maksimalnu aktivnost je enzim ispoljio na 60 °C, pa je na ovoj temperaturi ispitana i stabilnost enzima u prisustvu 20% DMSO-a, prilikom čega je enzim zadržao 43% aktivnosti nakon 12 h inkubacije u organskom rastvaraču. Upotrebom ovog enzima proizvedene su optički čiste β - i γ -aminokiseline koje često služe kao prekursori bioaktivnih jedinjenja, kao što je maravirok, antagonist CCR-5 receptora, koji se koristi u tretmanu infekcije HIV-om.^[212]

2.4.4.5. Transaminaze identifikovane metagenomskim pristupom

Kao što je već pomenuto, primenom metagenomskog pristupa mogu se iz prirodnih izvora identifikovati potentni biokatalizatori uz zaoblazanje potrebe za izolovanjem i uzgajanjem mikroorganizama. Ovim pristupom je iz metagenoma odvoda domaćinstva izolovana i sekvencirana DNK u okviru koje je identifikovano 36 potencijalnih gena koji kodiraju transaminaze klase III. Poravnanjem identifikovanih sekvenci zaključeno je da postoji veliki diverzitet među ovim enzimima s obzirom na to da je prosečan stepen identičnosti među njima iznosio 28%. Poređenjem sa sekvencama poznatih enzima u okviru NCBI baze podataka određen je prosečan stepen identičnosti od 87%. Od identifikovanih gena, 29 je uspešno uklonirano i eksprimirano u *E. coli* BL21 (DE3), uz zadovoljavajući nivo ekspresije za sve osim jednog enzima. Od svih eksprimiranih enzima, dva su bila potpuno nerastvorna. Određivanjem homologije u sekvenci sa poznatim dobro okarakterisanim transaminazama pokazano je da procenat identičnosti sa *Cv*-2025 od 17–54%, a sa *Vf*-TAm od 16–36%, čime je pokazano da je metagenom odvoda izvor novih udaljenih transaminaza klase III.^[23] U okviru drugog istraživanja iz kombinovanih metagenoma uzorkovanih sa jezika devet dobrovoljaca identifikovano je 53 otvorena okvira čitanja za transaminaze klase III, od kojih je 15 imalo punu dužinu sekvence. Od 15 potencijalnih enzima, 11 je upešno eksprimirano i skenirano na supstratnu specifičnost u formi ćelijskog lizata. Na osnovu skeniranja supstratne specifičnosti pokazano je da među ispitivanim enzimima 3 ispoljavaju široku supstratnu specifičnost na osnovu eseja sa (S)-MBA. Od cikličnih supstrata najbolje su prihvaćeni benzaldehid i cinamaldehyd. Modifikacijom aromatičnog prstena dolazilo je do smanjenja stepena konverzije supstrata. Od lineranih aldehidnih supstata bolje su prihvaćeni supstrati kraćeg ugljovodoničnog niza, dok ketoni kao što je 2-butanon ili 2-heksanon nisu prihvaćeni. Funkcionalizovani aldehidi i ketoni kao što je glukaldehid i L-eritruuloza su takođe prihvaćeni, ali uz nizak stepen konverzije (9%). Skening sa benzaldehidom je potvrdio da su sva tri enzima S-selektivna s obzirom na to da je formiranje benzilamina detektovano samo u prisustvu (S)-MBA. Poređenje sekvenci sa poznatim transaminazama, *Vibrio fluvialis* (*Vf*-TAm), *Chromobacterium violaceum* DSM30191 (*Cv*-TAm), *Pseudomonas putida* KT2440 (*Pp*-TAm) i *Klebsiella pneumonia* JS2F (*Kp*-TAm) pokazalo je da sva 3 enzima poseduju manje od 30% identičnosti u sekvenci sa *Vf*-TAm i *Cv*-TAm, dok jedan od enzima ima 55% identičnosti u sekvenci

sa *Kp*-TAM, dok je poređenjem kritičnih ostataka (Lys288, Asp259, Ser121 i Tyr153) u aktivnom mestu zaključeno da je većina ostataka konzervirana kod sva 3 ispitivana enzima. Sposobnost transaminacije konjugovanih aldehida kao što su cinamaldehyd i funkcionalizovani derivati otvara mogućnost za sintezu alilamina koji predstavljaju gradivne blokove za sintezu analoga lekova kao što je antifungicid naftin.^[213] Funkcionalnu metagenomiku za otkrivanje nove TA su prvi put primenili Pawar-a i saradnici uz upotrebu o-ksililendiamina kao amino donora i benzaldehida kao akceptora za skeniranje biblioteke fazmida kreirane od metagenoma uzorkovanog sa ležišta uglja. Identifikovani enzim pokazao je uspešnost u transformaciji nekoliko monoaromatičnih aldehida i ketona, proizvoda degradacije lignina, koji se mogu koristiti u proizvodnji farmaceutski značajnih hiralnih amina. Najveći stepen konverzije je detektovan kad je enzim upotrebljen u formi ćelijskog lizata. Enzim je pokazao manje od 30% homologije sa *Vf*-TAM i *Cv*-TAM. Maksimum konverzije benzaldehida u benzilamin postignut je na 30 °C, pH 7,5 i u prisustvu 10% DMSO-a. Rastvaranjem supstrata u metanolu i acetonitrilu takođe je postignut visok stepen konverzije supstrata.^[214]

2.5. Opin dehidrogenaze

Opin dehidrogenaze (1.5.1.X) su klasa NAD(P)H zavisnih oksidoreduktaza koje katalizuju reakciju reduktivne aminacije između α -keto kiseline i α - ili ω -amino grupe aminokiseline, pri čemu dolazi do formiranja klase hemijskih jedinjenja koja nose naziv opini.^[33, 215] Na osnovu stereochemije nastalog proizvoda razlikuju se dve klase opin dehidrogenaza, od kojih jedna katalizuje sintezu (*S*) opina a druga sintezu (*R*) opina, prilikom čega dolazi do formiranja dva asimetrična (hiralna) centra u proizvodu reakcije, od kojih jedan ima (L, L) a drugi (D, L) stereochemiju.^[215, 216]

Opini ispoljavaju različite fiziološke aktivnosti u zavisnosti od organizma koji ih proizvodi. Prvi opisani opin bio je oktopin, izolovan iz mišića hobotnice, 1927. godine, formiran kondenzacijom arginina i piruvata.^[217] Opin dehidrogenaze su široko rasprostranjenje među mekušcima i glavonošcima, u kojima imaju ulogu održavanja procesa glikolize u anaerobnim uslovima konverzijom piruvata u opine, pri čemu dolazi do regeneracije NAD-a.^[31, 32, 114, 217] Ova reakcija predstavlja ekvivalent reakciji laktat dehidrogenaze kod sisara.^[114] Hemija ove reakcije je složenija u poređenju sa proizvodnjom laktata, jer uključuje stvaranje imina između aminokiseline i piruvata pre NADH-zavisne redukcije.^[32]

Opini su takođe povezani sa patogeneom kvržičastih tumora kod biljaka inficiranih bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*. Kod ovih biljnih infekcija, opin dehidrogenaze su kodirane Ti plazmidom. Kada se eksprimiraju u inficiranoj biljnoj ćeliji, oni pretvaraju biljne metabolite u opine koji obezbeđuju hranljive materije za patogen.^[32, 114, 217] Pored *Agrobacterium*-a opin dehidrogenaze su takođe okarakterisane u bakterijama u zemljištu kao što su *Pseudomonas putida* i *Arthrobacter sp.* soj 1C, čiji enzim kondenzuje glioksilat ili piruvat i nekoliko aminokiselina u različite opine.^[217] Fiziološka uloga ovog enzima može biti da razgradi opine biljnog porekla da bi se dobio NADH, a ne da sintetiše opine, kao što se dešava u većini slučajeva sa NAD zavisnim oksidoreduktazama. Dobijena keto kiselina i L-aminokiselina mogu koristiti se kao izvor ugljenika i da podrže rast mikroorganizama.^[32]

U kvascu *S. cerevisiae* pronadjen je opin saharopin koji predstavlja ključnu komponentu u sintezi aminokiseline lizin.^[217] Nedavno je identifikovana nova klasa opina koji se ponašaju kao metalofore, sa varijantama pronadjenim u *Staphylococcus aureus* (stafilopin) i *Pseudomonas aeruginosa* (pseudopalin). Ove metalofore opinskog tipa predstavljaju ključni faktor virulencije u infekciji pomenutim bakterijama, s obzirom na to da igraju važnu ulogu u vezivanju jona metala iz organizma domaćina, pri čemu je stafilopin uključen u unos cinka, kobalta, nikla i gvožđa, a pseudopalin uključen u unos jona cinka, kobalta i gvožđa na ovaj način.^[32, 217]

I druga jedinjenja mogu da se svrstaju u klasu opina kao što su ona koja se formiraju β -alanopin dehidrogenazom (EC 1.5.1.26), tauropin dehidrogenazom (EC 1.5.1.23) i saharopin dehidrogenazom (EC 1.5.1.7) koristeći β -alanin, taurin i ϵ -amino grupu L-lizina, redom.^[32]

2.5.1. Opšte karakteristike i mehanizam opin dehidrogenaza

S obzirom na to da je funkcija opin dehidrogenaze poreklom iz umereno halofilne bakterije *Desulfohalobium retbaense* prvi put dokazana tokom izrade ove doktorske disertacije i da kristalna struktura enzima nije dostupna, strukturni i kinetički aspekti, kao i mehanizam opin dehidrogenaza će biti objašnjeni na primeru enzima poreklom iz *Arthrobacter sp.* soj 1C (UniProt ID Q44297), sa kojim ispitivani enzim pokazuje 44% identičnosti u sekvenci (prilog: slika 4).

N-(1-D-karboksiletil)-L-norvalin dehidrogenaza (CENDH) (EC 1.5.1.28) je enzim koji vodi poreklo iz zemljišnog izolata *Arthrobacter sp.* soj 1C, a postoji kao homodimer sa molekulskom masom subjedinice od približno 36 kD.^[32, 215, 218] Ovaj enzim katalizuje reverzibilnu reakciju oksidoredukcije sekundarnih amina dikarboksilnih kiselina opinskog tipa koristeći usključivo NADH kao kofaktor. U reakciji oksidativne deaminacije enzim je aktivan prema opinima kao što su N-[1-D-(karboksil) etil]-L-metionin i N-[1-D-(karboksil) etil]-L-fenilalanin. Utvrđeno je da je najbolji supstrat neproteogena aminokiselina L-norvalin, po čemu je enzim i dobio naziv. U reakcijama reduktivnog formiranja sekundarnih amina enzim koristi hidrofobne L-aminokiseline, kao što su L-metionin, L-izoleucin, L-valin, L-fenilalanin i L-leucin, kao amino donore i piruvat, oksaloacetat, glioksilat i ketobutirat, kao amino akceptore. Novoformirani stereocentar ima R konfiguraciju.^[31, 32, 114, 215, 218] Kloniranjem gena utvrđeno je da pomenuti enzim kodira peptid od 359 aminokiselina.^[31]

Pomenuti enzim pored oktopin dehidrogenaze poreklom iz velike školjke (*Pecten maximus*) predstavlja jednu od najbolje okarakterisanih opin dehidrogenaza. Njegova kristalna struktura je poznata (PDB:1BG6 apo forma enzima)^[215] i u kombinaciji sa kristalnom strukturom OpDH iz *Pecten maximus*-a (PDB: 3C7C holo struktura sa L-argininom; 3C7D holo struktura sa pirvatom) pružila je preliminarne uvide u mehanizam delovanja enzima.^[33] Uprkos nedostatku homologije u sekvenci (do 23% identičnosti) sa enzimima morskih beskičmenjaka, ukupna struktura proteina je slična i podrazumeva prisustvo dva domena. N terminalni deo proteina formira veći domen koji sadrži tipičan Rosmanov motiv za vezivanje kofaktora, dok je drugi domen sačinjen od α - heliksa i sadrži površinu dimerizacije subjedinica. Domeni zajedno formiraju šupljinu u kojoj se odigrava kataliza.^[32]

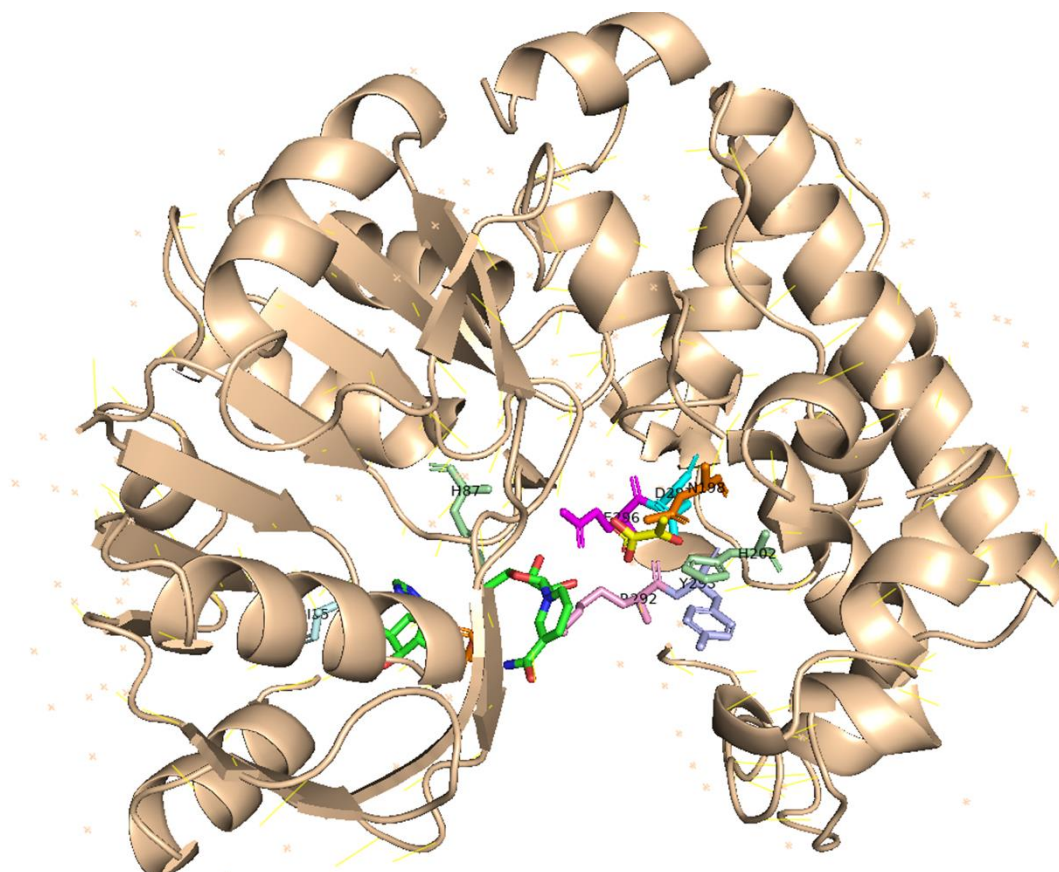
Analiza sekundarnih struktura pokazala je da se enzim sastoji od 19 α -heliksa, 12 β -pločica i 4 3_{10} heliksa, koje su udruženi tako da formiraju dva domena odvojena dubokom šupljinom. Ostaci 1-195 formiraju centralnu β -pločicu koja sadrži 8 lanaca i sačinjavaju domen I. Lanci u okviru pločice su mešovito paralelnog i antiparalelnog karaktera. Jedan deo centralne β -pločice organizovan je kao šestočlana paralelna pločica koja formira Rosmanov nabor. Deo ovog domena predstavlja i $\beta\alpha 1\beta$ struktura koja sadrži heliks koji učestvuje u vezivanju dinukleotida. Mesto vezivanja dinukleotida nalazi se u okviru konsenzusne sekvence bogate glicinom GLGNNGG koja je lokalizovana u neuređenoj petlji između prvog β lanca i $\alpha 1$ heliksa. Ovaj motiv okružen je nizom α -heliksa i malom četvorostrukom β -pločicom koja sadrži i paralelne i antiparalelne lance. Preostali aminokiselinski ostaci do C kraja proteina (196-359) sačinjavaju domen II, izgrađen od 12 α -heliksa povezanih petljama različite dužine. C-terminalni heliks formira interakcije posredovane molekulima vode sa sekundarnim strukturama u domenu I.^[215]

Monomeri enzima interaguju preko ostataka sadržanih u domenu II. U okviru dodirne površine između subjedinica nalazi se 53% nepolarnih i 47% polarnih atoma. U region dodirne površine uključen je 31 aminokiselinski ostatak svake subjedinice, pri čemu je samo ostatak Val322 konzerviran u okviru superfamilije opin dehidrogenaza. Interakcije formirane između subjedinica preko njihovih dodirnih površina uključuju kontakte između heliksa $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, $\alpha 12$ i petlji između

njih, kao i heliksa $\alpha 17$ i deo petlje između heliksa $\alpha 14$ i $\alpha 15$. Dodirna površina dimera se može razdvojiti na dve približno jednake polovine, od kojih jedna obuhvata glavni hidrofobni region, dok je druga hidrofilna.^[215]

Rendgenska analiza kompleksa CENDH sa NAD^+ ukazala je na to da se u šupljini između domena nalazi džep za adeninski prsten obložen bočnim lancima Ile35 i His87, a da atom azota glavnog lanca Leu12 formira vodoničnu vezu sa atomom kiseonika u prstenu riboze. Nema dokaza o direktnom vezivanju vodonika između adeninskog prstena i proteina. Hidroksilne grupe riboze formiraju vodonične veze sa karboksilnom grupom bočnog lanca ostatka Asp34 na C-terminusu proteina. Bočni lanac ovog ostatka formira vodoničnu vezu sa amidnim azotom ostatka u regionu bogatom glicinom. Na taj način je region bogat glicinom indirektno uključen u prepoznavanje kofaktora. Iznad kraja heliksa za vezivanje dinukleotida nalazi se pirofosfatni deo kofaktora. Između atoma azota ostatka Asn14 i Gly15 u regionu bogatom glicinom i atoma kiseonika fosfatne grupe riboze formiraju se vodonične veze.^[215]

Poravnanjem sekvenci sa drugim enzimima iz ove superfamilije zaključeno je da je 35 ostataka aminokiselina konzervirano. Šest konzerviranih ostataka (Asn198, His202, Arg292, Tyr293, Glu296 i Asp297) formiraju klaster i leže u šupljini između dva domena pored mesta vezivanja nukleotida, a lokalizovani su u okviru domena II. Ovaj klaster uključuje i His-Asp par (His202 i Asp297) koji se nalazi pored konzerviranog arginina (Arg292), ukazujući na paralelu sa drugim dehidrogenazama keto kiselina čija funkcionalnost zavisi od trijade His-Asp-Arg.^[215]



Slika 15. Prikaz trodimenzionalne strukture CENDH (PDB: 1BG6) sa označenim konzerviranim aminokiselinskim ostacima u šupljini između domena i naznačenim pretpostavljenim koordinatama NADH (obojen zelenom bojom) i piruvata (obojen žutom bojom). Slika je kreirana upotrebom PyMOL programa.

Prikaz trodimenzionalne strukture jedne subjedinice CENDH sa označenim konzerviranim ostacima u centralnoj šupljini, i pretpostavljenim koordinatama NADH i piruvata dat je na slici 15. Koordinate NADH i piruvata su ubačene na osnovu poravnanja 3D strukture CENDH (PDB: 1BG6) sa 3D strukturom oktopin dehidrogenaze iz *Pecten maximus* (PDB: 3C7D).

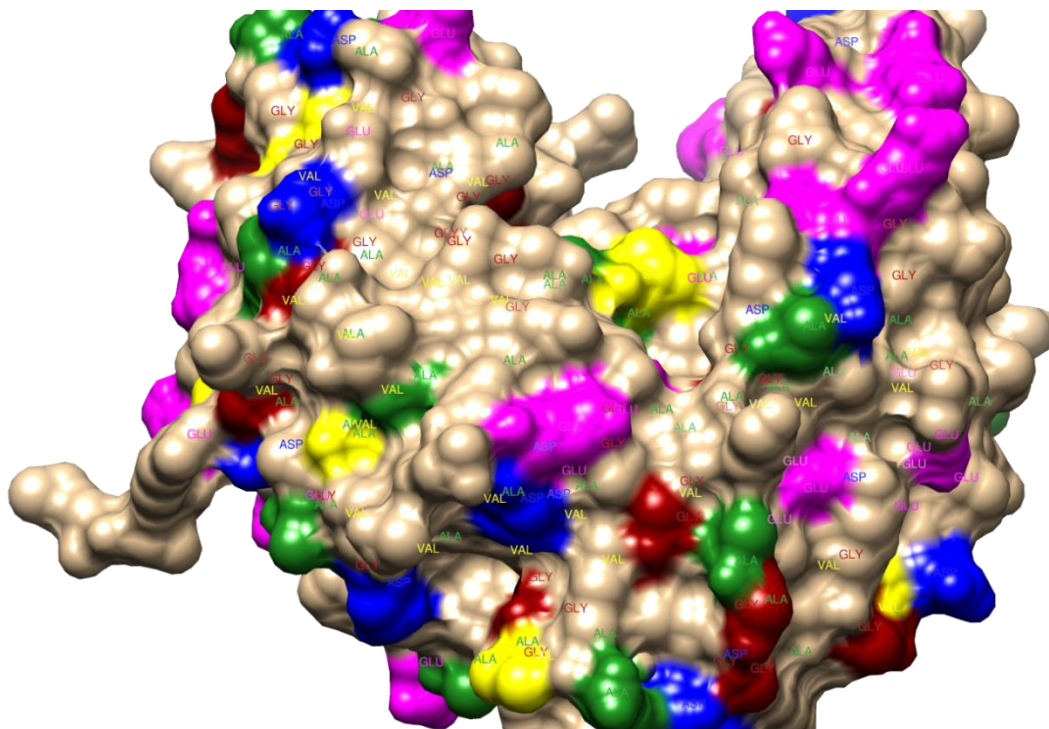
Sličnosti CENDH sa drugim dehidrogenazama čija je kataliza bazirana na pomenutoj katalitičkoj trijadi sugerišu da bi karboksilna grupa keto kiseline mogla da stupi u interakciju sa Arg292 čime bi se stabilizovao supstrat, His202 pored uloge u orijentaciji supstrata može igrati ulogu kiselinskog/baznog katalizatora doniranjem protona karbonilnoj grupi supstrata, dok ostatak asparaginske kiseline povećava kiselost ostatka histidina.^[215, 219] Kod oktopin dehidrogenaze poreklom iz *Pecten maximus* arginin u aktivnom mestu ostvaruje elektrostatičke interakcije između svoje guanidino grupe, negativno naelektrisanog džepa u proteinu (Glu142) i α -karboksilata arginina i His212. Pošto ovi ostaci potiču iz različitih domena, smatra se da vezivanje L-arginina stimuliše relativno zatvaranje domena i formira vezujuće mesto za piruvat da bi se enzim pokrenuo za reakciju kuplovanja,^[31, 114] te da je to ključni događaj za odigravanje katalize i sprečavanje redukcije ketokiseline. Ovo implicira uređeni ter-bi mehanizam za CENDH.^[32]

Pretpostavljeno je da se reakcija odvija preko karbinolaminskog intermedijera nakon nukleofilnog napada amino grupe aminokiseline na keto kiselinu. Jasno je da enzim mora da spreči redukciju piruvata u laktat i stoga konformaciona promena može omogućiti da NADH bude udaljen od piruvata sve dok se nukleofilni napad, koji dovodi do proizvodnje karbinolamina, ne završi. Ovo bi moglo objasniti očigledno odvajanje NAD^+ u domenu I od klastera konzerviranih ostataka u domenu II.^[215] Hidridni transfer sa NADH na stabilizovano prelazno stanje predstavlja finalni korak u formiranju opina. Hidridni jos se ne transferuje na α -keto kiselinu kao kod laktat dehidrogenaze, već na Šifovu bazu koja se formira kondenzacijom α -keto kiseline i aminokiseline.^[219]

Poređenjem strukture CENDH i OpDH iz *Pecten maximus* primećeno je da ostaci His202 i Asp297 kod CENDH odgovaraju katalitičkoj dijadi His212 i Asp329 kod enzima iz školjke. Na poziciji 118 CENDH poseduje ostatak alanina, dok OpDH iz *Pecten maximus* sadrži ostatak glutamina. Pretpostavlja se da u ovoj zameni leži razlog većeg promiskuiteta koji CENDH ima ka keto kiselinama, za razliku od PmOpDH, koja je strogo specifična za piruvat. Ova zamena ukazuje i na razliku u načinu vezivanja piruvata, s obzirom na to Ala111 ne može stupiti u interakciju sa karboksilnom kiselinom, već samo omogućava veći prostor za vezivanje supstrata. Ostaci Ser136 i Trp258 su ekvivalenti Glu142 i Trp278 koji su uključeni u vezivanje argininina kod enzima poreklom iz školjke. Ostatak Val197 odgovara Tyr208 kod PmOpDH i smatra se da utiče na veličinu supstrat vezujućeg džepa. Kod CENDH ovaj ostatak je lokalizovan na heliksu, za razliku od Tyr208 kod PmOpDH, gde se nalazi u okviru felksibilne petlje i može se rotirati izvan džepa za vezivanje omogućavajući vezivanje dužih aminokiselina. Ostatak Val197 okrenut je ka unutrašnjosti katalitičke šupljine, izazivajući preferenciju ka manjim i hidrofobnijim aminokiselinama.^[32]

Supstratnu specifičnost pomenutih enzima potvrđuju i Mihaelisove konstante (K_m) koje u slučaju CENDH koji pokazuje veću supstratnu promiskuitetnost ukazuju na slabu vezujuću interakciju sa aminokiselinama. Mihaelisove konstante za najbolje supstrate određene na pH 8,0 i 25 °C u prisustvu 10 mM piruvata i 0,1 mM NADH iznose: 2,17 mM (norvalin); 3,72 mM (norleucin); 4,1 mM (metionin); 3,0 (valin); 5,1 (alanin).^[220] Sa druge strane, OpDH iz *Pecten maximus* pokazuje jak afinitet za piruvat (K_m 0,71 mM) i za L-arginin (K_m 0,89 mM).^[32]

Na osnovu sekvence proteina konstruisan je 3D model opin dehidrogenaze poreklom iz *Desulfohalobium retbaense* upotrebom SWISS-MODEL portala i UCSF himera programa. Na slici 16 je dat prikaz površine proteina sa aminokiselinama koje su pretežno zastupljene u proteinima poreklom iz halofila.



Slika 16. Prikaz površine opin dehidrogenaze iz metagenomske sekvence *Desulfohalobium retbaense* sa obeleženim aminokiselinama koje su pretežno zastupljene u proteinima poreklom iz halofila. 3D model je konstruisan upotrebom SWISS-MODEL portala i UCSF Chimera programa.

2.5.2. Značaj i upotreba opin dehidrogenaza

Sekundarni amini dikarboksilnih kiselina opinskog tipa mogu biti korisni hiralni intermedijeri u proizvodnji farmaceutski aktivnih sastojaka, kao što su na primer enalapril i lizinopril, inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima. Angiotenzin konvertujući enzim učestvuje u formiranju angiotenzina II, koji dovodi do vazokonstrikcije i povećanja krvnog pritiska.^[220-222] S obzirom na to da ovaj tip jedinjenja sadrži više hiralnih centara, njihova sinteza upotrebom enzimске katalize, a ne klasične hemijske katalize, ima ogroman potencijal.

Asano i saradnici su pokazali kako se primenom CENDH može sintetisati ovaj tip jedinjenja. Oni su između ostalog pokazali da se upotrebom multienzimске kaskade koja uključuje fenilalanin dehidrogenazu, CENDH i format dehidrogenazu može postići sinteza enantiomerno čistog opina N-[1-(R)-(karboksil)etil]-(S)-fenilalanina iz fenilpiruvata i piruvata.^[220] Potencijalna farmaceutska primena ovih enzima može zahtevati upotrebu metoda proteinskog inženjeringa da bi se dobile varijante enzima sa novim specifičnostima koje imaju važnu primenu u oblastima proizvodnje i otkrivanja lekova, što zahteva određivanje molekularne strukture članova porodice opin dehidrogenaza.^[215]

2.5.2.1. Proteinski inženjering opin dehidrogenaza

Uzimajući u obzir široku supstratnu specifičnost opin dehidrogenaze iz *Arthrobacter sp.* kompanija *Codexis* je intenzivnim eksperimentima usmerene evolucije kreirala varijantu enzima sa proširenim obimom supstrata da bi se proizveli strukturno raznoliki sekundarni i tercijerni amini. U početnim krugovima inženjeringa fokus je bio na povećanju stabilnosti i specifične aktivnosti enzima. U kasnijim rundama radilo se na modifikaciji supstratne specifičnosti. Pozitivne varijante su u početku detektovane esejem koji je uključivao reduktivnu aminaciju prirodnih supstrata (L-norvalina

i piruvata), zatim je jedno od ova dva jedinjenja zamenjeno sa različitim sintetičkim derivatima, da bi se na kraju prešlo na reakcije između dva sintetička supstrata. Finalna varijanta enzima je formirana u 11 krugova evolucije i sadržala je 29 mutacija (stopa mutacije 8%) raspoređenih u okviru proteina od 359 aminokiselina. Sintetska primena enzima ispitana je na primeru antiaritmika vernakalanta.^[34, 114, 223] Ključni ostaci koji su bili uključeni u mutagenezu (Ala111, Ser136, Lys156, Val197, Asn198, Met201, Tyr259, Tyr280, Arg292 i Tyr293) lokalizovani su u šupljini između dva domena. S obzirom na to da je ostatak Arg292 takođe bio uključen u mutagenezu, to njegovu ulogu u reakcionom mehanizmu opin dehidrogenaza dovodi u sumnju. Mutacija Arg324 u *PmOpDH* je smanjila katalitičku aktivnost enzima prema njegovim prirodnim supstratima, dok je mutacija Arg292 kod CENDH poboljšala njegovu aktivnost prema supstratima kojima nedostaje karboksilatna funkcija. Ovaj rezultat ukazuje na to da je potrebno više eksperimentalnih detalja i strukturnih podataka da bi se u potpunosti razumeo mehanizam zatvaranja domena u opin dehidrogenazama.^[31-34]

2.5.2.2. Opin dehidrogenaze identifikovane metagenomikom

Mogućnost za primenu metagenomike u cilju izolovanja novih opin dehidrogenaza iz staništa sa ekstremnim uslovima koje će imati poželjna svojstva za industrijsku katalizu pokazana je na primeru analize metagenomske biblioteke kreirane na osnovu DNK izolovane iz populacija koje nastanjuju vrelo Satali (67 °C). Metagenomskim pristupom identifikovano je 6 gena koji kodiraju različite opin dehidrogenaze na osnovu višestrukog poravnanja sekvenci sa enzimima poznate primarne strukture iz skupa raznovrsnih organizama i sa različitim preferencijama supstrata i kofaktora. Inicijalno je detektovano 11 potencijalnih sekvenci koje kodiraju opin dehidrogenaze, koje su imale visok stepen sličnosti među sobom, ali manje od 40% sličnosti sa korišćenim templatima. Najbliži homolog bila je CENDH, koja je upotrebljena kao referenti enzim za karakterizaciju metagenomskih opin dehidrogenaza. Od 11 sekvenci dve su odbačene zbog nedostataka sekvence za vezivanje kofaktora, 3 enzima se nisu mogla eksprimirati u rastvornoj formi, a analizom preostalih 6 eksprimiranih enzima pokazano je da preferiraju NADPH kao kofaktor i L-aspartat kao aminokiselinu. Piruvat kao najpoželjnija keto kiselina većine opin dehidrogenaza nije menjana u datim eksperimentima. Okarakterisani enzimi su sadržali približno 40% identičnosti sa CENDH, dok je stepen sličnosti među njima iznosio od 45-80%. Diferencijalnom skenirajućom fluorimetrijom pokazano je da su tačke topljenja identifikovanih enzima u proseku od 15-30 °C više od CENDH, dok je merenjem rezidualnih aktivnosti nakon inkubacije enzima na različitim temperaturama pokazano da enzimi iz metagenomske biblioteke gube jako malo ili nimalo aktivnosti na 60 °C, a CENDH gubi aktivnosti već na 50 °C. Ovim je pokazano da se primenom metagenomike mogu identifikovati nove opin dehidrogenaze sa novom supstratnom specifičnošću i sa povećanom stabilnošću, što je dobra polazna tačka za potencijalnu primenu ovih enzima u industrijskim uslovima.^[224]

3. Ciljevi

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje primene rekombinantnih transaminaza i dehidrogenaza u sintezi amino derivata steroida sa ciljem dobijanja fiziološki aktivnih jedinjenja i njihovih prekursora, kao i optimizacija biokatalitičkog postupka proizvodnje amino steroida u cilju povećanja prinosa reakcije primenom enzimске imobilizacije i proteinskog inženjeringa. Osim toga, u okviru istraživanja rađeno je na dokazivanju aktivnosti i karakterizaciji pretpostavljene opin dehidrogenaze poreklom iz halofilnog organizma *Desulfohalobium retbaense* sa potencijalom za primenu u sintezi sekundarnih amina, kao i na konstruisanju mutiranih varijanti enzima upotrebom proteinskog inženjeringa i razvoju metode za visokoefikasnu pretragu biblioteka mutiranih genskih varijanti zasnovane na detekciji enzimске aktivnosti fluorescentnim esejem.

U okviru ove teze formulisano je nekoliko ciljeva:

- 1) Proizvodnja ArRMut11 (mutirane varijante (*R*)-selektivne ω -transaminaze, homologa enzima poreklom iz *Artrobacter* sp.) i (*S*)-selektivne ω -transaminaze iz *Chromobacterium violaceum* (Cv-2025) u *Escherichia coli* BL21, kao i određivanje aktivnosti i supstratne specifičnosti transaminaza ka steroidnim jedinjenjima različitih klasa steroida.
- 2) Sinteza amino derivata steroida rekombinantnim transaminazama.
- 3) Kloniranje i ekspresija transaminaza u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*.
- 4) Kloniranje, ekspresija i karakterizacija opin-dehidrogenaze poreklom iz *Desulfohalobium retbaense* u bakteriji *E. coli* BL21.
- 5) Testiranje mutiranih varijanti transaminaza/dehidrogenaza razvijenim fluorescentnim enzimskim testovima.

4. Materijal i metode

4.1. Materijal

4.1.1. Oprema

U izradi ove doktorske disertacije korišćena je sledeća oprema:

- Analitička vaga – SHIMADZU Uni Bloc ATX224
- Tehnička vaga - KERN 440-35-A
- pH metar - Adwa AD8000
- Centrifuga - Eppendorf minifuga
- Centrifuga - BioSan LMC 3000
- Termostat - Environmental Shaker - Inkubator ES - 20
- Termostat sa mešanjem - Termo Shaker TS - 100 Biosan
- PCR uređaj - Eppendorf Mastercycler personal
- Sistem za DNK elektroforezu - Hoefer SE 600 Ruby
- Uređaj za vizuelizaciju agaroznih gelova - UV lamp VWR GenoSmart
- Elisa čitač – SYNERGY LX multi-mode reader
- Spektrofotometar - uniSPEC 2 Spectrophotometer (LLG Labware)
- Sistem za proteinsku elektroforezu - Cleaver Scientific Ltd CS-300V
- Uređaj za snimanje NMR spektara - Bruker AVANCE III HD 400
- Uređaj za snimanje masenih spektara - LTQ Orbitrap XL
- Ultrazvučna sonda - Bandelin SONOPLUS UW 20

4.1.2. Reagensi i potrošni materijal

Komponente za pripremu mikrobioloških podloga, agar, tripton i pepton su poručeni od kompanije Torlak, Srbija. (*R*)-1-feniletilamin [(*R*)-metilbenzilamin, (*R*)-MBA] i (*S*)-1-feniletilamin [(*S*)-metilbenzilamin, (*S*)-MBA], L-alanin, L-valin i L-serin su poručeni od kompanije TCI hemikalije (Nemačka). Natrijum piruvat, kazaminokiseline (CAA) i azotne baze kvasca bez amonijum sulfata (YNB) su naručeni od kompanije Carl Roth, Nemačka. β -Nikotinamid adenin dinukleotid, redukovana dinatrijumova so (NADH) poručena je od kompanije ACROS, Belgija. Soli za pripremu medijuma i pufera poručene su od kompanije Centrohem (Srbija) i kompanije Thermo Fischer Scientific (Holandija). Antibiotici koji su korišćeni kao selektabilni markeri, ampicilin i kanamicin su poručeni od kompanije Invitrogen, Kalifornija, SAD.

Restrikcioni enzimi koji su korišćeni za kloniranje gena (*NheI*, *XhoI*, *EcoRI*, *DpnI*), T4 DNK ligaza, *Pfu* polimeraza, alkalna fosfataza za defosforilaciju vektora, odgovarajući puferi za optimalno dejstvo enzima i smeša dezoksiribonukleotida su poručeni od kompanije Thermo Fisher Scientific, SAD.

Komercijalna boja za DNK elektroforezu i DNK molekulski markeri koji su korišćeni za analizu plazmidne DNK i PCR proizvoda su poručeni od kompanije Thermo Fisher Scientific, SAD.

Konstruisanje mesto-dirigovanih mutanata ArRMut11 je rađeno pomoću *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* kompleta prema uputstvu proizvođača (Agilent Technologies, SAD). Nasumično mutirane biblioteke gena za opin dehidrogenazu su kreirane upotrebom *GeneMorph II mutagenesis* kompleta prema uputstvu proizvođača (Agilent Technologies, SAD).

Dihidrotestosteron i ostali steroidi koji su korišćeni za skrining supstratne specifičnosti transaminaze su naručeni od kompanije Sigma Aldrich (Nemačka). Piridoksal-5'-fosfat (PLP), HEPES, izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG), d4-metanol, polivinilpirolidin ($M_w=36000$ g/mol), glicidil metakrilat (GMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), 1-dodekanol, cikloheksanol, oksalna kiselina, monohidrat glioksilne kiseline i α -ketoglutarina kiselina su naručeni od kompanije Sigma Aldrich (Nemačka). Etilendiamin je poručen od kompanije Merck. Inicijator za sintezu polimera za imobilizaciju 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) AIBN (98%, Akzo Nobel) je prekrystalisan iz metanola.

Rastvarači za hromatografsko prečišćavanje 3α -amino- 5α -androstan- 17β -ol su poručeni od komercijalnih dobavljača i predestilovani pre upotrebe. Aluminijumske pločice za tankoslojnu hromatografiju - TLC silika gel 60 F₂₅₄ su poručene od kompanije Merck.

4.1.3. Izvor gena za ArRMut11, ω -transaminazu iz *Chromobacterium violaceum* i opin dehidrogenazu iz *Desulfohalobium retbaense*

Geni koji kodiraju ω -transaminaze ArRMut11 i Cv-2025 uklonirani u pET29(a) vektor su dobijeni od dr Jasmine Nikodinović-Runić, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Beograd.

Kodon optimizovana sekvenca opin dehidrogenaze klonirana u pUC57-Kan vektor je poručena od kompanije GenScript (SAD) i nakon toga je klonirana u pET22(b) vektor upotrebom *Nde*I i *Xho*I restrikcionih enzima bez stop kodona, da bi eksprimirani protein sadržao His tag.

4.1.4. Vektori i sojevi

Za kloniranje željenih gena i održavanje plazmida su korišćeni sojevi *E. coli DH5 α* i *XL10 gold*, dok su za ekspresiju proteina korišćeni sojevi *E. coli* BL21(DE3) pLysS i BL21 STAR. Za ekspresiju proteina na površini ćelija kvasca korišćen je *S. cerevisiae* EBY100 soj nakon kloniranja gena u pCTcon2 vektor; pomenuti soj kvasca i vektor su dobijeni od profesora Dejn Vitrap, MIT, SAD.

4.2. Mikrobiološke metode

Prilikom izvođenja mikrobioloških eksperimenata poštovani su svi propisi i preporuke. Mikrobiološke podloge su pripremane tako što je definisana količina supstanci rastvorena u demineralizovanoj vodi, nakon čega su medijumi sterilisani u autoklavu na 121 °C u trajanju od 20 minuta. Za pripremu medijuma korišćene su supstance čistoće pro analysis. Komponente koje je potrebno dodavati u medijum, a koje zbog degradacije ne smeju da se sterilisu u autoklavu (antibiotici, IPTG, adenin-sulfat, itd.) sterilisane su filtriranjem kroz filtere od 0,22 mikrona.

4.2.1. Medijumi za gajenje bakterija

4.2.1.1. Super optimalni tečni medijum za gajenje bakterija (SOC medijum)

SOC medijum se koristi za regeneraciju ćelija *E.coli* nakon procesa transformacije. Medijum je napravljen tako što je odmereno 0,5 g NaCl-a, 5 g ekstrakta kvasca i 20 g peptona i date komponente su rastvorene u demineralizovanoj vodi. Finalna zapremina rastvora je iznosila 960 mL. Napravljeni medijum je sterilisan u autoklavu na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon sterilizacije medijum je ohlađen na 50 °C i u njega je dodato 10 mL 1M MgCl₂, 10 mL MgSO₄ i 20 mL 20% (w/v) glukoze koji su prethodno takođe sterilisani.

4.2.1.2. Luria Bertani medijum (LB)

Prilikom pripreme kompetentnih ćelija *E. coli* korišćen je LB medijum bez dodatih antibiotika. Medijum je napravljen tako što je odmereno 5 g ekstrakta kvasca, 10 g NaCl i 10 g triptona i date komponente su rastvorene u demineralizovanoj vodi. Finalna zapremina rastvora je iznosila 1 L. pH rastvora je podešeno na 7,4 a zatim je napravljen medijum sterilisan u autoklavu na 121 °C u toku 20 minuta. Čvrsti medijum je pripremljen tako što je pored navedenih komponenti dodato i 20 g agra pre sterilizacije.

Kada su pripremani selekcion medijumi sa antibioticima nakon hlađenja medijuma na 50 °C u isti je dodat 1 mL rastvora antibiotika koncentracije 100 mg/mL (ampicilin ili kanamicin), a za zeocin je dodato 250 µL rastvora koncentracije 100 mg/mL.

4.2.1.3. NZY Broth medijum

Prilikom transformacije komercijalnih ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10-Gold korišćen je NZY Broth medijum. Medijum je napravljen tako što je odmereno 5 g NaCl-a, 5 g ekstrakta kvasca i 10 g NZ amina i date komponente su rastvorene u demineralizovanoj vodi. Finalna zapremina rastvora je iznosila 955 mL. Napravljeni medijum je sterilisan u autoklavu na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon sterilizacije medijum je ohlađen na 50 °C i u njega je dodato 12,5 mL 1M MgCl₂, 12,5 mL MgSO₄ i 20 mL 20% (w/v) glukoze koji su prethodno takođe sterilisani.

4.2.2. Medijumi za gajenje kvasaca

4.2.2.1. YPD medijum za gajenje kvasaca

Prilikom pripreme kompetentnih ćelija *S. cerevisiae* EBY100 korišćen je YPD medijum. Medijum je napravljen tako što je odmereno 10 g ekstrakta kvasca i 20 g triptona i date komponente su rastvorene u demineralizovanoj vodi. Finalna zapremina rastvora je iznosila 900 mL. Napravljeni medijum sterilisan u autoklavu na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon sterilizacije medijum je ohlađen na 50 °C i u njega je dodato 100 mL prethodno sterilisanog rastvora 20% (w/v) glukoze. Čvrst medijum je pripremljen tako što je pre sterilizacije dodato 20 g agra.

4.2.2.2. 2xYPAD tečni medijum za gajenje kvasaca

Prilikom pripreme kompetentnih ćelija *S. cerevisiae* EBY100 korišćen je 2xYPAD medijum. Medijum je napravljen tako što je odmereno 20 g ekstrakta kvasca i 40 g triptona i date komponente su rastvorene u demineralizovanoj vodi. Finalna zapremina rastvora je iznosila 800 mL. Napravljeni medijum sterilisan u autoklavu na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon sterilizacije medijum je ohlađen na 50 °C i u njega je dodato 200 mL prethodno sterilisanog rastvora 20% (w/v) glukoze.

4.2.2.3. Selektivni medijum za gajenje kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100

Za gajenje ćelija kvasca *S. cerevisiae* EBY100 soja koje su transformisane sa pCTcon2 vektorom ili konstruktom datog vektora i gena za ArRMut11 korišćen je YNB-CAA medijum sa glukozom. Medijum je napravljen tako što je odmereno 6,7 g azotnih baza kvasca sa (NH₄)₂SO₄ i 5 g kazaminokiselina i date komponente su rastvorene u demineralizovanoj vodi. Finalna zapremina rastvora je iznosila 890 mL. Napravljeni medijum je sterilisan u autoklavu na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon sterilizacije medijum je ohlađen na 50 °C i u njega je dodato 100 mL prethodno sterilisanih rastvora 20% (w/v) glukoze i 10 mL rastvora adenin sulfata koncentracije 20 mg/mL. Čvrst medijum je pripremljen tako što je pre sterilizacije dodato 20 g agra.

4.2.2.4. Tečni selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY100

Za indukciju ekspresije proteina u kvascu *S. cerevisiae* EBY100 soja korišćen je YNB-CAA medijum sa galaktozom. Medijum je napravljen tako što je odmereno 6,7 g azotnih baza kvasca sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 5 g kazaminokiselina i date komponente su rastvorene u demineralizovanoj vodi. Finalna zapremina rastvora je iznosila 890 mL. Napravljeni medijum je sterilisan u autoklavu na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon sterilizacije medijum je ohlađen na 50 °C i u njega je dodato 100 mL prethodno sterilisanih rastvora 20% (w/v) galaktoze i 10 mL rastvora adenin sulfata koncentracije 20 mg/mL.

4.2.3. Priprema kompetentnih ćelija

4.2.3.1. Hemijski kompetentne ćelije bakterije *Escherichia coli*

Kompetentne ćelije propagacionih i ekspresionih sojeva *E. coli* su pravljene tako što je prvo odgovarajući soj bakterija zasejan metodom iscrpljenja na LB-agar medijum bez antibiotika i ploče su inkubirane 16 h na 37 °C. Nakon toga je pojedinačna kolonija inokulisana u 2 mL tečnog LB medijuma i gajena uz šejkovanje 16 h na 37 °C. Kada su ćelije umnožene 1 mL prekonoćne kulture je prebačen u 100 mL LB medijuma i ćelije su gajene uz mešanje šejkerom na 37 °C dok optička gustina na 600 nm nije dostigla vrednost 0,4. Kada je dostignuta odgovarajuća optička gustina, kultura ćelija je prebačena u dve plastične viala koje su prethodno ohlađene na ledu. Ćelije su inkubirane 10 minuta na ledu, zatim su centrifugirane 10 min na 4 °C i 3000 obrtaja/min, nakon čega je supernatant odbačen, a ćelije su resuspendovane u 10 mL 85 mM rastvora CaCl_2 koji je sadržao 15% glicerol (v/v). Resuspendovane ćelije su centrifugirane 10 minuta na 4 °C i 3000 obrtaja/min, supernatant je odbačen, a ćelije su ponovo resuspendovane u istom rastvoru i inkubirane 30 minuta na ledu. U finalnom koraku su ćelije centrifugirane 10 minuta na 4 °C i 3000 obrtaja/min i resuspendovane u 1 mL istog rastvora. Suspenzija ćelija je podeljena u alikvote od 50 µL, alikvoti su zamrznuti u tečnom azotu i uskladišteni do upotrebe na -80 °C.

4.2.3.2. Hemijski kompetentne ćelije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja

Kompetente ćelije kvasca *S. cerevisiae* EBY100 napravljenje su tako što su ćelije zasejane metodom iscrpljenja na čvrst YPD medijum i ploče su inkubirane na 30 °C u periodu od 36 h. Nakon toga je pojedinačna kolonija inokulisana u 2,5 mL 2xYPAD medijuma uz dodatak hloramfenikola finalne koncentracije 12,5 µg/mL i gajena 16 h na 30 °C uz mešanje šejkerom na 200 obrtaja/min. Nakon umnožavanja celokupna zapremina je prebačena u 50 mL 2xYPAD medijuma i ćelije su gajene na 30 °C uz mešanje dok optička gustina na 600 nm nije dostigla vrednost 1 za šta je bilo potrebno oko 4 h. Nakon toga su ćelije centrifugirane 5 minuta na 3000 obrtaja/ minuti, supernatant je odbačen, a ćelije su resuspendovane u 25 mL sterilne demineralizovane vode. Potom su ćelije centrifugirane 5 minuta na 3000 obrtaja/minuti i resuspendovane u 500 µL sterilne demineralizovane vode. Nakon resuspendovanja ćelija u manjoj zapremini vode one su centrifugirane u minifugi u trajanju od 5 minuta na 6000 obrtaja/minuti i finalno resuspendovane u 500 µL prethodno sterilisanog FCC rastvora (5% glicerol (v/v) i 10% DMSO (v/v)). Suspenzija ćelija je podeljena u alikvote od 50 µL koji su uskladišteni do upotrebe na -80 °C.

4.2.3.3. Transformacija kompetentnih ćelija *Escherichia coli*

Alikvot kompetentnih ćelija je otopljen na ledu, nakon čega je u ćelije dodato od 1-5 µL rastvora plazmida, ligacione smeše ili PCR smeše. Ćelijska suspenzija je blago promešana i inkubirana 30 minuta na ledu. Nakon isteka perioda inkubacije na hladno ćelije su inkubirane 45 sekundi na 42 °C,

a zatim su vraćene na led u trajanju od 2 minuta nakon čega je u ćelije dodato 950 μ L SOC medijuma i one su inkubirane na 37 °C u periodu od 1 h uz mešanje na 250 obrtaja/min. Nakon isteka perioda regeneracije ćelija u zavisnosti od eksperimenta na pojedinačne LB ploče sa odgovarajućim antibiotikom je zasejano između 100 i 300 μ L ćelijske suspenzije. Ploče su zatim inkubirane od 14-16 h na 37 °C.

Transformacija ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10-Gold rađena je tako što su polipropilenske vialne zapremine 15 mL ohlađene na ledu, nakon čega je 100 μ L otopljene ćelijske suspenzije prebačeno u vialu. U vialu sa ćelijskom suspenzijom dodato je 2 μ L β -merkaptotetanol i lagano je promešana suspenzija. Suspenzija ćelija je inkubirana 10 minuta na ledu uz mešanje na svaka 2 minuta, nakon čega je u ćelije dodato 5 μ L PCR smeše i zatim su uzorci inkubirani 30 minuta na ledu. Nakon isteka predviđenog perioda ćelije su podvrgnute toplotnom šoku na 42 °C u trajanju od 30 sekundi, inkubirane 2 minuta na ledu, nakon čega je u alikvot ćelija dodato 900 μ L NZY Broth medijuma zagrejanog na 42 °C. Uzorci su inkubirani 1 h na 37 °C uz mešanje i po 100 μ L ćelijske suspenzije je zasejano na LB-agar ploču sa odgovarajućim antibiotikom u zavisnosti od plazmida sa kojim je rađeno. Ploče su inkubirane 14 h na 37 °C.

4.2.3.4. Transformacija kompetentnih ćelija *Saccharomyces cerevisiae* EBY100

Nakon otapanja na ledu kompetentne ćelije *S. cerevisiae* su centrifugirane 2 minuta na 6000 obrtaja/minuti, zatim je supernatant iznad ćelija odbačen, a u ćelije je dodato 260 μ L 50% rastvora PEG3350, 50 μ L prethodno skuvane jednolančane DNK koncentracije 2 mg/mL, 36 μ L sterilnog rastvora 1 M litijum acetata i 14 μ L odgovarajuće plazmidne DNK (prazan pCTcon2 vektor ili pCTcon2 vektor sa ukloniranim genom za ArRMut11). Nakon dodavanja navedenih komponenti ćelijska suspenzija je promešana na vorteksu i inkubirana na 42 °C u trajanju od 1 h. Zatim je u ćelijsku suspenziju dodat 1 mL medijuma za rast (YNB-CAA medijum sa glukozom i adeninom) i 200 μ L smeše je zasejano na čvrst medijum, nakon čega su ploče sa transformisanim ćelijama inkubirane 48 h na 28 °C.

4.3. Molekularno-biološke metode

4.3.1. Kloniranje gena za ArRMut11 u pCTcon2 vektor

4.3.1.1. Umnožavanje gena za ArRMut11 PCR reakcijom

Sekvenca gena za ArRMut11 (5' $\rightarrow$ 3'):

```
ATGGCGTTTAGCGCGGATACCCCGGAAATTGTGTATACCCATGATACCGGCCTGGATTATATTACCTATAGCG
ATTATGAACTGGATCCGGCGAACCCGCTGGCGGGCGGCGGCGTGGATTGAAGGCGCGTTTGTGCCGCC
GAGCGAAGCGCGCATTAGCATTTTTGATCAGGGCTTTTATACCAGCGATGCGACCTATAACCACCTTTCATGT
GTGGAACGGCAACGCGTTTCGCCTGGGCGATCATATTGAACGCCTGTTTAGCAACGCGGAAAGCATTCGCC
TGATTCCGCCGCTGACCCAGGATGAAGTGAAAGAAATTGCGCTGGAACCTGGTGGCGAAAACCGAACTGCG
CGAAGCGATGGTGACCGTGACCATTACCCGCGGCTATAGCAGCACCCCGTTTGAACGCGATATTACCAAAC
ATCGCCCGCAGGTGTATATGAGCGCGTGCCCGTATCAGTGGATTGTGCCGTTTGTATCGCATTCGCGATGGCG
TGCATCTGATGGTGGCGCAGAGCGTGCGCCGCACCCGCGCAGCAGCATTGATCCGCAGGTGAAAACTT
TCAGTGGGGCGATCTGATTGCGCGGATTACAGGAAACCCATGATCGCGGCTTTGAACTGCCGCTGCTGCTGG
ATTGCGATAACCTGCTGGCGGAAGGCCCGGGCTTTAACGTGGTGGTGATTAAAGATGGCGTGGTGGCGAGC
CCGGGCCGCGCGGCGCTGCCGGGCATTACCCGCAAAACCGTGCTGGAAATTGCGGAAAGCCTGGGCCATG
AAGCGATTCTGGCGGATATTACCCGCGGAACTGTATGATGCGGATGAAGTGCTGGGCTGCAGCACCGGC
GGCGGCGTGTGGCCGTTTGTGAGCGTGATGGCAACAGCATTAGCGATGGCGTGCCGGGGCCCGGTGACCC
AGAGCATTATTCGCCGCTATTGGGAACTGAACGTGGAACCGAGCAGCCTGCTGACCCCGGTGCAGTAT
```

Gen za ArRMut11 ω -transaminazu umnožen je PCR reakcijom upotrebom prajmera za kloniranje gena u pCTcon2 vektor. Kao templat je korišćen gen koji je ukloniran u pET29(a) vektor. Sastav smeše za umnožavanje gena prikazan je u tabeli 2, a PCR program koji je korišćen prikazan je u tabeli 3.

Sekvenca prajmera za kloniranje gena za ArRMut11 u pCTcon2 vektor (5' → 3'):

Forward prajmer *NheI* - AAGCTAGCATGGCGTTTAGCGCG

Reverse prajmer *XhoI* – AACTCGAGTCATGCGGCCGCATAGTC

Nakon što je postupak umnožavanja gena PCR metodom završen, proizvod je tretiran *DpnI* enzimom 1 h na 37 °C da bi se uklonila templatna DNK, prečišćen upotrebom kompleta za prečišćavanje po protokolu koji je opisan u odeljku 4.3.4. i analiziran DNK elektroforezom na agaroznom gelu (odeljak 4.3.6.).

Tabela 2. Sastav smeše za umnožavanje gena za ArRMut11 PCR reakcijom.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina (μL)</i>	<i>Finalna koncentracija</i>
MiliQ voda	37,5	
10X pufer za <i>Pfu</i> polimerazu	5	1x
Smeša deoksiribonukleotida-dNTP (10mM)	1	0,2 mM
DMSO (5%)	2,5	0,25%
Forward prajmer (25 μM)	1	0,5 μM
Reverse prajmer (25 μM)	1	0,5 μM
<i>Pfu</i> polimeraza (5 U/ μL)	1	0,1 U/μL
Templat	1	1 ng/μL
Ukupna zapremina	50	

Tabela 3. PCR program za umnožavanje gena za ArRMut11.

<i>Korak</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Vreme</i>	
Inicijalna denaturacija	95	2 minuta	
Denaturacija	95	30 sekundi	14 ciklusa
Annealing	69.6 uz smanjenje za 0.5°C po ciklusu	30 sekundi	
Elongacija	72	110 sekundi	
Denaturacija	95	30 sekundi	
Annealing	62.6	30 sekundi	19 ciklusa
Elongacija	72	110 sekundi	
Finalna elongacija	72	5 minuta	

4.3.1.2. Dvostruka digestija umnoženog gena za ArRMut11 i pCTcon2 vektora restrikcionim enzimima

Da bi gen za ArRMut11 bio insertovan u pCTcon2 vektor, vektor i prethodno dobijeni proizvod PCR reakcije su podvrgnuti dvostrukoj digestiji upotrebom *NheI* i *XhoI* restrikcionih enzima u trajanju od 12 h na 37 °C. Nakon toga su restrikcioni enzimi inaktivirani 20 minuta na 80 °C. Dvostruko digestovani proizvodi su zatim prečišćeni upotrebom kompleta za prečišćavanje PCR

proizvoda po protokolu koji je opisan u odeljku 4.3.4. i analizirani DNK elektroforezom na agaroznom gelu (odeljak 4.3.6.). U tabeli 4 je prikazan sastav reakcionih smeša za digestiju gena i vektora.

Tabela 4. Smeša za dvostruku restrikciju ArRMut11 gena i pCTcon2 vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>PCR proizvod</i>	<i>pCTcon2 vektor</i>
MiliQ voda	3,5 µL	5,5 µL
10X <i>Tango</i> pufer	2 µL	2 µL
<i>NheI</i> restrikcioni enzim (10 U/µL)	0,5 µL	0,5 µL
<i>XhoI</i> restrikcioni enzim (10 U/µL)	2 µL	2 µL
Uzorak	12 µL	10 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	20 µL	20 µL

4.3.1.3. Defosforilacija pCTcon2 vektora

Efikasnost ligacije može se pospešiti defosforilacijom dvostruko digestovanog vektora kako ne bi došlo do njegove religacije. U uzorak dvostuko digestovanog vektora dodato je 0,5 µL alkalne fosfataze i 2,3 µL odgovarajućeg pufera. Defosforilacija pCTcon2 vektora je trajala 15 minuta na 37 °C, nakon čega je enzim inaktiviran inkubiranjem na 80 °C u toku 10 minuta.

4.3.1.4. Ligacija dvostruko digestovanih proizvoda

Dvostruko digestovani proizvodi gena za ArRMut11 i pCTcon2 vektora tretirani na prethodno opisani način su zatim podvrgnuti ligaciji primenom T4 DNK ligaze. Ligacija je trajala 16 h na 16 °C, nakon čega je enzim inaktiviran inkubacijom na 75 °C u toku 10 minuta. Sastav reakcione smeše prikazan je u tabeli 5.

Tabela 5. Sastav smeše za ligaciju.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina (µL)</i>
MiliQ voda	11,5
Dvostruko digestovan vektor	3
Dvostruko digestovan PCR proizvod	2
<i>T4 DNK ligaza</i>	0,5
Pufer za ligazu	2
PEG4000	1
<i>Ukupna zapremina</i>	20 µL

Nakon završetka ligacije transformisane su kompetentne ćelije *E. coli* DH5α (odeljak 4.2.3.3.) sa 5 µL ligacione smeše.

4.3.1.5. Provera uspešnosti kloniranja restrikcionom digestijom

Nakon transformacije *E. coli* DH5α ligacionom smešom ArRMut11-pCTcon2 izolovani su plazmidi iz pojedinačnih kolonija koje su uzgajane na LB podlozi sa ampicilinom i postavljena je restrikcija sa *EcoRI* enzimom u trajanju od 2 h na 37 °C. Nakon isteka perioda restrikcije enzim je inaktiviran 20 minuta na 65 °C, a restrikovani plazmidi su analizirani DNK elektroforezom na agaroznom gelu (odeljak 4.3.6.). Kao negativna kontrola korišćen je prazan pCTcon2 vektor

restrikovan na isti način kao i uzorci izolovani iz transformisanih ćelija *E. coli* DH5 α . Sastav smeše za restrikciju plazmida prikazan je u tabeli 6.

Tabela 6. Sastav smeše za restrikciju plazmida.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina (μL)</i>
MiliQ voda	4
Izolovani plazmidi	5
<i>EcoRI</i> enzim	0,5
10x <i>EcoRI</i> pufer	1
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>10,5 μL</i>

4.3.1.6. Provera uspešnosti kloniranja PCR reakcijom

Uspešnost kloniranja gena za ω -transaminazu ArRMut11 u pCTcon2 vektoru proverena je pored restrikcije plazmida i PCR reakcijom upotrebom prajmera koji su korišćeni za kloniranje gena za ω -transaminazu. Kao templati su korišćeni plazmidi izolovani iz pojedinačnih kolonija koje su porasle nakon transformacije *E. coli* DH5 α ćelija. Sastav reakcione smeše i program za PCR su bili isti kao i u odeljku 4.3.1.1. sa tom razlikom što su korišćeni drugi templati koji su već prethodno pomenuti. Rezultati PCR reakcije su analizirani DNK elektroforezom na agaroznom gelu, opisanom u odeljku 4.3.6.

4.3.2. Kreiranje mesto specifičnih mutanata ArRMut11 u pET29a vektoru

Mesto specifični mutanti ω -transaminaze ArRMut11 u pET29(a) vektoru su napravljeni upotrebom *QuickChange Lightning Site - Directed Mutagenesis* kompleta (Agilent Technologies, SAD) prema uputstvu proizvođača. Kao templat je korišćen insert ArRMut11 u pET29(a) vektoru, a za svaku od odabranih pozicija korišćeni su odgovarajući prajmeri. PCR program je prikazan u tabeli 7.

Sekvence prajmera za kreiranje mutanata ArRMut11 (5' $\rightarrow$ 3'):

1. Mutant na poziciji 88 - zamena fenilalanina leucinom (F $\rightarrow$ L)
Forward primer - CGATCATATTGAACGCTGCTGAGCAACGCGGAAAGCATTTCGC
Reverse primer - GCGAATGCTTTCCGCGTTGCTCAGCAGGCGTTCAATATGATCG
2. Mutant na poziciji 184 - zamena asparaginske kiseline izoleucinom (D $\rightarrow$ I)
Forward primer - CCCC GCGCAGCAGCATTATTCCG CAGGTGAAAACTTTCAG
Reverse primer - CTGAAAGTTTTTCACCTGCGGAATAATGCTGCTGCGCGGGG
3. Mutant na poziciji 211 - zamena leucina asparaginskom kiselinom (L $\rightarrow$ D)
Forward primer - CGCGGCTTTGAACTGCCGGATCTGCTGGATTGCGATAACC
Reverse primer - GGTTATCGCAATCCAGCAGATCCGGCAGTTCAAAGCCGCG

Tabela 7. PCR program za kreiranje mesto specifičnih mutanata ArRMut11.

<i>Korak</i>	<i>Temperatura ($^{\circ}$C)</i>	<i>Vreme</i>	 18 ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	2 minuta	
Denaturacija	95	20 sekundi	
Annealing	60	10 sekundi	
Elongacija	68	195 sekundi	
Finalna elongacija	68	5 minuta	

Nakon umnožavanja gena i uvođenja mutacija na odgovarajućim pozicijama uzorci su analizirani agaroznom DNK elektroforezom (odjeljak 4.3.6.), tretirani *DpnI* enzimom 30 minuta i potom je urađena transformacija ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10-Gold. Iz transformisanih ćelija su izolovani plazmidi za sekvenciranje i transformaciju ekspresionih sojeva *E. coli*.

4.3.3. Kreiranje nasumično mutiranih biblioteka opin dehidrogenaze u pET22b vektoru

4.3.3.1. Uvođenje mutacija u gen za opin dehidrogenazu

Za uvođenje mutacija u gen za opin dehidrogenazu primenjen je *GeneMorph II Mutagenesis* komplet. Primenom različitih koncentracija templata mogu se dobiti biblioteke sa različitom stopom mutacija. U ovom slučaju izabrano je kreiranje biblioteke mutanata sa srednjom stopom mutacija. Nakon PCR reakcije umnoženi mutirani gen za opin dehidrogenazu iskorišćen je kao mega prajmer za amplifikaciju celog konstrukta gena sa pET22(b) vektorom. U tabeli 8 prikazan je sastav smeše za umnožavanje gena, dok je u tabeli 9 prikazan PCR program.

Sekvence primenjenih prajmera za umnožavanje gena za opin dehidrogenazu (5' → 3'):

Forward prajmer - CATATGTCACGTGAAACCGTGTGGGC

Reverse prajmer - CTCGAGCGCTTTCACGCCC

Tabela 8. Sastav smeše za umnožavanje gena za opin dehidrogenazu PCR reakcijom.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina (μL)</i>
MiliQ voda	30
10X <i>Mutazyme II</i> pufer	5
Smeša deoksiribonukleotida-dNTP (40mM)	1
<i>Forward</i> prajmer (125 ng/μL)	1
<i>Reverse</i> prajmer (125 ng/μL)	1
<i>Mutazyme II</i> DNK polimeraza (2,5 U/ μL)	1
Templat	11
<i>Ukupna zapremina</i>	50

Tabela 9. PCR program za umnožavanje gena za opin dehidrogenazu.

<i>Korak</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Vreme</i>	30 ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	2 minuta	
Denaturacija	95	30 sekundi	
<i>Annealing</i>	62	30 sekundi	
Elongacija	72	70 sekundi	
Finalna elongacija	72	10 minuta	

PCR proizvod je prečišćen prema protokolu opisanom u odeljku 4.3.4., izmerena mu je koncentracija upotrebom NanoDrop aparata i uzorak je analiziran DNK elektroforezom na agaroznom gelu (odjeljak 4.3.6.)

4.3.3.2. Umnožavanje celog plazmida primenom mega prajmera

U cilju umnožavanja konstrukta opin dehidrogenaze u pET22(b) vektoru postavljena je PCR reakcija upotrebom *Q5* polimeraze i primenjen je prethodno dobijeni mutirani gen za enzim kao mega prajmer. Nakon što je PCR reakcija završena, uklonjena je templatna DNK primenom *DpnI* enzima. Po dodatku 1 μ L *DpnI* enzima uzorak je inkubiran 1 h na 37 °C. Sastav smeše za PCR prikazan je u tabeli 10, a program za u tabeli 11. Nakon uklanjanja templatne DNK dobijeni PCR proizvod je analiziran DNK elektroforezom na agaroznom gelu i iskorišćen za transformaciju ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10-Gold.

Tabela 10. Sastav smeše za mega prajmer PCR.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina (μL)</i>
MiliQ voda	21,8
dNTP mix	1
5x pufer za <i>Q5</i> polimerazu	10
GC enhancer	10
Mega prajmer	6,2
<i>Q5</i> polimeraza	0,5
Templat	0,5
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>50</i>

Tabela 11. Program za mega prajmer PCR.

<i>Korak</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Vreme</i>	 30 ciklusa
Inicijalna denaturacija	98	30 sekundi	
Denaturacija	98	10 sekundi	
<i>Annealing</i>	72	30 sekundi	
Elongacija	72	7 minuta	
Finalna elongacija	72	10 minuta	

4.3.4. Prečišćavanje PCR proizvoda

PCR proizvodi, kao i dvostruko digestovani vektori, prečišćeni su prema protokolu za prečišćavanje PCR proizvoda. Na 100 μ L uzorka dodato je 500 μ L pufera za vezivanje (3M Guanidini-tiocijanat; 10 mM Tris-HCL, pH 6,6; 5% etanol (v/v)). Smeša je naneta na mini-spin kolonu i centrifugirana 60 sekundi na 11000 g. Silika gel mini-spin kolona je zatim isprana sa 500 μ L pufera za ispiranje (20 mM NaCl; 2 mM Tris-HCl pH 7,5) i centrifugiranjem 60 sekundi na 11000 g. Korak ispiranja je ponovljen sa 200 μ L pufera, a zatim je kolona prebačena u novi ependorf i u uzorak je dodato 20 μ L pufera za eluiranje (10 mM Tris-HCl pH 8,5). Uzorak je centrifugiran 60 sekundi na 11000 g.

4.3.5. Izolovanje plazmida iz bakterija

Sa čvrstog LB medijuma sa odgovarajućim antibiotikom (zavisno od rezistencije plazmida sa kojim je određen eksperiment rađen) zasejana je pojedinačna kolonija u 5 mL medijuma koji sadrži isti antibiotik. Bakterijska kultura je gajena u šejkeru na 200 obrtaja/minuti na 37 °C u periodu od 16 h. Prekonoćna kultura je centrifugirana na 13000 obrtaja/min u trajanju od 1 minuta, da bi se ćelije i

supernatant odvojili, nakon čega su ćelije resuspendovane u 150 μ L hladnog GTE⁺ rastvora (25 mM TRIS, 10 mM EDTA, 50 mM glukoza, 100 μ g/mL ribonukleaze, pH 8,0). U uzorak je zatim dodato 300 μ L sveže pripremljenog P2 rastvora (200 mM NaOH, 1% SDS), nakon čega je isti lagano promešan dok se rastvor ćelija nije izbistrio, a zatim je dodato 450 μ L hladnog 4 M CH₃COOK, pH 6,3. Ependorf je lagano promešan nekoliko puta izvrtanjem, pri čemu dolazi do formiranja beličastog precipitata. Čelijska suspenzija je cetrifugirana 4 minuta na 13000 obrtaja/min, zatim je supernatant je prebačen u nov ependorf, a plazmidna DNK je precipitirana dodatkom 400 μ L izopropanola. Sadržaj ependorfe je promešan nekoliko puta, centrifugiran 4 minuta na 13000 obrtaja/min, nakon čega je supernatant uklonjen, a talog je ispran dodatkom 1 mL ledeno hladnog 75% etanola. Uzorak je centrifugiran 2 minuta na 13000 obrtaja/min i precipitirana plazmidna DNK osušena u vakuum uparivaču na 45 °C u trajanju od 30 minuta.

4.3.6. DNK elektroforeza na agaroznom gelu

DNK elektroforeza na agaroznom gelu je korišćena za analizu PCR proizvoda i plazmida koji su restrikovani i na taj način su praćeni koraci tokom kloniranja gena i kreiranja biblioteka mutanata. U zavisnosti od mase uzoraka koji su ispitivani korišćena je 0,6% ili 0,8% agarozu u TBE puferu (89 mM TRIS, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8,0). Pre nanošenja na gel uzorci su mešani sa „6x purple loading dye“ bojom za DNK elektroforezu, a osim uzoraka na gel su nanošeni i DNK molekulski markeri, sa kojima su dobijene trake analiziranih uzoraka poređene. Elektroforeza je rađena pod naponom od 80 V, a DNK je vizuelizovana pod UV-lampom na osnovu prisustva SYBR Green boje koja je dodavana u agarozni gel tokom pripreme.

4.4. Izolovanje i karakterizacija rastvorne i imobilizovane ArRMut11

4.4.1. Preparativne metode

4.4.1.1. Proizvodnja ArRMut11 u *Escherichia coli* (DE3) pLySs soju

Proizvodnja ArRMut11 ω -transaminaze rađena je u *E. coli* BL21(DE3) pLysS soju u LB medijumu sa kanamicinom (30 μ g/mL). Kultura bakterija je gajena na 37 °C uz mešanje pri 200 obrtaja/minuti dok optička gustina merena na talasnoj dužini 600 nm nije dostigla vrednost između 0,6-0,7. Nakon toga je ekspresija proteina indukovana dodatkom IPTG-a, tako da mu je finalna koncentracija bila 0,5 mM i temperatura ekspresije je snižena na 30 °C. Nakon 24 h ćelije su prikupljene centrifugiranjem 25 minuta na 3000 obrtaja/min. Supernatant je odbačen, a ćelije su resuspendovane u puferu za lizu (PBS pufer, pH 7,5 koji je sadržao 20 mM imidazol i 0,1 mM PLP) i lizirane ultrazvučnom sondom (4x30 s) na hladno. Ekstrakt bez ćelija je dobijen centrifugiranjem liziranih ćelija 25 minuta na 3000 obrtaja/minuti, nakon čega je supernatant proceden kroz 0,22 μ m PVDF filter.

4.4.1.2. Metal-afinitetna hromatografija ArRMut11

Protein od interesa je iz prethodno dobijenog lizata prečišćen metal-afinitetnom hromatografijom na Ni-NTA koloni. Kolona je ekvilibrisana istim puferom koji je korišćen za lizu bakterijskih ćelija, nevezani proteini su uklonjeni ispiranjem kolone sa 5V ekvilibracionog pufera, dok je eluiranje ArRMut11 izvedeno linearnim gradijentom rastvora imidazola od 20 mM do 300 mM u PBS puferu pH 7,5. Proces prečišćavanja proteina praćen je denaturišućom elektroforezom na 12% gelu za razdvajanje (odeljak 4.4.2.5.), gel je obojen rastvorom CBB R-250 boje i trake proteina su poređene

sa molekulskim markerima. Frakcije koje su sadržale čist protein su spojene i uzorak je dijalizovan naspram PBS pufera pH 7,5. Koncentracija proteina je određena kako je opisano u odeljku 4.4.2.3.

4.4.1.3. Imobilizacija ArRMut11

4.4.1.3.1. Sinteza nosača za imobilizaciju enzima

Makroporozni nosač za imobilizaciju enzima sintetisan je prema blago modifikovanoj prethodno objavljenoj proceduri.^[225] Kontinualna faza (125 mL, 1wt% PVP, $M_w=360\ 000$ g/mol, u demineralizovanoj vodi) je stavljena u reaktor od 250 mL sa usidrenom mešalicom i zagrevana je do 70 °C. Nakon toga, monomerna faza, koja je sadržala 0,43 g AIBN-a, 10,33 g GMA, 7,68 g EDGMA, 2,38 g 1-dodekanola i 21,38 g cikloheksanola je dodata u kontinualnu fazu uz mešanje. Reakcija je stopirana nakon 6 h, a dobijene kopolimerne čestice su isprane 5 puta sa etanolom i osušene na 40 °C. Distribucija čestica na osnovu veličine je postignuta prosejavanjem polimera kroz veći broj sita različite veličine pora. Za imobilizaciju enzima je korišćena frakcija koja je sadržala čestice veličine između 150 i 500 μm .

Kopolimer je podvrgnut aminovanju sa etilendiaminom na sledeći način: Četiri grama kopolimera su suspendovana u 100 mL demineralizovane vode, a zatim je dodato 10 g etilendiamina i reakciona smeša je inkubirana 24 h na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon toga, reakciona smeša je zagrevana na 80 °C uz mešanje narednih 6 h. Polimer je profiltriran, ispran demineralizovanom vodom i osušen na 40 °C.

4.4.1.3.2. Imobilizacija enzima

Prethodno dobijeni aminovani polimer iskorišćen je za imobilizaciju enzima. Inicijalno je kopolimer ispran sa 0,1 M natrijum fosfatnim puferom pH 8,0, a zatim je inkubiran u 2,5% (v/v) glutaraldehidu u istom puferu na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 h uz povremeno mešanje. Višak glutaraldehida je uklonjen ispiranjem sa 0,1 M natrijum fosfatnim puferom pH 7,0. Aktiviranom polimeru je dodata određena količina rastvora ω -transaminaze sa 0,25 mM PLP-om (0,64; 1,6; 3,2; 8 ili 32 jedinice enzima) i uzorci su ostavljeni na 4 °C tokom 48 h uz povremeno mešanje. Nakon toga su uzorci isprani PBS puferom pH 7,5 koji je sadržao 1 M natrijum hlorid. Slobodne vezujuće grupe proteina su blokirane inkubiranjem nosača sa imobilizovanim enzimom u rastvoru 0,1 M etanolamina u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu pH 7,0 tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Polimer je ispran sa 0,1 M natrijum fosfatnim puferom pH 7,0 i čuvan na 4 °C do upotrebe. Specifična aktivnost enzima je određena esejem opisanim u odeljku 4.4.2.2. Dobijeni rezultati su predstavljeni grafički upotrebom Graph Pad Prism 6.

4.4.1.4 Sinteza 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ola primenom ArRMut11

U rastvor PLP-a (4,25 mg; 0,017 mmol) i izopropilamina (1,46 mL; 17 mmol) u destilovanoj vodi dodat je dihidrotestosteron (50 mg; 0,17 mmol) rastvoren u DMF-u (5,95 mL; 35%). pH vrednost rastvora je podešena na 9,9. U rastvor je zatim dodata eksprimirana ArRMut11 u formi liofilizovanog bakterijskog lizata (350 mg) i reakciona smeša je inkubirana na 42 °C uz mešanje (180 rpm) tokom 4 dana. Svakog dana je dodavana nova količina svežeg enzima (50 mg). Nakon 4 dana reakcija je stopirana dodatkom 2 M HCl (5,1 mL), a neizreagovani supstrat je odvojen ekstrakcijom sa dietiletom. Vodena faza je tretirana sa 10 M NaOH (1 mL), nakon čega je amino analog dihidrotestosterona ekstrahovan sa dietiletom. Kombinovani organski ekstrakti su osušeni sa Na_2SO_4 , rastvor je profiltriran i rastvarač je uklonjen uparavanjem na vakum uparivaču. Proizvod je dobijen kao braonkasta čvrsta materija u prinosu od 58% (29 mg). Čist proizvod je dobijen nakon preparativne *dry-flash* hromatografije na silika gelu (Merck silika gel 60 (0,063-0,200 mm)) upotrebom dvostepenog sistema eluiranja. U prvom koraku je korišćena smeša dihlormetan/metanol

(90:10, v/v), a nakon toga je u smešu rastvarača dodat trietilamin (dihlormetan/metanol/trietilamin, 89:10:1).

NMR spektar je snimljen na instrumentu Bruker AVANCE III 400 na frekvencijama od 400 MHz (^1H) i 100 MHz (^{13}C) na sobnoj temperaturi. Za kalibraciju su korišćeni signali rastvarača (metanol- d_4). Radi kompletne asignacije signala snimljeni su i HMBC i NOESY spektri. Maseni spektar je snimljen na LTQ Orbitrap XL uređaju primenom ESI metode jonizacije.

^1H -NMR (400 MHz, metanol- d_4 , ppm): 0,73 (s, 3H, H-18); 0,84 (s, 3H, H-19); 0,90 – 2,05 (skeletal steroida); 3,14 (bm, 1H, H-3); 3,56 (t, $J=8,6$ Hz, 1H, H-17).

^{13}C -NMR (100 MHz, metanol- d_4 , ppm): 11,8 (CH_3 , C-18); 11,9 (CH_3 , C-19); 21,6 (CH_2); 24,4 (CH_2); 29,0 (CH_2); 29,8 (CH_2); 30,8 (CH_2); 32,9 (CH_2); 33,2 (CH_2); 36,1 (CH_2); 37,0 (CH); 37,5 (Cq); 38,2 (CH_2); 40,5 (CH); 44,2 (Cq); 47,3 (CH, C-3); 52,6 (CH); 56,0 (CH); 82,7 (CH_2 , C17).

4.4.2. Analitičke metode

4.4.2.1. Određivanje supstratne specifičnosti ArRMut11 reverzno faznom hromatografijom

Da bi se odredila supstratna specifičnost ω -transaminaze ArRMut11 ka različitim steroidima praćena je konverzija (*R*)-MBA u acetofenon reverzno faznom hromatografijom na koloni NucleosilC18. (*R*)-MBA (25 mM) i PLP (0,5 mM) su rastvoreni u HEPES puferu (100 mM; pH 8,0). U 300 μL ovog rastvora je dodato 100 μL sirovog bakterijskog ekstrakta sa eksprimiranom ArRMut11 i 100 μL odgovarajućeg steroida rastvorenog u DMSO (20 mM, 20%). Reakcione smeše su inkubirane 24 h na 37 °C uz mešanje (180 obrtaja/minuti). Reakcija je zaustavljena dodatkom 500 μL acetonitrila koji je sadržao 0,2% TFA. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 13000 obrtaja/minuti i supernatanti su analizirani na NucleosilC18 koloni. Korišćen je linearni gradijent od 30% acetonitrila/70% 0,1% TFA do 95% acetonitrila/5% 0,1% TFA pri protoku od 1 mL/minuti. Proces je praćen UV detekcijom na 245, 254 i 280 nm. Acetofenon je eluiran pri retencionom vremenu od 4,6 minuta.

4.4.2.2. Merenje enzimske aktivnosti ArRMut11

Enzimska aktivnost je izmerena u rastvoru koji je sadržao 12,5 mM (*R*)-MBA i 30 mM natrijum piruvat u 0,1 M HEPES puferu pH 8,0 uz dodatak 0,25 mM PLP-a. Reakcione smeše su inkubirane 2 h na 37 °C uz mešanje. ApSORBANCA je merena svakih 30 minuta na 245 nm pri čemu je praćena konverzija (*R*)-MBA u acetofenon koji se sa velikom osetljivošću može detektovati na datoj talasnoj dužini ($\epsilon=12 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).^[169] Jedna jedinica enzimske aktivnosti je definisana kao količina enzima koja katalizuje konverziju 1,0 μmol (*R*)-MBA u acetofenon po minutu.

4.4.2.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u bakterijskom lizatu i nakon prečišćavanja afinitetnom hromatografijom određena je Bradfordovom metodom uz upotrebu goveđeg serum albumina kao standarda.^[226]

4.4.2.4. Tankoslojna hromatografija na silika gelu (TLC)

Proces sinteze i prečišćavanja amino analoga dihidrotestosterona je praćen tankoslojnom hromatografijom na silika gelu (silika gel 60 F₂₅₄, Merck). Razvijanje hromatograma je rađeno u sistemu razvijaa dihlormetan/metanol/trietilamin (89:10:1), a detekcija je izvršena nakon prskanja pločica rastvorom 50% sumporne kiseline.

4.4.2.5. Denaturišuća poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Prisustvo proteina od interesa nakon proizvodnje u odgovarajućem soju *E. coli* (zavisno od eksperimenta), kao i homogenost uzorka nakon prečišćavanja proteina su provereni pomoću denaturišuće poliakrilamidne gel elektroforeze (SDS-PAGE). Za koncentrovanje uzoraka korišćen je 4% gel, dok je za razdvajanje uzoraka korišćen 12% gel. Gelovi su pripremljeni prema uputstvu prikazanom u tabeli 12.

Tabela 12. Sastav gelova za denaturišuću poliakrilamidnu gel elektroforezu.

Komponenta	4% gel za koncentrovanje	10% gel za razdvajanje
Rastvor akrilamida (AA, 30% T, 2,7% C)*	500 µL	4 mL
1,5 M TRIS pufer pH 8,8	/	2,5 mL
0,5 M TRIS pufer pH 6,8	940 µL	/
Voda	2,25 mL	3,33 mL
10% SDS	38 µL	100 µL
TEMED	2 µL	4 µL
10% APS	5 µL	75 µL
Ukupna zapremina	4 mL	10 mL

*T je ukupna masa akrilamida i bisakrilamida u 100 mL rastvora; C je masa bisakrilamida u odnosu na T.

Uzorci za elektroforezu su pripremljeni mešanjem sa puferom za uzorke u odnosu 4:1 (uzorak:PUZ, v/v). Pufer za uzorke sadrži 60 mM TRIS pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 14,4 mM β -merkaptotanol i 0,02% BFP. Dok su uzorci bili u gelu za koncentrovanje elektroforeza je išla pod naponom od 80 V, a kada su ušli u gel za razdvajanje napon je povećan na 180 V. Razdvajanje je izvršeno u puferu za elektroforezu (25 mM TRIS; 192 mM glicin; 0,1% SDS; pH 8,3), a nakon završene elektroforeze trake proteina su vizuelizovane bojenjem gela rastvorom CBB R-250 (0,1% CBB; 50% metanol; 10% sirćetna kiselina) i obezbojavanjem sa rastvorom 7% sirćetne kiseline.

4.4.3. Karakterizacija rastvorne i imobilizovane ArRMut11

4.4.3.1. Određivanje pH optimuma

pH optimum rastvorne i imobilizovane forme ArRMut11 određen je merenjem enzimске aktivnosti prema protokolu opisanom u odeljku 4.4.2.2. na različitim pH vrednostima u opsegu od pH 5 do pH 12 (pH=5-6, citratno-fosfatni pufer; pH=7-9, HEPES pufer; pH=10-11, karbonatni pufer; pH=12, fosfatni pufer). Dobijeni rezultati su predstavljeni grafički upotrebom Graph Pad Prism 6 programa.

4.4.3.2. Određivanje temperaturne stabilnosti

U cilju određivanja temperaturne stabilnosti odgovarajuća enzimska forma (rastvorni i imobilizovan) inkubirana je u 0,1 M HEPES puferu (pH 8,0) na 50, 60 i 70 °C tokom 30 minuta. Nakon inkubiranja uzorci su ohlađeni 10 minuta na ledu nakon čega je merena rezidualna aktivnost enzima prema protokolu opisanom u odeljku 4.4.2.2. Dobijeni rezultati su predstavljeni grafički upotrebom Graph Pad Prism 6 programa.

4.4.3.3. Ispitivanje stabilnosti enzima u organskom rastvaraču

Stabilnost rastvorne i imobilizovane forme ArRMut11 u organskom rastvaraču je određena nakon inkubiranja enzima tokom 24 h u rastvoru 35% DMF-a u 0,1 M HEPES puferu (pH 8,0), na 37 °C uz

mešanje na 180 obrtaja/minuti. Nakon 24 h enzimsku aktivnost je izmerena prema protokolu opisanom u odeljku 4.4.2.2. Dobijeni rezultati su predstavljeni grafički upotrebom Graph Pad Prism 6 programa.

4.4.3.4. Određivanje temperaturne stabilnosti enzima u organskom rastvaraču

Temperaturna stabilnost enzima u prisustvu organskog rastvarača je određena nakon inkubiranja odgovarajuće forme ArRMut11 u rastvoru 35% DMF-a u 0,1 M HEPES puferu (pH 8,0) na 50, 60 i 70 °C tokom 2 h. U različitim vremenskim tačkama uzimani su alikvoti reakcionih smeša i uzorci su ohlađeni na ledu tokom 10 minuta. Rezidualna aktivnost enzima je određena prema protokolu opisanom u odeljku 4.4.2.2. Dobijeni rezultati su predstavljeni grafički upotrebom Graph Pad Prism 6 programa.

4.4.3.5. Određivanje stepena višestruke upotrebe imobilizovane ArRMut11 u sintezi 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ol

Mogućnost višestruke upotrebe imobilizovane ArRMut11 je ispitana tokom 10 ciklusa biosinteze praćenjem konverzije dihidrotestosterona u 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ol. U rastvor PLP-a (0,425 mg; 0,017 mmol) i izopropilamina (146 μ L; 17 mmol) u destilovanoj vodi, pH rastvora je podešeno na 9,9, dodato je 595 μ L rastvora dihidrotestosterona (5 mg; 10 mM) u DMF-u (35%). Reakcija je započeta dodatkom 0,47 jedinica imobilizovanog enzima, nakon čega je reakciona smeša tokom prvog ciklusa konverzije ostavljena 4 dana na 42 °C uz mešanje pri 180 obrtaja/minuti. Uporedo je postavljena reakcija sa bakterijskim lizatom koji je sadržao eksprimiranu ArRMut11 radi poređenja procesa konverzije. Alikvoti reakcionih smeša su uzimani nakon svaka 24 h i analizirani tankoslojnom hromatografijom prema protokolu opisanom u odeljku 4.4.2.4. Imobilizovani enzim je iz reakcione smeše uklonjen centrifugiranjem, 2 puta ispran rastvorom 35% DMF-a, a zatim 2 puta demineralizovanom vodom. Nakon toga postavljen je novi ciklus sinteze sa recikliranim enzimom pri istim uslovima kao i prethodni. Nakon prvog ciklusa vreme reakcije je skraćeno na 2 dana. Nakon svakog ciklusa određena je rezidualna aktivnost imobilizovanog enzima primenom protokola opisanog u odeljku 4.4.2.2. Dobijeni rezultati su predstavljeni grafički upotrebom Graph Pad Prism 6 programa.

4.5. Proizvodnja ArRMut11 u *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soju i merenje enzimске aktivnosti

Nakon transformacije kvasca *S. cerevisiae* EBY100 ploče na koje su ćelije zasejane su inkubirane 48 h na 30 °C, a zatim su pojedinačne kolonije inokulisane u 5 mL selektivnog YNB-CAA medijuma za gajenje ćelija u koji je dodat hloramfenikol u finalnoj koncentraciji 12,5 μ g/mL da bi se sprečila kontaminacija. Kulture su inkubirane 2 dana na 28 °C uz mešanje na 200 obrtaja/minuti, a kada je optička gustina na 600 nm dostigla vrednost između 3,5 i 4 indukovana je ekspresija proteina YNB-CAA medijumom sa galaktozom tako da je finalna optička gustina na 600 nm iznosila približno 0,8. Medijumu za indukciju je dodat i 0,1 mM PLP. Ekspresija je rađena na 25 °C tokom 36 h uz mešanje na 200 obrtaja/minuti, a na svaka 4 h su uzeti alikvoti od po 1 mL i određivana je aktivnost enzima. Ćelije kvasca su prikupljene centrifugiranjem, isprane 3 puta 100 mM HEPES puferom pH 8,0 da bi se uklonio sav fermentacioni medijum i finalno resuspendovane u 150 μ L pufera. Ćelije transformisane praznim pCTcon2 vektorom su korišćene kao kontrola. Aktivnost enzima je merena prema protokolu opisanom u odeljku 4.4.2.2. U reakcionu smešu je dodato 100 μ L ćelijske suspenzije kvasca.

4.6. Proizvodnja mesto-specifičnih mutanata ArRMut11 u *Escherichia coli* i određivanje enzimске aktivnosti

Nakon što je sekvenciranjem potvrđeno da su na odabranim pozicijama uvedene željene mutacije urađena je ekspresija osnovne varijante ArRMut11 i dobijenih mutanata u tri soja *E. coli*: BL21(DE3) pLysS soju, BL21 (DE3) Star soju i Shuffle soju. Ekspresija je rađena u LB medijumu sa kanamicinom (30 µg/mL). Kulture su gajene na 37 °C uz mešanje pri 200 obrtaja/minuti dok OD na 600 nm nije dostigla vrednost između 0,6-0,7. Ekspresija proteina je u prvom setu eksperimenata indukovana dodatkom 0,5 mM IPTG-a u finalnoj koncentraciji, a temperatura je snižena na 30 °C. U drugom setu eksperimenata ekspresija je indukovana dodatkom 0,35 mM IPTG-a, a temperatura je snižena na 20 °C. Čelije su pokupljene centrifugiranjem 25 minuta na 3000 obrtaja/min. Supernatant je odbačen, a čelije su resuspendovane u puferu za lizu (PBS pufer, pH 7,5 koji je sadržao 0,1 mM PLP) i lizirane ultrazvučnom sondom (4x30 s) na hladno. Ekstrakt bez čelija je dobijen centrifugiranjem liziranih čelija 5 minuta na 13000 obrtaja/minuti. Aktivnost enzima je merena prema protokolu opisanom u odeljku 4.4.2.2.

4.7. Proizvodnja Cv-2025 u *Escherichia coli* (DE3) pLySs soju

4.7.1. Preparativne metode

4.7.1.1. Proizvodnja Cv-2025 u *Escherichia coli* (DE3) pLySs soju

Omega-transaminaza Cv-2025 proizvedena je u *E. coli* BL21(DE3) pLysS soju u LB medijumu sa kanamicinom (30 µg/mL). Uzorak je inkubiran preko noći na 37 °C uz mešanje pri 200 obrtaja/minuti, a nakon toga je prekonoćna kultura prebačena u veću zapreminu medijuma i uzorci su ostavljeni na 37 °C dok optička gustina merena na talasnoj dužini 600 nm nije dostigla vrednost između 0,6-0,8. Ekspresija proteina je indukovana dodatkom IPTG-a, tako da mu je finalna koncentracija bila 1 mM i temperatura ekspresije je snižena na 30 °C. Nakon 24 h čelije su pokupljene centrifugiranjem na hladno 25 minuta na 3000 obrtaja/min. Supernatant je odbačen, a čelije su resuspendovane u puferu za lizu (PBS pufer, pH 7,5 koji je sadržao 0,1 mM PLP) i lizirane ultrazvučnom sondom (4x30 s) na hladno. Ekstrakt bez čelija je dobijen centrifugiranjem liziranih čelija 25 minuta na 3000 obrtaja/minuti, nakon čega je supernatant proceden kroz 0,22 µm PVDF filter.

Proces proizvodnje enzima je praćen denaturišućom poliakrilamidnom elektroforezom na 12% gelu za razdvajanje (odeljak 4.4.2.5.), a molekulska masa proteina je određena poređenjem sa molekulskim standardima nakon bojenja gela bojom CBB R-250 i obezbojavanja 7% sirćetnom kiselinom.

4.7.2. Analitičke metode

4.7.2.1. Merenje enzimске aktivnosti Cv-2025 i određivanje koncentracije proteina

Aktivnost enzima je određena praćenjem konverzije (S)-MBA u acetofenon merenjem apsorbance rastvora na 245 nm, na 25 °C u trajanju od 5 minuta. Smeša za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti Cv-2025 sadržala je 1,5 mM (S)-MBA i 1,5 mM natrijum piruvat u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,0. U reakcionu smešu je dodat DMSO u koncentraciji od 0,25% i 4 µL bakterijskog lizata sa eksprimiranom transaminazom.

Koncentracija proteina u bakterijskom lizatu određena je Bradfordovom metodom upotrebom goveđeg serum albumina kao standarda.^[226]

4.8. Izolovanje i karakterizacija opin dehidrogenaze

4.8.1. Preparativne metode

4.8.1.1. Proizvodnja opin dehidrogenaze u *Escherichia coli*

Optimalni uslovi za proizvodnju opin dehidrogenaze su ispitani u pilot eksperimentu upotrebom tri različita soja *E. coli* (BL21 (DE3), BL21 STAR i BL21 OVER). Proizvodnja enzima je izvedena u LB medijumu sa ampicilinom (30 µg/mL) na 37 °C. Kada je optička gustina merena na talasnoj dužini 600 nm dostigla vrednost od 0,6-0,8 indukovana je ekspresija proteina dodatkom IPTG-a (0,35 mM finalno) i temperatura je snižena na 20 °C da bi se sprečilo formiranje inkluzionih tela. Nakon 20 h ćelije su prikupljene centrifugiranjem i lizirane ultrazvučnom sondom. Ekstrakt bez ćelija je dobijen nakon centrifugiranja liziranih ćelija. Proces proizvodnje enzima je praćen denaturišućom poliakrilamidnom elektroforezom na 12% gelu za razdvajanje, a molekulska masa proteina je određena poređenjem sa molekulskim standardima nakon bojenja gela bojom CBB R-250 i obezbojavanja 7% sirćetnom kiselinom. U daljim eksperimentima je korišćen soj *E. coli* BL21 STAR za produkciju proteina pri istim uslovima kao što je rađeno u pilot eksperimentu.

4.8.1.2. Prečišćavanje opin dehidrogenaze

Opin dehidrogenaza je prečišćena afinitetnom hromatografijom na metalu na Ni-NTA koloni koja je prethodno ekvilibrisana puferom koji je korišćen za lizu bakterijskih ćelija (50 mM natrijum fosfat pH 7,5; 150 mM NaCl; 15 mM imidazol). Nevezani proteini su eluirani ispiranjem kolone sa ekvilibracionim puferom, dok je ciljani protein eluiran lineranim gradijentom rastvora imidazola od 15-350 mM. Proces prečišćavanja proteina je praćen SDS-PAGE elektroforezom prema protokolu opisanom u odeljku 4.4.2.5. Trake čistog proteina su vizuelizovane nakon bojenja gela rastvorom CBB R-250 i obezbojavanja 7% sirćetnom kiselinom. Frakcije koje su sadržale čist protein su spojene i dijalizovane naspram 50 mM natrijum fosfatnog pufera pH 7,0.

4.8.2. Analitičke metode

4.8.2.1. Merenje aktivnosti opin dehidrogenaze i određivanje koncentracije proteina

Aktivnost enzima određena je praćenjem smanjenja apsorbance NADH na 340 nm na temperaturi od 25 °C tokom 5 minuta. Aktivnost enzima je izračunata na osnovu ekstinkcionog koeficijenta NADH, koji iznosi 6,22 mM⁻¹cm⁻¹. Aktivnost enzima je merena u rastvoru 100 mM fosfatnog pufera, pH 6,8, koji je sadržao 0,15 mM NADH, 5,0 mM piruvat i 5,0 mM L-alanin. Reakcija je započeta dodavanjem određene zapremine rastvora enzima. Jedna jedinica enzimске aktivnosti (U) je definisana kao količina enzima koja katalizuje oksidaciju 1 µmol NADH u minutu.

Koncentracija proteina je određena Bradfordovom metodom^[226] ili merenjem A₂₈₀ nm upotrebom teorijski određenog ekstinkcionog koeficijenta (35870 M⁻¹cm⁻¹), izračunatog primenom ExPASy ProtParam programa na osnovu aminokiselinske sekvence proteina. Predviđena aminokiselinska sekvenca je određena upotrebom ExPASy programa za translaciju genske sekvence.

4.8.2.2. Određivanje supstratne specifičnosti enzima i kinetičkih parametara

Supstratna specifičnost enzima u smeru reduktivne reakcije formiranja sekundarnih amina je ispitana upotrebom nekoliko keto-kiselina kao što su piruvat, oksaloacetat, glioksilat i α -ketoglutarat kao akceptora amino grupe i serije aminokiselina kao amino donora. Korišćen je enzimski esej opisan u odeljku 4.8.2.1. Pre dodatka rastvora supstrata u reakcionu smešu vrednost pH je podešena na 6,8. Kinetičke konstante (K_m , k_{cat} i k_{cat}/K_m) su određene za supstrate sa kojima je izmerena najveća aktivnost. Za određivanje kinetičkih parametara za piruvat ko-supstrat je bio L-alanin, čija je koncentracija fiksirana na 5,0 mM. Za L-alanin, L-valin i L-serin, kao ko-supstrat je korišćen piruvat čija je koncentracija fiksirana na 5,0 mM. Kinetički parametri su određeni nakon linearne regresije podataka uklopljenih u Michaelis-Menten i Lineweaver-Burk dijagrame upotrebom GraphPad Prism 6. Sva merenja su rađena u triplicatu.

4.8.2.3. Ispitivanje uticaja pH i koncentracije NaCl na enzimsku aktivnost

Uticaj pH na aktivnost enzima je ispitivan merenjem enzimске aktivnosti u opsegu pH vrednosti od 5,0 do 10,0 primenom 0,1 M natrijum acetatnog pufera (pH 5,0-5,5), 0,1 M natrijum fosfatnog pufera (pH 6,0-8,0), 0,1 M TRIS-HCl pufera (pH 8,5-9,0) i 0,1 M karbonatnog pufera (pH 9,5-10,0).

Za ispitivanje uticaja dodatka soli na enzimsku aktivnost različite koncentracije soli (0,25-3,0 M NaCl) su dodate u reakcionu smešu. Ostali uslovi pri kojima je određivana aktivnost opin dehidrogenaze su bili isti kao što je opisano u odeljku 4.8.2.1. Sva merenja su rađena u triplicatu.

4.8.2.4. Ispitivanje uticaja pH, temperature i koncentracije NaCl na stabilnost enzima

Stabilnost enzima na različitim pH vrednostima ispitana je inkubiranjem enzima u 0,2 M puferima u opsegu pH od 4,0 do 12,0, na 25 °C tokom 30 minuta, nakon čega je aktivnost enzima izmerena pri uslovima opisanim u odeljku 4.8.2.1. Enzimska aktivnost pre inkubiranja u puferima različite pH vrednosti je uzeta kao 100%.

Temperaturna stabilnost enzima je ispitana inkubiranjem rastvora enzima u opsegu od 30 do 55 °C, nakon čega je izmerena rezidualna aktivnost u alikvotima uzetim nakon 30 i 60 minuta inkubacije pri standardnim enzimskim uslovima. Aktivnost enzima izmerena nakon inkubiranja na 30 °C je uzeta kao 100% aktivnosti.

Stabilnost u solima je ispitana nakon inkubiranja rastvora enzima sa NaCl-om u različitim koncentracijama, do 3 M, tokom 24 h na 25 °C. Rezidualna aktivnost enzima je izmerena pri standardnim uslovima u alikvotima uzetim u različitim vremenskim tačkama. Aktivnost izmerena u uzorku enzima pre inkubacije sa natrijum hloridom je uzeta kao 100% aktivnosti. Sva merenja su rađena u triplicatu.

4.8.2.5. Ispitivanje stabilnosti enzima u prisustvu organskog rastvarača

U rastvor enzima su dodati organski rastvarači (DMSO ili DMF) u različitim koncentracijama nakon čega su uzorci inkubirani na 25 °C, tokom 24 h u DMSO-u, a tokom 4 h u DMF-u. Rezidualna aktivnost je određena u alikvotima uzetim u različitim vremenskim tačkama pri standardnim uslovima enzimskog esreja (odeljak 4.8.2.1.) u odnosu na aktivnost enzima bez dodatka organskog rastvarača. Sva merenja su rađena u triplicatu.

4.8.2.6. Dvodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza (2D PAGE)

Prečišćena rekombinantna opin dehidrogenaza analizirana je poliakrilamidnom gel elektroforezom u dve dimenzije prema protokolu opisanom u referenci^[227] da bi se potvrdila homogenost preparata i odredila izoelektrična tačka enzima. Ukratko, u prvoj dimenziji 15 µg uzorka je razdvojeno izoelektričnim fokusiranjem na 5% (w/v) poliakrilamidnom gelu koji je sadržao 2,4% (v/v) amfolita (pH 3,5-10, Farmacija) pri nativnim uslovima. Nakon razdvajanja u prvoj dimenziji, deo gela na kom se nalazio protein od interesa je inkubiran u ekvibracionom puferu (62,5 mM TRIS-HCl; 5% β-merkaptioetanol; 2,5% SDS; 10% glicerol) tokom 1 h (2x30 minuta), nakon čega je nanet na 12% denaturišući gel u drugoj dimenziji. Protein od ineteresa je vizuelizovan nakon bojenja CBB R-250 bojom. Izoelektrična tačka opin dehidrogenaze je izračunata na osnovu standardne prave koja je konstruisana prema kretanju amfolita pri primenjenim uslovima u prvoj dimenziji.

4.8.2.7. Ispitivanje uticaja prisustva jona na enzimsku aktivnost

U cilju ispitivanja uticaja koji različiti joni imaju na aktivnost enzima, u reakcionu smešu su dodati rastvori određenih soli (NaCl; NH₄Cl; MgCl₂; Na₂SO₄ i C₆H₅Na₃O₇) u opsegu koncentracija od 0,05-0,5 M. Enzimska aktivnost je zatim izmerena u triplicatu prema protokolu opisanom u odeljku 4.8.2.1.

4.8.2.8. Ispitivanje uslova za skladištenje enzima

Optimalni uslovi za skladištenje enzima su određeni nakon inkubiranja rastvora čistog enzima i rastvora enzima uz dodatak stabilizatora (10% glicerol; 50% glicerol; 50 mM NaCl i 0,1 mM NADH) u 50 mM natrijum fosfatnom puferu pH 7,0 na -20 °C tokom 21 dana. Rezidualna aktivnost je merena nakon svakih 7 dana pri uslovima opisanim u odeljku 7.7.1.2.

4.9. Razvoj fluorescentnog eseja za detekciju aktivnosti opin dehidrogenaze u mikrotitar ploči

4.9.1. Produkcija nasumičnih mutanata opin dehidrogenaze u mikrotitar ploči

Biblioteka nasumičnih mutanata opin dehidrogenaze koja je kreirana upotrebom *Gene MorphII Random Mutagenesis kompleta* i *Q5 polimeraze* je iskorišćena za transformaciju kompetentnih ćelija *E. coli* (DE3) STAR. Dobijene pojedinačne kolonije su odgajene u mikrotitar ploči (96 bunara) tako što su inicijalno inokulisane u 50 µL LB medijuma sa ampicilinom (100 µg/mL) i ploča je ostavljena u mikrotitar šejker na 37 °C i 500 rpm. Nakon otprilike 14 h, dodato je 190 µL LB medijuma sa ampicilinom (30 µg/mL) i uzorci su ostavljeni na 37 °C dok OD merena na 600 nm nije dostigla vrednost 0,5-0,7. Ekspresija proteina je indukovana dodatkom 10 µL IPTG-a (finalno 0,35 mM) i temperatura je snižena na 20 °C. U mikrotitar ploču je zasejano nekoliko kolonija divljeg tipa enzima kao pozitivna kontrola, kao i nekoliko kolonija transformisanih praznim pET22(b) vektorom kao negativna kontrola. Nakon 24 h uzorci su centrifugirani 20 minuta na 2000 rpm, supernatant je odvojen, a ćelije su resuspendovane u 200 µL pufera za lizu, koji je sadržao 50 mM natrijum fosfat pH 7,5, 150 mM NaCl, 15 mM imidazol, 1.5% triton X100, 9000 IU/mL lizozima i 35 µM polimiksin B sulfat. Ekstrakt bez ćelija je dobijen centrifugiranjem bakterijskog lizata 20 minuta na 2000 rpm, nakon čega je supernatant odvojen od ćelijskih ostataka.

4.9.2. Određivanje aktivnosti divljeg tipa opin dehidrogenaze merenjem fluorescencije NADH i skeniranje nasumičnih mutanata u mikrotitar ploči

Dva osnovna parametra prilikom pronalaženja poboljšanih enzimskih varijanti primenom skrininga u mikrotitar ploči jesu standardna devijacija i opseg detekcije sistema za skeniranje.^[228] Standardna devijacija testa za skeniranje biblioteka mutanata je određena u ploči od 96 bunara u kojoj su odgajene kolonije divljeg tipa enzima na prethodno opisani način. Nakon lize ćelije izmerena je enzimska aktivnost za divlji tip enzima i na osnovu dobijenih rezultata određen je koeficijent validnosti. Validnost testa potvrđena je skeniranjem konstruisanih biblioteka mutanata opin dehidrogenaze.

Aktivnost enzima određena je praćenjem smanjenja fluorescencije NADH (ekscitacija 340 nm; emisija 460 nm, gain 90) u periodu od 5 minuta na 27 °C u rastvoru 100 mM fosfatnog pufera, pH 6,8, koji je sadržao 0,15 mM NADH, 5,0 mM piruvat i 5,0 mM L-alanin. Reakcija je započeta dodavanjem 5 µL rastvora enzima.

5. Rezultati i diskusija

5.1. Heterologna ekspresija, prečišćavanje i skrining supstratne specifičnosti ω -transaminaze ArRMut11

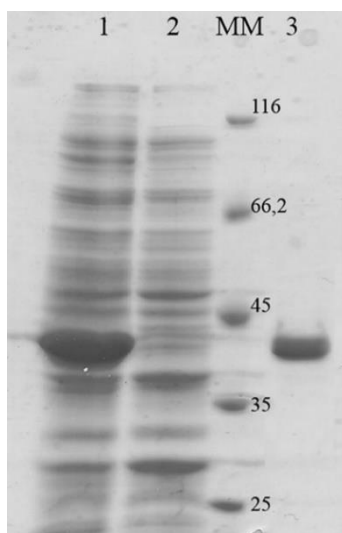
Rekombinantni proteini se mogu eksprimirati upotrebom prokariotskih sistema (*Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*), eukariotskih sistema (kvasci, ćelije insekata i sisara) ili upotrebom *in vitro* sistema.^[103] Prilikom odabira odgovarajućeg ekspresionog sistema treba obratiti pažnju na ekonomske i kvalitativne aspekte, pa tako krajnji cilj i svrha proizvoda diktiraju odabir domaćina.^[97]

Prilikom odabira domaćina za ekspresiju proteina treba uzeti u obzir autentičnost eksprimiranog proteina, nivo ekspresije i zahteve za proizvodnju na velikoj skali, lokalizaciju proteina (intracelularni, sekretovani ili membranski), potrebe za kofaktorom, potrebe za posttranslacionim modifikacijama i procesovanjem proteina, kao i troškove i bezbednost proizvodnje.^[95]

E. coli ima brzu stopu rasta, lako se uzgaja do velike gustine ćelija, laka je za genetsku manipulaciju, omogućava proizvodnju velike količine rekombinantnog proteina, zahteva upotrebu jednostavnih medijuma za uzgajanje i relativno su niski troškovi proizvodnje.^[96, 97, 103, 104]

5.1.1. Heterologna ekspresija ArRMut11 u *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLySs soju i prečišćavanje proteina afinitetnom hromatografijom

Transaminaza ArRMut11 je eksprimirana u *E. coli* BL21 (DE3) pLySs soju, nakon čega je protein prečišćen do homogenosti afinitetnom hromatografijom na koloni Ni-NTA agaroze (prilog: slika 1). Proces proizvodnje i prečišćavanja enzima je praćen denaturišućom elektroforezom na 12% gelu i nakon bojenja i obezbojavanja gela ustanovljeno je da se u uzorku prečišćenog proteina može detektovati samo jedna proteinska traka, čija je molekulska masa procenjena na približno 40 kDa (slika 17), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim nakon MALDI-TOF analize, kojom je pokazano da jedna subjedinica proteina ima masu od 36,72 kDa.^[26]

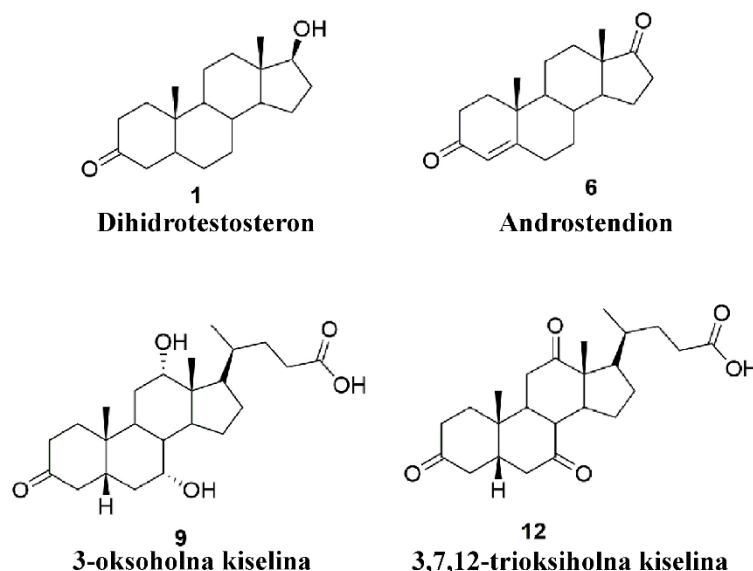


Slika 17. Elektroforegram nakon ekspresije i prečišćavanja ArRMut11 na 12% gelu za razdvajanje: (1) lizat BL21 (DE3) pLySs ćelija sa eksprimiranom ArRMut11; (2) lizat ćelija pre indukcije ekspresije proteina; (MM) molekularni markeri; (3) uzorak prečišćene ArRMut11 nakon afinitetne hromatografije.

5.1.2. Skeniranje supstratne specifičnosti ArRMut11 ka steroidima

Hiljade steroida koji ispoljavaju raznovrsne biološke aktivnosti, uključujući antiinflamatorni, antitumorski, antimikrobni i imunosupresivni efekat, detektovano je u mikroorganizmima, biljkama i životinjama.^[229-231]

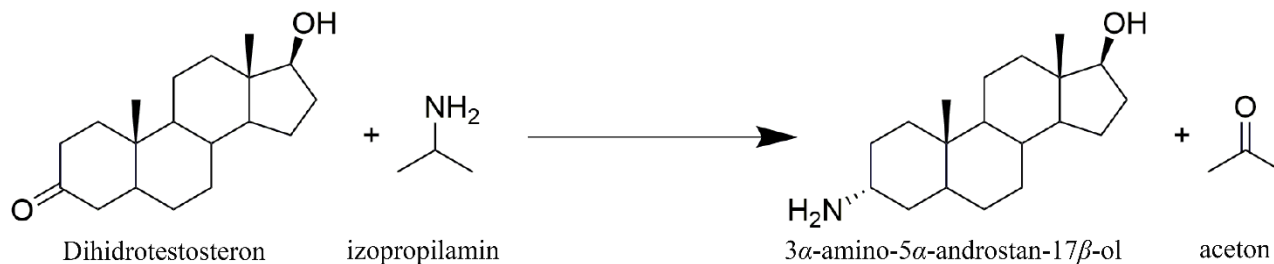
Bez obzira što je pomenuta transaminaza prethodno već testirana u smislu afiniteta za aminovanje nekoliko steroidnih jedinjenja^[35] u okviru ove disertacije hteli smo da dodatno testiramo reaktivnost i selektivnost enzima za aminovanje steroidnih jedinjenja koja se značajno razlikuju po položaju i reaktivnosti keto-grupe, kao i konfiguraciji A i B prstenova. Prinos reakcije je izražen kao mol% konverzije (*R*)-MBA u acetofenon (prilog: tabela 1). Retenciona vremena pri primenjenim uslovima bila su za (*R*)-MBA 1,96 minuta, a za acetofenon 4,6 minuta. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1 u prilogu, zaključeno je da je među 12 testiranih jedinjenja najbolji prinos konverzije primećen kod dihidrotestosterona (prilog: tabela 1, jedinjenje **1**), androstendiona (prilog: tabela 1, jedinjenje **6**), 3-oksoholne kiseline (prilog: tabela 1, jedinjenje **9**) i 3,7,12,-trioksoholne kiseline (prilog: tabela 1, jedinjenje **12**) (slika 18).



Slika 18. Prikaz struktura steroida ka kojima enzim pokazuje najveći afinitet.

Ka jedinjenjima obeleženim brojevima **9** (3-oksoholna kiselina) i **12** (3,7,12-trioksoholna kiselina) enzim pokazuje visok afinitet kao i procenat konverzije (17 i 35%, redom). Najveći prinos transformacije je detektovan u slučaju 3,7,12-trioksoholne kiseline (**12**), međutim, pomenuti derivat holne kiseline poseduje tri keto grupe, i na osnovu rezultata dobijenih sa drugim derivatima holne kiseline može se očekivati kompleksna smeša proizvoda čije bi izolovanje i odvajanje iz reakcione smeše bilo izuzetno otežano. Tome ide u prilog i rezultat reakcija sa derivatima holne kiseline koji imaju po jednu keto grupu, naime, 3-okso-, 7-okso- i 12-oksoholna kiselina (**9**, **10** i **11**), koje su reagovale sa različitim stepenima konverzije, a najvećim za 3-oksoholnu kiselinu. Izolovanje proizvoda dobijenog transformacijom jedinjenja obeleženog brojem **9** bilo je otežano usled njegove dobre rastvorljivosti u vodi i organskom rastvaraču. U probi u kojoj je androstendion podvrgnut biokonverziji (**6**), procenat konverzije je bio 11%, ali s obzirom na to da pomenuto jedinjenje sadrži 2 keto grupe koje se razlikuju kako po položaju tako i po reaktivnosti, može se očekivati da bi osnovni proizvod reakcije bio 17-amino derivat, zbog toga što je keto grupa u položaju 17 više eksponovana, pa time i više dostupna za reakciju.^[232] U isto vreme ne može se isključiti ni mogućnost formiranja proizvoda u položaju 3, što znači da bi se mogla očekivati smeša proizvoda čije bi izolovanje i razdvajanje bilo zahtevno.^[35] S obzirom na dobijene rezultate, odlučeno je da se u daljem radu koristi

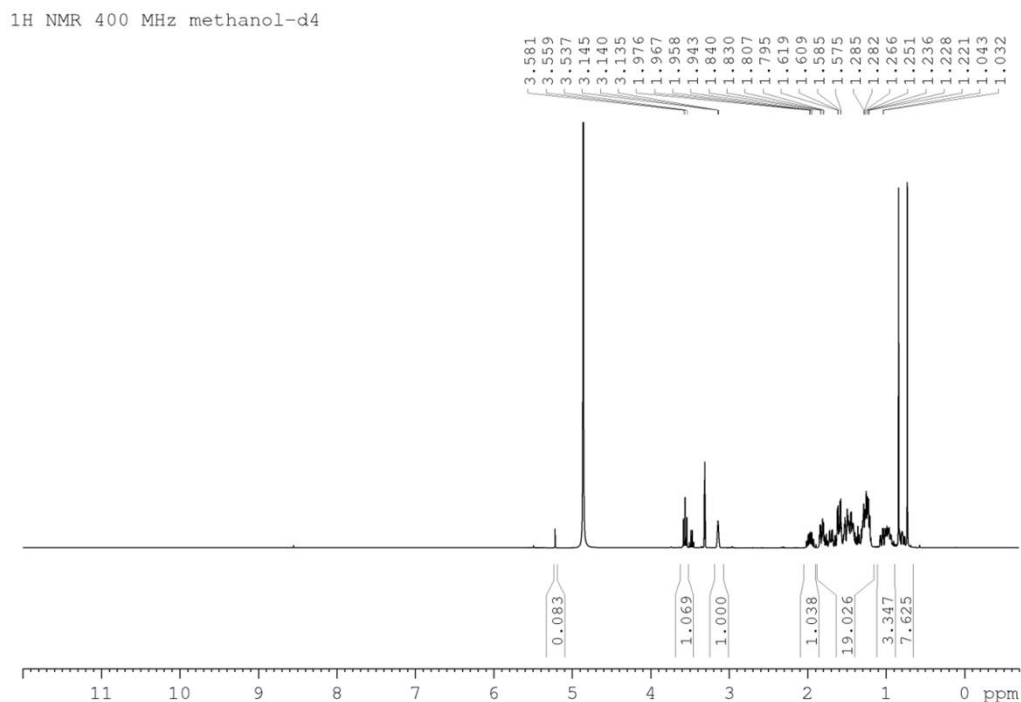
dihidrotosteron (**1**) (slika 19). Keto grupa u položaju 3 izdvaja se po reaktivnosti i u slučaju derivata holnih kiselina (**9**, **10** i **11**), pri čemu je najveći stepen konverzije uočen za 3-oksoholnu kiselinu (**1**).



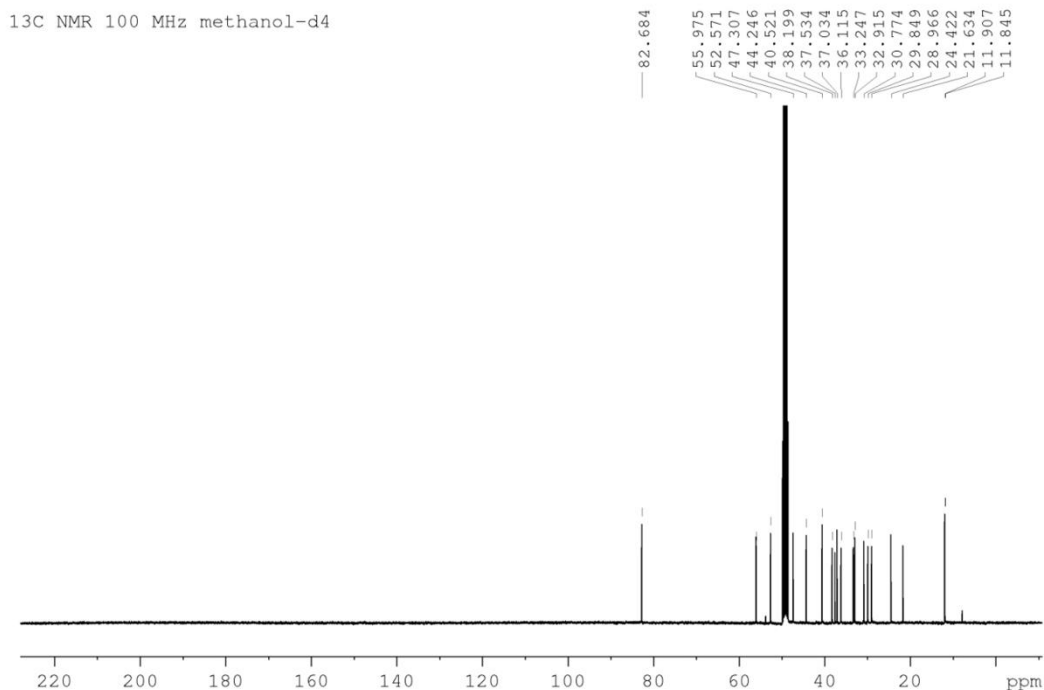
Slika 19. Šematski prikaz konverzije dihidrotosterona katalizovane ω -transaminazom ArRMut11 uz upotrebu izopropilamina kao donora amino grupe.

5.1.3. Sinteza i karakterizacija 3α-amino-5α-androstan-17β-ola

Dobijeni proizvod je od ostatka komponenti iz reakcione smeše odvojen prvo ekstrakcijom, a zatim je prečišćen *dry-flash* silika gel hromatografijom. Amino derivat dihidrotosterona je dobijen u vidu belog praha (25 mg; 50% prinos), a struktura proizvoda je potvrđena ¹H i ¹³C-NMR spektroskopijom u deuterisanom metanolu (slika 20 i slika 21).

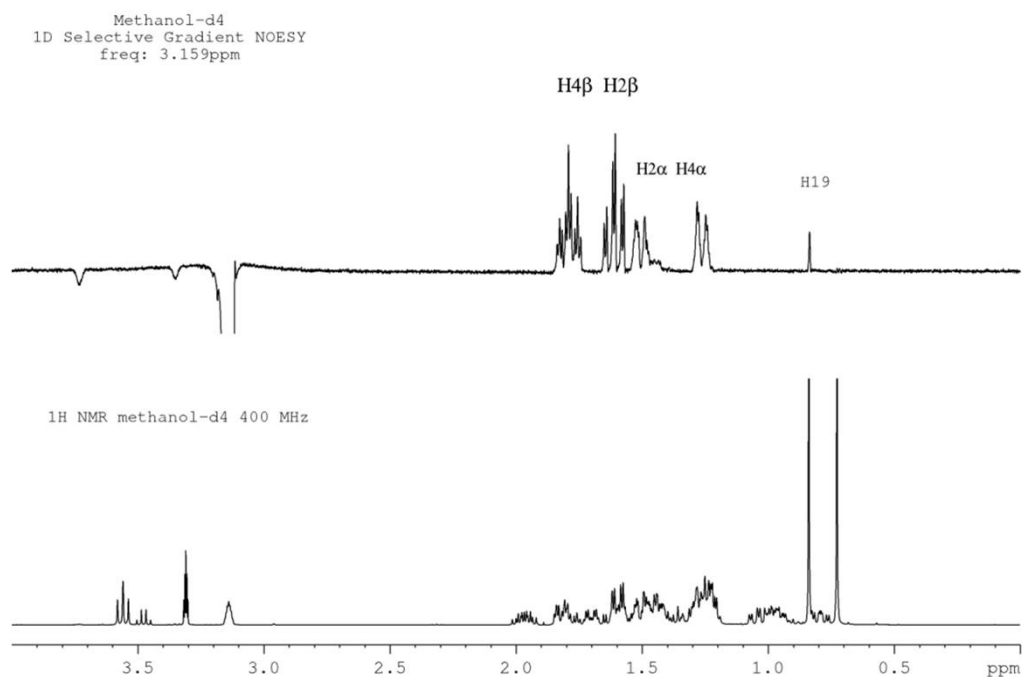


Slika 20. ¹H-NMR spektar 3α-amino-5α-androstan-17β-ola (400 MHz, metanol-d₄).



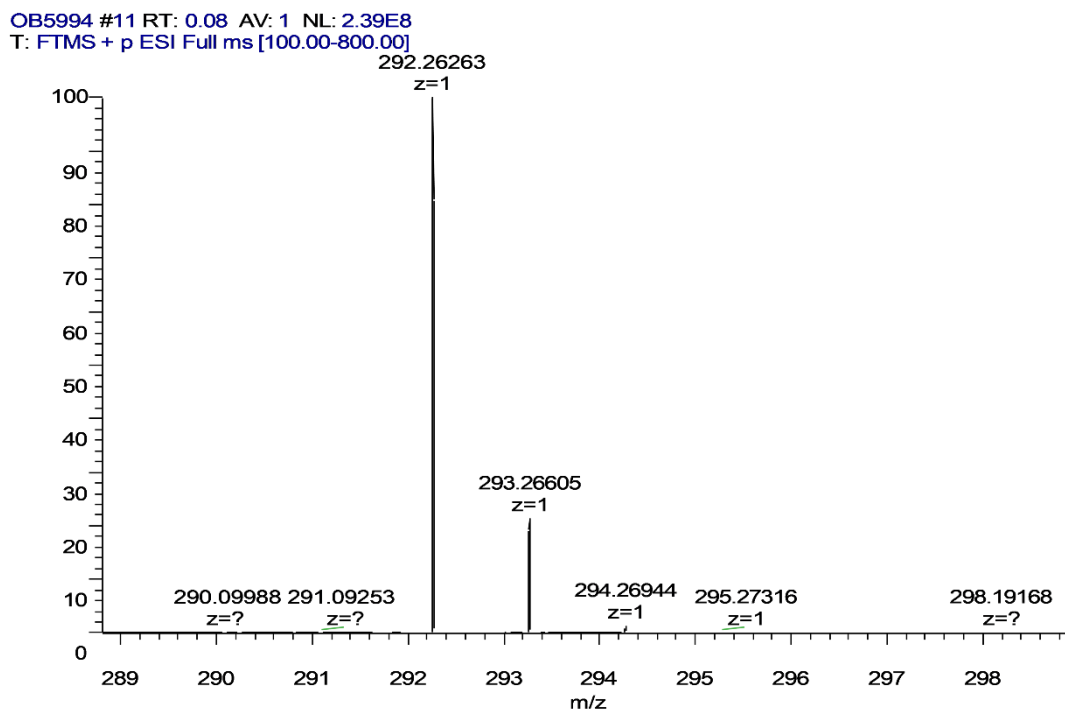
Slika 21. ^{13}C -NMR spektar 3α -amino- 5α -androstan- 17β -ola (100 MHz, metanol- d_4).

Pozicija i širina signala H-C (3) u ^1H NMR spektru ($\delta\text{H} = 3.14$ ppm) upućuje na ekvatorijalnu (β) orijentaciju H-C (3) zbog odsustva diaksijalnog kuplovanja i anizotropnog efekta cikloheksilnog prstena. Potvrda za ovu tvrdnju je dobijena iz 1D NOESY eksperimenta (slika 22). Dobijeni spektar je pokazao da H-C (3) ispoljava NOE (*engl.* nuclear overhauser effect) interakciju sa protonima angularne metil grupe (H-C (19), $\delta\text{H} = 0.84$ ppm), što je ukazalo na to da su i angularna metil grupa C (19) i H-C (3) sa iste β -strane steroidnog skeleta. Na osnovu ovog podatka zaključeno je da NH_2 -grupa ima α orijentaciju, odnosno da C (3) ima *R*-stereochemiju. Dodatno, odgovarajuće NOE interakcije sa H- 2β i H- 4β protonima su značajno jače nego sa H- 2α i H- 4α . Dobijeni rezultat koji je ukazao na stereospecifično formiranje amina sa *R*-konfiguracijom je u saglasnosti sa postojećim podacima za male ciklične ketone i *R*-specifičnu transaminaciju sa ATA-117, homologom enzima iz *Arthrobacter sp.*^[26] U okviru ove disertacije je pokazano da enzim ArRMut11 ima afinitet ka većim supstratima, a da istovremeno zadržava *R*-stereochemiju tokom katalitičkog procesa transaminacije.



Slika 22. 1D NOESY sa selektivnom inverzijom H3 protona (gornji spektar) i ^1H -NMR spektar (donji spektar).

Masenom spektroskopijom detektovan je $[\text{M}-\text{H}]^+$ jon sa masom od 292.2626 g/mol (slika 23).



Slika 23. Maseni spektar 3α-amino-5α-androstan-17β-ola.

5.2. Karakterizacija solubilnog i imobilizovanog enzima

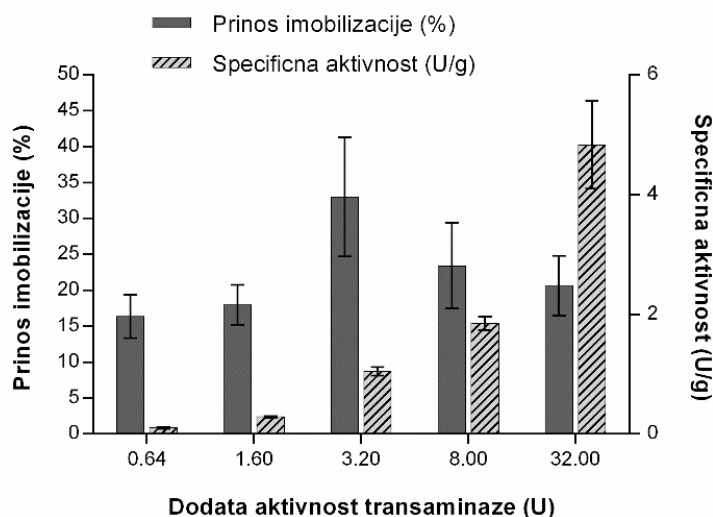
Razvoj različitih tehnika imobilizacije omogućio je višestruku upotrebu enzima, kao i povećanje ekonomičnosti i energetske efikasnosti mnogih procesa.^[5] S obzirom na to da se svaki enzim drugačije ponaša kada se nalazi u imobilizovanoj formi, proces imobilizacije potrebno je optimizovati za svaki biokatalizator.^[12]

5.2.1. Imobilizacija ArRMut11

Omega transaminaza ArRMut11, koja predstavlja jedan od predmeta istraživanja ove doktorske disertacije, prethodno je imobilizovana različitim tehnikama i na različitim tipovima polimera. Jedan od primera imobilizacije ArRMut11 jeste u formi celih ćelija *E. coli* koje eksprimiraju pomenuti enzim metodom zarobljavanja u sol-gelu u silika matriksu napravljenom kiselo katalizovanom hidrolizom tetraetil ortosilikata i tako pripremljen enzim je upotrebljen za kinetičku rezoluciju različitih *rac*-amina.^[203] Pored toga transaminaza ArRMut11 je imobilizovana zajedno sa lipazom na EziG-Amber matriksu (staklo obloženo polimerom sa polu-hidrofilnom polimernom površinom) i primenjena u enzimskoj kaskadi u protočnom reaktoru za sintezu hiralnih amida. Prinos imobilizacije na datom polimeru je iznosio 69% za transaminazu, a procenat vezane aktivnosti je iznosio 43%.^[233]

Imobilizacija ArRMut11 je izvedena i na nekoliko nosača obloženih epoksidnim grupama putem kovalentnih interakcija, kao i na dva adsorpciona nosača preko hidrofobnih interakcija, da bi se napravio imobilizat transaminaze koji može da vrši katalizu u organskom rastvaraču. U ovom slučaju najveću specifičnu aktivnost imao je SEPABED EXE120, izuzetno hidrofoban polimetakrilatni nosač, koji je dalje korišćen za optimizaciju procesa imobilizacije.^[234]

U okviru naših istraživanja, da bismo dodatno povećali stabilnost transaminaze ArRMut11 i omogućili višestruku upotrebu u sintezi hiralnih amina i amino steroida enzim je imobilizovan na hidrofilnom makroporoznom kopolimeru sačinjenom od GMA i EGDMA. Optimalna količina enzima potrebna za imobilizaciju je određena na osnovu procene uticaja količine dodatog enzima, po gramu suvog polimera, na specifičnu aktivnost enzima i prinos imobilizacije (slika 24).

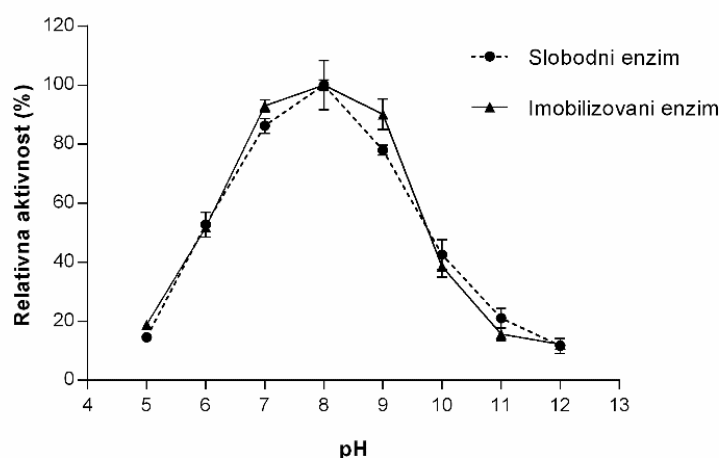


Slika 24. Zavisnost specifične aktivnosti imobilizovanog enzima i prinosa imobilizacije od količine dodatih enzimskih jedinica. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih na slici 24 zaključeno je da se optimalan odnos između specifične aktivnosti i prinosa imobilizacije postiže kada se tokom procesa imobilizacije doda 8 U enzima. Enzim koji je imobilizovan pri ovim uslovima imao je specifičnu aktivnost od 1,84 U/g suvog polimera sa prinosom imobilizacije od 23,4%. Dobijena niska specifična aktivnost imobilizovanog enzima verovatno je bila posledica difuzionih ograničenja koja nastaju kada enzim koji je imobilizovan deluje na supstrat ili interferencije procesa imobilizacije sa katalitičkim mestom enzima.^[225]

5.2.2. Određivanje pH optimuma rastvorne i imobilizovane ArRMut11

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 25 zaključeno je da i enzim u rastvoru i imobilizovan enzim ispoljavaju najveću aktivnost na pH 8,0, s tim što je kod imobilizovanog enzima uočen širi pH optimum koji se kretao od pH 7,0 do pH 9,0.

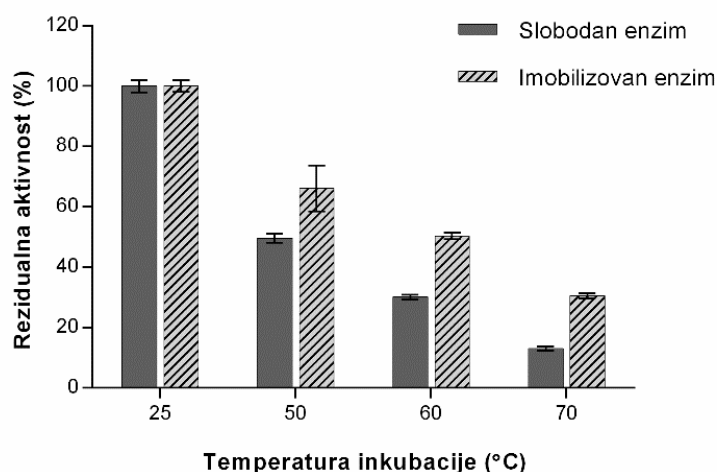


Slika 25. Uticaj pH na aktivnost rastvorne i imobilizovane transaminaze ArRMut11 u 0,1 M puferima, u opsegu od pH 5,0 do pH 12,0, mereno na 37 °C. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

Širi pH opseg u kom enzim ispoljava značajnu aktivnost primećen je i prilikom imobilizacije ω -transaminaze iz *Chromobacterium violaceum* na magnetnim mezoporoznim silikatnim nanocvetovima funkcionalizovanim sa Ni-NTA,^[201] ω -transaminaze iz *Mycobacterium vanbaalenii* na polivinil acetat-Fe₃O₄ nanočesticama^[196] i enkapsulacijom ω -TA ATA-117 u sol-gel/Celite 545 matriksu.^[235]

5.2.3. Određivanje temperaturne stabilnosti rastvorne i imobilizovane ArRMut11

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 26 uočeno je da imobilizovani enzim zadržava 30% početne aktivnosti čak i nakon 30 minuta inkubacije na 70 °C, što nije slučaj sa rastvornom formom ArRMut11, koja je zadržala samo 13% početne aktivnosti nakon inkubacije na 70 °C. Rezidualna aktivnost rastvornog enzima je pala na 49,6% početne aktivnosti već nakon 30 minuta inkubacije na 50 °C, dok je pri tim uslovima imobilizovani enzim zadržao 66,2% početne aktivnosti.



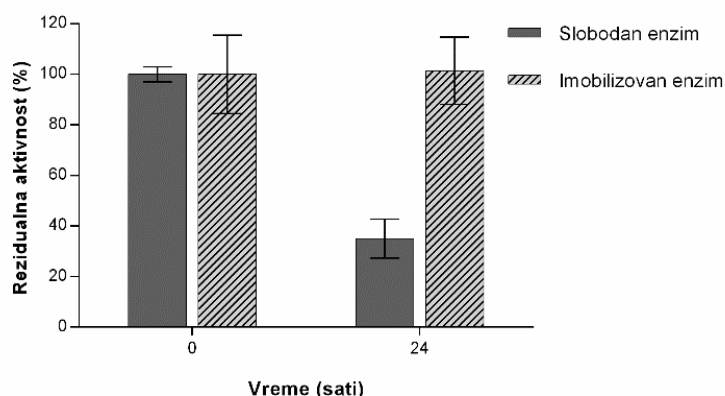
Slika 26. Temperaturna stabilnost rastvorne i imobilizovane ArRMut11 u 0,1 M HEPES puferu pH 8,0, merena nakon trideset minuta inkubacije na 50, 60 i 70 °C. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

Kovalentna imobilizacija enzima doprinela je povećanju njegove temperaturne stabilnosti usled formiranja višestrukih kovalentnih veza između enzima i nosača, što je za posledicu imalo smanjenje konformacione slobode i termalnih vibracija.^[71] Povećana temperaturna stabilnost usled imobilizacije enzima već je prijavljena za (*R*)-selektivnu transaminazu iz *Aspergillus fumigatus* imobilizovanu na hitozanu posredstvom glutaraldehida,^[236] transaminazu iz *Burkholderia multivorans* imobilizovanu na nekoliko tipova nosača,^[237] transaminazu iz *Mycobacterium vanbaalenii* imobilizovanu na magnetnim PVA-Fe₃O₄ nanočesticama,^[196] (*R*)-selektivnu ω-TA poreklom iz *Aspergillus terreus* imobilizovanu na komercijalnim nosačima^[200] i transaminazu iz *Chromobacterium violaceum* imobilizovanu na magnetnim mezoporoznim silikatnim nanocvetovima funkcionalizovanim sa Ni-NTA.^[201] Pored pomenutih transaminaza, uticaj imobilizacije na povećanje temperaturne stabilnosti je prijavljen i za druge enzime kao što je lipaza iz *Candida rugosa*,^[238] alkohol dehidrogenaza,^[239] lakaza^[240] i mnogi drugi.

5.2.4. Ispitivanje stabilnosti rastvorne i imobilizovane ArRMut11 u organskom rastvaraču

Stabilnost enzima u organskim rastvaračima zavisi od koncentracije istog i u korelaciji je sa supstratnom specifičnošću enzima.^[59] Prisustvo organskog rastvarača tokom biokatalitičke konverzije kompleksnih supstrata kao što su steroidi je neophodno usled niske rastvorljivosti supstrata u vodenim rastvorima.^[35] Pored pomenutog, prednosti upotrebe organskih rastvarača u enzimskim reakcijama su i manja šansa za mikrobiološku kontaminaciju, kao i manja potreba za stabilizacijom enzima hemijskim modifikacijama ili imobilizacijom.^[44]

Stabilnost rastvorne i imobilizovane ArRMut11 je ispitana nakon 24 časa inkubacije enzima u 35% organskom rastvaraču (DMF). Za razliku od rastvornog enzima, čija je rezidualna aktivnost nakon 24 h inkubacije smanjena na približno 35% početne aktivnosti, imobilizovani enzim je zadržao 100% aktivnosti pri istim uslovima (slika 27). Imobilizacija je doprinela stabilizaciji strukture enzima, time omogućavajući primenu u industrijskim procesima koji zahtevaju visoke koncentracije organskog rastvarača. Imobilizovani enzim poseduje rigidniju konformaciju koja sprečava denaturaciju u prisustvu organskog rastvarača.^[45]



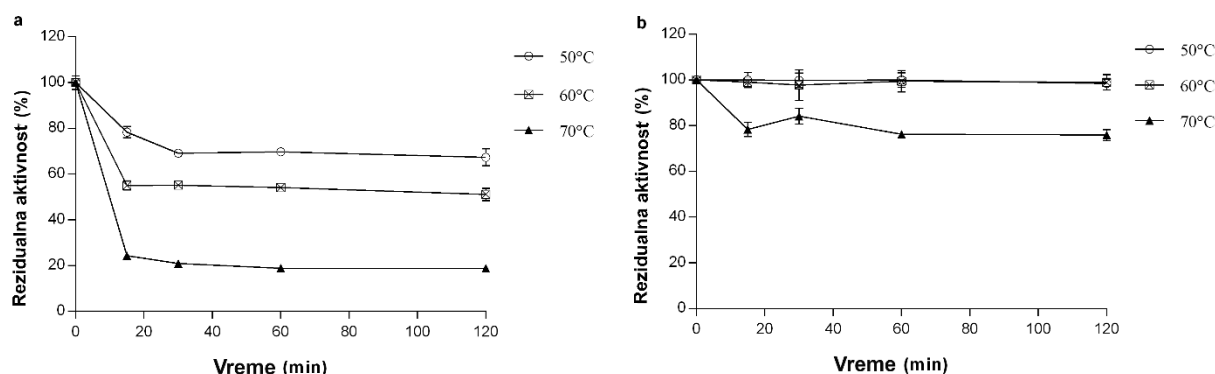
Slika 27. Uticaj organskog rastvarača (35% dimetilformamid (DMF)) na stabilnost rastvorne i imobilizovane ArRMut11, određivan nakon 24 h inkubacije. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

Uticaj imobilizacije na stabilizaciju transaminaze ArRMut11 u prisustvu organskog rastvarača je već pokazan nakon imobilizacije enzima na nekoliko komercijalnih polimernih smola, uključujući nosače funkcionalizovane epoksi grupama i nosače za adsorpciju enzima putem hidrofobnih interakcija, pri čemu je najveću aktivnost u konverziji prekursora sitagliptina pokazao preparat enzima imobilizovan hidrofobnim interakcijama na polimetakrilatnoj smoli. Pomenuta transaminaza na taj način imobilizovana pokazala se izuzetno stabilnom u izopropil acetatu tokom 6 dana na 50 °C.^[234] Povećana stabilnost imobilizovanog u odnosu na rastvorni enzim u prisustvu organskih rastvarača je primećena i za transaminaze iz različitih izvora (*V. fluvialis*, *Ruegeria* sp. TM1040 i *Luminiphilus syltensis* NOR5-1B) nakon imobilizacije na nekoliko tipova nosača (epoksi-kuglicama, aminskim kuglicama, aminskim kuglicama funkcionalizovanim glutaraldehidom i umrežavanjem enzimskih agregata) u prisustvu visokih koncentracija DMSO-a, etanola i izopropanola.^[237] Osim kod pomenutih transaminaza, uticaj imobilizacije na povećanje stabilnosti enzima u prisustvu visokih koncentracija organskih rastvarača je primećen i kod α -himotripsina, alkohol dehidrogenaze, lipaze i drugih.^[241-243]

5.2.5. Određivanje temperaturne stabilnosti rastvorne i imobilizovane ArRMut11 u organskom rastvaraču

Industrijski uslovi često podrazumevaju istovremenu upotrebu organskih rastvarača i povišene temperature, pa je iz tog razloga ispitan uticaj oba faktora istovremeno na rastvornu i imobilizovanu transaminazu ArRMut11.

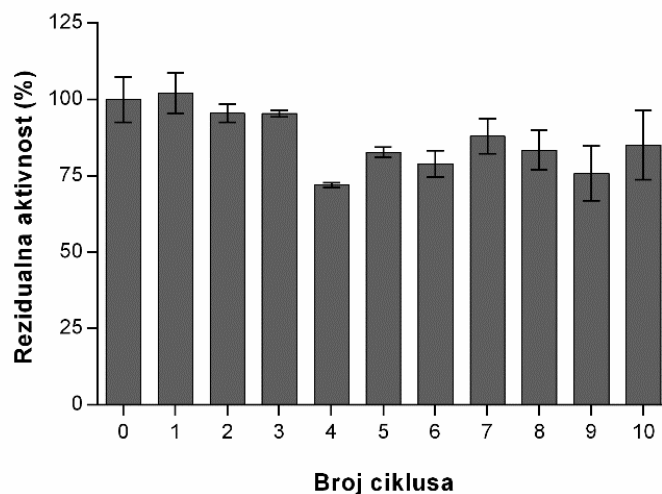
Rezultati određivanja rezidualne aktivnosti rastvorne i imobilizovane ArRMut11 na različitim temperaturama tokom 2 h inkubacije u 35% DMF-u su prikazani na slici 28. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je u slučaju rastvorne forme enzima (slika 28a) došlo do naglog pada aktivnosti u prvih 30 minuta inkubacije na svim temperaturama, nakon čega je aktivnost enzima ostala nepromenjena. Sa povećanjem temperature inkubacije rezidualna aktivnost solubilnog enzima je značajno opadala. Najveći gubitak aktivnosti primećen je na 70 °C gde je došlo do gubitka skoro 80% početne aktivnosti. Kovalentnom imobilizacijom došlo je do povećanja stabilnosti enzima, kao što je prikazano na slici 28b. Nakon inkubacije na 50 °C i 60 °C imobilizovani enzim je zadržao 100% početne aktivnosti tokom 2 h, dok je na 70 °C došlo do gubitka samo 20% početne aktivnosti. Dobijeni rezultati su ukazali na to da imobilizovani enzim ima poboljšane karakteristike, čime bi trebalo da se obezbedi mogućnost višestruke upotrebe u organskim sintezama.



Slika 28. Temperaturna stabilnost transaminaze ArRMut11 inkubirane u rastvoru 35% DMF-a; (a) rastvorni enzim (b) imobilizovani enzim. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

5.2.6. Višestruka upotreba imobilizovane ArRMut11 u sintezi 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ola

Mogućnost višestruke upotrebe imobilizovane transaminaze ArRMut11 ispitana je u 10 uzastopnih ciklusa konverzije dihidrotestosterona, pri čemu je enzim zadržao 85% početne aktivnosti (slika 29). Tokom prvog ciklusa konverzije uzorci su analizirani tankoslojnom hromatografijom na osnovu čega je primećeno da nakon drugog dana ne dolazi do značajne promene stepena konverzije dihidrotestosterona u odgovarajući amino derivat, pa je tokom narednih ciklusa vreme reakcije skraćeno na 2 dana (prilog: slika 2). TLC analiza je pokazala da je tokom prvih šest ciklusa konverzije reakcija bila skoro kvantitativna, dok je nakon šestog ciklusa došlo do smanjenja stepena konverzije, verovatno usled blagog gubitka polimera i enzimске aktivnosti između ciklusa (prilog: slika 3).



Slika 29. Rezidualna aktivnost imobilizovane ArRMut11 merena tokom 10 uzastopnih ciklusa sinteze 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ola. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

Mogućnost višestruke upotrebe transaminaze ArRMut11 je pokazana i nakon imobilizacije enzima na SEPABEADS EXE120 polimeru, pri čemu je na ovaj način pripremljen enzimski preparat upotrebljen u 10 uzastopnih ciklusa konverzije prekursora sitagliptina u trajanju od ukupno 200

časova bez značajnog gubitka aktivnosti, čime se količina enzima potrebnog za reakciju smanjila za više od 90% u odnosu na rastvornu formu.^[234]

Potencijal za višestruku primenu imobilizovanih transaminaza dokazan je i u slučaju transaminaza poreklom iz različitih izvora (*Vibrio fluvialis*, *Burkholderia multivorans*, *Silicibacter pomeroyi* i *Luminiphilus syltensis*) imobilizovanih na aminskim kuglicama i aminskim kuglicama funkcionalizovanim gluutaraldehidom prilikom konverzije 5-(hidroksimetil)furfurala u 5-(hidroksimetil)furfurilamin. Za većinu imobilizata je pokazana visoka stabilnost tokom 5 ciklusa konverzije uz upotrebu alanina kao ko-supstrata.^[12] U drugoj publikaciji istih autora pomenute transaminaze, isključujući transaminazu iz *Silicibacter pomeroyi*, a uključujući mutanta transaminaze iz *Ruegeria* sp. TM1040 imobilizovane osim na pomenutim aminskim kuglicama i na epoksi-kuglicama i umrežavanjem enzimskih agregata upotrebljene su u 10 ciklusa kinetičke rezolucije *rac*-MBA, pri čemu su transaminaze poreklom iz *Vibrio fluvialis* i *Luminiphilus syltensis* pokazale neznatan gubitak aktivnosti bez obzira na način imobilizacije, dok je kod transaminaze iz *Burkholderia multivorans* do najvećeg gubitka aktivnosti došlo nakon imobilizacije umrežavanjem enzimskih agregata.^[237] Višestruka upotreba imobilizovanih transaminaza prijavljena je i u mnogim drugim publikacijama.^[196, 198, 207, 236, 244-246]

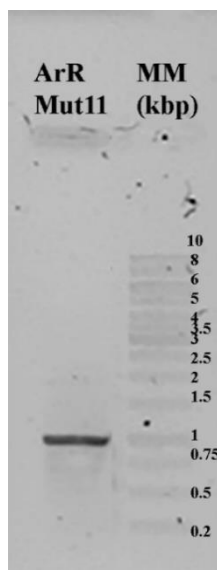
5.3. Ekspresija ω -transaminaze ArRMut11 na površini ćelija *Saccharomyces cerevisiae* EBY100

Kvasac je ekspresioni sistem koji ima najveću komercijalnu vrednost, a među kvascima najširu upotrebu ima *S. cerevisiae* (pekarski kvasac).^[97] *Saccharomyces cerevisiae* je jednoćelijski organizam, jedan od najbolje proučenih eukariotskih mikroorganizama. S obzirom na dostupnost velikog broja informacija o njegovim genetskim, fiziološkim, biohemijskim i metaboličkim karakteristikama *S. cerevisiae* se intenzivno koristi kao sistem za heterolognu ekspresiju kodirajućih gena eukariotskih proteina za primenu u istraživanjima i industriji.^[95] Kao domaćin za ekspresiju proteina kvasac ima prednost zbog brze proliferacije, dostizanja velike gustine suspenzije ćelija, zahteva upotrebu relativno jeftinih medijuma za gajenje, lak je za genetsku manipulaciju i poseduje sposobnost obavljanja post-translacionih modifikacija sličnih kao kod sisarskih ćelija (proteolitičko procesovanje, formiranje disulfidnih veza, glikozilacija i druge).^[247] Pored svih pomenutih prednosti ovaj sistem je takođe bezbedan za upotrebu, uključujući odsustvo endotoksina i onkogena.^[104]

Tehnikama prikaza na površini ćelije omogućena je ekspresija željenog proteina uz pomoć proteina usidrenog u membranu, koji je genetski fuzionisan sa proteinom od interesa. Ovakvi sistemi prikaza proteina na površini ćelija mikroorganizama našli su primenu u razvoju vakcina i antitela, skeniranju biblioteka mutiranih gena, biokonverziji i biosorpciji.^[248] Razvojem ovog polja *S. cerevisiae* je dobio status primamljivog mikroorganizma kao platforme za imobilizaciju enzima koji se mogu koristiti kao obnovljivi samoimobilisani biokatalizatori (poznati kao „biokatalizatori cele ćelije“).^[249]

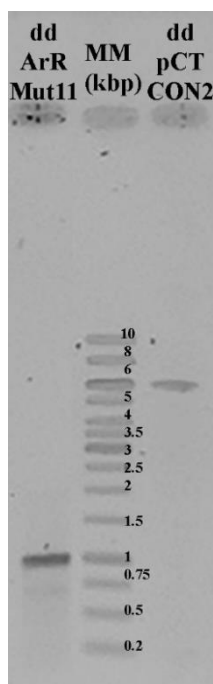
5.3.1. Kloniranje ArRMut11 u pCTcon2 ekspresioni vector

Ekspresija proteina na površini ćelija kvasca podrazumevala je da se prvo gen od interesa (ArRMut11) insertuje u vektor (pCTcon2) koji sadrži sekvence koje omogućavaju ovakav vid proteinske ekspresije. Gen za transaminazu ArRMut11 (odjeljak 4.3.1.1.) umnožen je PCR reakcijom upotrebom odgovarajućih prajmera specifičnih za dati gen (odjeljak 4.3.1.1.). Nakon što je umnožavanje gena završeno, proizvod reakcije je prečišćen i analiziran DNK elektroforezom na agaroznom gelu (slika 30). Kao što je na slici 30 prikazano, na agaroznoj elektroforezi je dobijena pojedinačna traka koja po molekulskoj masi (1 Kb) odgovara masi gena za ArRMut11, na osnovu čega je zaključeno da je gen od interesa uspešno umnožen.



Slika 30. Agarozna DNK elektroforeza PCR-om umnoženog gena za transaminazu ArRMut11.

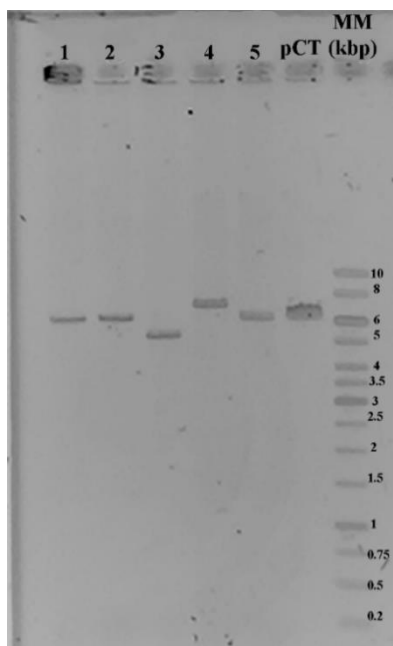
Potom je pristupljeno dvostrukoj digestiji vektora i gena upotrebom *NheI* i *XhoI* restrikcionih enzima. pCTcon2 vektor je nakon završetka dvostruke digestije defosforilisan primenom alkalne fosfataze, nakon čega su defosforilisani vektor i dvostruko digestovan gen za ArRMut11 prečišćeni i potom analizirani agaroznom DNK elektroforezom (slika 31).



Slika 31. Agarozna DNK elektroforeza dvostruko digestovanog gena za transaminazu ArRMut11 i pCTcon2 vektora.

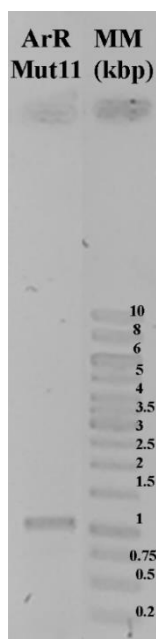
Na elektroforegramu su uočene pojedinačne trake koje po masi odgovaraju dvostruko digestovanom genu (1 Kb) i dvostruko digestovanom vektoru (6,4 Kb), nakon čega je postavljena ligacija dobijenih proizvoda upotrebom DNK ligaze, a zatim je urađena transformacija *E. coli* DH5 α kompetentnih ćelija. Uspešnost kloniranja je proverena tako što je 5 pojedinačnih transformisanih kolonija *E. coli* DH5 α zasejano u tečni medijum, nakon čega su iz prekonoćnih kultura izolovani plazmidi, koji su potom restrikovani upotrebom *EcoRI* restrikcionog enzima. Restrikovani plazmidi

analizirani su agaroznom DNK elektroforezom, a za poređenje molekulske mase korišćen je na isti način restrikovan prazan pCTcon2 vektor (slika 32).



Slika 32. Agarozna DNK elektroforeza plazmida izolovanih iz ćelija *E. coli* DH5α i praznog pCTcon2 vektora restrikovanih *EcoRI* restrikcionim enzimom.

Sa slike 32 može se uočiti da je masa plazmida izolovanog iz kolonije obeležene brojem 4 za nijansu veća od mase praznog pCTcon2 vektora. Međutim, s obzirom na to da je razlika u masi između praznog vektora (6,4 Kb) i vektora sa insertovanim genom za transaminazu ArRMut11 (7,4 Kb) mala i da se ne može sa sigurnošću tvrditi da data kolonija sadrži insertovan gen, postavljena je PCR reakcija upotrebom prajmera specifičnih za gen kao drugi nivo provere uspešnosti kloniranja. Kao templat je korišćen plazmid izolovan iz kolonije obeležene brojem 4 (slika 33).



Slika 33. DNK elektroforeza nakon PCR reakcije za proveru kloniranja transaminaze ArRMut11 u pCTcon2 vektor.

Na slici 33 se jasno uočava pojedinačna traka koja po masi (1 Kb) odgovara genu za transaminazu ArRMut11, na osnovu čega je zaključeno da je kloniranje gena za ArRMut11 u pCTcon2 vektor bilo uspešno. Dobijeni plazmid je uskladišten u *E. coli* DH5 α ćelijama i iskorišćen za transformaciju *S. cerevisiae* EBY100 ćelija radi ekspresije proteina na površini.

5.3.2. Ekspresija ArRMut11 na površini ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100

Kompetentne ćelije kvasca *S. cerevisiae* EBY100 su transformisane konstruktom ArRMut11-pCTcon2, nakon čega su pojedinačne kolonije zasejane u tečni YNB-CAA medijum sa glukozom i hloramfenikolom. Kulture su gajene na 28 °C, a kada je optička gustina na 600 nm dostigla vrednost 3,5-4, indukovana je ekspresija proteina dodatkom YNB-CAA medijuma sa galaktozom i 0,1 mM PLP-om, tako da je finalna OD na 600 nm iznosila približno 0,8. Temperatura ekspresije je snižena na 25 °C, a potom su na svaka 4 h, tokom 36 h, uzimani alikvoti ćelija i merena je aktivnost enzima. Ni u jednoj od analiziranih kolonija nije detektovana enzimska aktivnost, pa je odlučeno da se za kreiranje mesto-specifičnih mutanata ArRMut11 koristi enzim insertovan u pET29(a) vektor i da se za produkciju proteina koristi *E. coli*.

Postoji nekoliko potencijalnih razloga zbog kojih nije detektovana enzimska aktivnost u kvascu:

1. Genska sekvenca proteina koji je korišćen kao templat za kloniranje u pCTcon2 vektor nije kodon optimizovana za ekspresiju u kvascu, a poznato je da različiti ekspresioni sistemi preferiraju različite kodone tokom sinteze proteina.^[6, 96, 97]
2. ArRMut11 je dimerni protein koji u aktivnoj formi ima vezan PLP, pa se postavlja pitanje adekvatnog uvijanja i dimerizacije proteina.

5.4. Mesto-dirigovana evolucija proteina

Racionalni dizajn je metoda inženjeringa proteina koja omogućava usmerenu mutagenezu u cilju dobijanja enzima sa poboljšanim svojstvima, a uključuje temeljno razumevanje odnosa strukture i funkcije enzima, odnosno poznavanje aktivnog mesta enzima, njegovih strukturnih karakteristika, uloge u biokatalizi, stabilnosti i vezivanju supstrata. Ovaj pristup je od izuzetnog značaja kada su poznati detalji o strukturi enzima na atomskom nivou. Na osnovu informacija o strukturnim i funkcionalnim karakteristikama, poravnanja sekvenci i upotrebe različitih računarskih alata određuju se kritični amino kiseliniski ostaci za mesto-specifičnu mutagenezu.^[4, 84]

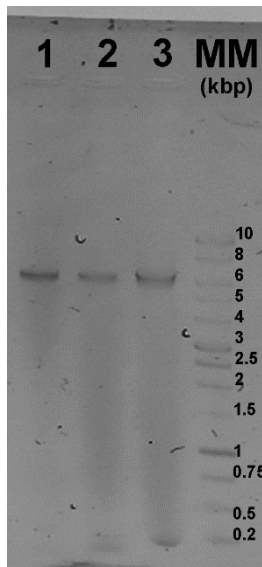
5.4.1. Kreiranje mesto-dirigovanih mutanata ArRMut11 u pET29a vektoru

Da bi se povećala aktivnost enzima ka dihidrotestosteronu kao i prinos konverzije u odgovarajući amino analog kreirani su mutanti ArRMut11 primenom mesto-specifične mutageneze. Pozicije na kojima će mutacije biti uvedene su odabrane upotrebom ISM metode (metodologija informacionog spektra).^[250, 251] Izabrane su tri pozicije kao kandidati za mutacije koje je trebalo da dovedu do nastanka mutanata sa povećanom aktivnošću ka dihidrotestosteronu:

4. Zamena fenilalanina leucinom na poziciji 88
5. Zamena asparaginske kiseline izoleucinom na poziciji 184
6. Zamena leucina asparaginskom kiselinom na poziciji 211

Mutacije su uvedene u gen za ArRMut11 upotrebom *QuickChange Lightning Site – Directed Mutagenesis* kompleta. Kao templat je korišćen insert ArRMut11 u pET29(a) vektoru. Nakon umnožavanja gena i uvođenja mutacija na odgovarajućim pozicijama uzorci su analizirani agaroznom

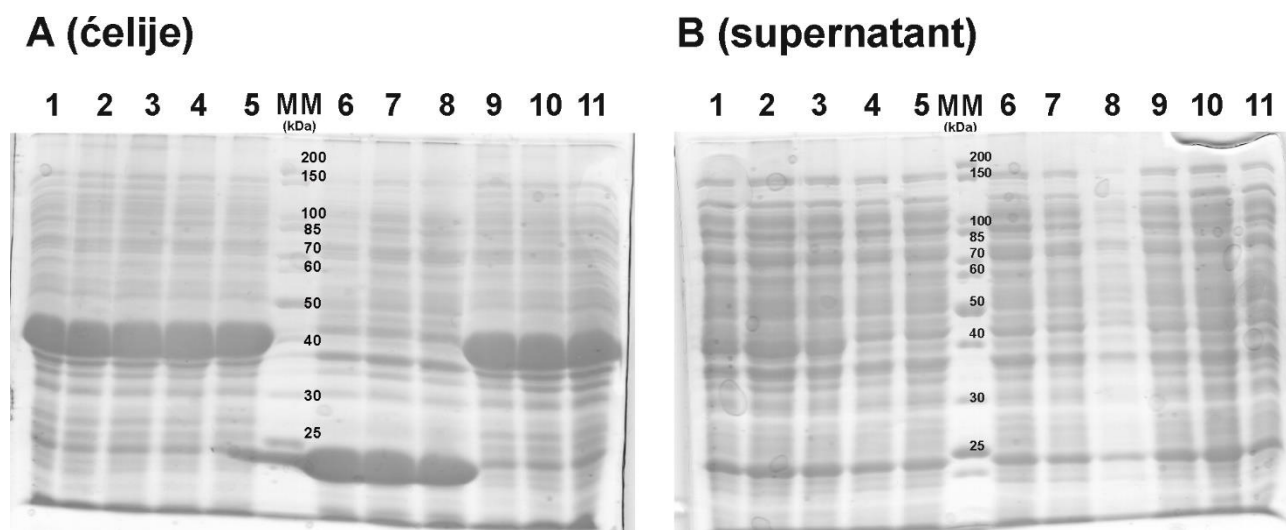
DNK elektroforezom (slika 34). Na slici 34 se u sva 3 uzorka, odnosno u PCR proizvodima sva 3 mutanta, uočava traka na molekularnoj masi nešto višoj od 6 Kb, što je masa koja odgovara konstrukt ArRMut11 u pET29(a) vektoru. Dobijeni PCR proizvodi su iskorišćeni za transformaciju ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10-Gold. Iz transformisanih ćelija su izolovani plazmidi koji su zatim sekvencirani.



Slika 34. Agarozna DNK elektroforeza mesto-specifičnih mutanata ArRMut11 kreiranih upotrebom *QuickChange Lightning Site – Directed Mutagenesis* kompleta.

5.4.2. Ekspresija prirodnog oblika i mutiranih varijanti ArRMut11 u *Escherichia coli* i određivanje enzimske aktivnosti

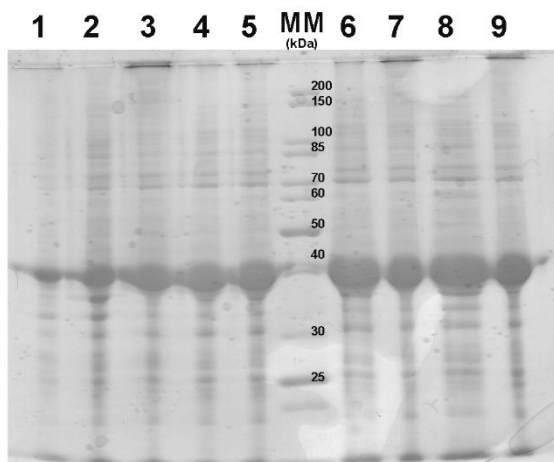
Analizom rezultata sekvenciranja potvrđeno je da su na sve tri pozicije uspešno uvedene mutacije, nakon čega je pristupljeno transformaciji ekspresionih sojeva *E. coli* i određivanju enzimske aktivnosti. Rezultati sekvenciranja su pokazali da je u slučaju mutanta na poziciji 184, gde je izvršena zamena asparaginske kiseline leucinom prisutna dodatna mutacija koja se nalazi u blizini mesta željene, odnosno, uočeno je odsustvo jednog ostatka timina, čime je došlo do izmene okvira čitanja gena i sinteze proteina od samo 20 kDa, što je i potvrđeno nakon ekspresije osnovne forme ArRMut11 i kreiranih mutanata u *E. coli* BL21 (DE3) pLysS soju (slika 35). Zasejano je po nekoliko kolonija osnovnog tipa ArRMut11 i dobijenih mutanata za analizu.



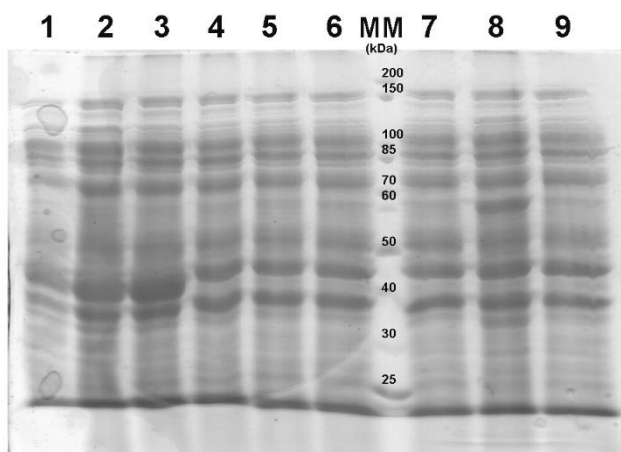
Slika 35. Elektroforegram nakon ekspresije osnovnog tipa i mesto-specifičnih mutanata ArRMut11 u *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLySs soju: (A) uzorci ćelijskih ostataka; (B) uzorci supernatanata; (MM) molekularni markeri.

Sa slike 35 se uočava da se osnovna forma ArRMut11 eksprimira delimično kao rastvorni protein molekulske mase približno oko 40 kDa (slika 35-B, uzorci obeleženi brojevima 1, 2 i 3), ali je predominantna količina enzima u formi inkluzionih tela (slika 35-A, uzorci obeleženi brojevima 1, 2 i 3). Kada su u pitanju kreirani mesto-specifični mutanti, kao što je već prethodno pomenuto, kod mutanta na poziciji 184 došlo je do promene otvorenog okvira čitanja i sinteze proteina od 20 kDa u formi inkluzionih tela (slika 35A, uzorci obeleženi 6, 7 i 8), dok se u uzorcima supernatanata (slika 35-B, uzorci obeleženi brojevima 6, 7 i 8) ne uočava traka na masi od 40 kDa, koja odgovara molekularnoj masi enzima od interesa. Što se tiče mutanata na pozicijama 88 i 211, na slici 35-A (uzorci obeleženi brojevima 4 i 5, mutant na poziciji 88; uzorci obeleženi brojevima 9, 10 i 11, mutant na poziciji 211) uočava se prisustvo proteinske trake na masi od 40 kDa u formi inkluzionih tela, koja odgovara eksprimiranoj ω -transaminazi ArRMut11. Sa druge strane, u solubilnim frakcijama se ne uočava proteinska traka na odgovarajućoj masi, slika 35-B (uzorci obeleženi brojevima 4, 5, 9, 10 i 11). Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da se u datom soju jedino osnovni tip ArRMut11 eksprimira u solubilnoj formi. Nakon toga, ekspresija kreiranih mutanata, osim mutanta na poziciji 184, za koji je prethodno potvrđeno da je došlo do izmene okvira čitanja gena, je urađena i u *E. coli* BL21 (DE3) Star soju (slika 36) i *E. coli* SHuffle soju (slika 37) da bi se utvrdilo da li je moguće eksprimirati mutante u solubilnoj formi u nekom od datih sojeva.

A (ćelije)

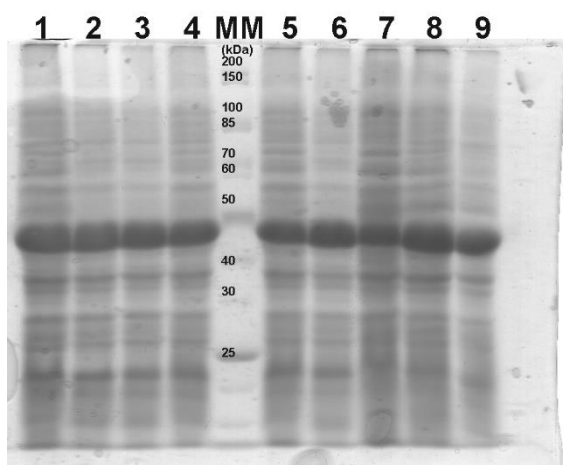


B (supernatant)

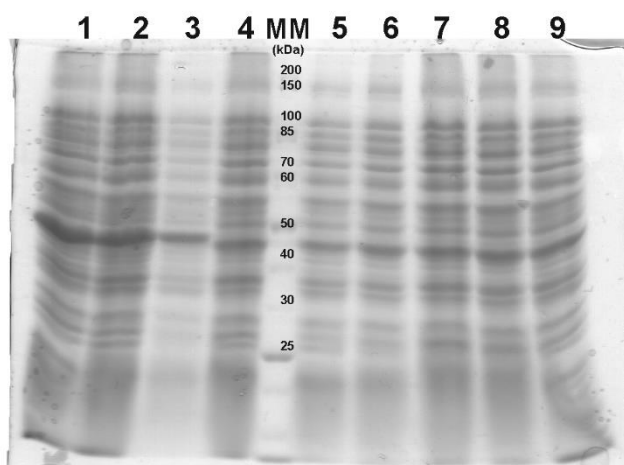


Slika 36. Elektroforegram nakon ekspresije osnovnog tipa i mesto-specifičnih mutanata ArRMut11 u *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star soju: (A) uzorci ćelijskih ostataka; (B) uzorci supernatanata; (MM) molekularni markeri.

A (ćelije)



B (supernatant)

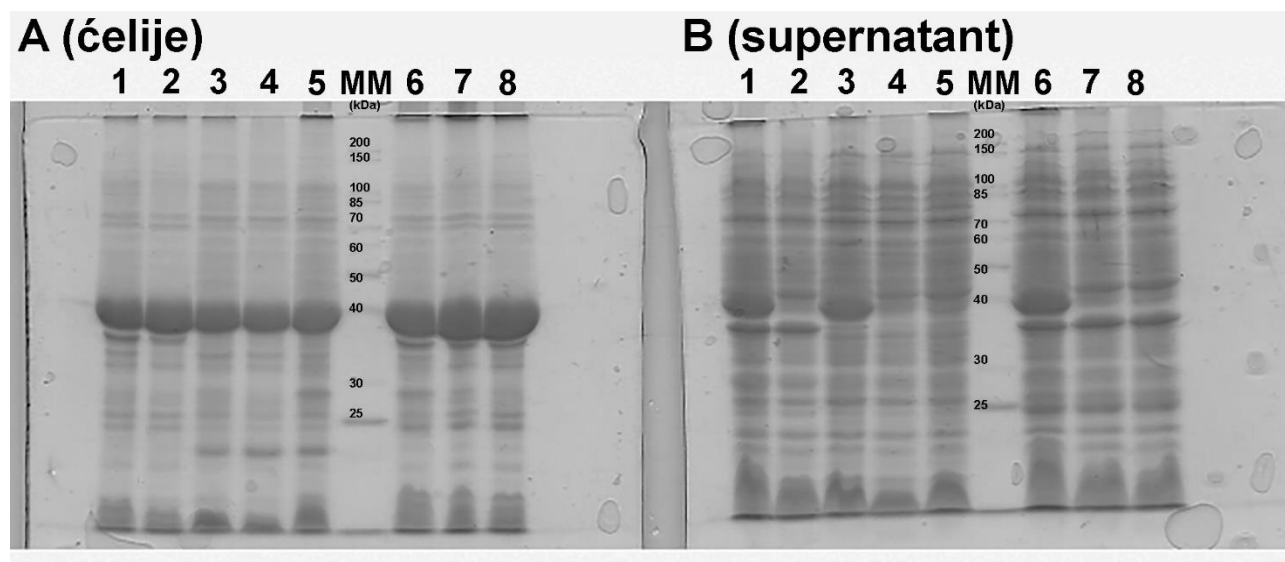


Slika 37. Elektroforegram nakon ekspresije osnovnog tipa i mesto-specifičnih mutanata ArRMut11 u *Escherichia coli* SHuffle soju: (A) uzorci ćelijskih ostataka; (B) uzorci supernatanata; (MM) molekularni markeri.

Sa slika 36 i 37 se može zaključiti da je ekspresioni profil u *E. coli* BL21 (DE3) Star soju i *E. coli* SHuffle soju isti kao i u pLysS soju, odnosno u supernatantima dobijenim nakon ekspresije osnovnog tipa ArRMut11 (slika 36-B i slika 37-B, uzorci obeleženi brojevima 1, 2 i 3) se uočava prisustvo proteinske trake na masi od oko 40 kDa koja odgovara masi enzima od interesa. Veći deo proteina se i u ovom slučaju nalazi u formi inkuzionih tela što se može videti na slikama 36-A i 37-A u uzorcima obeleženim brojevima 1, 2 i 3. Kada su u pitanju ekspresioni profili *E. coli* BL21 (DE3) Star i *E. coli* SHuffle ćelija transformisanih mutantima ArRMut11 na pozicijama 88 i 211, i u ovom slučaju se uočava isti trend kao i prilikom ekspresije u pLysS soju, odnosno u supernatantima dobijenim nakon ekspresije se ne uočava prisustvo proteinske trake na masi koja odgovara ArRMut11 (slika 36-B i slika 37-B, uzorci 4, 5 i 6-mutant na poziciji 88; uzorci 7, 8 i 9-mutant na poziciji 211), dok se u

ćelijskim ostacima analiziranih kolonija uočava prisustvo trake na masi od oko 40 kDa u formi inkluzionih tela.

Nakon što je utvrđeno da se pri primenjenim uslovima ekspresije proteina (30 °C; 0,5 mM IPTG) u sva 3 upotrebljena soja *E. coli* jedino osnovni tip ArRMut11 eksprimira u solubilnoj formi, dok se mesto-specifični mutanti talože kao inkluzionu tela, uslovi ekspresije su promenjeni da bi se smanjila verovatnoća za formiranje inkuzionih tela, odnosno smanjena je koncentracija IPTG-a koji je korišćen za indukciju na 0,35 mM i temperatura ekspresije je snižena na 20 °C (slika 38).^[6, 252]



Slika 38. Elektroforegram nakon ekspresije osnovnog tipa i mesto-specifičnih mutanata ArRMut11 u *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLySs, Star i SHuffle soju: (A) uzorci ćelijskih ostataka; (B) uzorci supernatanta; (MM) molekulski markeri.

Ipak, promene u uslovima ekspresije nisu dovele do produkcije solubilnog proteina kod mesto-specifičnih mutanata ni u jednom od primenjenih sojeva, i na osnovu slike 38 može se zaključiti da se i u ovom slučaju jedino osnovni tip ArRMut11 može detektovati u solubilnoj frakciji (slika 38-B, uzorci obeleženi brojevima 1, 3 i 6), dok se kreirani mutanti uočavaju samo u uzorcima ćelijskih ostataka u vidu inkluzionih tela (slika 38-A).

Da bi se dobijeni rezultati potvrdili određena je i enzimska aktivnost u solubilnim frakcijama dobijenim nakon ekspresije osnovnog tipa ArRMut11 i dobijenih mutanata. Rezultati određivanja aktivnosti prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Aktivnost osnovnog tipa ArRMut11 i dobijenih mutanata izražena kao koncentracija enzimske aktivnosti (U/mL).

<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLySs			<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Star			<i>Escherichia coli</i> SHuffle		
<i>wt</i>	<i>m F→L</i>	<i>m L→D</i>	<i>wt</i>	<i>m F→L</i>	<i>m L→D</i>	<i>wt</i>	<i>m F→L</i>	<i>m L→D</i>
0.03	0.0017	0.0019	0.032	0.0009	0.0025	0.072	0.0041	0.0057

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 13 uočava se da jedino osnovni tip ArRMut11 (obeležen kao wt u tabeli) pokazuje aktivnost u sva tri soja *E. coli* koja su korišćena za ekspresiju, dok kod

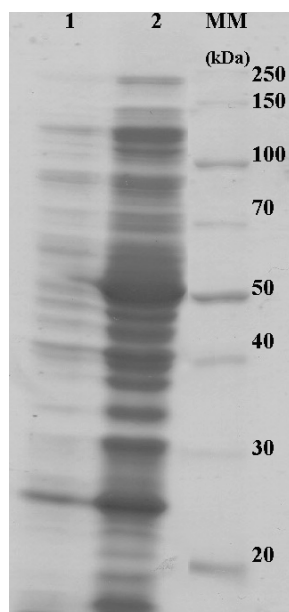
mesto-specifičnih mutanata nije detektovana enzimaska aktivnost, čime su potvrđeni i rezultati dobijeni nakon elektroforeze.

Prezentovani rezultati doveli su do zaključka da bez obzira na to što je na osnovu upotrebljenog algoritma predviđeno da bi konstruisanje odabranih mesto-specifičnih mutanata ω -transaminaze ArRMut11 trebalo da dovede do sinteze enzima koji će imati povećanu aktivnost sa dihidrotestosteronom, uvođenje dodatnih mutacija u protein koji se već dosta razlikuje od osnovne varijante (27 mutacija je uvedeno metodama dirigovane evolucije i racionalnog dizajna) izazvalo je smanjenje rastvorljivosti sintetisanog proteina i njegovo taloženje u formi inkluzionih tela. Dati algoritam nije mogao da predvidi način uvijanja proteina. Dalja optimizacija procesa nije rađena s obzirom na to da renaturacija proteina iz inkluzionih tela podrazumeva upotrebu denaturišućih agenasa kao što su urea i detergentsi i postavlja se pitanje da li bi se i koja količina aktivnog enzima dobila. Imajući u vidu da je ovo skup i vremenski zahtevan proces, zaključeno je da nije isplativ, naročito u slučaju kada je potrebno dobiti enzim koji bi se koristio za organske sinteze na industrijskom nivou.

5.5. Heterologna ekspresija ω -transaminaze iz *Chromobacterium violaceum* u *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS i detekcija enzimске aktivnosti

Transaminaza poreklom iz *Chromobacterium violaceum* je jedna od najbolje proučenih ω -transaminaza i detaljno je okarakterisana strukturno^[162, 163] i u pogledu supstratne specifičnosti.^[161, 253, 254] S obzirom na potencijal ovog enzima za upotrebu u sintezi hiralnih amina, postoji i nekoliko publikacija na temu modifikacije Cv-2025 primenom proteinskog inženjeringa u okviru aktivnog mesta sa ciljem konstruisanja forme enzima sa izmenjenom enantiospecifičnošću ili koja bi mogla da katalizuje konverziju strukturno kompleksnijih supstrata.^[255-258]

Proces proizvodnje enzima u *E. coli* BL21 (DE3) pLysS soju je praćen denaturišućom elektroforezom na 12% gelu. Nakon bojenja i obezbojavanja gela ustanovljeno je da se u uzorku bakterijskog lizata može detektovati proteinska traka čija je masa procenjena na približno 50 kDa (slika 39), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima.^[161] Određeno je da pri uslovima navedenim u odeljku 4.7.2.1. enzim u lizatu ispoljava aktivnost od 1,167 U/mL.



Slika 39. Elektroforegram nakon ekspresije Cv-2025: (1) lizat BL21 (DE3) pLysS ćelija pre indukcije ekspresije; (2) lizat ćelija sa eksprimiranom Cv-2025; (MM) molekularni markeri.

Dobijeni enzim je testiran kao katalizator za sintezu amino derivata steroida i pri tome nije pokazao aktivnost.

5.6. Heterologna ekspresija i karakterizacija pretpostavljene opin dehidrogenaze iz metagenomske sekvence *Desulfohalobium retbaense*

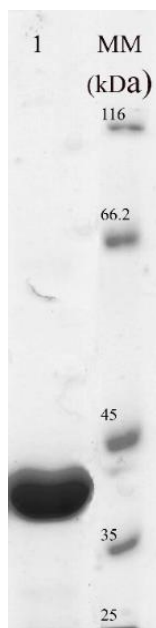
Opin dehidrogenaze su dehidrogenaze aminokiselina koje mogu da kupluju karbonilna jedinjenja sa aminima većim od amonijaka, pri čemu se formirana imino veza među supstratima redukuje uz pomoć hidridnog jona sa prstena NAD(P)H. Sposobnost ovih enzima da sintetišu proizvode definisane hiralnosti od jednog hiralnog i jednog ahiralnog prekurskora čini ih dobrim kandidatima za sintezu sekundarnih hiralnih amina koji predstavljaju funkcionalnu grupu mnogih biološki aktivnih molekula.^[29-31]

Pretpostavljena opin dehidrogenaza okarakterisana u okviru ove disertacije potiče iz umereno halofilne sulfat-redukujuće bakterije *Desulfohalobium retbaense* izolovane iz sedimenta jezera Retba. Enzim je identifikovan iz metagenomske biblioteke metodom pretraživanja zasnovanom na poređenju sekvenci sa poznatom opin dehidrogenazom poreklom iz *Arthrobacter sp.* soj 1C (CENDH), UniProt ID K44297, korišćenom u eksperimentima usmerene evolucije od strane kompanije *Codexis*.

5.6.1. Heterologna ekspresija i prečišćavanje opin dehidrogenaze

Optimalan soj *E. coli* za produkciju opin dehidrogenaze je nađen nakon pilot eksperimenta u kom je nekoliko različitih sojeva upotrebljeno za proizvodnju proteina koji sadrži his tag iz kodon optimizovane genske sekvence (prilog: slika 5-A) na 20 °C tokom 20 h. Ekspresioni profil je analiziran denaturišućom elektroforezom (prilog: slika 6). Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da se u lizatu *E. coli* BL21 (DE3) i BL21 Star (DE3) ćelija (uzorci obeleženi brojevima 4 i 6, redom) uočava traka proteina na poziciji koja odgovara masi od 40 kDa, što je u saglasnosti sa molekulskom masom proteina dobijenom iz predviđene amino kiselinske sekvence. Predviđena amino kiselinska sekvenca koja je korišćena za izračunavanje teorijske pI vrednosti i molekulске mase upotrebom ExPASy Compute pI/Mw alatke je prikazana na slici 5-B u prilogu. Rekombinantni protein je većinski bio prisutan u formi inkluzionih tela, što je uočeno nakon posmatranja uzoraka ćelijskih ostataka (prilog: slika 6, uzorci 3 i 5, redom), ali je takođe uočena i značajna količina solubilnog proteina. U uzorcima BL21 OVER ćelija nije uočena traka koja odgovara proteinu od interesa ni u ćelijskom lizatu, kao ni u ostacima ćelija (prilog: slika 6, uzorci 1 i 2, redom). U daljim eksperimentima korišćen je *E. coli* BL21 Star (DE3) soj za produkciju proteina usled detektovanog prisustva velike količine solubilnog proteina.

Opin dehidrogenaza je iz bistrog ćelijskog lizata dobijenog nakon produkcije proteina prečišćena metal-afinitetnom hromatografijom na koloni Ni-NTA. Hromatogram prečišćavanja proteina prikazan je na slici 7 u prilogu. Proces prečišćavanja je praćen SDS-PAGE elektroforezom, nakon čega je utvrđena homogenost uzorka, odnosno prisustvo samo jedne trake proteina na masi od 40 kDa (slika 40).



Slika 40. Elektroforegram opin dehidrogenaze produkovane u *E. coli* BL21 Star (DE3) soju nakon prečišćavanja metal-afinitetnom hromatografijom: (1) prečišćena opin dehidrogenaza; (MM) molekulski markeri.

5.6.2. Određivanje supratne specifičnosti i kinetičkih parametara opin dehidrogenaze

Rezultati određivanja supratne specifičnosti opin dehidrogenaze iz *Desulfohalobium retbaense* su prikazani u tabeli 14. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da od testiranih α -keto kiselina enzim preferira piruvat, ali ispoljava aktivnost i sa oksaloacetatom i glioksilatom u značajno manjoj meri. Aktivnost u prisustvu α -ketoglutarata nije detektovana. Kada su u pitanju donori amino grupe, skrining je urađen u širokom opsegu standardnih i nekoliko nestandardnih aminokiselina pri čemu je zaključeno da enzim ispoljava relativno širok opseg specifičnosti. U smeru formiranja sekundarnih amina kao preferencijalni donor amino grupe istakao se L-alanin, uz piruvat kao akceptor amino grupe. Pored alanina kao dobri donori amino grupe pokazali su se i L-valin, L-serin i L-cistein sa kojima je izmerena enzimska aktivnost iznosila 65%, 40% i 64% aktivnosti u odnosu na L-alanin. Kada su u pitanju nestandardne aminokiseline koje su testirane enzim je pokazao afinitet ka norvalinu u određenoj meri kada je korišćen piruvat kao ko-supstrat, ali je detektovana aktivnost bila približno 20 puta niža nego sa L-alaninom.

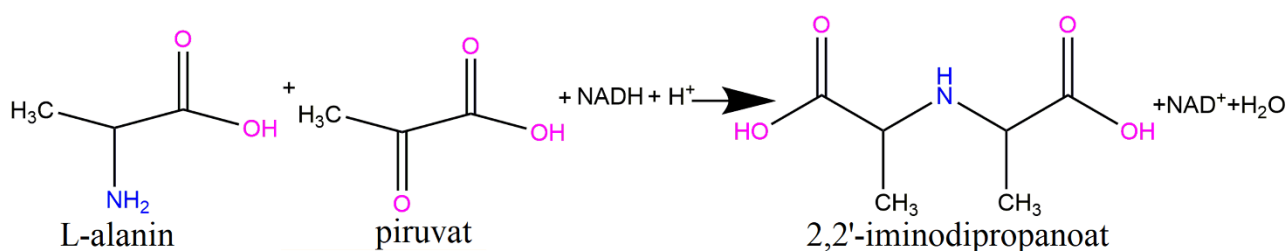
Tabela 14. Supratna sprecifičnost opin dehidrogenaze izražena kao koncentracija enzimске aktivnosti (U/mL)^[a].

Aminokiselina	Keto kiselina			
	Piruvat	Oksaloacetat	Glioksilat	α -ketoglutarat
L-Alanin	90.43 $\pm$ 8.23	24.80 $\pm$ 2.34	0.55 $\pm$ 0.02	ND ^[b]
L-Valin	59.51 $\pm$ 5.82	15.03 $\pm$ 1.58	0.73 $\pm$ 0.06	ND
L-Cistein	57.96 $\pm$ 3.66	13.47 $\pm$ 1.18	0.45 $\pm$ 0.01	ND
L-Serin	34.84 $\pm$ 4.57	8.75 $\pm$ 1.65	0.42 $\pm$ 0.09	ND
L-Glicin	7.37 $\pm$ 0.18	ND	ND	ND
Norvalin ^[c]	4.78 $\pm$ 0.55	ND	ND	ND
Norleucin ^[c]	ND	ND	ND	ND
L-Leucin	1.90 $\pm$ 0.39	ND	ND	ND

L-Izoleucin	ND	ND	ND	ND
L-Metionin	ND	ND	ND	ND
L-Prolin	ND	ND	ND	ND
L-Glutamin	ND	ND	ND	ND
L-Asparagin	ND	ND	ND	ND
L-Lizin	ND	ND	ND	ND
L-Arginin	ND	ND	ND	ND
L-Fenilalanin	ND	ND	ND	ND
L-Histidin	ND	ND	ND	ND
β -Alanin	ND	ND	ND	ND
L-Asparaginska kiselina	ND	ND	ND	ND
L-Glutaminska kiselina	ND	ND	ND	ND
L-Triptofan	ND	ND	ND	ND

[a] Vrednosti predstavljaju aktivnost $\pm$ standardna devijacija tri nezavisna merenja [b] Aktivnost nije detektovana. [c] Racemska smeša.

Na osnovu rezultata prezentovanih u tabeli 14 zaključeno je da proučavani enzim ispoljava aktivnost alanin specifične opin dehidrogenaze (slika 41).



Slika 41. Jednačina reakcije katalizovane alanin specifičnom opin dehidrogenazom iz *Desulfohalobium retbaense*.

Za supstrate sa kojima je enzim pokazao najveću aktivnost određene su Mihaelis-Mentenova konstanta (K_m) i konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m). Nakon linearizacije Mihaelis-Menten jednačine primenom Lineweaver-Burk metode izračunata je K_m vrednost za piruvat, pri čemu je koncentracija L-alanina fiksirana na 5,0 mM, a koncentracija NADH na 0,15 mM (prilog: slika 8-A). Prema istom principu su izračunate K_m vrednosti za L-alanin, L-valin i L-serin, pri čemu je koncentracija piruvata fiksirana na 5,0 mM, a koncentracija NADH na 0,15 mM (prilog: slika 8-B, 8-C i 8-D, redom).

Tabela 15. Kinetički parametri prečišćene opin dehidrogenaze.

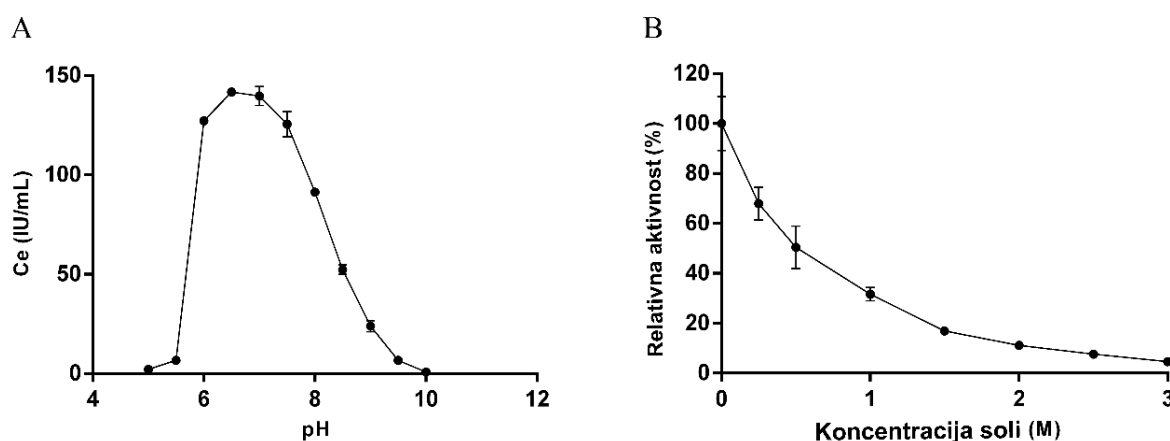
Supstrat	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Piruvat	2.191	129.98	59.34
Alanin	1.3	167.86	128.28
Valin	1.26	74.97	59.41
Serin	2.8	89.15	31.82

Za piruvat je dobijena K_m vrednost od 2,19 mM, dok je za L-alanin i L-valin, nađeno da je K_m 1,3 mM, s tim što su dobijene vrednosti za k_{cat} i k_{cat}/K_m 2,2 puta niže za L-valin nego za L-alanin (tabela 15). Kada je u pitanju L-serin, dobijena je 2 puta viša vrednost K_m nego za L-alanin, dok su vrednosti

za k_{cat} i k_{cat}/K_m bile 2, odnosno 4 puta niže nego za L-alanin (tabela 15). Dobijeni rezultati ukazali su na to da alanin specifična opin dehidrogenaza iz *Desulfohalobium retbaense* ima relativno široku supstratnu specifičnost, omogućavajući sintezu opina i sa drugim aminokiselinama osim L-alanina, kao što je pokazano i za AlaDH iz *M. sanguinea*,^[259] i suprotno od AlaDH iz *A. marina*, koja je visoko specifična za L-alanin.^[260] Katalitička efikasnost alanin specifične opin dehidrogenaze iz *Desulfohalobium retbaense* je 6,5 puta niža u odnosu na AlaDH iz *A. marina*, ali je 3,3 puta viša u odnosu na AlaDH iz *M. sanguinea* (167,86, 1084,6 i 51,7 s⁻¹, redom).

5.6.3. Uticaj pH i rastuće koncentracije NaCl-a na enzimsku aktivnost

Uticaj pH na enzimsku aktivnost je ispitan u opsegu od pH 5,0 do pH 10,0, pri čemu je opin dehidrogenaza pokazala aktivnost u neutralnom opsegu pH (6,0-7,5), sa najvećom aktivnošću izmerenom na pH 6,5. Ispod pH 6,0 nije detektovana enzimska aktivnost, na pH 8,0 izmereno je 50% aktivnosti, dok je na pH 8,5 izmereno samo 30% maksimalne aktivnosti enzima (slika 42-A). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima za pH optimum drugih alanin specifičnih opin dehidrogenaza u smeru formiranja sekundarnih amina.^[261, 262]



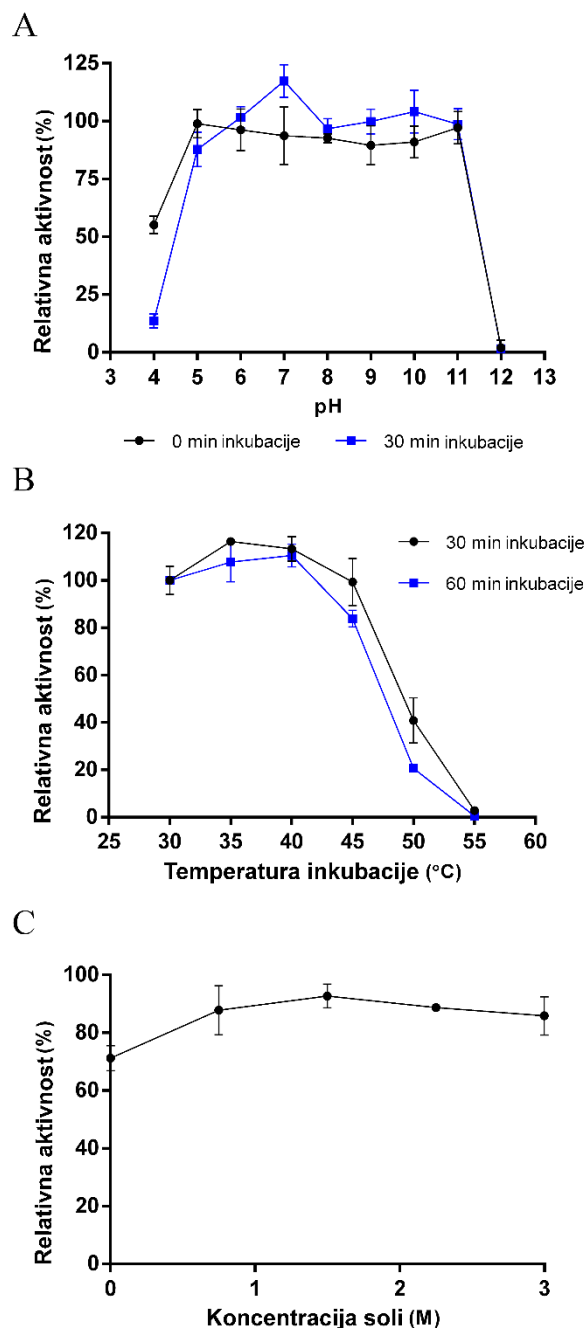
Slika 42. A) Uticaj pH i B) Uticaj rastuće koncentracije NaCl-a na aktivnost prečišćene opin dehidrogenaze iz *Desulfohalobium retbaense*. Relativna aktivnost je definisana kao procenat aktivnosti u odnosu na maksimalnu aktivnost enzima. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

Uticaj dodatka soli u reakcionu smešu u rastućoj koncentraciji na aktivnost opin dehidrogenaze prikazan je na slici 42-B. Aktivnost enzima je merena uz dodatak NaCl-a u koncentraciji od 0-3M, pri čemu je najveća aktivnost enzima izmerena u uzorku bez prisustva soli. Sa povećanjem koncentracije soli došlo je do naglog smanjenja enzimске aktivnosti, pri čemu je enzim zadržao samo 50% početne aktivnosti već u prisustvu 0,5 M NaCl-a, dok je pri koncentraciji soli od 1 M aktivnost enzima pala na 30%. Maksimalna enzimska aktivnost u rastvoru bez dodatka soli već je prijavljena za termo-halofilnu lipazu iz *Salinivibrio* sp. soj SA-2,^[263] LipBL iz *Marinobacter lypoliticus* SM19^[65] i ekstracelularnu haloalkalnu proteazu iz *Salinivibrio* sp. soj AF-2004.^[264]

5.6.4. Uticaj pH, temperature i NaCl-a na stabilnost enzima

Pored aktivnosti koju opin dehidrogenaza ispoljava pri određenim uslovima reakcije, važan faktor je i stabilnost koju enzim uspeva da zadrži tokom inkubacije na različitim pH vrednostima, povišenoj temperaturi i u prisustvu povišene koncentracije soli. Da bi se ispitala pH stabilnost, opin dehidrogenaza je inkubirana u puferima različite pH vrednosti tokom 30 minuta, na 25 °C, nakon čega je merena rezidualna aktivnost enzima. U toku navedenog perioda inkubacije, opin dehidrogenaza je pokazala stabilnost u širokom pH opsegu, od pH 6,0 do pH 11,0, pri čemu je enzim

zadržao skoro 85% početne aktivnosti na pH 5,0 (slika 43-A). Na pH 12,0, došlo je do potpunog gubitka aktivnosti nakon 30 minuta inkubacije, dok je na pH 4,0 već prilikom dodatka pufera aktivnost pala na 50% početne aktivnosti, a nakon 30 minuta aktivnost enzima se smanjila na 10% početne aktivnosti.



Slika 43. A) Uticaj pH, B) Uticaj temperature i C) Uticaj NaCl-a na stabilnost prečišćene opin dehidrogenaze iz *Desulfohalobium retbaense*. Relativna aktivnost je definisana kao procenat aktivnosti u odnosu na maksimalnu aktivnost enzima. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

Da bi se odredila temperaturna stabilnost, enzim je inkubiran u opsegu temperature od 30 do 55 °C tokom 30 i 60 minuta, nakon čega je merena rezidualna enzimaska aktivnost. Kao maksimalna vrednost aktivnosti (100%) uzeta je aktivnost enzima izmerena nakon inkubiranja na 30 °C (slika 43-

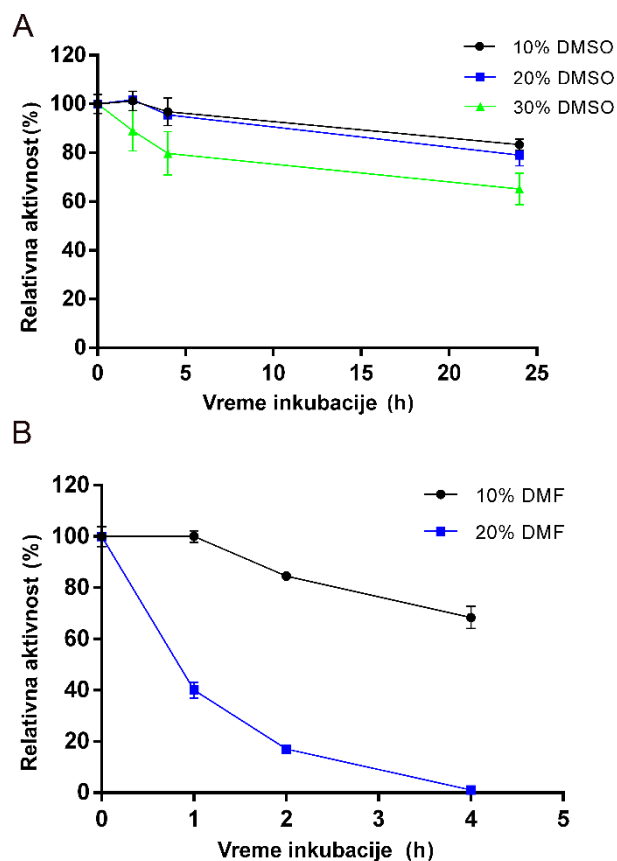
B). Opín dehidrogenaza je zadržala maksimalnu aktivnost do 45 °C tokom 30 minuta inkubacije i do 40 °C tokom 60 min inkubacije. Nakon 30 minuta inkubacije na 50 °C enzim je zadržao približno 40% početne aktivnosti, dok je nakon 60 min inkubacije na 45 i 50 °C, aktivnost enzima pala na 80% i 20% početne aktivnosti, redom. Pri višim temperaturama već nakon 30 min inkubacije došlo je do potpunog gubitka aktivnosti enzima.

Stabilnost opín dehidrogenaze nakon dodatka soli (0-3 M) ispitana je nakon inkubiranja enzima na 25 °C tokom 24 h. Kao maksimalni procenat (100%) enzimске aktivnosti uzeta je aktivnost izmerena u uzorku pre dodatka soli. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 43-C, a na osnovu njih je zaključeno da enzim pokazuje stabilnost u prisustvu soli u koncentraciji do 3 M. U uzorku u kom nije dodata so, aktivnost enzima je pala na 75% početne aktivnosti nakon inkubiranja u navedenim uslovima, dok je uz dodatak soli rezidualna aktivnost enzima porasla na 90% i ostala na toj vrednosti u čitavom opsegu koncentracija soli sa kojom je enzim inkubiran. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je gubitak aktivnosti enzima posledica termalne inaktivacije, odnosno inkubacije na 25 °C tokom 24 h, i da je prisustvo soli dovelo do povećanja termalne stabilnosti enzima. Ovakav uticaj soli na generalnu i termalnu stabilnost opín dehidrogenaze iz *Desulfohalobium retbaense* je već prijavljen u slučaju drugih enzima koji vode poreklo iz halofila, kao što je lipaza iz *Chromohalobacter* sp.,^[265] termoalkalofilna lipaza iz *Bacillus atrophaeus* FSHM2^[266] i alkalna serin proteaza iz *Haloalkaliphilic bacterium* sp. AH-6.^[267]

5.6.5. Stabilnost opín dehidrogenaze u organskom rastvaraču

Povećana aktivnost i stabilnost enzima poreklom iz halofila u prisustvu organskog rastvarača posledica je toga što prisustvo visoke koncentracije soli implicira smanjenu količinu vode, čime se nameće njihova potencijalna upotreba u sintetskim procedurama koje zavise od prisustva organskih rastvarača.^[59]

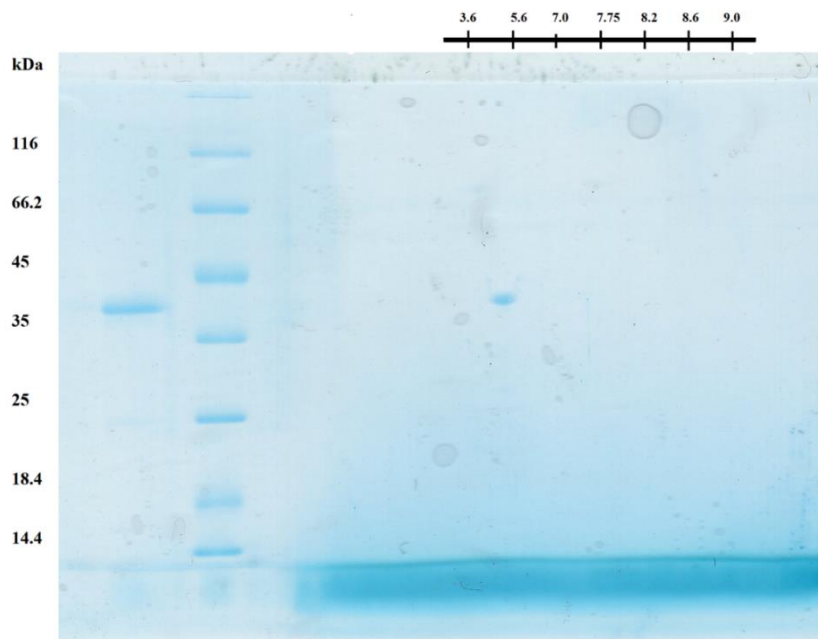
Kao što je prikazano na slici 44, opín dehidrogenaza zadržava stabilnost u DMSO-u do koncentracije od 20% (v/v) tokom 4 h, dok je nakon 24 h inkubacije došlo do pada aktivnosti enzima na 80% početne aktivnosti. Prilikom inkubacije enzima u 30% (v/v) DMSO-u, aktivnost se smanjila na 80% početne aktivnosti nakon 4 h inkubacije, dok je nakon 24 h inkubacije enzim zadržao 65% početne aktivnosti. Gubitak enzimске aktivnosti nakon 24 h inkubacije je verovatno delimično posledica termalne inaktivacije na 25 °C, kao što je pokazano tokom ispitivanja stabilnosti enzima u prisustvu povišene koncentracije NaCl-a, pa je pretpostavka da enzim zadržava veći procenat aktivnosti nakon 24 h nego što je izmereno. Kada je u pitanju DMF, nakon 2 h inkubacije u 10% i 20% rastvoru, enzim je zadržao 85% odnosno 17% početne aktivnosti, dok je nakon 4 h aktivnost enzima pala na 68% u slučaju 10% DMF-a, a u prisustvu 20% rastvarača došlo je do potpunog gubitka aktivnosti enzima. Povećana stabilnost enzima poreklom iz halofila u polarnim organskim rastvaračima je već objavljena za lipaze iz različitih izvora,^[65, 268, 269] proteazu iz halotolerantne bakterije *Virgibacillus* sp. SK33,^[270] i NAD⁺- zavisnu glutamat dehidrogenazu iz *Halobacterium salinarum* soj NRC-36014.^[271]



Slika 44. Uticaj organskog rastvarača na stabilnost prečišćene opin dehidrogenaze. A) DMSO u koncentraciji od 10, 20, i 30%; B) DMF u koncentraciji od 10 i 20%. Relativna aktivnost je definisana kao procenat aktivnosti izmerene u rastvoru enzima bez organskog rastvarača. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

5.6.6. 2D elektroforeza

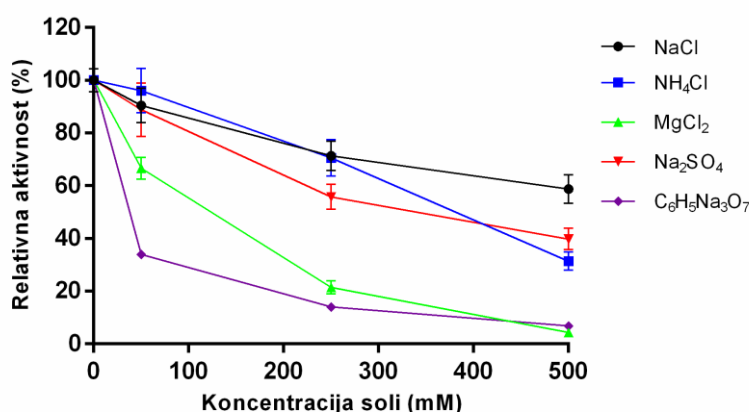
Nakon bojenja gela CBB R-250 bojom, uočena je jedna tačka na 2D PAGE (slika 45) na molekulskoj masi od 40 kDa, a eksperimentalno je određeno da je pI vrednost prečišćene opin dehidrogenaze iz *Desulfohalobium retbaense* 5,25. Eksperimentalno određena pI vrednost je u saglasnosti sa teorijski određenom pI (5,66), izračunatom iz amino kiselinske sekvence proteina koji sadrži His tag upotrebom ExPASy Compute pI/Mw alatke. Proteini koji vode poreklo iz halofilnih organizama imaju takvu raspodelu aminokiselina koja uzrokuje da njihova izoelektrična tačka bude u kiseljoj sredini (oko 5,0).^[60]



Slika 45. Prečišćena opin dehidrogenaza nakon analiziranja izoelektričnim fokusiranjem prema pI vrednosti, a zatim prema molekularnoj masi na 12% SDS PAGE nakon bojenja sa CBB R-250.

5.6.7. Efekat prisustva jona na aktivnost enzima

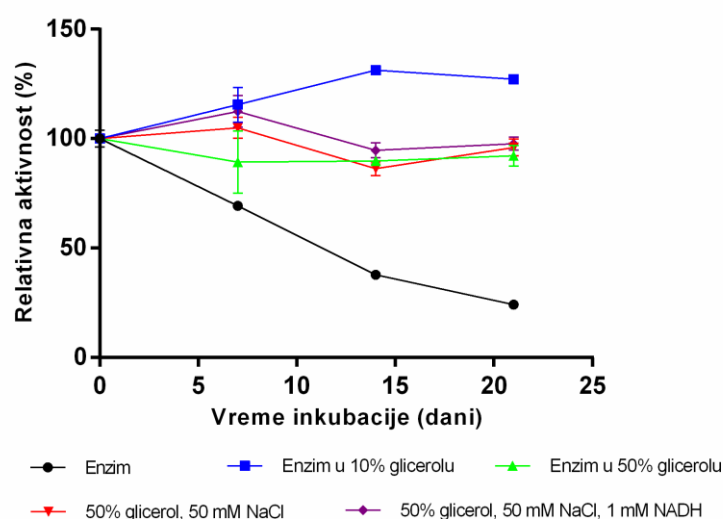
Da bi se utvrdio uticaj prisustva različitih jona na aktivnost opin dehidrogenaze, NaCl, NH₄Cl, MgCl₂, Na₂SO₄, ili C₆H₅Na₃O₇ su dodati u reakcionu smešu u različitim koncentracijama. Na osnovu rezultata (slika 46) zaključeno je da enzim gubi približno 10% aktivnosti već u prisustvu 0,05 M NaCl-a, NH₄Cl-a i Na₂SO₄-a. Pri 0,5 M koncentraciji pomenutih soli aktivnost enzima je pala na 59%, 32%, i 40%, redom. Uticaj prisustva NaCl-a na aktivnost enzima je već ispitan u prethodnim eksperimentima i pokazano je da enzim ispoljava najveću aktivnost u odsustvu soli. Kada su u pitanju MgCl₂ i C₆H₅Na₃O₇, opin dehidrogenaza je zadržala 66% i 33% aktivnosti pri koncentraciji od 0,05 M, dok je pri višim koncentracijama (0,5 M) došlo skoro do potpunog gubitka enzimske aktivnosti. Inhibitorni efekat testiranih jona je već pokazan kod alanopin dehidrogenaze iz *Littorina littorea*.^[262]



Slika 46. Uticaj dodatka različitih jona u reakcionu smešu u opsegu koncentracija od 0,05-0,5 M na aktivnost opin dehidrogenaze. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

5.6.8. Uslovi za skladištenje enzima

Da bi se utvrdili optimalni uslovi za skladištenje enzim je inkubiran u prisustvu stabilizatora kao što su 10% i 50% glicerol, uz dodatak NaCl-a u niskim koncentracijama i 1 mM NADH. U svim navedenim uslovima enzim je zadržao minimum 90% početne aktivnosti tokom najmanje 3 nedelje, osim u slučaju u kom nije dodat stabilizator, gde je došlo do gubitka 30% aktivnosti već nakon 7 dana (slika 47). Najveću stabilnost enzim je pokazao u prisustvu 10% glicerola, koji je na osnovu dobijenih rezultata doveo do povećanja aktivnosti enzima tokom skladištenja. Dodatak soli u maloj koncentraciji i 1 mM NADH u rastvor enzima u 50% glicerolu nije značajno uticao na povećanje stabilnosti tokom skladištenja.



Slika 47. Uslovi za skladištenje enzima. Da bi se utvrdili optimalni uslovi za skladištenje, prečišćeni enzim je uskladišten pri različitim uslovima na -20 °C, a aktivnost je merena u intervalu od 7 dana. Svaki pojedinačni podatak predstavlja prosečnu vrednost tri nezavisna merenja sa standardnom devijacijom.

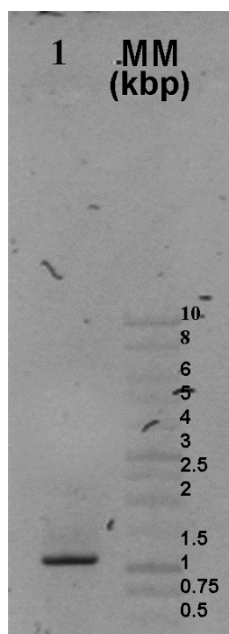
5.7. Razvoj fluorescentnog eseja za detekciju aktivnosti opin dehidrogenaze u mikrotitar ploči

5.7.1. Priprema nasumično mutiranih biblioteka gena opin dehidrogenaze

Enzimi izolovani iz prirodnih izvora često ne mogu direktno da se primenjuju u industrijskim uslovima već prvo moraju proći proces optimizacije u cilju poboljšanja osobina kao što su specifičnost, selektivnost, katalička efikasnost i stabilnost.^[83] Usmerena evolucija je široko prihvaćen pristup u oblasti proteinskog inženjeringa, koji podrazumeva ponavljajuće cikluse nasumične mutageneze i selekciju mutanata koji poseduju određenu osobinu. Na ovaj način se generišu varijante enzima sa poboljšanim karakteristikama. U poređenju sa racionalnim dizajnom nema potrebe za detaljnim poznavanjem odnosa strukture i funkcije, omogućava se relativno brza modifikacija enzima i sama tehnika podseća na proces prirodne evolucije.^[4, 84]

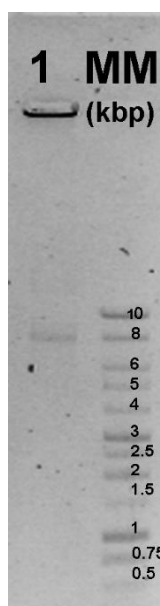
U cilju kreiranja nasumičnih mutanata gena opin dehidrogenaze upotrebljena je „*Mutazyme II*” DNK polimeraza pri čemu je pripremljena biblioteka sa srednjom stopom mutacija. Kao templat za umnožavanje gena i uvođenje mutacija korišćen je insert opin dehidrogenaze u pET22(b) vektoru (slika 48). Na elektroforegramu prikazanom na slici 48 može se uočiti jedna traka na molekulske

mase za nijansu više od 1 Kb, što odgovara molekulknoj masi gena za opin dehidrogenazu (1,1 Kb), na osnovu čega je zaključeno da je gen od interesa uspešno umnožen primenom pomenute polimeraze.



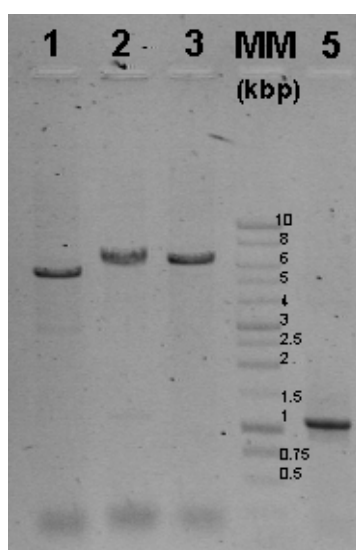
Slika 48. Agarozna DNK elektroforeza PCR-om umnoženog gena za opin dehidrogenazu upotrebom „*Mutazyme II*” DNK polimeraze.

Dobijeni PCR proizvod je tretiran *DpnI* enzimom sa ciljem uklanjanja celokupne templatne DNK, nakon čega je uzorak prečišćen i iskorišćen kao megaprajmer za umnožavanje celog plazmida upotrebom *Q5* polimeraze.^[272] Templat za megaprajmer PCR je bio plazmid koji sadrži gen za opin dehidrogenazu u pET22(b) vektoru (ODH-pET22(b)), čime je izbegnut korak ligacije. Dobijeni proizvod je tretiran *DpnI* enzimom i analiziran agaroznom DNK elektroforezom (slika 49).



Slika 49. Agarozna DNK elektroforeza proizvoda dobijenog nakon megaprajmer PCR-a konstrukta ODH-pET22(b) upotrebom *Q5* polimeraze.

Na slici 49 uočava se traka na molekulskoj masi nešto nižoj od 8 Kb, što je iznad mase koja odgovara konstrukt ODH-pET22(b) (6,6 Kb), ali je u saglasnosti sa literaturnim podacima za veličinu proizvoda koji se dobija nakon umnožavanja mega prajmer PCR-om. Umnoženi plazmidi su iskorišćeni za transformaciju ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10-Gold, nakon čega je deo transformisanih ćelija zasejan na LB ploče sa ampicilinom, a deo u tečni medijum. Posle 16 h inkubacije na 37 °C iz tečne kulture je izolovan pul plazmida pripremljene biblioteke. Izolovani plazmidi su restrikovani radi potvrđivanja korektne molekulske mase i postavljena je PCR reakcija da se potvrdi prisustvo gena za opin dehidrogenazu (slika 50). Sa slike 50 se uočava da se restrikcionim enzimima isečeni plazmidi nalaze na masi nešto iznad 6 Kb (uzorci 2 i 3) što odgovara masi gena insertovanog u vektor (6,6 Kb), dok se prazan restrikovani pET22(b) vektor (uzorak 1) koji je korišćen kao kontrola nalazi između markera mase 5 i 6 Kb parova (5,5 Kb). Takođe, u proizvodu dobijenom nakon PCR reakcije (uzorak 5) se uočava pojedinačna traka na masi iznad markera od 1 Kb para, što odgovara masi gena za opin dehidrogenazu (1,1 Kb).



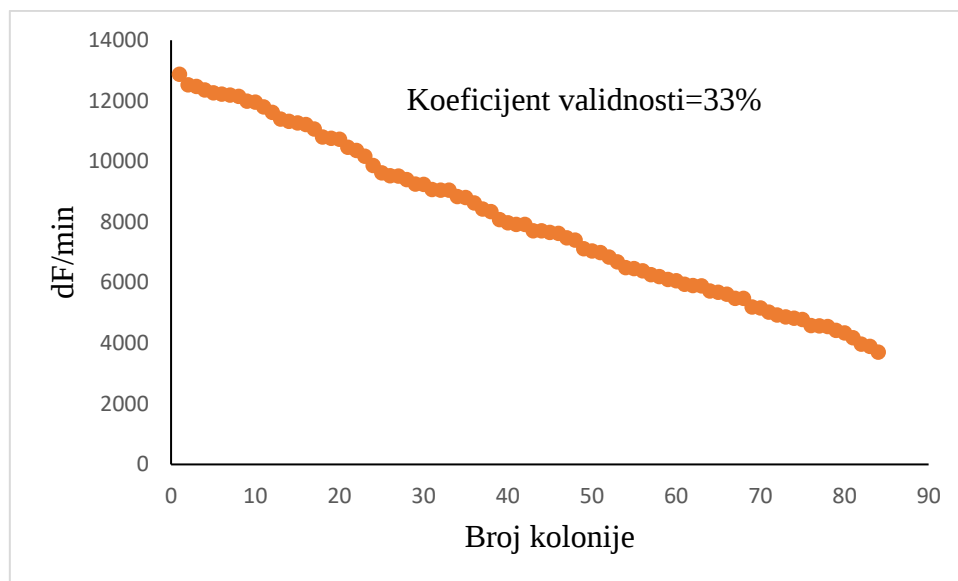
Slika 50. Agarozna DNK elektroforeza PCR proizvoda i restrikovanih plazmida izolovanih iz kolonija ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10-Gold transformisanih *error-prone* bibliotekom opin dehidrogenaze u pET22(b) vektoru.

5.7.2. Ekspresija prirodnog oblika i nasumičnih mutanata opin dehidrogenaze u mikrotitar ploči i detekcija enzimske aktivnosti promenom fluorescencije NADH

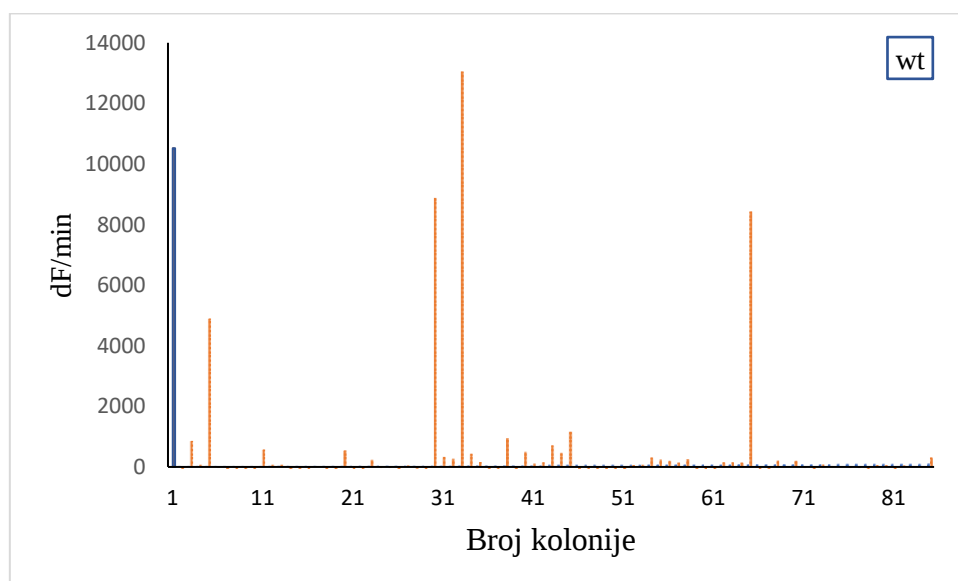
Biblioteka nasumičnih mutanata opin dehidrogenaze koja je kreirana sa ciljem da se proizvede forma enzima koja će imati povećanu aktivnost i/ili promenjenu specifičnost je nakon ekspresije pojedinačnih transformanata u mikrotitar ploči skenirana fluorescentnim esejem baziranim na smanjenju fluorescencije NADH. Finalni cilj je bio da se razvije pouzdan i reproducibilan fluorescentni test za visokoefikasnu pretragu mutiranih genskih varijanti opin-dehidrogenaze da bi se u budućnosti upotrebom metoda proteinskog inženjeringa mogla kreirati forma enzima koja će moći da se koristi u sintezi sekundarnih amina.

Osnovni kriterijumi prilikom razvoja sistema za visokoefikasnu pretragu biblioteke mutanata gena jesu niska standardna devijacija, visoka osetljivost, reproduktivnost, jednostavnost i odsustvo uticaja komponenti reakcione smeše na enzimsku aktivnost.^[228] Da bi se odredio koeficijent validnosti fluorescentnog testa prvo su u mikrotitar ploči odgajene kolonije divljeg tipa enzima i nakon liziranja ćelija je određena enzimska aktivnost i standardna devijacija (slika 51). Nakon određivanja

koeficijenta validnosti fluorescentnog esejja izmerena je aktivnost mutanata u okviru kreirane *error-prone* biblioteke u odnosu na aktivnost divljeg tipa enzima (slika 52).



Slika 51. Enzimska aktivnost (promena fluorescencije po minuti [dF/min]) 84 klona divljeg tipa opin dehidrogenaze predstavljena opadajućim redosledom.



Slika 52. Analiza aktivnosti (dF/min) divljeg tipa opin dehidrogenaze i mutanata u okviru *error-prone* biblioteke.

Nakon inicijalnog skeniranja kreirane biblioteke razvijenim fluorescentnim testom detektovano je nekoliko potencijalnih transformanata opin dehidrogenaze, od kojih jedan pokazuje povećanu aktivnost u odnosu na divlji tip enzima, dok su ostali pokazali manju aktivnost od divljeg tipa, ali je moguće da je kod ovih transformanata došlo do promene supstrate specifičnosti (slika 52). S obzirom na to da su sva merenja rađena jednom, potrebno je ponoviti skeniranje biblioteke kao i ploče sa divljim tipom enzima minimum tri puta, da bi se potvrdili dobijeni rezultati, i nakon toga izolovali, sekvencirali i okarakterisali detektovani transformanti.

6. Zaključci

- Omega-transaminaze ArRMut11 i Cv-2025 uspešno su proizvedene u *E. coli* BL21 (DE3) pLySs soju i određena je njihova aktivnost, kao i specifičnost ω -transaminaze ArRMut11 ka različitim steroidnim supstratima. Primećeno je da je najveći stepen konverzije u slučaju jedinjenja koja poseduju keto grupu u položaju 3, kao što su dihidrotestosteron, androstendion, 3-oksoholna kiselina i 3,7,12-trioksoholna kiselina. U cilju optimizacije sintetičke procedure na velikoj skali izabran je dihidrotestosteron. Proizvod reakcije transaminacije 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ol dobijen je u vidu belog praha u prinosu od 50% i okarakterisan je spektroskopski, čime je potvrđeno da uvedena NH₂ grupa u položaju 3 poseduje *R*-stereochemiju.
- ArRMut11 je imobilizovana na makroporoznom metakrilatnom polimeru, pri čemu je na ovaj način pripremljen enzimski preparat pokazao aktivnost od 1,84 U/g suvog polimera. Imobilizovani enzim je pokazao veću stabilnost nakon 24-časovne inkubacije u organskom rastvaraču (35% DMF) u odnosu na rastvornu formu, odnosno imobilizovani preparat je zadržao 100% početne aktivnosti, dok je rastvorni enzim zadržao 35% početne aktivnosti. Povećana stabilnost imobilizovanog enzima pokazana je i nakon dvočasovne inkubacije u 35% DMF-u na 70 °C, pri čemu je njegova aktivnost pala na 75% početne aktivnosti, dok je rastvorni enzim zadržao samo 19% početne aktivnosti pri primenjenim uslovima. Usled formiranja višestrukih kovalentnih veza između enzima i nosača došlo je do povećanja temperaturne stabilnosti i stabilnosti u organskom rastvaraču, čime je dobijen dodatno stabilizovan biokatalizator sa potencijalom za primenu u konverziji velikih supstrata na industrijskom nivou.
- Imobilizovana ArRMut11 pokazala je visok kapacitet mogućnosti za višestruku upotrebu zadržavajući 85% početne aktivnosti nakon deset uzastopnih ciklusa sinteze 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ola.
- Gen za ω -transaminazu ArRMut11 uspešno je ukloniran u pCTcon2 vektor, međutim nakon ekspresije na površini ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 nije detektovana enzimska aktivnost.
- Da bi se povećala aktivnost enzima ka dihidrotestosteronu i prinos konverzije konstruisani su mesto-specifični mutanti ω -transaminaze ArRMut11. Odabir pozicija vršen je pomoću ISM metode (metodologija informacionog spektra). Analizom rezultata sekvenciranja potvrđeno je da su na sve tri odabrane pozicije uspešno uvedene mutacije. Osnovni tip ArRMut11 i kreirani mutanti proizvedeni su u različitim sojevima *E. coli* pri čemu je pokazano da se samo osnovna varijanta enzima produkuje u rastvornoj frakciji dok se mutirane enzimске varijante talože u vidu inkuluzionih tela. Uvođenje dodatnih mutacija u protein koji se već dosta razlikuje od osnovne varijante poreklom iz *Arthrobacter* sp. (ArRMut11 sadrži 27 mutacija uvedenih metodama dirigovane evolucije i racionalnog dizajna) dovelo je do smanjenja rastvorljivosti sintetisanih proteina. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da upotrebljeni algoritam nije mogao da predvidi način uvijanja proteina.
- Omega-transaminaza poreklom iz *Chromobacterium violaceum* nije pokazala aktivnost kao katalizator za sintezu amino derivata steroida.

- Dokazana je aktivnost pretpostavljene opin dehidrogenaze poreklom iz halofilnog organizma *Desulfohalobium retbaense*. Enzim koji je identifikovan iz metagenomske biblioteke na osnovu poređenja sekvence sa poznatim proteinima je uspešno proizveden u *E. coli* i okarakterisan. Određivanjem supstratne specifičnosti pokazano je da se radi o alanin opin dehidrogenazi, enzimu koji preferencijalno koristi L-alanin i piruvat kao supstrate. Pored L-alanina, enzim je pokazao afinitet i prema L-valinu, L-serinu i L-cisteinu, a kada se radi o α -keto kiselinama osim piruvata pokazana je aktivnost i sa oksaloacetatom i gliksilatom u malom procentu. Dobijeni rezultati idu u prilog tome da se opin dehidrogenaza može koristiti u sintezi sekundarnih hiralnih amina koji predstavljaju prekursore mnogih farmaceutski aktivnih jedinjenja.
- Opin dehidrogenaza je pokazala značajnu stabilnost u širokom opsegu eksperimentalnih uslova što je čini dobrim kandidatom za primenu u industrijskim uslovima i to:
 - Optimalna aktivnost na pH 6,5 u odsustvu soli;
 - Enzim je zadržao 80% početne aktivnosti nakon jednočasovne inkubacije na 45 °C;
 - Nakon 24 časa inkubacije u 30% dimetil sulfoksidu enzim je zadržao 65% početne aktivnosti;
 - Širok opseg pH stabilnosti, od pH 6,0 do pH 11,0, tokom 30 minuta inkubacije;
 - Stabilnost u prisustvu NaCl do 3,0 M tokom 24 časa inkubacije;
- Uspešno je konstruisana biblioteka nasumičnih mutanata opin dehidrogenaze, koja je skenirana razvijenim fluorescentnim esejem. Na osnovu preliminarnih rezultata zaključeno je da se razvijeni fluorescentni test može koristiti za skring biblioteka mutanata opin dehidrogenaze uz dodatnu optimizaciju. Prilikom pretrage biblioteke gena pronađeno je nekoliko transformanata sa povećanom aktivnošću ili promenjenom specifičnošću opin-dehidrogenaze.

7. Literatura

- [1] J. Chapman, A.E. Ismail, C.Z. Dinu, Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks, *Catalysts* 8(6) (2018) 238.
- [2] Z. Zhao, M.-C. Zhou, R.-L. Liu, Recent Developments in Carriers and Non-Aqueous Solvents for Enzyme Immobilization, *Catalysts* 9(8) (2019) 647.
- [3] M.E. Guazzaroni, A. Beloqui, J.M. Vieites, Y. Al-ramahi, N.L. Cortés, A. Ghazi, P.N. Golyshin, M. Ferrer, Metagenomic Mining of Enzyme Diversity, in: K.N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010, pp. 2911-2927.
- [4] S. Kim, S. Ga, H. Bae, R. Sluyter, K. Konstantinov, L.K. Shrestha, Y.H. Kim, J.H. Kim, K. Ariga, Multidisciplinary approaches for enzyme biocatalysis in pharmaceuticals: protein engineering, computational biology, and nanoarchitectonics, *EES Catalysis* 2(1) (2024) 14-48.
- [5] R.N. Patel, Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26(7) (2018) 1252-1274.
- [6] G.L. Rosano, E.A. Ceccarelli, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges, *Frontiers in Microbiology* 5 (2014).
- [7] A.L. Demain, P. Vaishnav, Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnology Advances* 27(3) (2009) 297-306.
- [8] N. Hoang Hiep, K. and Moonil, An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization, *Applied Science and Convergence Technology* 26(6) (2017) 157-163.
- [9] C. Silva, M. Martins, S. Jing, J. Fu, A. Cavaco-Paulo, Practical insights on enzyme stabilization, *Critical Reviews in Biotechnology* 38(3) (2018) 335-350.
- [10] I. Slabu, J.L. Galman, R.C. Lloyd, N.J. Turner, Discovery, Engineering, and Synthetic Application of Transaminase Biocatalysts, *ACS Catalysis* 7(12) (2017) 8263-8284.
- [11] W. Böhmer, T. Knaus, A. Volkov, T.K. Slot, N.R. Shiju, K. Engelmark Cassimjee, F.G. Mutti, Highly efficient production of chiral amines in batch and continuous flow by immobilized ω -transaminases on controlled porosity glass metal-ion affinity carrier, *Journal of Biotechnology* 291 (2019) 52-60.
- [12] T. Heinks, L.M. Merz, J. Liedtke, M. Höhne, L.M. van Langen, U.T. Bornscheuer, G. Fischer von Mollard, P. Berglund, Biosynthesis of Furfurylamines in Batch and Continuous Flow by Immobilized Amine Transaminases, *Catalysts* 13(5) (2023) 875.
- [13] N.M. Mesbah, Industrial Biotechnology Based on Enzymes From Extreme Environments, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10 (2022).
- [14] M.N. de Guzmán, V.A. Vargas, H. Antezana, M. Svoboda, Lipolytic enzyme production by halophilic/halotolerant microorganisms isolated from Laguna Verde, Bolivia, *Revista Boliviana de Química* 25(1) (2008) 14-23.
- [15] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A.J. Poulouse, G. Bohlmann, Industrial use of immobilized enzymes, *Chemical Society Reviews* 42(15) (2013) 6437-6474.
- [16] S. Parekh, V.A. Vinci, R.J. Strobel, Improvement of microbial strains and fermentation processes, *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(3) (2000) 287-301.
- [17] R. Singh, M. Kumar, A. Mittal, P.K. Mehta, Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, *3 Biotech* 6(2) (2016) 174.
- [18] S. Prasad, I. Roy, Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance, Recent patents on biotechnology 12(1) (2018) 33-56.
- [19] M. Höhne, U.T. Bornscheuer, Biocatalytic Routes to Optically Active Amines, *ChemCatChem* 1(1) (2009) 42-51.
- [20] E. Vitaku, D.T. Smith, J.T. Njardarson, Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals, *Journal of Medicinal Chemistry* 57(24) (2014) 10257-10274.
- [21] S.A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C.C.R. Allen, T.S. Moody, B.F. Gilmore, Application of ω -Transaminases in the Pharmaceutical Industry, *Chemical Reviews* 118(1) (2018) 349-367.
- [22] W. Zawodny, S.L. Montgomery, Evolving New Chemistry: Biocatalysis for the Synthesis of Amine-Containing Pharmaceuticals, *Catalysts* 12(6) (2022) 595.

- [23] L. Leipold, D. Dobrijevic, J.W.E. Jeffries, M. Bawn, T.S. Moody, J.M. Ward, H.C. Hailes, The identification and use of robust transaminases from a domestic drain metagenome, *Green Chemistry* 21(1) (2019) 75-86.
- [24] W. Kroutil, E.-M. Fischereder, C.S. Fuchs, H. Lechner, F.G. Mutti, D. Pressnitz, A. Rajagopalan, J.H. Sattler, R.C. Simon, E. Siirola, Asymmetric Preparation of prim-, sec-, and tert-Amines Employing Selected Biocatalysts, *Organic Process Research & Development* 17(5) (2013) 751-759.
- [25] G.A. Behrens, A. Hummel, S.K. Padhi, S. Schätzle, U.T. Bornscheuer, Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis, *Advanced Synthesis & Catalysis* 353(13) (2011) 2191-2215.
- [26] C.K. Savile, J.M. Janey, E.C. Mundorff, J.C. Moore, S. Tam, W.R. Jarvis, J.C. Colbeck, A. Krebber, F.J. Fleitz, J. Brands, P.N. Devine, G.W. Huisman, G.J. Hughes, Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture, *Science* 329(5989) (2010) 305-309.
- [27] T. Sehl, H.C. Hailes, J.M. Ward, R. Wardenga, E. von Lieres, H. Offermann, R. Westphal, M. Pohl, D. Rother, Two Steps in One Pot: Enzyme Cascade for the Synthesis of Nor(pseudo)ephedrine from Inexpensive Starting Materials, *Angewandte Chemie International Edition* 52(26) (2013) 6772-6775.
- [28] S. Wu, R. Snajdrova, J.C. Moore, K. Baldenius, U.T. Bornscheuer, Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications, *Angewandte Chemie International Edition* 60(1) (2021) 88-119.
- [29] S. Vázquez-Dorado, A. Sanjuan, A.S. Comesaña, A. de Carlos, Identification of octopine dehydrogenase from *Mytilus galloprovincialis*, *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 160(2-3) (2011) 94-103.
- [30] S.H. Smits, A. Mueller, L. Schmitt, M.K. Grieshaber, A structural basis for substrate selectivity and stereoselectivity in octopine dehydrogenase from *Pecten maximus*, *Journal of molecular biology* 381(1) (2008) 200-11.
- [31] M. Sharma, J. Mangas-Sanchez, N.J. Turner, G. Grogan, NAD(P)H-Dependent Dehydrogenases for the Asymmetric Reductive Amination of Ketones: Structure, Mechanism, Evolution and Application, *Advanced Synthesis & Catalysis* 359(12) (2017) 2011-2025.
- [32] A. Telek, Z. Molnár, B.G. Vértessy, G. Tasnádi, Opine dehydrogenases, an underexplored enzyme family for the enzymatic synthesis of chiral amines, *Chemistry* 120(10) (2023) 2793-2808.
- [33] L. Ducrot, M. Bennett, G. Grogan, C. Vergne-Vaxelaire, NAD(P)H-Dependent Enzymes for Reductive Amination: Active Site Description and Carbonyl-Containing Compound Spectrum, *Advanced Synthesis & Catalysis* 363(2) (2021) 328-351.
- [34] C. Haibin, S. J. Collier, J. Nazor, J. Sukumaran, D. Smith, J. C. Moore, G. Hughes, J. Janey, G. Huisman, S. Novick, N. Agard, O. Alvizo, G. Cope, W. L. YEO, S. NG (Codexis), US patent 13, 890, 944, 2013.
- [35] N. Richter, R.C. Simon, W. Kroutil, J.M. Ward, H.C. Hailes, Synthesis of pharmaceutically relevant 17- α -amino steroids using an ω -transaminase, *Chemical Communications* 50(46) (2014) 6098-6100.
- [36] J.A.R. Salvador, J.F.S. Carvalho, M.A.C. Neves, S.M. Silvestre, A.J. Leitão, M.M.C. Silva, M.L. Sá e Melo, Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds, *Natural Product Reports* 30(2) (2013) 324-374.
- [37] M. Mokotoff, M. Zhao, R.J. Marshall, E. Winslow, L.K. Wong, Q.-J. Liao, Peptidyl aminosteroids as potential new antiarrhythmic agents, *Steroids* 55(9) (1990) 399-404.
- [38] M. Merlani, L. Amiranashvili, E. Kemertelidze, K. Mulkijanyan, Synthesis and antimycobacterial activity of some steroidal derivatives of tigogenin, *Chemistry of Natural Compounds* 45 (2009) 389-392.
- [39] R. Krieg, E. Jortzik, A.-A. Goetz, S. Blandin, S. Wittlin, M. Elhabiri, M. Rahbari, S. Nuryyeva, K. Voigt, H.-M. Dahse, A. Brakhage, S. Beckmann, T. Quack, C.G. Grevelding, A.B. Pinkerton, B. Schönecker, J. Burrows, E. Davioud-Charvet, S. Rahlfs, K. Becker, Arylmethylamino steroids as antiparasitic agents, *Nature Communications* 8(1) (2017) 14478.
- [40] Z. Song, Q. Zhang, W. Wu, Z. Pu, H. Yu, Rational design of enzyme activity and enantioselectivity, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 11 (2023).
- [41] M.E. Hassan, Q. Yang, Z. Xiao, L. Liu, N. Wang, X. Cui, L. Yang, Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications, *3 Biotech* 9(12) (2019) 440.
- [42] S. Simić, E. Zukić, L. Schmermund, K. Faber, C.K. Winkler, W. Kroutil, Shortening Synthetic Routes to Small Molecule Active Pharmaceutical Ingredients Employing Biocatalytic Methods, *Chemical Reviews* 122(1) (2022) 1052-1126.
- [43] S. Jemli, D. Ayadi-Zouari, H.B. Hlima, S. Bejar, Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes, *Critical Reviews in Biotechnology* 36(2) (2016) 246-258.

- [44] N. Mokashe, B. Chaudhari, U. Patil, Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector, *International Journal of Biological Macromolecules* 117 (2018) 493-522.
- [45] V. Stepankova, S. Bidmanova, T. Koudelakova, Z. Prokop, R. Chaloupkova, J. Damborsky, Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents, *ACS Catalysis* 3(12) (2013) 2823-2836.
- [46] D. Kelly, eacute, C. David Camacho, oacute, rdova, A.-E. Marcia, oacute, Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications, *J. Microbiol. Biotechnol.* 27(4) (2017) 649-659.
- [47] M. Khan, K. Jithesh, R. Mookambikay, Cloning and characterization of two functionally diverse lipases from soil metagenome, *The Journal of General and Applied Microbiology* 59(1) (2013) 21-31.
- [48] X. Chu, H. He, C. Guo, B. Sun, Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea, *Applied Microbiology and Biotechnology* 80(4) (2008) 615-625.
- [49] A. Chien, D.B. Edgar, J.M. Trela, Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*, *Journal of Bacteriology* 127(3) (1976) 1550-1557.
- [50] K.S. Lundberg, D.D. Shoemaker, M.W.W. Adams, J.M. Short, J.A. Sorge, E.J. Mathur, High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*, *Gene* 108(1) (1991) 1-6.
- [51] F. Sarmiento, R. Peralta, J.M. Blamey, Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3 (2015).
- [52] A.L. Huston, Biotechnological Aspects of Cold-Adapted Enzymes, in: R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, C. Gerday (Eds.), *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 347-363.
- [53] C. Ortiz, M.L. Ferreira, O. Barbosa, J.C.S. dos Santos, R.C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, L.E. Briand, R. Fernandez-Lafuente, Novozym 435: the "perfect" lipase immobilized biocatalyst?, *Catalysis Science & Technology* 9(10) (2019) 2380-2420.
- [54] M. Mangiagalli, S. Brocca, M. Orlando, M. Lotti, The "cold revolution". Present and future applications of cold-active enzymes and ice-binding proteins, *New biotechnology* 55 (2020) 5-11.
- [55] P. Izadi, J.-M. Fontmorin, L.F.L. Fernández, S. Cheng, I. Head, E.H. Yu, High Performing Gas Diffusion Biocathode for Microbial Fuel Cells Using Acidophilic Iron Oxidizing Bacteria, *Frontiers in Energy Research* 7 (2019).
- [56] S.J. Ferguson, W.J. Ingledew, Energetic problems faced by micro-organisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a paradigm, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777(12) (2008) 1471-1479.
- [57] Wanyonyi, W. C., Onyari, J. M., Shiundu, P. M., and Mulaa, F. J. (2016). New Eco-Friendly and Clean Method of Processing Hides and Fish Skins into Leather Using Alkaline Protease Enzyme. Patent, (KE/P/2015/2231).
- [58] S. Gupta, P. Sharma, K. Dev, A. Sourirajan, Halophilic Bacteria of Lunsu Produce an Array of Industrially Important Enzymes with Salt Tolerant Activity, *Biochemistry Research International* 2016(1) (2016) 9237418.
- [59] J. Qiu, R. Han, C. Wang, Microbial halophilic lipases: A review, *Journal of Basic Microbiology* 61(7) (2021) 594-602.
- [60] S. DasSarma, P. DasSarma, Halophiles and their enzymes: negativity put to good use, *Current opinion in microbiology* 25 (2015) 120-6.
- [61] B. Dutta, R. Bandopadhyay, Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 11(1) (2022) 75.
- [62] S. Patel, M. Saraf, Perspectives and Application of Halophilic Enzymes, in: D.K. Maheshwari, M. Saraf (Eds.), *Halophiles: Biodiversity and Sustainable Exploitation*, Springer International Publishing, Cham, 2015, pp. 403-419.
- [63] A. Oren, Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms, *Environmental Technology* 31(8-9) (2010) 825-834.
- [64] M. Kamekura, T. Hamakawa, H. Onishi, Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP, *Applied and environmental microbiology* 44(4) (1982) 994-5.
- [65] D. Pérez, S. Martín, G. Fernández-Lorente, M. Filice, J.M. Guisán, A. Ventosa, M.T. García, E. Mellado, A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA), *PloS one* 6(8) (2011) e23325.
- [66] A. Salihu, M.Z. Alam, Solvent tolerant lipases: A review, *Process Biochemistry* 50(1) (2015) 86-96.

- [67] X. Li, H.-Y. Yu, Halostable cellulase with organic solvent tolerance from *Haloarcula* sp. LLSG7 and its application in bioethanol fermentation using agricultural wastes, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 40(12) (2013) 1357-1365.
- [68] H.-Y. Yu, X. Li, Characterization of an organic solvent-tolerant thermostable glucoamylase from a halophilic isolate, *alolactibacillus* sp. SK71 and its application in raw starch hydrolysis for bioethanol production, *Biotechnology Progress* 30(6) (2014) 1262-1268.
- [69] X. Li, H.-Y. Yu, Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production, *Folia Microbiologica* 59(6) (2014) 455-463.
- [70] Y.R. Maghraby, R.M. El-Shabasy, A.H. Ibrahim, H.M.E.-S. Azzazy, Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications, *ACS Omega* 8(6) (2023) 5184-5196.
- [71] R.K. Singh, M.K. Tiwari, R. Singh, J.-K. Lee, From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes, *International Journal of Molecular Sciences* 14(1) (2013) 1232-1277.
- [72] P. De Santis, L.-E. Meyer, S. Kara, The rise of continuous flow biocatalysis – fundamentals, very recent developments and future perspectives, *Reaction Chemistry & Engineering* 5(12) (2020) 2155-2184.
- [73] J. Britton, S. Majumdar, G.A. Weiss, Continuous flow biocatalysis, *Chemical Society Reviews* 47(15) (2018) 5891-5918.
- [74] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech* 3(1) (2013) 1-9.
- [75] Paulus, W.; Hauer, B.; Haring, D.; Dietsche, F. U.S. Patent 20060030013, 2006. .
- [76] Allen, D. R.; Mozhaev, V. V.; Valivety, R. H. U.S. Patent 7,067,291, 2006. .
- [77] A. Kumari, B. Kaur, R. Srivastava, R.S. Sangwan, Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties, *Biochemistry and Biophysics Reports* 2 (2015) 108-114.
- [78] I. Benucci, M.C. Caso, T. Bavaro, S. Masci, M. Keršienė, M. Esti, Prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* immobilized on a food-grade carrier for the production of gluten-reduced beer, *Food Control* 110 (2020) 106987.
- [79] J.C. Soares, P.R. Moreira, A.C. Queiroga, J. Morgado, F.X. Malcata, M.E. Pintado, Application of immobilized enzyme technologies for the textile industry: a review, *Biocatalysis and Biotransformation* 29(6) (2011) 223-237.
- [80] A. Vasconcelos, C.J.S.M. Silva, M. Schroeder, G.M. Guebitz, A. Cavaco-Paulo, Detergent Formulations for Wool Domestic Washings Containing Immobilized Enzymes, *Biotechnology Letters* 28(10) (2006) 725-731.
- [81] M. Mohammadi, R. Rezaei Mokarram, M. Ghorbani, H. Hamishehkar, Inulinase immobilized gold-magnetic nanoparticles as a magnetically recyclable biocatalyst for facial and efficient inulin biotransformation to high fructose syrup, *International Journal of Biological Macromolecules* 123 (2018).
- [82] G. Ren, X. Xu, Q. Liu, J. Cheng, X. Yuan, L. Wu, Y. Wan, Electrospun poly(vinyl alcohol)/glucose oxidase biocomposite membranes for biosensor applications, *Reactive and Functional Polymers* 66(12) (2006) 1559-1564.
- [83] E.L. Bell, W. Finnigan, S.P. France, A.P. Green, M.A. Hayes, L.J. Hepworth, S.L. Lovelock, H. Niikura, S. Osuna, E. Romero, K.S. Ryan, N.J. Turner, S.L. Flitsch, *Biocatalysis*, *Nature Reviews Methods Primers* 1(1) (2021) 46.
- [84] A. Madhavan, K.B. Arun, P. Binod, R. Sirohi, A. Tarafdar, R. Reshmy, M. Kumar Awasthi, R. Sindhu, Design of novel enzyme biocatalysts for industrial bioprocess: Harnessing the power of protein engineering, high throughput screening and synthetic biology, *Bioresource Technology* 325 (2021) 124617.
- [85] O. May, P.T. Nguyen, F.H. Arnold, Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of l-methionine, *Nature Biotechnology* 18(3) (2000) 317-320.
- [86] S.-H. Lee, Y.-W. Kim, S. Lee, J.-H. Auh, S.-S. Yoo, T.-J. Kim, J.-W. Kim, S.-T. Kim, H.-J. Rho, J.-H. Choi, Y.-B. Kim, K.-H. Park, Modulation of Cyclizing Activity and Thermostability of Cyclodextrin Glucanotransferase and Its Application as an Antistaling Enzyme, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6) (2002) 1411-1415.
- [87] D. Sriprapundh, C. Vieille, J.G. Zeikus, Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH, *Protein Engineering, Design and Selection* 16(9) (2003) 683-690.

- [88] S. Tobe, H. Shimogaki, M. Ohdera, Y. Asai, K. Oba, M. Iwama, M. Irie, Expression of Bacillus Protease (Protease BYA) from Bacillus sp. Y in Bacillus subtilis and Enhancement of Its Specific Activity by Site-Directed Mutagenesis;Improvement in Productivity of Detergent Enzyme, Biological and Pharmaceutical Bulletin 29(1) (2006) 26-33.
- [89] A. Madhavan, R. Sindhu, B. Parameswaran, R.K. Sukumaran, A. Pandey, Metagenome Analysis: a Powerful Tool for Enzyme Bioprospecting, Applied Biochemistry and Biotechnology 183(2) (2017) 636-651.
- [90] S. Li, X. Yang, S. Yang, M. Zhu, X. Wang, TECHNOLOGY PROSPECTING ON ENZYMES: APPLICATION, MARKETING AND ENGINEERING, Computational and Structural Biotechnology Journal 2(3) (2012).
- [91] M.N. Xing, X.Z. Zhang, H. Huang, Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis, Biotechnol Adv 30(4) (2012) 920-9.
- [92] T. Patel, H.G. Chaudhari, V. Prajapati, S. Patel, V. Mehta, N. Soni, A brief account on enzyme mining using metagenomic approach, Frontiers in Systems Biology 2 (2022).
- [93] S.L. Robinson, J. Piel, S. Sunagawa, A roadmap for metagenomic enzyme discovery, Natural Product Reports 38(11) (2021) 1994-2023.
- [94] D. Mattanovich, P. Branduardi, L. Dato, B. Gasser, M. Sauer, D. Porro, Recombinant Protein Production in Yeasts, in: A. Lorence (Ed.), Recombinant Gene Expression, Humana Press, Totowa, NJ, 2012, pp. 329-358.
- [95] N. Zhang, Z. An, Heterologous Protein Expression in Yeasts and Filamentous Fungi, Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2010, pp. 145-156.
- [96] M.R. Mallu, S.R. Golamari, S.R.C.K. Kotikalapudi, R. Vemparala, Overview of Bacterial and Yeast Systems for Protein Expression, Journal of Pharmaceutical Research International 33(32A) (2021) 113-118.
- [97] A. Gomes, S. Byregowda, V. B M, B. Vinayagamurthy, An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins, Advances in Animal and Veterinary Sciences 4 (2016) 346-356.
- [98] N.A. Baeshen, M.N. Baeshen, A. Sheikh, R.S. Bora, M.M.M. Ahmed, H.A.I. Ramadan, K.S. Saini, E.M. Redwan, Cell factories for insulin production, Microbial Cell Factories 13(1) (2014) 141.
- [99] S. Khan, M.W. Ullah, R. Siddique, G. Nabi, S. Manan, M. Yousaf, H. Hou, Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life, International Journal of Genomics 2016(1) (2016) 2405954.
- [100] A. Stryjewska, K. Kiepusa, T. Librowski, S. Lochyński, Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins, Pharmacological Reports 65(5) (2013) 1075-1085.
- [101] M. Pouresmaeil, S. Azizi-Dargahlou, Factors involved in heterologous expression of proteins in E. coli host, Archives of Microbiology 205(5) (2023) 212.
- [102] J. Kaur, A. Kumar, J. Kaur, Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements, International Journal of Biological Macromolecules 106 (2018) 803-822.
- [103] B. Jia, C.O. Jeon, High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives, 6(8) (2016).
- [104] J. Yin, G. Li, X. Ren, G. Herrler, Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes, J Biotechnol 127(3) (2007) 335-47.
- [105] L.G. Popova, D.E. Khramov, O.I. Nedelyaeva, V.S. Volkov, Yeast Heterologous Expression Systems for the Study of Plant Membrane Proteins, International Journal of Molecular Sciences 24(13) (2023) 10768.
- [106] A.M. Vieira Gomes, T. Souza Carmo, L. Silva Carvalho, F. Mendonça Bahia, N.S. Parachin, Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production, Microorganisms 6(2) (2018) 38.
- [107] M.W. Traxlmayr, C. Obinger, Directed evolution of proteins for increased stability and expression using yeast display, Archives of Biochemistry and Biophysics 526(2) (2012) 174-180.
- [108] J. Lopez-Morales, R. Vanella, G. Kovacevic, M.S. Santos, M.A. Nash, Titrating Avidity of Yeast-Displayed Proteins Using a Transcriptional Regulator, ACS Synthetic Biology 12(2) (2023) 419-431.
- [109] A. Angelini, T.F. Chen, S. de Picciotto, N.J. Yang, A. Tzeng, M.S. Santos, J.A. Van Deventer, M.W. Traxlmayr, K.D. Wittrup, Protein Engineering and Selection Using Yeast Surface Display, in: B. Liu (Ed.), Yeast Surface Display: Methods, Protocols, and Applications, Springer New York, New York, NY, 2015, pp. 3-36.
- [110] G.M. Cherf, J.R. Cochran, Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 1319 (2015) 155-75.

- [111] K.V. Teymennet-Ramírez, F. Martínez-Morales, M.R. Trejo-Hernández, Yeast Surface Display System: Strategies for Improvement and Biotechnological Applications, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9 (2022).
- [112] E.T. Boder, K.D. Wittrup, Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, *Methods in enzymology* 328 (2000) 430-44.
- [113] D. Ghislieri, N.J. Turner, Biocatalytic Approaches to the Synthesis of Enantiomerically Pure Chiral Amines, *Topics in Catalysis* 57(5) (2014) 284-300.
- [114] J.H. Schrittwieser, S. Velikogne, W. Kroutil, Biocatalytic Imine Reduction and Reductive Amination of Ketones, *Advanced Synthesis & Catalysis* 357(8) (2015) 1655-1685.
- [115] J. Barrios-Rivera, Y. Xu, M. Wills, V.K. Vyas, A diversity of recently reported methodology for asymmetric imine reduction, *Organic Chemistry Frontiers* 7(20) (2020) 3312-3342.
- [116] S.K. Au, J. Groover, B.D. Feske, A.S. Bommarius, Chapter 7 - Organic Synthesis with Amino Acid Dehydrogenases, Transaminases, Amine Oxidases, and Amine Dehydrogenases, in: A. Goswami, J.D. Stewart (Eds.), *Organic Synthesis Using Biocatalysis*, Academic Press 2016, pp. 187-212.
- [117] F. Parmeggiani, S.L. Lovelock, N.J. Weise, S.T. Ahmed, N.J. Turner, Synthesis of D- and L-Phenylalanine Derivatives by Phenylalanine Ammonia Lyases: A Multienzymatic Cascade Process, *Angewandte Chemie International Edition* 54(15) (2015) 4608-4611.
- [118] F. Balkenhohl, B. Hauer, W. Ladner, U. Pressler, C. Nibling, (BASF AG), European Patent EP0720655(B1), 1999
- [119] G.-H. Kim, H. Jeon, T.P. Khobragade, M.D. Patil, S. Sung, S. Yoon, Y. Won, I.S. Choi, H. Yun, Enzymatic synthesis of sitagliptin intermediate using a novel ω -transaminase, *Enzyme and Microbial Technology* 120 (2019) 52-60.
- [120] F.-Y. Zhu, M.-Y. Huang, K. Zheng, X.-J. Zhang, X. Cai, L.-G. Huang, Z.-Q. Liu, Y.-G. Zheng, Designing a novel (R)- ω -transaminase for asymmetric synthesis of sitagliptin intermediate via motif swapping and semi-rational design, *International Journal of Biological Macromolecules* 253 (2023) 127348.
- [121] T.P. Khobragade, S. Sarak, A.D. Pagar, H. Jeon, P. Giri, H. Yun, Synthesis of Sitagliptin Intermediate by a Multi-Enzymatic Cascade System Using Lipase and Transaminase With Benzylamine as an Amino Donor, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9 (2021).
- [122] J. Limanto, E.R. Ashley, J. Yin, G.L. Beutner, B.T. Grau, A.M. Kassim, M.M. Kim, A. Klapars, Z. Liu, H.R. Strotman, M.D. Truppo, A Highly Efficient Asymmetric Synthesis of Vernakalant, *Organic Letters* 16(10) (2014) 2716-2719.
- [123] D. Ghislieri, A.P. Green, M. Pontini, S.C. Willies, I. Rowles, A. Frank, G. Grogan, N.J. Turner, Engineering an Enantioselective Amine Oxidase for the Synthesis of Pharmaceutical Building Blocks and Alkaloid Natural Products, *Journal of the American Chemical Society* 135(29) (2013) 10863-10869.
- [124] H. Kohls, F. Steffen-Munsberg, M. Höhne, Recent achievements in developing the biocatalytic toolbox for chiral amine synthesis, *Current Opinion in Chemical Biology* 19 (2014) 180-192.
- [125] B. Mijts, S. Muley, J. Liang, L. M. Newman, X. Zhang, J. LaLonde, M. D. Clay, J. Zhu, J. M. Gruber, J. Colbeck, J. D. Munger, Jr., J. Mavinhalli, R. Sheldon, (Codexis, Inc.), WO2010008828, 2010.
- [126] T. Li, J. Liang, A. Ambrogelly, T. Brennan, G. Gloor, G. Huisman, J. Lalonde, A. Lekhal, B. Mijts, S. Muley, L. Newman, M. Tobin, G. Wong, A. Zaks, X. Zhang, Efficient, Chemoenzymatic Process for Manufacture of the Boceprevir Bicyclic [3.1.0]Proline Intermediate Based on Amine Oxidase-Catalyzed Desymmetrization, *Journal of the American Chemical Society* 134(14) (2012) 6467-6472.
- [127] Imine Reductase Mediated Synthesis of (S,S)-Sertraline. IP.com. *Prior Art Database*, Vol. 12B, Dec 11, 2017; pages 1–3. IP.com Disclosure Number IPCOM000251929. <https://priorart.ip.com/IPCOM/000251929>.
- [128] M. Schober, C. MacDermaid, A.A. Ollis, S. Chang, D. Khan, J. Hosford, J. Latham, L.A.F. Ihnken, M.J.B. Brown, D. Fuerst, M.J. Sangane, G.-D. Roiban, Chiral synthesis of LSD1 inhibitor GSK2879552 enabled by directed evolution of an imine reductase, *Nature Catalysis* 2(10) (2019) 909-915.
- [129] N.S. Nadaraia, E.O. Onashvili, M.L. Kakhbrishvili, N.N. Barbakadze, B. Sylla, A. Pichette, Synthesis and Antiviral Activity of Several N-Containing 5 α -STEROIDS, *Chemistry of Natural Compounds* 52(5) (2016) 853-855.
- [130] M. Videnović, D.M. Opsenica, J.C. Burnett, L. Gomba, J.E. Nuss, Ž. Selaković, J. Konstantinović, M. Krstić, S. Šegan, M. Zlatović, R.J. Sciotti, S. Bavari, B.A. Šolaja, Second Generation Steroidal 4-Aminoquinolines Are Potent, Dual-Target Inhibitors of the Botulinum Neurotoxin Serotype A Metalloprotease and P. falciparum Malaria, *Journal of Medicinal Chemistry* 57(10) (2014) 4134-4153.

- [131] C.O. Nnadi, G.U. Ebiloma, J.A. Black, N.J. Nwodo, L. Lemgruber, T.J. Schmidt, H.P. de Koning, Potent Antitrypanosomal Activities of 3-Aminosteroids against African Trypanosomes: Investigation of Cellular Effects and of Cross-Resistance with Existing Drugs, *Molecules* 24(2) (2019) 268.
- [132] N.S. Nadaraia, L.S. Amiranashvili, M. Merlani, M.L. Kakhabrishvili, N.N. Barbakadze, A. Geronikaki, A. Petrou, V. Poroikov, A. Ciric, J. Glamoclija, M. Sokovic, Novel antimicrobial agents' discovery among the steroid derivatives, *Steroids* 144 (2019) 52-65.
- [133] M.I. Merlani, M.G. Davitishvili, N.S. Nadaraia, M.I. Sikharulidze, K. Papadopoulos, Conversion of Epiandrosterone Into 17 β -Amino-5 α -androstane, *Chemistry of Natural Compounds* 40(2) (2004) 144-146.
- [134] N.S. Nadaraia, L.S. Amiranashvili, M.I. Merlani, Structure–Activity Relationship of Epimeric 3,17-Substituted 5 α -Androstane Aminoalcohols, *Chemistry of Natural Compounds* 52(5) (2016) 961-962.
- [135] N.S. Nadaraia, V.I. Sladkov, E.V. Dorodnikova, M.D. Mashkovskii, E.P. Kemertelidze, N.N. Suvorov, Synthesis and antiarrhythmic activity of epimeric 17-amino-5 α -androstane-3-ols and their derivatives, *Pharmaceutical Chemistry Journal* 22(3) (1988) 207-212.
- [136] M.R. Welch, C. Grommes, Retrospective analysis of the effects of steroid therapy and antidiabetic medication on survival in diabetic glioblastoma patients, *CNS Oncology* 2(3) (2013) 237-246.
- [137] C. Lemini, Y. Franco, M.E. Avila, R. Jaimez, Contrasting effects of estradiol and 17 β -aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice, *European Journal of Pharmacology* 510(3) (2005) 229-233.
- [138] R. Maltais, M. Perreault, J. Roy, D. Poirier, Minor chemical modifications of the aminosteroid derivative RM-581 lead to major impact on its anticancer activity, metabolic stability and aqueous solubility, *European Journal of Medicinal Chemistry* 188 (2020) 111990.
- [139] M. Renata, Z. Istvan, Steroidal Anticancer Agents: An Overview of Estradiol-related Compounds, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 18(5) (2018) 652-666.
- [140] M. El-Far, G.A. Elmegeed, E.F. Eskander, H.M. Rady, M.A. Tantawy, Novel modified steroid derivatives of androstanolone as chemotherapeutic anti-cancer agents, *European Journal of Medicinal Chemistry* 44(10) (2009) 3936-3946.
- [141] Y.A. Mostafa, S.D. Taylor, 17 β -Arylsulfonamides of 17 β -aminoestra-1,3,5(10)-trien-3-ol as highly potent inhibitors of steroid sulfatase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20(4) (2012) 1535-1544.
- [142] J. Roy, R. Maltais, H. Jegham, D. Poirier, Libraries of 2 β -(N-substituted piperazino)-5 α -androstane-3 α , 17 β -diols: chemical synthesis and cytotoxic effects on human leukemia HL-60 cells and on normal lymphocytes, *Molecular Diversity* 15(2) (2011) 317-339.
- [143] H. Jegham, J. Roy, R. Maltais, S. Desnoyers, D. Poirier, A novel aminosteroid of the 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol family induces cell cycle arrest and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells, *Investigational New Drugs* 30(1) (2012) 176-185.
- [144] L.C. Kenmogne, D. Ayan, J. Roy, R. Maltais, D. Poirier, The Aminosteroid Derivative RM-133 Shows In Vitro and In Vivo Antitumor Activity in Human Ovarian and Pancreatic Cancers, *PloS one* 10(12) (2015) e0144890.
- [145] J.F. Rocha, A.F. Pina, S.F. Sousa, N.M.F.S.A. Cerqueira, PLP-dependent enzymes as important biocatalysts for the pharmaceutical, chemical and food industries: a structural and mechanistic perspective, *Catalysis Science & Technology* 9(18) (2019) 4864-4876.
- [146] D.M. Needham, A quantitative study of succinic acid in muscle: Glutamic and aspartic acids as precursors, *Biochemical Journal* 24(1) (1930) 208-227.
- [147] A.E. Braunstein, M.G. Kritzmman, Formation and Breakdown of Amino-acids by Inter-molecular Transfer of the Amino Group, *Nature* 140(3542) (1937) 503-504.
- [148] S. Pandya, A. Gupte, Transaminases for Green Chemistry: Recent Progress and Future Prospects, *Microbiology and Biotechnology Letters* 51 (2023) 333-352.
- [149] S. Dewhurst, I. Smallman, A simple laboratory experiment to demonstrate transamination, *Biochemical Education* 16(2) (1988) 97-98.
- [150] S.A. Kelly, S. Mix, T.S. Moody, B.F. Gilmore, Transaminases for industrial biocatalysis: novel enzyme discovery, *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(11) (2020) 4781-4794.
- [151] S.-M. Dold, C. Syltatk, J. Rudat, Transaminases and their applications, *Green biocatalysis*. Ed.: R. Patel, Wiley-VCH Verlag 2016, pp. 715-746.
- [152] Q. Meng, C. Ramírez-Palacios, H.J. Wijma, D.B. Janssen, Protein engineering of amine transaminases, *Frontiers in Catalysis* 2 (2022).

- [153] R. Percudani, A. Peracchi, The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families, *BMC Bioinformatics* 10(1) (2009) 273.
- [154] M. Thomsen, L. Skalden, G. Palm, M. Höhne, U. Bornscheuer, W. Hinrichs, Crystallographic characterization of the (R)-selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus*, *Acta Crystallographica Section D* 70 (2014) 1086-1093.
- [155] D. Peisach, D.M. Chipman, P.W. Van Ophem, J.M. Manning, D. Ringe, Crystallographic Study of Steps along the Reaction Pathway of d-Amino Acid Aminotransferase, *Biochemistry* 37(14) (1998) 4958-4967.
- [156] K. Okada, K. Hirotsu, H. Hayashi, H. Kagamiyama, Structures of *Escherichia coli* Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase and Its Complexes with 4-Methylvalerate and 2-Methylleucine: Induced Fit and Substrate Recognition of the Enzyme, *Biochemistry* 40(25) (2001) 7453-7463.
- [157] S. Sugio, G.A. Petsko, J.M. Manning, K. Soda, D. Ringe, Crystal Structure of a D-Amino Acid Aminotransferase: How the Protein Controls Stereoselectivity, *Biochemistry* 34(30) (1995) 9661-9669.
- [158] K.M. Boyko, T.N. Stekhanova, A.Y. Nikolaeva, A.V. Mardanov, A.L. Rakompletin, N.V. Ravin, E.Y. Bezsudnova, V.O. Popov, First structure of archaeal branched-chain amino acid aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis* specific for l-amino acids and R-amines, *Extremophiles* 20(2) (2016) 215-225.
- [159] E.Y. Bezsudnova, V.O. Popov, K.M. Boyko, Structural insight into the substrate specificity of PLP fold type IV transaminases, *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(6) (2020) 2343-2357.
- [160] M.D. Toney, Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1814(11) (2011) 1407-1418.
- [161] U. Kaulmann, K. Smithies, M.E.B. Smith, H.C. Hailes, J.M. Ward, Substrate spectrum of ω -transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and its potential for biocatalysis, *Enzyme and Microbial Technology* 41(5) (2007) 628-637.
- [162] M.S. Humble, K.E. Cassimjee, M. Håkansson, Y.R. Kimbung, B. Walse, V. Abedi, H.-J. Federsel, P. Berglund, D.T. Logan, Crystal structures of the *Chromobacterium violaceum* ω -transaminase reveal major structural rearrangements upon binding of coenzyme PLP, *The FEBS Journal* 279(5) (2012) 779-792.
- [163] C. Sayer, M.N. Isupov, A. Westlake, J.A. Littlechild, Structural studies of *Pseudomonas* and *Chromobacterium* ω -aminotransferases provide insights into their differing substrate specificity, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 69(Pt 4) (2013) 564-76.
- [164] S. Kwon, H.H. Park, Structural Consideration of the Working Mechanism of Fold Type I Transaminases From Eubacteria: Overt and Covert Movement, *Computational and Structural Biotechnology Journal* 17 (2019) 1031-1039.
- [165] K.E. Cassimjee, B. Manta, F. Himo, A quantum chemical study of the ω -transaminase reaction mechanism, *Organic & Biomolecular Chemistry* 13(31) (2015) 8453-8464.
- [166] M. Fuchs, J.E. Farnberger, W. Kroutil, The Industrial Age of Biocatalytic Transamination, *European Journal of Organic Chemistry* 2015(32) (2015) 6965-6982.
- [167] B.-Y. Hwang, B.-G. Kim, High-throughput screening method for the identification of active and enantioselective ω -transaminases, *Enzyme and Microbial Technology* 34(5) (2004) 429-436.
- [168] M. Chen, L. Rong, X. Chen, A simple and sensitive detection of glutamic-pyruvic transaminase activity based on fluorescence quenching of bovine serum albumin, *RSC Advances* 5(125) (2015) 103557-103562.
- [169] S. Schätzle, M. Höhne, E. Redestad, K. Robins, U.T. Bornscheuer, Rapid and Sensitive Kinetic Assay for Characterization of ω -Transaminases, *Analytical Chemistry* 81(19) (2009) 8244-8248.
- [170] M.D. Truppo, N.J. Turner, Micro-scale process development of transaminase catalysed reactions, *Organic & Biomolecular Chemistry* 8(6) (2010) 1280-1283.
- [171] S. Schätzle, M. Höhne, K. Robins, U.T. Bornscheuer, Conductometric Method for the Rapid Characterization of the Substrate Specificity of Amine-Transaminases, *Analytical Chemistry* 82(5) (2010) 2082-2086.
- [172] D. Baud, N. Ladkau, T.S. Moody, J.M. Ward, H.C. Hailes, A rapid, sensitive colorimetric assay for the high-throughput screening of transaminases in liquid or solid-phase, *Chemical Communications* 51(97) (2015) 17225-17228.
- [173] A.R. Martin, R. DiSanto, I. Plotnikov, S. Kamat, D. Shonnard, S. Pannuri, Improved activity and thermostability of (S)-aminotransferase by error-prone polymerase chain reaction for the production of a chiral amine, *Biochemical Engineering Journal* 37(3) (2007) 246-255.
- [174] G. Wang, Z. Jiang, Q. Xiao, C. Jiang, X.a. Shi, Visible spectrophotometric assay for characterization of ω -transaminases, *Analytical Biochemistry* 658 (2022) 114933.

- [175] J. Hopwood, M.D. Truppo, N.J. Turner, R.C. Lloyd, A fast and sensitive assay for measuring the activity and enantioselectivity of transaminases, *Chemical Communications* 47(2) (2011) 773-775.
- [176] S.C. Willies, J.L. Galman, I. Slabu, N.J. Turner, A stereospecific solid-phase screening assay for colonies expressing both (R)- and (S)-selective ω -aminotransferases, *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 374(2061) (2016).
- [177] M.S. Weiß, I.V. Pavlidis, C. Vickers, M. Höhne, U.T. Bornscheuer, Glycine Oxidase Based High-Throughput Solid-Phase Assay for Substrate Profiling and Directed Evolution of (R)- and (S)-Selective Amine Transaminases, *Analytical Chemistry* 86(23) (2014) 11847-11853.
- [178] M. Bommer, J.M. Ward, A 1-step microplate method for assessing the substrate range of l- α -amino acid aminotransferase, *Enzyme and Microbial Technology* 52(4) (2013) 218-225.
- [179] T. Scheidt, H. Land, M. Anderson, Y. Chen, P. Berglund, D. Yi, W.-D. Fessner, Fluorescence-Based Kinetic Assay for High-Throughput Discovery and Engineering of Stereoselective ω -Transaminases, *Advanced Synthesis & Catalysis* 357(8) (2015) 1721-1731.
- [180] F. Cheng, X.-L. Chen, C. Xiang, Z.-Q. Liu, Y.-J. Wang, Y.-G. Zheng, Fluorescence-based high-throughput screening system for R- ω -transaminase engineering and its substrate scope extension, *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(7) (2020) 2999-3009.
- [181] M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, Recent Advances in ω -Transaminase-Mediated Biocatalysis for the Enantioselective Synthesis of Chiral Amines, *Catalysts* 8(7) (2018) 254.
- [182] D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, omega-Transaminases for the synthesis of non-racemic alpha-chiral primary amines, *Trends in biotechnology* 28(6) (2010) 324-32.
- [183] M.D. Truppo, J.D. Rozzell, J.C. Moore, N.J. Turner, Rapid screening and scale-up of transaminase catalysed reactions, *Organic & Biomolecular Chemistry* 7(2) (2009) 395-398.
- [184] M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, J. Sattler, W. Banko, A.K. Holzer, M. Pickl, W. Kroutil, K. Faber, Improved chemoenzymatic asymmetric synthesis of (S)-Rivastigmine, *Tetrahedron* 68(37) (2012) 7691-7694.
- [185] M. Höhne, S. Kühl, K. Robins, U.T. Bornscheuer, Efficient Asymmetric Synthesis of Chiral Amines by Combining Transaminase and Pyruvate Decarboxylase, *ChemBioChem* 9(3) (2008) 363-365.
- [186] N. Richter, J.E. Farnberger, D. Pressnitz, H. Lechner, F. Zepeck, W. Kroutil, A system for ω -transaminase mediated (R)-amination using l-alanine as an amine donor, *Green Chemistry* 17(5) (2015) 2952-2958.
- [187] M. Girardin, S.G. Ouellet, D. Gauvreau, J.C. Moore, G. Hughes, P.N. Devine, P.D. O'Shea, L.-C. Campeau, Convergent Kilogram-Scale Synthesis of Dual Orexin Receptor Antagonist, *Organic Process Research & Development* 17(1) (2013) 61-68.
- [188] C.K. Chung, P.G. Bulger, B. Kosjek, K.M. Belyk, N. Rivera, M.E. Scott, G.R. Humphrey, J. Limanto, D.C. Bachert, K.M. Emerson, Process Development of C-N Cross-Coupling and Enantioselective Biocatalytic Reactions for the Asymmetric Synthesis of Niraparib, *Organic Process Research & Development* 18(1) (2014) 215-227.
- [189] Z. Peng, J.W. Wong, E.C. Hansen, A.L.A. Puchlopek-Dermenci, H.J. Clarke, Development of a Concise, Asymmetric Synthesis of a Smoothed Receptor (SMO) Inhibitor: Enzymatic Transamination of a 4-Piperidinone with Dynamic Kinetic Resolution, *Organic Letters* 16(3) (2014) 860-863.
- [190] C. Molinaro, P.G. Bulger, E.E. Lee, B. Kosjek, S. Lau, D. Gauvreau, M.E. Howard, D.J. Wallace, P.D. O'Shea, CRTH2 Antagonist MK-7246: A Synthetic Evolution from Discovery through Development, *The Journal of Organic Chemistry* 77(5) (2012) 2299-2309.
- [191] L. Frodsham, M. Golden, S. Hard, M.N. Kenworthy, D.J. Klauber, K. Leslie, C. Macleod, R.E. Meadows, K.R. Mulholland, J. Reilly, C. Squire, S. Tomasi, D. Watt, A.S. Wells, Use of ω -Transaminase Enzyme Chemistry in the Synthesis of a JAK2 Kinase Inhibitor, *Organic Process Research & Development* 17(9) (2013) 1123-1130.
- [192] M. Burns, C.A. Martinez, B. Vanderplas, R. Wisdom, S. Yu, R.A. Singer, A Chemoenzymatic Route to Chiral Intermediates Used in the Multikilogram Synthesis of a Gamma Secretase Inhibitor, *Organic Process Research & Development* 21(6) (2017) 871-877.
- [193] Debarge, S.; Erdman, D.T.; O'Neill, P.M.; Kumar, R.; Karmilowicz, M.J. Process and Intermediates for the Preparation of Pregabalin. WO2014155291A1, 2 October 2014.
- [194] I.K. Mangion, B.D. Sherry, J. Yin, F.J. Fleitz, Enantioselective Synthesis of a Dual Orexin Receptor Antagonist, *Organic Letters* 14(13) (2012) 3458-3461.
- [195] X. Gu, J. Zhao, L. Chen, Y. Li, B. Yu, X. Tian, Z. Min, S. Xu, H. Gu, J. Sun, X. Lu, M. Chang, X. Wang, L. Zhao, S. Ye, H. Yang, Y. Tian, F. Gao, Y. Gai, G. Jia, J. Wu, Y. Wang, J. Zhang, X. Zhang, W. Liu, X. Gu,

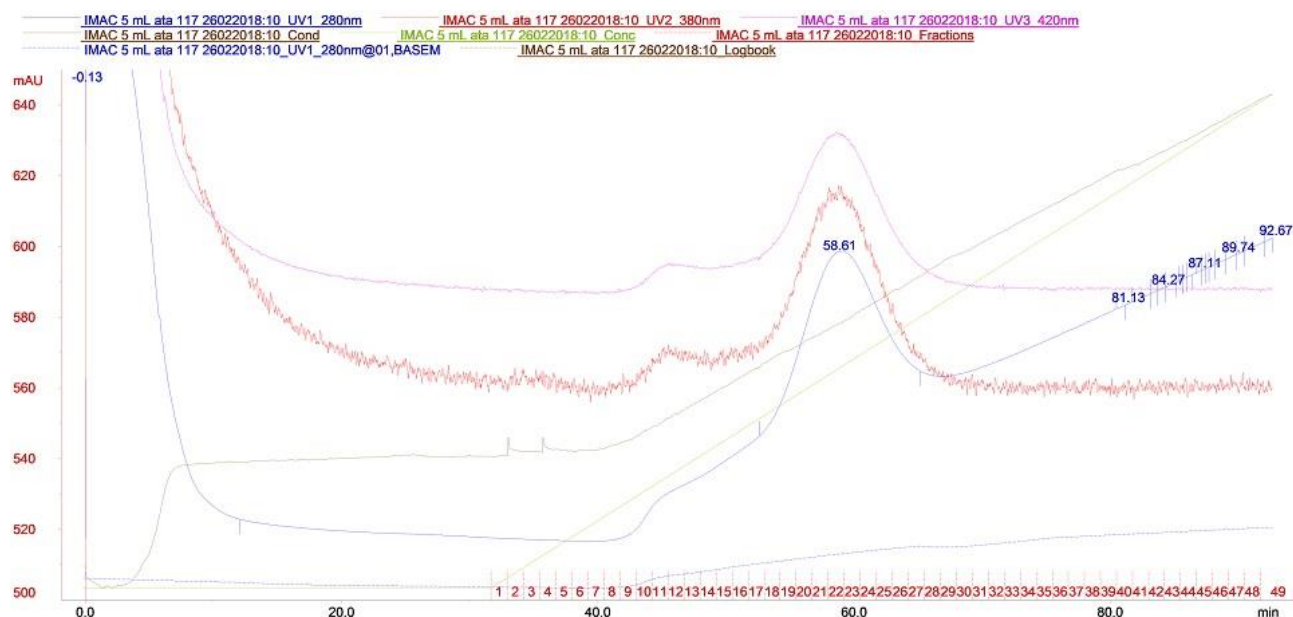
- X. Luo, H. Dong, H. Wang, B. Schenkel, F. Venturoni, P. Filippini, B. Guelat, T. Allmendinger, B. Wietfeld, P. Hoehn, N. Kovacic, L. Hermann, T. Schlama, T. Ruch, N. Derrien, P. Piechon, F. Kleinbeck, Application of Transition-Metal Catalysis, Biocatalysis, and Flow Chemistry as State-of-the-Art Technologies in the Synthesis of LCZ696, *The Journal of Organic Chemistry* 85(11) (2020) 6844-6853.
- [196] H. Jia, F. Huang, Z. Gao, C. Zhong, H. Zhou, M. Jiang, P. Wei, Immobilization of ω -transaminase by magnetic PVA-Fe₃O₄ nanoparticles, *Biotechnology Reports* 10 (2016) 49-55.
- [197] J.M. Carceller, K.S. Arias, M.J. Climent, S. Iborra, A. Corma, Enzymatic and chemo-enzymatic strategies to produce highly valuable chiral amines from biomass with ω -transaminases on 2D zeolites, *National Science Review* 9(9) (2022).
- [198] S.-S. Yi, C.-w. Lee, J. Kim, D. Kyung, B.-G. Kim, Y.-S. Lee, Covalent immobilization of ω -transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 on chitosan beads, *Process Biochemistry* 42(5) (2007) 895-898.
- [199] J. Sun, W.-h. Cui, K. Du, Q. Gao, M. Du, P. Ji, W. Feng, Immobilization of R- ω -transaminase on MnO₂ nanorods for catalyzing the conversion of (R)-1-phenylethylamine, *Journal of Biotechnology* 245 (2017) 14-20.
- [200] W. Neto, M. Schürmann, L. Panella, A. Vogel, J.M. Woodley, Immobilisation of ω -transaminase for industrial application: Screening and characterisation of commercial ready to use enzyme carriers, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 117 (2015) 54-61.
- [201] G. Cao, J. Gao, L. Zhou, Z. Huang, Y. He, M. Zhu, Y. Jiang, Fabrication of Ni²⁺-nitrilotriacetic acid functionalized magnetic mesoporous silica nanoflowers for one pot purification and immobilization of His-tagged ω -transaminase, *Biochemical Engineering Journal* 128 (2017) 116-125.
- [202] S.P. de Souza, I.I. Junior, G.M.A. Silva, L.S.M. Miranda, M.F. Santiago, F. Leung-Yuk Lam, A. Dawood, U.T. Bornscheuer, R.O.M.A. de Souza, Cellulose as an efficient matrix for lipase and transaminase immobilization, *RSC Advances* 6(8) (2016) 6665-6671.
- [203] Z. Molnár, E. Farkas, Á. Lakó, B. Erdélyi, W. Kroutil, B.G. Vértessy, C. Paizs, L. Poppe, Immobilized Whole-Cell Transaminase Biocatalysts for Continuous-Flow Kinetic Resolution of Amines, *Catalysts* 9(5) (2019) 438.
- [204] E. Abaházi, P. Sátorhelyi, B. Erdélyi, B.G. Vértessy, H. Land, C. Paizs, P. Berglund, L. Poppe, Covalently immobilized Trp60Cys mutant of ω -transaminase from *Chromobacterium violaceum* for kinetic resolution of racemic amines in batch and continuous-flow modes, *Biochemical Engineering Journal* 132 (2018) 270-278.
- [205] W. Böhmer, L. Koeneke, T. Simon, F.G. Mutti, Parallel Interconnected Kinetic Asymmetric Transformation (PIKAT) with an Immobilized ω -Transaminase in Neat Organic Solvent, *Molecules* 25(9) (2020) 2140.
- [206] L. Van den Biggelaar, P. Soumillion, D.P. Debecker, Enantioselective Transamination in Continuous Flow Mode with Transaminase Immobilized in a Macrocellular Silica Monolith, *Catalysts* 7(2) (2017) 54.
- [207] T. Heinks, S. Koopmeiners, N. Montua, N. Sewald, M. Höhne, U.T. Bornscheuer, G. Fischer von Mollard, Co-Immobilization of a Multi-Enzyme Cascade: (S)-Selective Amine Transaminases, l-Amino Acid Oxidase and Catalase, *ChemBioChem* 24(19) (2023) e202300425.
- [208] C. Wang, K. Tang, Y. Dai, H. Jia, Y. Li, Z. Gao, B. Wu, Identification, Characterization, and Site-Specific Mutagenesis of a Thermostable ω -Transaminase from *Chloroflexi* bacterium, *ACS Omega* 6(26) (2021) 17058-17070.
- [209] L. Cerioli, M. Planchestainer, J. Cassidy, D. Tessaro, F. Paradisi, Characterization of a novel amine transaminase from *Halomonas elongata*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 120 (2015) 141-150.
- [210] S.A. Kelly, J. Megaw, J. Caswell, C.J. Scott, C.C.R. Allen, T.S. Moody, B.F. Gilmore, Isolation and Characterisation of a Halotolerant ω -Transaminase from a Triassic Period Salt Mine and Its Application to Biocatalysis, *ChemistrySelect* 2(30) (2017) 9783-9791.
- [211] S.A. Kelly, T.S. Moody, B.F. Gilmore, Biocatalysis in seawater: Investigating a halotolerant ω -transaminase capable of converting furfural in a seawater reaction medium, *Engineering in Life Sciences* 19(10) (2019) 721-725.
- [212] S. Mathew, S.P. Nadarajan, T. Chung, H.H. Park, H. Yun, Biochemical characterization of thermostable ω -transaminase from *Sphaerobacter thermophilus* and its application for producing aromatic β - and γ -amino acids, *Enzyme and Microbial Technology* 87-88 (2016) 52-60.
- [213] D. Baud, J.W.E. Jeffries, T.S. Moody, J.M. Ward, H.C. Hailes, A metagenomics approach for new biocatalyst discovery: application to transaminases and the synthesis of allylic amines, *Green Chemistry* 19(4) (2017) 1134-1143.

- [214] Sandip V. Pawar, S.J. Hallam, V.G. Yadav, Metagenomic discovery of a novel transaminase for valorization of monoaromatic compounds, *RSC Advances* 8(40) (2018) 22490-22497.
- [215] K.L. Britton, Y. Asano, D.W. Rice, Crystal structure and active site location of N-(1-D-carboxylethyl)-L-norvaline dehydrogenase, *Nature structural biology* 5(7) (1998) 593-601.
- [216] J.S. McFarlane, J. Zhang, S. Wang, X. Lei, G.R. Moran, A.L. Lamb, Staphylopine and pseudopaline dehydrogenase from bacterial pathogens catalyze reversible reactions and produce stereospecific metallophores, 294(47) (2019) 17988-18001.
- [217] J.S. McFarlane, C.L. Davis, A.L. Lamb, Staphylopine, pseudopaline, and yersinopine dehydrogenases: A structural and kinetic analysis of a new functional class of opine dehydrogenase, *The Journal of biological chemistry* 293(21) (2018) 8009-8019.
- [218] Y. Asano, K. Yamaguchi, K. Kondo, A new NAD⁺-dependent opine dehydrogenase from *Arthrobacter* sp. strain 1C, *Journal of Bacteriology* 171(8) (1989) 4466-4471.
- [219] A. Müller, F. Janßen, M.K. Grieshaber, Putative reaction mechanism of heterologously expressed octopine dehydrogenase from the great scallop, *Pecten maximus* (L), *The FEBS Journal* 274(24) (2007) 6329-6339.
- [220] Y. Kato, H. Yamada, Y. Asano, Stereoselective synthesis of opine-type secondary amine carboxylic acids by a new enzyme opine dehydrogenase use of recombinant enzymes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1(3) (1996) 151-160.
- [221] M.A. Ondetti, B. Rubin, D.W. Cushman, Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: New Class of Orally Active Antihypertensive Agents, *Science* 196(4288) (1977) 441-444.
- [222] M.T. Wu, A.W. Douglas, D.L. Ondeyka, L.G. Payne, T.J. Ikeler, H. Joshua, A.A. Patchett, Synthesis of N²-[(S)-1-carboxy-3-phenylpropyl]-L-lysyl-L-proline (lisinopril), *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74(3) (1985) 352-354.
- [223] United States Patent Alvizo et al . ENGINEERED IMINE REDUCTASES AND METHODS FOR THE REDUCTIVE AMINATION OF KETONE AND AMINE COMPOUNDS. Patent No.: US 10370648B26 Date of Patent: Aug .6, 2019.
- [224] A. Telek, Z. Molnár, K. Takács, B. Varga, V. Grolmusz, G. Tasnádi, B.G. Vértessy, Discovery and biocatalytic characterization of opine dehydrogenases by metagenome mining, *Applied Microbiology and Biotechnology* 108(1) (2024) 101.
- [225] N. Milosavić, R. Prodanović, S. Jovanović, Z. Vujčić, Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly(GMA-co-EGDMA), *Enzyme and Microbial Technology* 40(5) (2007) 1422-1426.
- [226] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72(1) (1976) 248-254.
- [227] I. Aleksic, M. Popovic, R. Dimitrijevic, U. Andjelkovic, E. Vassilopoulou, A. Sinaniotis, M. Atanaskovic-Markovic, B. Lindner, A. Petersen, N.G. Papadopoulos, M. Gavrovic-Jankulovic, Molecular and immunological characterization of Mus a 5 allergen from banana fruit, *Molecular Nutrition & Food Research* 56(3) (2012) 446-453.
- [228] D. Despotovic, L. Vojcic, R. Prodanovic, R. Martinez, K.-H. Maurer, U. Schwaneberg, Fluorescent Assay for Directed Evolution of Perhydrolases, *SLAS Discovery* 17(6) (2012) 796-805.
- [229] H. Wang, I. Abe, Recent developments in the enzymatic modifications of steroid scaffolds, 22(18) (2024) 3559-3583.
- [230] N. Sultana, Microbial biotransformation of bioactive and clinically useful steroids and some salient features of steroids and biotransformation, *Steroids* 136 (2018) 76-92.
- [231] F. Mao, W. Ni, X. Xu, H. Wang, J. Wang, M. Ji, J. Li, Chemical Structure-Related Drug-Like Criteria of Global Approved Drugs, *Molecules* 21(1) (2016) 75.
- [232] N. Richter, R.C. Simon, H. Lechner, W. Kroutil, J.M. Ward, H.C. Hailes, ω -Transaminases for the amination of functionalised cyclic ketones, *Organic & Biomolecular Chemistry* 13(33) (2015) 8843-8851.
- [233] A. Pintor, A.P. Matthey, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, A. Volkov, Development of an amine transaminase-lipase cascade for chiral amide synthesis under flow conditions, *Green Chemistry* 25(15) (2023) 6041-6050.
- [234] M.D. Truppo, H. Strotman, G. Hughes, Development of an Immobilized Transaminase Capable of Operating in Organic Solvent, *ChemCatChem* 4(8) (2012) 1071-1074.

- [235] D. Koszelewski, N. Müller, J.H. Schrittwieser, K. Faber, W. Kroutil, Immobilization of ω -transaminases by encapsulation in a sol-gel/celite matrix, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 63(1) (2010) 39-44.
- [236] H. Mallin, M. Höhne, U.T. Bornscheuer, Immobilization of (R)- and (S)-amine transaminases on chitosan support and their application for amine synthesis using isopropylamine as donor, *Journal of Biotechnology* 191 (2014) 32-37.
- [237] T. Heinks, N. Montua, M. Teune, J. Liedtke, M. Höhne, U.T. Bornscheuer, G. Fischer von Mollard, Comparison of Four Immobilization Methods for Different Transaminases, *Catalysts* 13(2) (2023) 300.
- [238] C. Otero, A. Ballesteros, J.M. Guisán, Immobilization/stabilization of lipase from *Candida rugosa*, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 19(2) (1988) 163-175.
- [239] J.M. Bolivar, L. Wilson, S.A. Ferrarotti, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, C. Mateo, Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalent immobilization on glyoxyl-agarose, *Journal of Biotechnology* 125(1) (2006) 85-94.
- [240] M.E. Çorman, N. Öztürk, N. Bereli, S. Akgöl, A. Denizli, Preparation of nanoparticles which contains histidine for immobilization of *Trametes versicolor* laccase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 63(1) (2010) 102-107.
- [241] P. Wang, S. Dai, S.D. Waezsada, A.Y. Tsao, B.H. Davison, Enzyme stabilization by covalent binding in nanoporous sol-gel glass for nonaqueous biocatalysis, *Biotechnology and Bioengineering* 74(3) (2001) 249-255.
- [242] D. Alsafadi, F. Paradisi, Covalent Immobilization of Alcohol Dehydrogenase (ADH2) from *Haloferax volcanii*: How to Maximize Activity and Optimize Performance of Halophilic Enzymes, *Molecular Biotechnology* 56(3) (2014) 240-247.
- [243] T. Matsumoto, R. Yamada, H. Ogino, Chemical treatments for modification and immobilization to improve the solvent-stability of lipase, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35(12) (2019) 193.
- [244] W. Ju, X. Zhen, L. Zheng, Soluble expression and biomimetic immobilization of a ω -transaminase from *Bacillus subtilis*: Development of an efficient and recyclable biocatalyst, *Biochemical Engineering Journal* 160 (2020) 107635.
- [245] G. Rehn, C. Grey, C. Branneby, L. Lindberg, P. Adlercreutz, Activity and stability of different immobilized preparations of recombinant *E. coli* cells containing ω -transaminase, *Process Biochemistry* 47(7) (2012) 1129-1134.
- [246] N. Janson, T. Heinks, T. Beuel, S. Alam, M. Höhne, U.T. Bornscheuer, G. Fischer von Mollard, N. Sewald, Efficient Site-Selective Immobilization of Aldehyde-Tagged Peptides and Proteins by Knoevenagel Ligation, *ChemCatChem* 14(2) (2022) e202101485.
- [247] M. Garvey, Non-Mammalian Eukaryotic Expression Systems Yeast and Fungi in the Production of Biologics, *Journal of Fungi* 8(11) (2022) 1179.
- [248] T. Tanaka, A. Kondo, Cell-surface display of enzymes by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for synthetic biology, *FEMS Yeast Research* 15(1) (2015) 1-9.
- [249] I.D.F. Tabañag, I.-M. Chu, Y.-H. Wei, S.-L. Tsai, The Role of Yeast-Surface-Display Techniques in Creating Biocatalysts for Consolidated BioProcessing, *Catalysts* 8(3) (2018) 94.
- [250] M. Senćanski, N. Sumonja, V. Perovic, S. Glisic, N. Veljkovic, V. Veljkovic, The Application of Information Spectrum Method on Small Molecules and Target Recognition, 2019.
- [251] T. Bojić, V.R. Perović, S. Glišić, In silico Therapeutics for Neurogenic Hypertension and Vasovagal Syncope, *Frontiers in Neuroscience* 9 (2016).
- [252] A. Bhatwa, W. Wang, Y.I. Hassan, N. Abraham, X.-Z. Li, T. Zhou, Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9 (2021).
- [253] N.G. Schmidt, R.C. Simon, W. Kroutil, Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Optically Pure Aromatic Propargylic Amines Employing ω -Transaminases, *Advanced Synthesis & Catalysis* 357(8) (2015) 1815-1821.
- [254] D. Pressnitz, C.S. Fuchs, J.H. Sattler, T. Knaus, P. Macheroux, F.G. Mutti, W. Kroutil, Asymmetric Amination of Tetralone and Chromanone Derivatives Employing ω -Transaminases, *ACS Catalysis* 3(4) (2013) 555-559.
- [255] K.E. Cassimjee, M.S. Humble, H. Land, V. Abedi, P. Berglund, *Chromobacterium violaceum* ω -transaminase variant Trp60Cys shows increased specificity for (S)-1-phenylethylamine and 4'-substituted acetophenones, and follows Swain-Lupton parameterisation, *Organic & Biomolecular Chemistry* 10(28) (2012) 5466-5470.

- [256] M.S. Humble, K.E. Cassimjee, V. Abedi, H.-J. Federsel, P. Berglund, Key Amino Acid Residues for Reversed or Improved Enantiospecificity of an ω -Transaminase, *ChemCatChem* 4(8) (2012) 1167-1172.
- [257] D. Deszcz, P. Affaticati, N. Ladkau, A. Gegel, J.M. Ward, H.C. Hailes, P.A. Dalby, Single active-site mutants are sufficient to enhance serine:pyruvate α -transaminase activity in an ω -transaminase, *The FEBS Journal* 282(13) (2015) 2512-2526.
- [258] H. Land, F. Ruggieri, A. Szekrenyi, W.-D. Fessner, P. Berglund, Engineering the Active Site of an (S)-Selective Amine Transaminase for Acceptance of Doubly Bulky Primary Amines, *Advanced Synthesis & Catalysis* 362(4) (2020) 812-821.
- [259] N. Endo, N. Kan-no, E. Nagahisa, Purification, characterization, and cDNA cloning of opine dehydrogenases from the polychaete rockworm *Marphysa sanguinea*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147(2) (2007) 293-307.
- [260] H. Gohlke, U. Hergert, T. Meyer, D. Mulnaes, M.K. Grieshaber, S.H.J. Smits, L. Schmitt, Binding Region of Alanopine Dehydrogenase Predicted by Unbiased Molecular Dynamics Simulations of Ligand Diffusion, *Journal of Chemical Information and Modeling* 53(10) (2013) 2493-2498.
- [261] K.B. Storey, Tissue-specific alanopine dehydrogenase and strombine dehydrogenase from the sea mouse, *Aphrodite aculeata* (polychaeta), *Journal of Experimental Zoology* 225(3) (1983) 369-378.
- [262] W.C. Plaxton, K.B. Storey, Alanopine dehydrogenase: Purification and characterization of the enzyme from *Littorina littorea* foot muscle, *Journal of comparative physiology* 149(1) (1982) 57-65.
- [263] M.A. Amoozegar, E. Salehghamari, K. Khajeh, M. Kabiri, S. Naddaf, Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2, *J Basic Microbiol* 48(3) (2008) 160-7.
- [264] H.R. Karbalaei-Heidari, A.-A. Ziaee, J. Schaller, M.A. Amoozegar, Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004, *Enzyme and Microbial Technology* 40(2) (2007) 266-272.
- [265] L. Ai, Y. Huang, C. Wang, Purification and characterization of halophilic lipase of *Chromohalobacter* sp. from ancient salt well, *Journal of Basic Microbiology* 58(8) (2018) 647-657.
- [266] A. Ameri, M. Shakibaie, M.A. Faramarzi, A. Ameri, S. Amirpour-Rostami, H.R. Rahimi, H. Forootanfar, Thermoalkalophilic lipase from an extremely halophilic bacterial strain *Bacillus atrophaeus* FSHM2: Purification, biochemical characterization and application, *Biocatalysis and Biotransformation* 35(3) (2017) 151-160.
- [267] M.S. Dodia, C.M. Rawal, H.G. Bhimani, R.H. Joshi, S.K. Khare, S.P. Singh, Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated Haloalkaliphilic bacterium sp. AH-6, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(2) (2008) 121-131.
- [268] N.M. Mesbah, Covalent immobilization of a halophilic, alkalithermostable lipase LipR2 on Florisil® nanoparticles for production of alkyl levulinates, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 667 (2019) 22-29.
- [269] S. Malekabadi, A. Badoei-dalfard, Z. Karami, Biochemical characterization of a novel cold-active, halophilic and organic solvent-tolerant lipase from *B. licheniformis* KM12 with potential application for biodiesel production, *International Journal of Biological Macromolecules* 109 (2018) 389-398.
- [270] S. Sinsuwan, S. Rodtong, J. Yongsawatdigul, Evidence of Cell-Associated Proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 Isolated from Fish Sauce Fermentation, *Journal of Food Science* 76(3) (2011) C413-C419.
- [271] N. Munawar, P.C. Engel, Overexpression in a non-native halophilic host and biotechnological potential of NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum* strain NRC-36014, *Extremophiles* 16(3) (2012) 463-76.
- [272] K. Miyazaki, M. Takenouchi, Creating Random Mutagenesis Libraries Using Megaprimer PCR of Whole Plasmid, *BioTechniques* 33(5) (2002) 1033-1038.

8. Prilog



Slika 1. Hromatogram prečišćavanja ArRMut11 afinitetnom hromatografijom na Ni-NTA koloni.

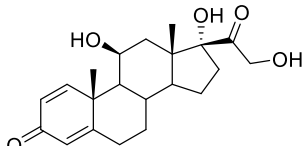
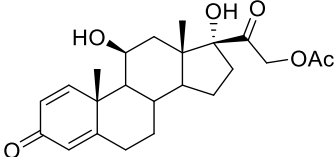
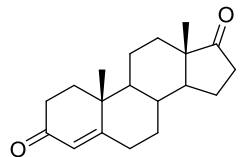
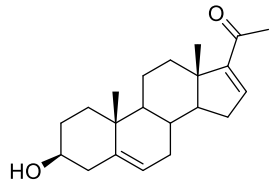
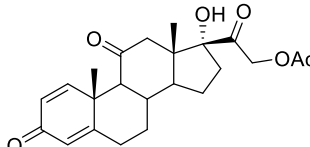
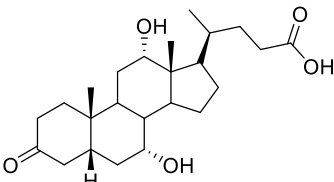
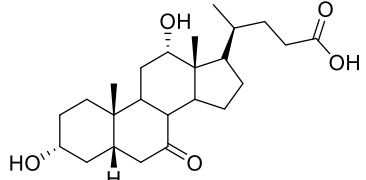
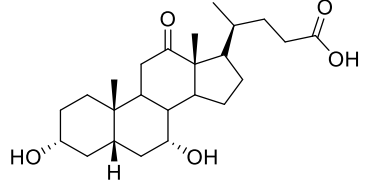
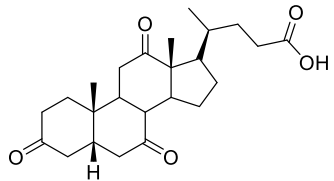
Tabela 1. Supstratna specifičnost ArRMut11 ka steroidima.

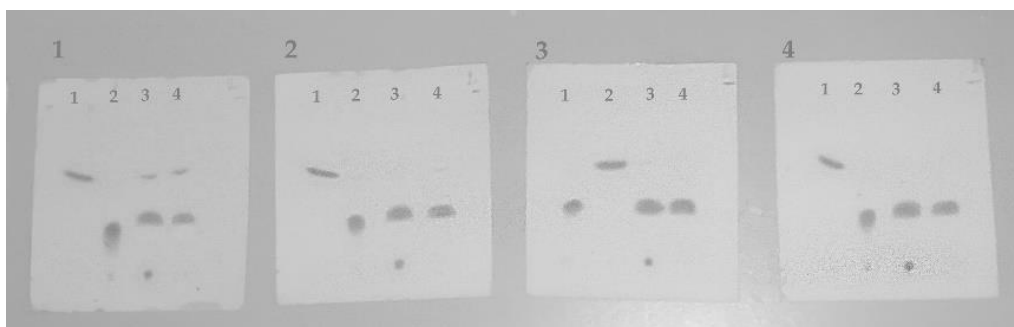
Jedinjenje			Prinos reakcije izražen u nmol% konverzije (R)-MBA u acetofenon- Površina pika acetofenona x K(a) ² /površina pika MBA x K(MBA) ³ + površina pika acetofenona x K(a)
Redni broj	Ime	Struktura ⁴	
1	Dihidrottestosteron		10.22 %
2	Deoksikortikosteron 21-glukozid		1.18 %
3	16α, 17α-Epoksiprogesteron		6.15 %

² K (a) – Količina standarda acetofenona (nmol)/ površina pika standarda acetofenona (mAU x min)

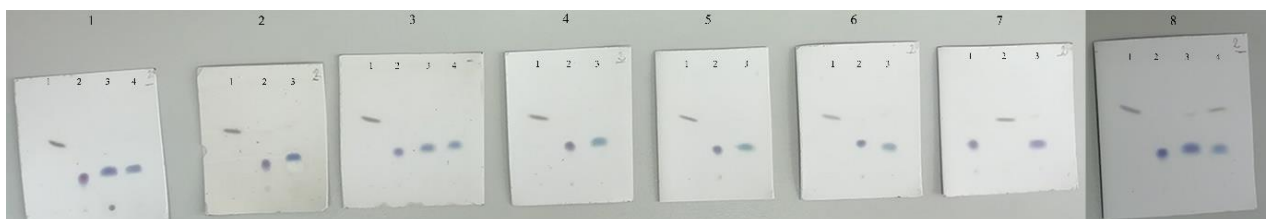
³ K (MBA) – Količina standarda (R)-MBA (nmol)/ površina pika standarda (R)-MBA (mAU x min)

⁴ Za kreiranje struktura steroida korišćen je ChemDraw program.

4	Prednizolon		6.98 %
5	Prednizolon 21-acetat		0.88 %
6	Androstendion		10.97 %
7	16-dehidropregnenolon		5.19 %
8	1,4-pregnadien-17 alfa-ol-21-acetoksi-3,11,20-trion		6.83 %
9	3-oksoholna kiselina		17.0 %
10	7-oksoholna kiselina		3.73 %
11	12-oksoholna kiselina		1.13 %
12	3,7,12-trioksoholna kiselina		34.97 %



Slika 2. Prikaz TLC analize proizvoda reakcije nakon prvog ciklusa konverzije dihidrotestosterona upotrebom bakterijskog lizata sa eksprimiranom ArRMut11 i imobilizovane ArRMut11. Legenda: Brojevi od 1 do 4, iznad TLC pločica, označavaju broj dana u kom je rađen TLC tokom prvog ciklusa konverzije. Brojevi od 1 do 4 na TLC pločicama odnose se na analizirani uzorak. Brojevima 1 i 2 obeleženi su standardi dihidrotestosterona i odgovarajućeg amino analoga, redom, osim na pločici 3, gde je obrnut redosled ova dva uzorka. Broj 3 se odnosi na analizirani proizvod reakcione smeše gde je korišćen bakterijski lizat sa eksprimiranom ArRMut11, dok se broj 4 odnosi na proizvod reakcije u kojoj je upotrebljena imobilizovana ArRMut11.



Slika 3. Prikaz TLC analize proizvoda reakcije nakon 10 uzastopnih ciklusa konverzije primenom imobilizovane ArRMut11. Legenda: Brojevi od 1 do 8, iznad TLC pločica, označavaju broj ciklusa konverzije osim u slučaju pločice 3 na kojoj su analizirani uzorci iz 3 i 4 ciklusa, i pločice 8 na kojoj su analizirani uzorci iz 9 i 10 ciklusa. Brojevi od 1 do 4 na TLC pločicama odnose se na analizirani uzorak. Brojevima 1 i 2 obeleženi su standardi dihidrotestosterona i odgovarajućeg amino analoga, redom, osim na pločici 7 gde je obrnut redosled ova dva uzorka. Brojevi 3 i 4 se odnose na analizirani proizvod reakcije iz odgovarajućeg ciklusa konverzije.

[Download](#)
[GenPept](#)
[Graphics](#)

[Next](#)
[Previous](#)
[Description](#)

RecName: Full=Opine dehydrogenase; AltName: Full=N-(1-D-carboxyethyl)-L-norvaline dehydrogenase [Arthrobacter sp. 1C]

Sequence ID: [Q44297.1](#)
Length: 359
Number of Matches: 1

[See 2 more title\(s\)](#)
[See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 1 to 349
[GenPept](#)
[Graphics](#)

[Next Match](#)
[Previous Match](#)

Score

Expect

Method

Identities

Positives

Gaps

301 bits(772)
2e-105
Compositional matrix adjust.
154/350(44%)
222/350(63%)
2/350(0%)

Query 1
MSRETVWAIVGGGNGGQSLAGHLSLMGYVRLYDIFTETVDAINAQGGIEVSGV-VEGFG
59

M
+A++G GNGG + A +L+L G V +DI + + I +G I G + G

Sbjct 1
MIESKTYAVLGLGNGGHAFAYLALKGQSVLAWNDIAQRKEIQDRGATIAEGPGLAGTA
60

Query 60
KPELVTTDLGAAVKGADAVMIVAPAVAHKTIKQCAPYVSAGQTYILHPGATCGALEFRH
119

P+L+T+D+G AVK AD ++IV PA+ H +IA A Y+S GQ IL+PGAT GALEFR

Sbjct 61
HPDLLTSDIGLAVKDADVILIVPAIHASIAANIASYISEGQLIILNPGATGGALEFRK
120

Query 120
TLDECNCTPDLAVAETNSLIYACRAPKPGHAVIHGKDDLVLSTLPAKNEHVLGVLQEA
179

L E N P++ + ET+S+++ CR+ +PG ++ IK + + LPAK L +

Sbjct 121
ILRE-NGAPEVTIGETSSMLFTRCSERPQGVTVNAIKGAMDFACLPAKAGWALEQIGSV
179

Query 180
FPQIVGGANVMQSSLGNNANIMHPAPTLNLTSLIESRHDWYYYREGITPSIGAFVEELDK
239

PQ V NV+ +SL N NA+MHP PTLN + ES + YY EGITPS+G+ E++D

Sbjct 180
LPQYVAENVLHTSLTNVNAVHPLPTLLNAARCESGTPFYLYLEGITPSVSGLSAEKVDA
239

Query 240
ERVNLQAQAFGLDMITIREWYRVAYGVEAETLSEAVKKNPAYAEIRGQKELRTRYLLEDIP
299

ER+ +A+AF L++ ++ EWY+ +YG T+ EAV+ NPAY I G L TRY ED+

Sbjct 240
ERIAIAKAFDLNVPSCVEWYKESYGQSPATIEAVQGNPAYRGIAGPINLTRYFFEDVS
299

Query 300
TGLVPMIEMGKLMGVDTPRMELVARFGSSLLLEEDFFAKGRTLKNLGLAGM
349

TGLVP+ E+G+ + V TP ++ V SSL++ DF +GRTL+ LGL+G+

Sbjct 300
TGLVPLSELGRAVNVPTPLIDAVLDLISSLDIDTFRKEGRTLEKLGSL
349

Related Information

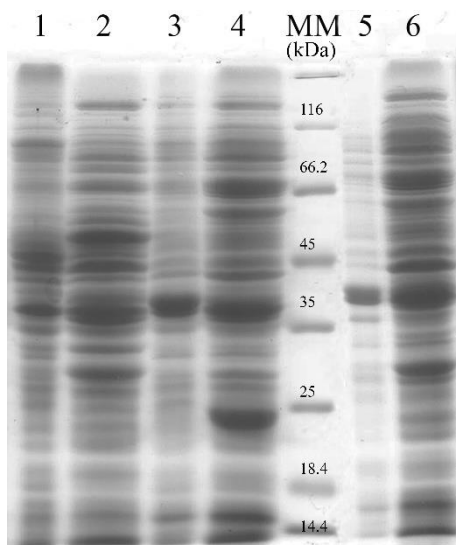
[Identical Proteins](#) - Identical proteins to Q44297.1

Related Information
[Identical Proteins](#) - Identical proteins to Q44297.1

Slika 4. Poređenje sekvenci pretpostavljene opin dehidrogenaze iz metagenomske sekvence *Desulfohalobium retbaense* i opin dehidrogenaze poreklom iz *Arthrobacter sp.* soja 1C (CENDH) korišćene u eksperimentima dirigovane evolucije od strane kompanije Codexis.

- A) catATGTCACGTGAAACCGTGTGGGCTATTGTTGGCGGTGGCAATGGTGGCCAGAGCCTGGCAGGT CATCTGTCTCTGATGGGCTACCCGGTCCGCCTGTATGATATCTTTACCGAAACGGTGGACGCCATTA ATGCACAAGGTGGCATCGAAGTGAGCGGTGTGGTTGAAGGTTTCGGCAAACCGGAACCTGGTGAC CACCGATCTGGGTGCGGCGGTGAAAGGTGCCGATGCAGTCATGATTGTGGCACCGGCTGTTGCGC ACAAACCATCGCCAAACAGTGCGCACCGTACGTCTCTGCCGGCCAAACCTATATTCTGCATCCG GGTGCTACGTGTGGCGCGCTGGAATTCGTACACACCCTGGATGAATGCAACTGTACGCCGGACCT GGCCGTTGCAGAAACCAATAGTCTGATCTACGCTTGCCGTGCGCCGAAACCGGGTCATGCGGTGA TTCACGGCATCAAAGATGACCTGGTTCTGTCCACGCTGCCGGCAGCTAAAAACGAACATGTTCTG GGTGTCCTGCAGGAAGCGTTTCCGCAAATTGTTGGTGGCGCGAATGTCATGCAGAGCAGCCTGGG CAACGCTAATGCGATTATGCATCCGGCGCCGACCCTGCTGAACACGTCACCTGATCGAATCGCGTCA CGATTGGTATTACTATCGCGAAGGTATTACCCCGTCAATCGGCGCCTTTGTGCAAGAACTGGATAA AGAACGTGTGAATCTGGCCCAGGCATTCGGTCTGGACATGATTACCATCCGTGAATGGTACCGCGT CGCCTATGGCGTGGAAGCAGAAACGCTGTGCGGAAGCCGTGAAGAAAAACCCGGCTTACGCGGAA ATTCGCGGTGAGAAAGAACTGCGTACCCGCTATCTGCTGGAAGATATTCGACGGGCGCTGGTTCC GATGATCGAAATGGGTAAACTGATGGGCGTTGATACCCCGGTATGGAAGTGGTCGCACGCTTTG GTAGTTCCCTGCTGGAAGAAGATTTCTTTGCCAAAGGTGCTACCCCTGAAAAATCTGGGCCTGGCA GGCATGGGCAAAGATGACTTCTGCACTATCTGCAAACGGGCGTGAAAGCGctgcagaccaccaccac caccactga
- B) MSRETVWAIVGGGNGGQSLAGHLSLMGYPVRLYDIFTETVDAINAQGGIEVSGVVEGFGKPELVTTD LGAAVKGADAVMIVAPAVAHKTIKQCAPYVSAGQTYILHPGATCGALEFRHTLDECNCTPDLAVAET NSLIYACRAPKPGHAVIHGKDDLVLSTLPAKNEHVLGVLQEAFFQIVGGANVMQSSLGNNANIMHP APTLLNTSLIESRHDWYYYREGITPSIGAFVEELDKERVNLAQAFGLDMITIREWYRVAYGVEAETLSE AVKKNPAYAEIRGQKELRTRYLLEDIPTGLVPMIEMGKLMGVDTPRMELVARFGSSLLLEEDFFAKGRT LKNLGLAGMGKDDFLQYLQTVKALEHHHHHH

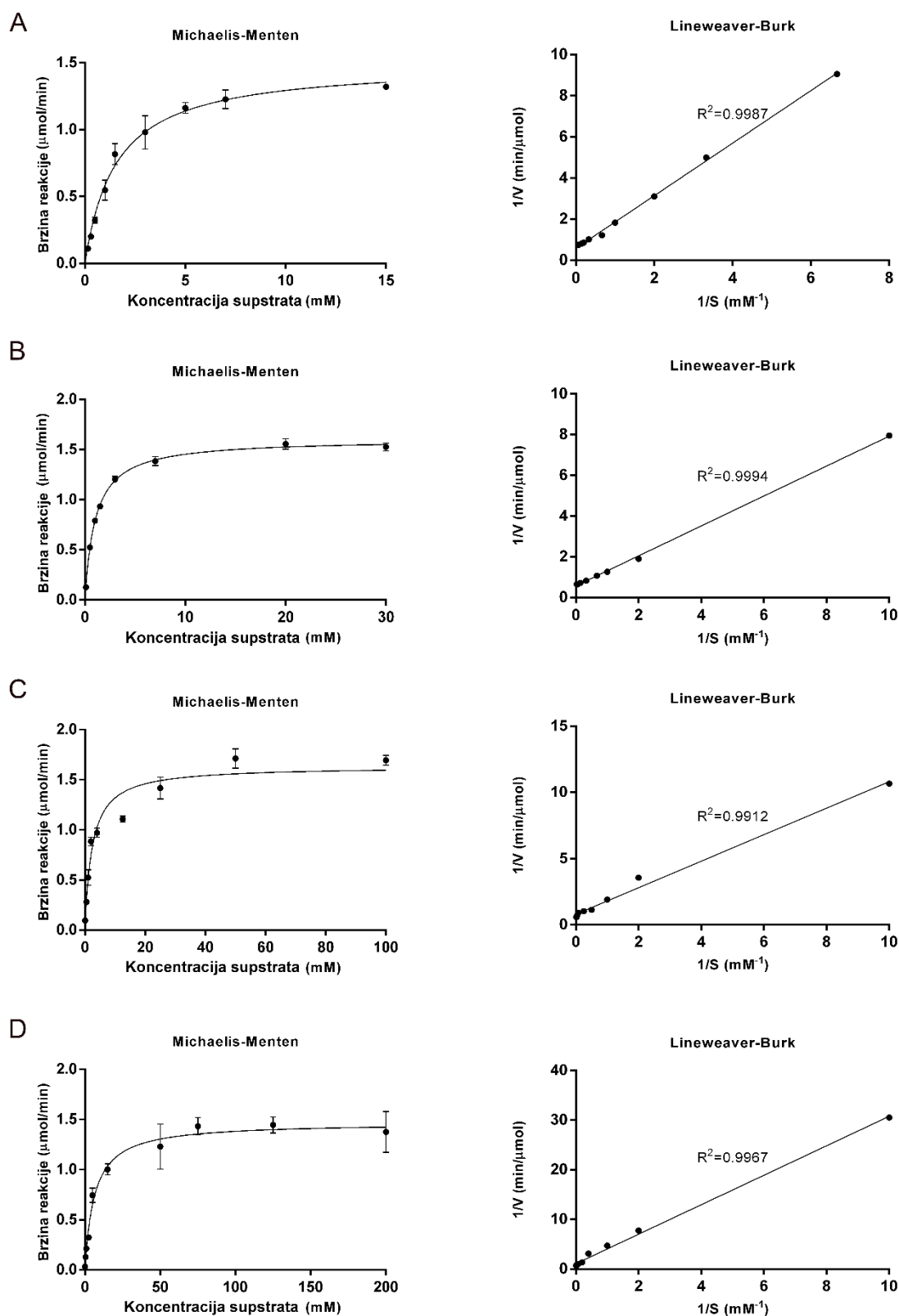
Slika 5. A) Kodon optimizovana nukleotidna sekvenca opin dehidrogenaze iz *Desulfohalobium retbaense*. B) Predviđena amino kiselinska sekvenca opin dehidrogenaze iz *Desulfohalobium retbaense*.



Slika 6. SDS-PAGE analiza opin dehidrogenaze eksprimirane u različitim sojevima *Escherichia coli*. Uzorci 1-2: ostaci ćelija i lizat *Escherichia coli* OVER ćelija; Uzorci 3-4: ostaci ćelija i lizat *Escherichia coli* BL21 (DE3) ćelija. MM-proteinski markeri; Uzorci 5-6: ostaci ćelija i lizat *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) ćelija.



Slika 7. Hromatogram prečišćavanja opin dehidrogenaze afinitetnom hromatografijom na Ni-NTA koloni.



Slika 8. Mihaelis-Menten i Lineweaver-Burk grafici za A) piruvat, B) L-alanin, C) L-valin, and D) L-serin.

Biografija

Nevena Kaličanin je rođena 05. jula 1988. godine u Beogradu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu „Vuk Karadžić“ i gimnaziju „Peta Beogradska gimnazija“. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, odsek Biohemija, upisuje 2007. godine. Diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 8,52 i ocenom 10 na završnom radu, a master studije na istom studijskom programu završava odbranom master teze 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,8 i ocenom 10 na master radu. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu upisuje školske 2014/15. godine pod rukovodstvom profesora dr Radivoja Prodanovića gde se bavi istraživanjima na temu upotrebe enzima u organskim sintezama, proteinskim inženjeringom i razvojem metoda visoko efikasne pretrage biblioteka mutiranih enzimskih varijanti. Položila je sve ispite na doktorskim studijama sa ocenom 10.

Od 01.03.2015. godine zaposlena je u okviru Centra za Hemiju, na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu. Tokom doktorskih studija bila je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Ispitivanje odnosa struktura-funkcija u ćelijskom zidu biljaka i izmene strukture zida enzimskim inženjeringom“ pod rukovodstvom dr Ksenije Radotić-Hadžić Manić i na projektu Fonda za nauku Republike Srbije pod nazivom „Small Molecule Anti-RNA-virus Therapy. Repurposing Iminosugars and Chloroquine Analogues Against COVID-19“, pod rukovodstvom akademika dr Radomira Saičića. Član je „Biohemijskog društva Srbije“ od 2017. godine.

Tokom doktorskih studija bila je angažovana kao saradnik u nastavi na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu na sledećim kursevima: Biohemija proteina i nukleinskih kiselina, Proteinski inženjering, Biohemija metabolizma i Biohemija.

Nevena je objavila i učestvovala u izradi sedam radova u međunarodnim časopisima, od kojih dva kao prvi autor i ima četiri saopštenja iz oblasti doktorske disertacije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Невена Каличанин

Број индекса ДБ 08/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синтеза аминокислотних деривата стероида рекомбинантним трансаминазама и дехидрогеназама

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Невена Каличанин
Број индекса _____ ДБ 08/2014
Студијски програм _____ Биохемија
Наслов рада _____ Синтеза аминокиселина деривата стероида рекомбинантним
трансаминазама и дехидрогеназама
Ментор _____ др Радивоје Продановић, редовни професор Хемијског
факултета Универзитета у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Синтеза аминокислотних деривата стероида рекомбинантним трансаминазама и дехидрогеназама

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

② Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве)

Потпис аутора

У Београду, _____

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.