



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biochemijos institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos II kurso studentė

Rasa Vitėnaitė

Magistro darbas

Rekombinantinių flavino reduktazių iš *Arthrobacter* spp. ir *Acinetobacter* sp. bakterijų sintezė ir charakterizavimas

Darbo vadovė:
dr. Jonita Stankevičiūtė

Vilnius, 2020

Rekombinantinių flavino reduktazių iš *Arthrobacter* spp. ir *Acinetobacter* sp. bakterijų sintezė ir charakterizavimas

Darbas atliktas

Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, Biochemijos institute

Darbą atliko: **Rasa Vitėnaitė**

.....

Darbo vadovė: **dr. Jonita Stankevičiūtė**

.....

TURINYS

SANTRUMPŲ IR SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Biokatalizė	8
1.1.1. Biokatalizės privalumai ir trūkumai	8
1.1.2. Biokatalizės taikymas pramonėje	10
1.2. Oksidoreduktazės	12
1.2.1. Monooksigenazės	14
1.2.1.1. Flavino monooksigenazės	16
1.2.1.2. Flavino monooksigenazių klasifikacija	18
1.3 Flavino reduktazės ir taikymas biokatalizėje	23
1.3.1 Charakterizuotos flavino reduktazės	24
1.3.2. Dvikomponenčių flavino monooksigenazių sistemų taikymas biokatalizėje	26
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI	28
2.1. Naudotos medžiagos	28
2.1.1. Reagentai	28
2.1.2. Prietaisai	29
2.1.3. Bakterijos	29
2.1.4. Plazmidiniai vektoriai	29
2.1.5. Terpės	30
2.2. Metodai	30
2.2.1. Plazmidinės DNR skyrimas	30
2.2.2. Elektrokompentinių ląstelių paruošimas	31
2.2.3. Elektroporacija	31
2.2.4. Rekombinantinių baltymų sintezė ir sąlygų optimizavimas	31
2.2.5. Beląstelių ekstraktų ruošimas	32
2.2.6. Fermentų gryninimas ir dializė	32
2.2.7. Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje (NDS-PAGE) denatūruojančiomis sąlygomis	33
2.2.8. Baltymų koncentracijos nustatymas	33
2.2.9. Flavino reduktazių charakterizavimo tyrimai	34
2.2.9.1 Substratinis specifiskumas ir koncentracijos įtaka fermentiniam aktyvumui	34
2.2.9.2 Flavino reduktazių termotabilumo įvertinimas	34
2.2.9.3. Flavino reduktazių aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros	35

2.2.9.4. Buferinio tirpalo prigimties ir pH įtakos flavino reduktazių aktyvumui nustatymas	35
2.2.9.5. Išgrynintų rekombinantinių flavino reduktazių priklausomybė nuo stabilizatorių ir laikymo sąlygų	35
2.2.9.6. Flavino reduktazių fermentinio aktyvumo ir kinetinių parametrų nustatymas ..	35
2.3. Kompiuteriniai flavino reduktazių sekų analizės metodai	36
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	37
3.1. Tyrimo objektai	37
3.2. Bakterinių flavino reduktazių bioinformatinė analizė	38
3.3. Sintezės parametrų optimizavimas	41
3.3.1 Rekombinantinių baltymų sintezės priklausomybė nuo temperatūros ir induktoriaus koncentracijos.....	41
3.3.2 Trukmės po indukcijos įtaka tirpaus baltymo kiekiui	44
3.3.3. Rekombinantinių flavino reduktazių HpyE, PyrE ir IifD gryninimas.....	45
3.4. Rekombinantinių flavino reduktazių biocheminis charakterizavimas.....	47
3.4.1 HpyE, PyrE ir IifD substratinio specifiškumo nustatymas.....	47
3.4.2. Flavino reduktazių aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros.....	52
3.4.3. Rekombinantinių HpyE, PyrE ir IifD termostabilumo įvertinimas	53
3.4.4. Rekombinantinių flavino reduktazių aktyvumo ir stabilumo priklausomybė nuo buferinio tirpalo prigimties ir pH.....	55
3.4.5. Fermentų stabilumo ir aktyvumo priklausomybė nuo stabilizatoriaus koncentracijos ir laikymo sąlygų	57
3.5. Numatyti eksperimentai	59
3.6. Rezultatų aptarimas	60
IŠVADOS.....	62
PADĖKA.....	63
SANTRAUKA.....	64
SUMMARY	65
LITERATŪROS ŠALTINIAI.....	66

SANTRUMPŲ IR SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS

Å	– RMSD matavimo vienetas Angstreimas (10^{-10} m)
AA	– akrilamidas
APS	– amonio persulfatas
BLAST	– palyginių paieškos programa (angl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
FAD	– flavinadenindinukleotidas
FMN	– flavinmononukleotidas
FMO	– flavino monooksigenazė
HPAH	– 4-hidroksifenilacetato-3-hidroksilazė
IMAC	– imobilizuotų metalo jonų giminingumo chromatografija (angl. <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>)
IPTG	– izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozidas
LB	– Luria-Bertani bakterijų auginimo terpė
NAD⁺	– nikotinamido adenindinukleotidas
NADP⁺	– nikotinamido adenindinukleotido fosfatas
NCBI	– JAV nacionalinis biotechnologinės informacijos centras (angl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NDS	– natrio dodecilsulfatas
NDS-PAGE	– baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis
PAAG	– poliakrilamidinis gelis
PDB ID	– baltymų duomenų bazės identifikavimo numeris (angl. <i>Protein Data Bank Identification</i>)
RMSD	– atominės padėties vidutinis kvadratinis nuokrypis
TEMED	– tetrametiletilendiaminas
Tris	– 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

IVADAS

Biokatalizė yra kai kurių seniausių žmonėms žinomų cheminių virsmų pagrindas. Fermentų ar visų ląstelių pritaikymas šimtmečius yra siejamas su gėrimų (vyno, alaus) ir maisto (sūrio, kepinų) pramonėmis. XX a. antroje pusėje biokatalizė buvo pradėta vertinti kaip potencialus sintetinių junginių gamybos kelias, o 1970-aisiais pradėjo populiarėti hidrolizinių fermentų ir oksidoreduktazių panaudojimas chiralinių junginių sintezei (Tathe et al., 2011). Šiuo metu prieinamas žymiai platesnis biokatalizatorių spektras, o biokatalizė plačiai taikoma farmacijos, medicinos, žemės ūkio, medienos, popieriaus, tekstilės, maisto bei gėrimų pramonėje (Paul et al., 2018). Dažnai biologinės alternatyvos yra specifiskesnės ir ekonomiškesnės už cheminius katalizatorius, bet, nepaisant šių pranašumų, iki šiol stinga efektyvią katalizę vykdančių fermentų (Finnigan et al., 2017).

Daugelyje biologinių procesų, tokių kaip natūralių ir antropogeninių junginių katabolizmas, vitaminų ar antibiotikų biosintezė, dalyvauja nuo flavino priklausomos monooksigenazės. Jos katalizuoja vieno molekulinio deguonies atomo inkorporavimą į substratą, o kitas deguonies atomas yra redukuojamas iki vandens (Huijbers et al. 2014). Per pastaruosius kelis dešimtmečius buvo rasta nemažai reaktyvių ir selektyvių dvikomponenčių flavino monooksigenazių sistemų, kurios parodė platų taikymo sričių diapazoną (Maenpuen et al., 2019). Tokio tipo monooksigenazės katalizuoja hidroksilinimo, epoksidacijos, halogeninimo, sieros pašalinimo reakcijas. Jas siekiama pritaikyti farmacinių komponentų, tiksliosios chemijos ir žemės ūkio chemijos produktų gamyboje (Ainsley et al., 2018; Gray et al., 2003; Maenpuen et al., 2019; Panke et al., 2002). Svarbu paminėti, kad dvikomponentėms monooksigenazėms yra reikalingas nuolatinis aprūpinimas redukuota flavino forma. Tai užtikrina antras dvikomponenčių flavino monooksigenazių sistemos komponentas – flavino reduktazė. Šis fermentas laikomas pagalbiniu. Siekiant efektyvios katalizės, monooksigenazė turi būti tinkamai suderinta su flavino reduktaze. Nepaisant šių pagalbinių fermentų svarbos, pastebima, kad išsamiai charakterizuotų flavino reduktazių yra mažai. Rinkoje išlieka poreikis aktyvesnių, stabilesnių ir reakcijos greičio neribojančių tokio tipo fermentų. Gausesnės detalės biocheminiai flavino reduktazių charakterizavimai kartu su katalizės reakcijų tyrimais leistų geriau suvokti šių fermentų struktūrą ir savybes, o sintetinės chemijos mokslininkai turėtų galimybę šiuos katalizatorius panaudoti naujose reakcijose ir juos integruoti į kompleksines biokatalizės kaskadas.

Siekiant prisidėti prie biokatalizės problemų, susijusių su dvikomponenčių flavino monooksigenazių sistemomis, sprendimo, **šio darbo tikslas** buvo susintetinti rekombinantines flavino reduktazes iš *Arthrobacter* spp. ir *Acinetobacter* sp. bakterijų ir atlikti jų biocheminį charakterizavimą.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti rekombinantinių HpyE, PyrE ir IifD flavino reduktazių bioinformatinę analizę palyginant su struktūriniais homologais.
2. Nustatyti optimalias sąlygas rekombinantinių flavino reduktazių HpyE iš *Arthrobacter* sp. PY22, PyrE iš *Arthrobacter* sp. 68b ir IifD iš *Acinetobacter* sp. O153 sintezei *E.coli* BL21 (DE3) bakterijose.
3. Atlikti biocheminį HpyE, PyrE ir IifD flavino reduktazių charakterizavimą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Biokatalizė

Biokatalizė yra cheminis procesas, kurio metu fermentai arba ląstelės katalizuoja organinių junginių biotransformacijas (Tramper, 1996). XX a. antroje pusėje biokatalizė buvo pradėta vertinti kaip potencialus nenatūralių ar sintetinių junginių gamybos kelias. 1970 – aisiais pradėjo populiarėti hidrolizinių fermentų (pvz., lipazių, peptidazių) ir oksidoreduktazių (pvz., alkoholio dehidrogenazių) panaudojimas chiralinių statybinių elementų sintezei, ypač farmacijos pramonėje, kur prioritetas buvo galutinio produkto stereocheminis grynumas. Tik 1990 – 2000 m. įvykę reikšmingi pokyčiai leido žymiai platesniam fermentų spektrui tapti prieinamu ir paskatino mokslininkus fermentus naudoti organinės chemijos reakcijoms. Genų klonavimas, ekspresija ir manipuliavimas lėmė sumažėjusį laukinio tipo fermentų naudojimą, o baltymų inžinerijos metodai tapo galinga fermentų savybių optimizavimo technologija, ypač pagerinusia stabilumą, stereoselektyvumą ir katalizinį aktyvumą. Dėl sekvenuotų genomų padaugėjo baltymų sekų, kurias galima panaudoti kaip pagrindą naujiems fermentams atrasti (Turner ir Humphreys, 2018).

Šiandien biokatalizatoriai vis dažniau pasirenkami kaip alternatyva cheminei katalizei, ypač tais atvejais, kai svarbu pasiekti tam tikro tipo selektyvumą (pvz., stereo-, regio- ar chemo). Taip pat pastebėta, kad cheminiuose procesuose efektyviai naudojant biokatalizatorius reikšmingai sumažėja gamybiniai kaštai (Chapman et al., 2018; Turner ir Humphreys, 2018).

Biokatalizė šiuo metu plačiai taikoma farmacijos, medicinos, žemės ūkio, medienos, popieriaus, tekstilės, maisto ir gėrimų pramonėje (Bommarius ir Riebel, 2005; de Gonzalo ir Domínguez de Maria, 2018; Paul et al., 2018).

1.1.1. Biokatalizės privalumai ir trūkumai

Ilgus metus tyrėjai cheminėms transformacijoms naudojo ląsteles arba fermentus, tačiau stabilumo stoka, siauras substratinis specifiškumas, nedidelis egzistuojančių fermentų kiekis bei reakcijų sąlygų apribojimai išstūmė biokatalizę ir ji atsidūrė organinės sintezės šešėlyje. Anksčiau daugelį fermentų buvo galima įsigyti tik nedideliais kiekiais ir labai brangiai, pvz., išgaunant iš gyvūninio ar augalinio audinio, tačiau dabar jie lengvai gali būti sintetinami dideliais kiekiais standartinėse raiškos sistemose, pavyzdžiui, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus* ar *Bacillus* genčių bakterijose (de Souza et al., 2017), o fermentų įsigijimas ir naudojimas tapo toks pats paprastas kaip ir bet kurio kito cheminio reagento (Drauz et al., 2012). Rekombinantinė DNR technologija, leidžianti efektyviau gaminti

ir tikslingai derinti atskirus fermentus, paskatino naujų fermentų tyrimų proveržį, o didesnio biokatalizatorių stabilumo linkme plėtojamas procesas lėmė, kad biokatalizės rodikliai smarkiai pagerėjo (Bommarius ir Riebel, 2005; Drauz et al., 2012).

Pramoninėje gamyboje pagrindiniai veiksniai yra proceso kelias į galutinį produktą ir produkto atskyrimas nuo papildomų teršalų. Palyginus su chemine katalize, biokatalizė turi reikšmingų privalumų: fermentai reakcijas vykdo švelnesnėmis sąlygomis, pagreitina reakciją nepakeisdami reakcijos termodinamikos ir yra labai selektyvūs substrato, rišamųjų vietų ir funkcinių grupių, kurios yra būtinos cheminėje sintezėje, atžvilgiu. Biokatalizatoriai taip pat sumažina pašalinių reakcijų galimybę, sutrumpina sintezės kelią ir skatina efektyvesnius bei ekologiškesnius gamybos procesus (Paul et al., 2018).

Selektyvumas yra bene patraukliausia fermentų, naudojamų organinėje sintezėje, savybė (Abdelraheem et al., 2019; Bommarius ir Riebel, 2005; Drauz et al., 2012). Kai fermentai katalizuoja tam tikro substrato transformaciją, jie geba atskirti tapačių funkcinių grupių vietas (regioselektyvumas), skirtingas funkcines grupes (chemoselektyvumas) ir stereoizomerus arba prochiralinių / mezo junginių orientaciją (stereoselektyvumas). Šį selektyvumą lemia skirtingos pereinamųjų būsenų energijos, kurias fermentas suformuoja su kiekvienu iš skirtingų substratų arba tam tikro substrato orientacija per tuos etapus. Kuo didesnis šis energijos skirtumas, tuo geresnis proceso selektyvumas (Turner ir Humphreys, 2018). Ši savybė ypač svarbi biokatalizatorius naudojant pažangių farmacinių sintonų sintezėje, nes reguliavimo agentūros reikalauja kiekvienos priemonės atskirų toksikologinių tyrimų, kurios sudėtyje yra daugiau kaip 1 % (Roper ir Grogan, 2016).

Dar vienas biokatalizatorių privalumas yra jų gebėjimas katalizę vykdyti nesudėtingomis reakcijos sąlygomis. Fermentinės reakcijos paprastai vyksta vandenyje, esant žemai temperatūrai ir atmosferos slėgiui, dažnai nereikalaujant funkcinių grupių aktyvavimo ar apsaugos žingsnių (Sheldon ir Brady, 2018). Paprastai fermentai veikia esant neutraliam arba silpnai šarminiam / rūgštiniam pH intervalui, tarp 5 ir 10, nors pasitaiko išimčių (Drauz et al., 2012). Biokatalizinės reakcijos gali būti vykdomos vandeninėje aplinkoje, išvengiant tirpiklių naudojimo ir pašalinimo, taip sumažinant žalą aplinkai ir sveikatai. Visgi, biokatalizės reakcijos dvifazėse sistemose ir gryname organiniame tirpiklyje sudaro sąlygas didesniai substrato įkrovimui, užkerta kelią vandenyje jautrių junginių hidrolizei ir keičia daugelio reakcijų termodinaminę pusiausvyrą. Pastaraisiais dešimtmečiais padaugėjo fermentų, naudojamų kartu su organiniais tirpikliais. Vis daugiau inžineriniu būdu gautų fermentų gali veikti tiek organiniuose tirpikliuose, tiek vandeninėje aplinkoje, išlaikant jų aktyvumą ir selektyvumą nurodytų substratų atžvilgiu (Abdelraheem et al., 2019; Paul et al., 2018).

Fermentams teikiama pirmenybė, kai pagrindinė problema yra reakcijos specifiškumas, kai katalizatoriai turi būti aktyvūs švelniomis sąlygomis ir kai taikomi griežti aplinkos taršos ribojimai (Illanes, 2008). Tačiau, stabilumo problemos ir nepakankamas gerai apibūdintų, paruoštų naudoti, biokatalizatorių skaičius vis dar yra nemažos kliūtys ribojančios platų biokatalizatorių taikymą (de Gonzalo ir Domínguez de Maria, 2018; Williams ir Hall, 2008). Dažniausiai nurodomi šiandieninės biokatalizės trūkumai:

1. Ribotas katalizuojamų reakcijų skaičius;
2. Fermentai nepasiekia aktyvumo ir (arba) enantioselektyvumo standartų, reikalingų vaistų gamyboje;
3. Fermentams dažnai reikia brangių kofaktorių;
4. Fermentai gali pasiekti didžiausią aktyvumą tik su nedidele substrato koncentracija ir nėra tinkami pramoninėms gamybos sąlygoms;
5. Fermentus sunku naudoti, jie yra nestabilūs;

Trumpai aptariant naudojimo trūkumus, svarbu paminėti, kad daugeliu atvejų reikalingi kofaktoriai ir tai gali būti sąlyginai brangūs junginiai. Šiuo metu yra daug biokatalizės pavyzdžių, kur naudojant didelio masto kofaktorių regeneravimo sistemas labai sumažinamos šio komponento sąnaudos. Mažai tikėtina, kad dėl gamtinės evoliucijos vystytusi fermentų stabilumas darbui organinių tirpiklių aplinkoje, esant aukštai temperatūrai ar nefiziologinėms pH vertėms (išskyrus kai kurių ekstremofilinių mikroorganizmų atvejus). Norint pašalinti šiuos ribojančius veiksnius, vykdomi kryptingos evoliucijos projektai, kai į fermentą įtraukiant specifinius požymius, suteikiamos norimos charakteristikos. Kryptinga evoliucija tampa įprasta praktika, leidžiančia lengvai padidinti tikslinio fermento reaktyvumą (de Gonzalo ir Domínguez de Maria, 2018; Illanes, 2008).

1.1.2. Biokatalizės taikymas pramonėje

Biokatalizė šiuo metu apibūdinama kaip kylanti mokslo sritis ir sulaukia vis didesnio populiarumo. Susidomėjimo priežastis gali būti susijusi su gilesniu supratimu apie gamtos natūralių išteklių išekvojimą ir didžiulį poreikį juos saugoti. Tai paskatino pramonės įmones suvokti savo indėlį į aplinkos taršą ir pakreipti gamybinius procesus ekologiškesniu ir švaresniu keliu (de Gonzalo ir Domínguez de Maria, 2018).

Kaip jau minėta anksčiau, fermentų selektyvumas yra pagrindinis jų taikymo pranašumas, kurį įrodo epichlorhidrino, etilo-3-hidroksibutirato fermentinės sintezės ir gliukozės izomerizavimasis į fruktozę. Taip pat ir farmacinių ingredientų, tokių kaip simvastatinas, sitagliptinas ir pusiau sintetiniai cefalosporinai, sintezė. Visose šiose reakcijose

regio- ir enantioselektyvumą suteikia trimatės fermentų struktūros, dėl kurių gaunami optiškai grynai junginiai ir izomerai. Verta pažymėti, kad šios reakcijos negali būti atliktos cheminiais metodais (Abdelraheem et al., 2019). Geras biokatalizės įtakos vaistų gamybai pavyzdys yra pregabalino sintezė. 2007 m. kompanija „Pfizer“ perėjo prie lipazės katalizuojamo hidrolizės proceso. Dėl šio pokyčio organinio tirpiklio sunaudojimas sumažėjo 92 %, organinio katalizatoriaus (Raney nikelio) – 87 %, o pradinės medžiagos sąnaudos sumažėjo 50 %. Pregabalino E koeficientas (atliekų masės santykis produkto vienetui) buvo sumažintas nuo 87 iki 17,64 (de Gonzalo ir Domínguez de Maria, 2018).

Dažniausiai naudojami fermentai yra hidrolazės. Jos naudojamos kaip proceso katalizatoriai ar priedai, maisto, pašarų, ploviklių, odos ir tekstilės pramonėje. Nepaisant įspūdingo biokatalizės progreso, jie vis dar sudaro didžiąją dalį fermentų rinkos. Svarbiausios fermentų taikymo sritys yra apibendrintos 1.1 lentelėje.

Peptidazės sudaro didžiausią pramoninių fermentų kategoriją, jų taikymas apima svarbius pramonės sektorius, tokius kaip maisto ir gėrimų gamyba, plovikliai, oda ir farmacija. Fermentų panaudojimas celiuliozės ir popieriaus pramonėje yra taip pat labai aktualus, ypač atsižvelgiant į tai, kad jai kelia grėsmę aplinkos apsaugos teisės aktai. Šiuo metu medienos plaušienos balinime naudojamos hemiceliulazės, siekiant iš dalies pakeisti balinimo procedūras, kurių pagrindą sudaro chloras. Ligninazės turi didelį potencialą tiek balinant medieną, tiek plaušieną, o celiulazės plačiai naudojamos maisto, pašarų, ploviklių ir tekstilės pramonėje bei kaip virškinimo pagalbinė priemonė farmacijoje. Celiulazės yra naudojamos atskirai arba kartu su pektinazėmis ir hemiceliulazėmis sultims, aliejui ir agarui ekstrahuoti, džinsinio audinio ir medvilninio audinio biologiniam apdirbimui (Illanes, 2008).

Remiantis paskelbtomis publikacijomis, apžvelgiančiomis biokatalizės taikymą pramonėje, akivaizdu, kad dauguma iki šiol pramoniniu būdu įgyvendintų biokatalizinių procesų produktų yra chiraliniai junginiai. Tačiau biokatalizė yra paklausi ne tik didelės vertės, nedidelio tūrio produktų gamyboje, bet ir paviršiaus aktyviųjų medžiagų, biriųjų cheminių medžiagų ir biokuro gamyboje (Drauz et al., 2012). Be pramoninio taikymo, fermentai vis labiau naudojami cheminėje ir klinikinėje analizėje, biomedicinoje ir moksliniuose tyrimuose (Chapman et al., 2018; Illanes, 2008).

1.1 lentelė. Fermentų pramoninio taikymo sritys (lentelė modifikuota pagal: Chapman et al., 2018; de Gonzalo ir Domínguez de Maria 2018; Illanes 2008).

Pramonės šaka	Fermentas	Taikymas
Maisto	Amilazės	Krakmolo hidrolizė
	Peptidazės	Sūrio ir mėsos perdirbimas
	Pektinazės	Sulčių nuskaidrinimas
	Lipazės	Riebalų modifikavimas
	Gliukozės izomerazės	Fruktozės gamyba
Farmacijos	Penicilino acilazės	Penicilino darinių gamyba
	Hidrolazės: lipazės, peptidazės	Optiškai gryną junginių gamyba
	Oksidoreduktazės	
	Transaminazės	
	Liazės	
Tekstilės	Amilazės	Krakmolo pašalinimas
	Celiulazės	Džinsinio audinio plovimas
	Pektinazės	Lino ir kitų pluoštų apdorojimas
	Peptidazės	Šilko apdirbimas
	Lakazės	Džinsu balinimas
	Katalazės	Perteklinio vandenilio peroksido pašalinimas
Medienos ir popieriaus	Hemicelulazės	Pagerintas balinimas
	Celiulazės	Popieriaus gamyba
	Lipazės	Piko komponentų pašalinimas
	Celiulazės / hemiceliulazės	Perdirbtų pluoštų dažai, balinimas, pluošto apdirbimas
	Lakazės	
Ploviklių	Peptidazės, Lipazė, amilazė, celiulazė	Dėmių pašalinimas, riebalų ir aliejaus pašalinimas, spalvos išsaugojimas
Biokuro	Lipazė, celiulazė, ksilanazė	Riebalų rūgščių metilesterių gamyba, lignoceliulotinės medžiagos skilimas bioetanolio gamybai

Fermentus galima rasti beveik visur, pradedant aukštos pridėtinės vertės produktų gamyba ir baigiant plastiko atliekų skaidymu. Dedama daug pastangų, kad šiuo metu naudojami brangūs ir dažnai toksiški cheminiai katalizatoriai, tokie kaip pereinamieji metalai, būtų pakeisti fermentiniais. Prognozuojama, kad iki 2024 m. pasaulinė fermentų rinka padidės nuo 7 iki 10 milijardų dolerių (Abdelraheem et al., 2019).

1.2. Oksidoreduktazės

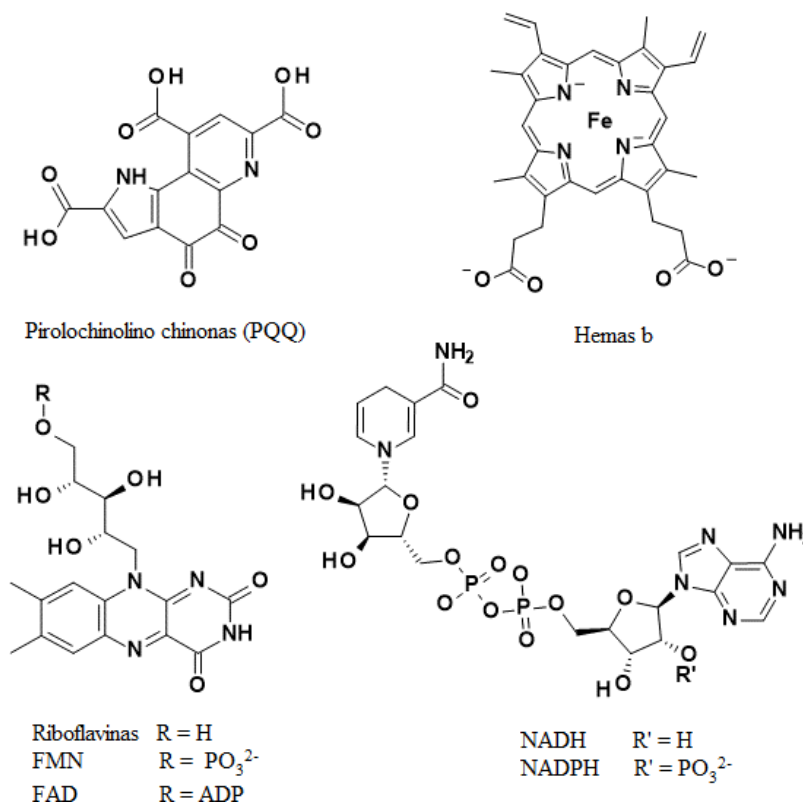
Unikalios fermentų, kaip kataliziškai aktyvių baltymų, funkcijas lemia jų sudėtingos trimatės struktūros ir juose integruotas aktyvus centras. Tai leidžia labai specifiskai atpažinti konkrečius substratus, todėl gaunamas aukštas selektyvumas. Fermentai paprastai klasifikuojami pagal reakcijų, kurias jie katalizuoja tipus ir nomenklatūros klasifikacijoje jie yra suskirstyti į septynias pagrindines klases, pagal fermentų komisijos numerius (EC), kurios pateiktos 1.2 lentelėje. Pirmosios šešios kategorijos nesikeitė daugelį metų, kol 2018 m. buvo pridėta nauja klasė - translokazės (EC7) (Tao et al., 2020). Akivaizdu, kad naujų fermentų paieškose ir jų savybių nustatyme slypi didelis potencialas, o žinios gautos iš fermentų

charakterizavimo yra reikšmingos norint pritaikyti juos tiek didelio masto, pramoniniuose procesuose, tiek labai specifinėse srityse. Fermentai, priklausantys 1 – 5 klasėms, pasirodė esantys labai veiksmingi katalizatoriai įvairiems organiniams sintetiniams virsmams, kurie taip pat tinkami pramoniniam naudojimui (Drauz et al., 2012; Paul et al., 2018).

1.2 lentelė. Fermentų klasifikacija pagal katalizuojamų reakcijų tipą (modifikuota pagal Drauz et al., 2012; Tao et al., 2020).

Fermentų klasė	EC	Vykdomos reakcijos
Oksidoreduktazės	1	C = O ir C = C redukcija; redukcinis C = O amininimas; C - H, C = C, C - N ir C - O oksidacija; kofaktoriaus redukcija /oksidacija;
Transferazės	2	Amino, acilo, fosforilo, metilo, glikozilo, nitro ir sieros turinčių funkcinių grupių perkėlimas;
Hidrolazės	3	Esterių, amidų, laktonų, laktamų, epoksidų, nitrilų ir kt. skaidymas dalyvaujant vandens molekulėms, taip pat atvirkštinės reakcijos;
Liazės (sintazės)	4	Funkcinių grupių prijungimas prie dvigubo ryšio, tokių kaip C = C, C = N ir C = O, arba nehidrolizinis grupių atskėlimas susidarant dvigubam ryšiui;
Izomerazės	5	Izomerų transformacija (izomerizacijos);
Ligazės (sintetazės)	6	Sudėtinių junginių (analogiškai ligazėms) susidarymas, nuo ATP priklausomas procesas
Translokazės	7	Protonų, aminorūgščių, anijonų, katijonų translokacija

Biochemines reakcijas, kurių metu elektronai pernešami iš vienos molekulės į kitą, katalizuoja fermentai, vadinami oksidoreduktazėmis (Jones, 1981). Tam, kad paspartintų reakcijas, oksidoreduktazės dažnai naudoja organinius kofaktorius. Pasitaiko nuo kofaktoriaus nepriklausomų oksidoreduktazių, kurioms katalizinį aktyvumą užtikrina kelios aromatinų aminorūgščių liekanos aktyviajame centre (E. Ellis, 2002; Fetzner, 2002; Imhoff et al., 2003; Littlechild, 1999). Oksidoreduktazės, kurioms reikalingas kofaktorius, naudoja flavinus (FAD / FADH₂, FMN / FMNH₂), nikotinamido adenino dinukleotidus (NAD(P)⁺ / NAD(P)H), metalo jonus, hemo grupę arba pirolochinolino chinonus (PQQ) (Cirino ir Arnold, 2002; Xu, 2005) (1.1 pav.). Šie kofaktoriai jungiasi su fermentais, o giminingumas yra nM diapazone. Kai kurios oksidoreduktazės savo kofaktorius suriša kovalentiškai (Heuts et al., 2009). Pavyzdžiui, ištyrinėta gliukooligosacharido oksidazės (GOOX) kristalų struktūra iš *Acremonium rangeum* atskleidė, kad jo FAD kofaktorius yra bivalentiškai sujungtas su cisteino ir histidino liekanomis (Huang et al., 2005). Kai kofaktoriai yra tvirtai arba kovalentiškai sujungti su fermentu, juos galima laikyti prostetine grupe, t.y., jie sudaro nuolatinę fermento struktūros dalį. Mažesniu giminingumu pasižymintys kofaktoriai gali būti laikomi kosubstratais ir jie dažnai keliauja tarp skirtingų fermentų (pvz., NAD(P)H ar kofermentas A). Šie kofaktoriai yra vadinami kofermentais (Torres Pazmiño et al. 2010).



1.1 pav. Oksidoreduktazių kofaktoriai.

Atsižvelgiant į katalizuojamos reakcijos tipą, oksidoreduktazės buvo suskirstytos į 22 skirtingus EC poklasius. Bendresnę klasifikaciją, paremtą katalizuojamos reakcijos mechanizmu, pasiūlė Xu (Xu, 2005). Pagal ją fermentai buvo suskirstyti į keturis pogrupius: (I) oksidazės, (II) peroksidazės, (III) oksigenazės / hidrosilazės ir (IV) dehidrogenazės / reduktazės. Fermentai, priskiriami oksigenazėms, kai jie katalizuoja oksidacijos-redukcijos reakciją, deguonies atomą(-us) įterpiant į organinį substratą deguonies donoru naudojant molekulinį deguonį (O_2). Šį pogrupį dar galima suskirstyti į du tipus: monooksigenazes, kurios katalizuoja vieno deguonies atomo įterpimą į substratą, ir dioksenigenazes, kurios katalizuoja abiejų deguonies atomų įterpimą (Baker Dockrey ir Narayan, 2019).

1.2.1. Monooksigenazės

Kaip minėta anksčiau, monooksigenazės (EC 1.13.x.x ir EC 1.14.x.x) katalizuoja vieno deguonies atomo įterpimą į organinį substratą iš molekulinio deguonies. Tam, kad galėtų katalizuoti šią reakciją, monooksigenazės turi suaktyvinti molekulinį deguonį. O_2 yra labai stabili molekulė, todėl be aktyvacijos reakcija vykti negalėtų. Ši aktyvacija įvyksta perdavus elektronus molekuliniam deguoniui, po kurio gali įvykti organinio substrato oksigenazė. Susidarančio reaktyviojo deguonies tarpinio produkto tipas priklauso nuo to, koks yra kofaktorius (nors kai kuriais atvejais jo gali ir nebūti). Vidinės monooksigenazės elektronus

gauna iš paties substrato, tuo tarpu išorinės monooksigenazės priklauso nuo išorinių elektronų donorų, pvz., NAD(P)H (Torres Pazmiño et al. 2010).

Sėkmingai elektronų pernašai monooksigenazinėse reakcijose dažniausiai yra reikalingi kofaktoriai. Monooksigenazių kofaktoriai gali būti neorganiniai (metalo jonai), organiniai (flavinas, pterinas) arba metalo-organiniai (hemas, kobalaminas). Jie gali būti tvirtai prisijungę aktyviame centre (prostetinės grupės) arba dalyvauti kaip kofermentai. Priklausomai nuo katalizėje dalyvaujančio kofaktoriaus tipo monooksigenazės yra suskirstytos į 7 šeimas (Torres Pazmiño et al. 2010).

- 1) *Nuo hemo grupės priklausomos monooksigenazės*, dar vadinamos citochromo P450 monooksigenazėmis arba CYP, gali būti randamos daugelyje gyvybės formų. Tokie fermentai būdingi tiek eukariotams (žinduoliams, augalams, grybams), tiek bakterijoms (Nelson et al., 1996). Katalizuojamoje oksidacijos reakcijoje hemo kofaktorių galima redukuoti specifiniu elektronų donoru tik surišus substratą. Elektronai paprastai tiekiami per suderintą flavino reduktazę, kuri savo ruožtu priima elektronus iš NAD(P)H (van Berkel et al., 2006).
- 2) *Nuo flavino priklausomos monooksigenazės*. Šių fermentų naudojami flavinai FMN arba FAD yra stipriai surišti su fermentu (prostetinė grupė) arba veikia kaip kosubstratas (kofermentas). Nors buvo nustatyta ir vidinių, nuo flavino priklausomų monooksigenazių, dauguma šių fermentų yra išorinės monooksigenazės ir reikalauja NAD(P)H kaip pagalbinio kofermento (Fraaije ir van Berkel, 2006).
- 3) *Nuo vario priklausomos monooksigenazės* sudaro palyginus nedidelę fermentų šeimą, kuriai reikalingi vario jonai, kad jų substratai būtų hidroksilinti. Šiai šeimai priklausančių fermentų daugiausia rasta eukariotuose (Levin et al., 1960).
- 4) *Ne heminės nuo geležies priklausomos monooksigenazės* oksidaciniam aktyvumui užtikrinti naudoja du geležies atomus kaip kofaktorių. Šie fermentai taip pat vadinami bakterinėmis daugiakomponentėmis monooksigenazėmis (BMM). Jie katalizuoja hidroksilinimo, epoksidacijos reakcijas ir susideda iš trijų komponentų: monooksigenazės, reduktazės ir mažo reguliacinio baltymo (Leahy et al., 2003; Wallar ir Lipscomb, 1996).
- 5) *Nuo pterino priklausomos monooksigenazės*. Yra žinoma, kad šie fermentai hidroksilina fenilalanino, tirozino ir triptofano aromatinį žiedą. Nors kai kurie iš šių fermentų randami bakterijose, jie daugiausia yra eukariotų kilmės. Šios monooksigenazės prijungia vieną geležies atomą savo aktyviajame centre su dviem histidinais ir glutamatu, o kofermentu naudoja tetrahidrobiopteriną (BH₄) (Fitzpatrick, 1999).

- 6) *Nuo kofaktorių nepriklausomos monooksigenazės*. 1993 m. buvo išgryninta ir charakterizuota tetracenomicino F1 monooksigenazė (TcmH) iš *Streptomyces glaucens*. Įrodyta, kad šis fermentas yra nuo vidinio kofaktoriaus nepriklausanti monooksigenazė, nes jo veiklai reikia tik molekulinio deguonies, o substratas naudojamas kaip reduktorius. Be to, slopinimo tyrimai parodė, kad sulfhidrilo grupės ir histidino liekanos yra būtinos jo oksidaciniam aktyvumui (Shen ir Hutchinson, 1993). Naujų šios monooksigenazių šeimos narių radimas parodė, kad daugelis šių fermentų daugiausia randami *Streptomyces* gentyje.
- 7) *Kitos monooksigenazės*. 2005 m. buvo nustatyta, kad metiltransferazės homologas hidroksilina 15-demetoksi-ε-rodomicino C-10 anglies atomą. Nustatyta, kad ši *Streptomyces purpurascens* aklacinomicino 10-hidroksilazė į substratą įterpia deguonies atomą iš molekulinio deguonies. Stebėtinas faktas yra tai, kad šis fermentas kaip kofaktorių naudoja S-adenozil-L-metioniną, kuris įprastai būdingas metiltransferazėms (Jansson et al., 2005; Jansson et al., 2003).

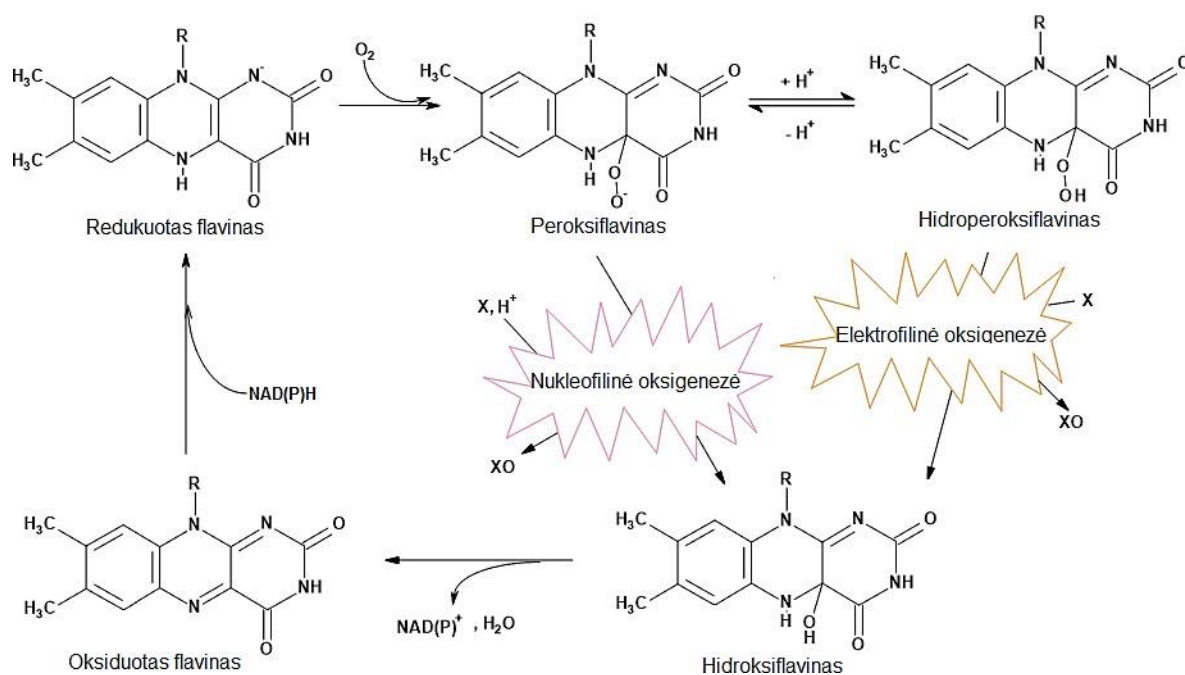
Dabartinis monooksigenazių pritaikymas iš esmės buvo apribotas natyvių reakcijų mechanizmais, tačiau vis geriau suvokdami šių fermentų struktūrą ir funkcijas, sintetinės chemijos mokslininkai turi galimybę šiuos katalizatorius panaudoti naujose reakcijose ir juos integruoti į kompleksines biokatalizės kaskadas (Baker Dockrey ir Narayan, 2019).

1.2.1.1. Flavino monooksigenazės

Nuo flavino priklausomos monooksigenazės dalyvauja daugelyje biologinių procesų. Šie fermentai vaidina svarbų vaidmenį natūralių ir antropogeninių junginių katabolizme, o kiti padeda atlikti hormonų, vitaminų ir antibiotikų biosintezę arba padeda įgyvendinti gynybos strategijas. Flavino monooksigenazės katalizuoja vieno molekulinio deguonies atomo inkorporavimą į substratą, o kitas deguonies atomas yra redukuojamas iki vandens (Huijbers et al., 2014).

Reakcijos tarp O₂ ir anglies organiniuose junginiuose yra negalimos dėl skirtingų kvantinių būsenų (angl. *spin-forbidden reactions*). Nepaisant to, daugybė fermentų rado būdą, kaip suaktyvinti molekulinį deguonį ir panaudoti jį kaip substratą oksidacijoje. Norėdami sugeneruoti molekulinį deguonį pernešančią formą, fermentai naudoja pereinamuosius metalus, kurie gali būti pririšti prie organinio kofaktoriaus, pvz., hemo grupė P450 monooksigenazėje. Tačiau flavino monooksigenazės, oksigenezės reakcijų metu, naudoja išimtinai tik organinį kofaktorių (van Berkel et al., 2006).

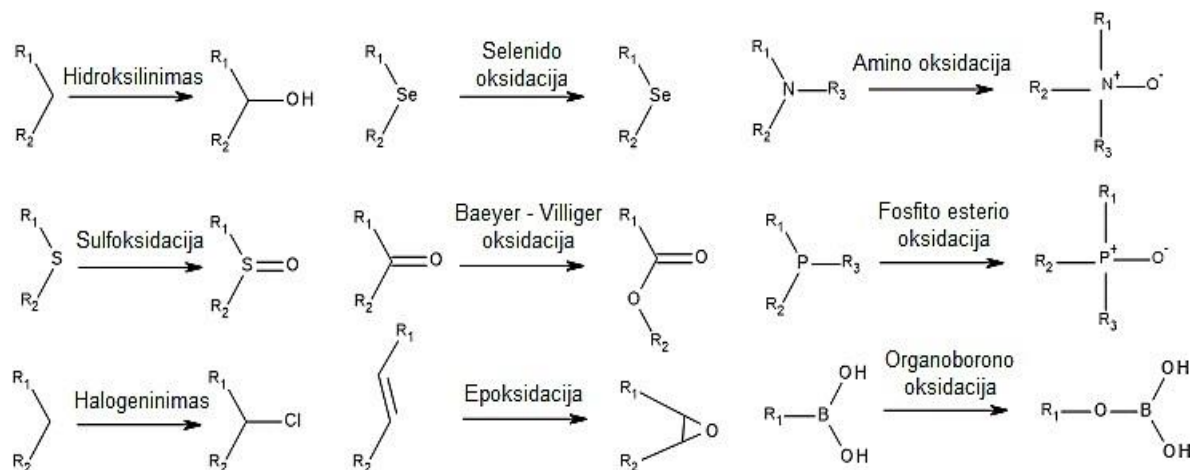
Tam, kad sureaguotų su molekulinio deguonimi ir jį panaudotų kaip substratą, flavino kofaktorius turi būti redukuotas (Massey, 1994). Vienam elektronui pereinant iš redukuoto flavino į deguonį, susidaro superoksido ir flavino radikalo kompleksas, o elektronų sukinio inversija (angl. *spin-inversion*) lemia redukuoto deguonies susidarymą (Ghisla ir Massey, 1989). Veikiant daugeliui flavino monooksigenazių susidaro kovalentinis aduktas tarp flavino C(4a) ir molekulinio deguonies. Jį stabilizavus, gaunamas reaktyvusis C(4a) – hidroperoksiflavinas (1.2 pav.). Toks peroksiflavinas yra nestabilus ir paprastai suyra iki vandenilio peroksido ir oksiduoto flavino. Vis dėlto, flavino monooksigenazės gali stabilizuoti šį junginį taip, kad jis galėtų oksiduoti substratą (Entsch ir van Berkel, 1995; Holtmann ir Hollmann, 2016). Priklausomai nuo peroksiflavino protonizacijos būsenos, substratas yra veikiamas nukleofiliškai arba elektrofiliškai. Galiausiai, vienas molekulinio deguonies atomas prijungiamas prie substrato, o kitas yra redukuojamas iki vandens (1.2 pav.).



1.2 pav. Bendras deguonies aktyvavimo mechanizmas flavino monooksigenazėse (pagal Huijbers et al., 2014).

Oksidacinių flavofermentų tyrimai per pastaruosius dešimtmečius parodė, kad šie fermentai pasižymi stulbinama katalizuojamų reakcijų įvairove. Toks molekulinio deguonies naudojimo lankstumas skirtingoms reakcijoms, išlaikant aukštą enantio- ir (arba) regioselektyvumo laipsnį iki šiol nebuvo pastebėtas jokioje kitoje fermentų šeimoje. Oksigenazės reakcijos, kurias katalizuoja flavino monooksigenazės yra hidroksilinimas, epoksidacija, Baeyer – Villiger oksidacija, sulfoksidacija ir kt. (1.3 pav.). Reakcijos specifiškumas ir selektyvumas priklauso nuo kiekvienos monooksigenazės aktyviojo centro formos ir cheminės prigimties (van Berkel et al., 2006).

Flavino monooksigenazių katalizuojamų reakcijų diapazoną atskleidžia įvairūs fiziologiniai procesai, kuriuose dalyvauja šie fermentai. Jie svarbūs baltymų susilankstymo reguliavime (Suh et al., 1999), dalyvauja ksenobiotikų metabolizme žmonėse (Ziegler, 1990), yra reikšmingi toksinų biosintezėje (Keller et al., 2000), vaistų aktyvinimo procesuose (DeBarber et al., 2000), augalų augimo reguliavime (Zhao et al., 2001) ir sutinkami teršalų skaidyme mikroorganizmais (Wieser et al., 1997).



1.3 pav. Reakcijos katalizuojamos flavino monooksigenazių (Huijbers et al., 2014).

Pastaruoju metu buvo atrasta daug naujų flavino monooksigenazių. Šie baltymai ne tik kelia pagrindinius enzimologinius klausimus, bet ir patraukia farmacijos bei smulkiosios chemijos pramonės atstovų susidomėjimą, atsižvelgiant į jų, kaip regio- ir enantioselektyvių biokatalizatorių, svarbą (Huijbers et al., 2014).

1.2.1.2. Flavino monooksigenazių klasifikacija

Remiantis Tarptautinės biochemijos ir molekulinės biologijos sąjungos nomenklatūros komiteto rekomendacijomis, flavino monooksigenazės priklauso oksidoreduktazių poklasiams 1.13 ir 1.14. EC 1.13 – tai oksidoreduktazės, veikiančios pavienius donorus inkorporuojant molekulinį deguonį (oksigenazės), o EC 1.14 – oksidoreduktazės, veikiančios porinius donorus (McDonald, 2019). Po to, kai 1957 m. buvo išgryninta laktato 2-monooksigenazė (Sutton, 1957), o 1965 m. — salicilato 1-monooksigenazė, (Yamamoto et al., 1965), buvo aprašyta mažiausiai 130 flavino monooksigenazių. Jos sudaro didžiausią flavofermentų šeimą (MacHeroux et al., 2011). 2006 m. buvo pasiūlyta flavino monooksigenazes suskirstyti į šešias grupes (van Berkel et al., 2006), o padaugėjus informacijos apie vidines flavino monooksigenazes, dabar šie nariai papildė klasifikacijos narius iki 8:

- 1) A – B grupės monooksigenazės. Tai vienkomponenčiai fermentai, kurie priklauso nuo NAD(P)H kaip išorinio elektronų donoro.

- 2) C – F grupės monooksigenazės. Tai dvikomponenčiai fermentai, kuriems reikia pagalbinio baltymo — flavino reduktazės. Jos vaidmuo yra tiekti redukuotą flaviną, o monooksigenazė flaviną sunaudoja molekulinio deguonies aktyvavimui.
- 3) G – H, tai vidinės flavoproteinų monooksigenazės, kurios redukuoja flavino kofaktorių per substrato oksidaciją.

Flavino monooksigenazių klasifikacija grindžiama struktūros ypatybėmis, baltymų sekos motyvais, elektronų donoru ir oksigenazinės reakcijos tipu (van Berkel et al., 2006). Kiekvienos flavino monooksigenazių grupės apžvalga pateikta 1.3 lentelėje.

1.3 lentelė. Flavino monooksigenazių klasifikacija (Huijbers et al., 2014).

Grupė	Kofaktorius	Elektronų donoras	Baltymų sankloda	Reakcija	Prototipas
A	FAD	NAD(P)H	Rosmano (GR-2)	Hidroksilinimas Sulfoksidacija	<i>p</i> -Hidroksibenzoato 3-hidroksilazė
B	FAD	NAD(P)H	Rosmano (FMO)	Baeyer–Villiger oksidacija Heteroatomų oksigenazė N-Hidroksilinimas	Cikloheksanono monooksigenazė Dimetilalanilino monooksigenazė L-Ornitino monooksigenazė
C	FMN	FMNH ₂	TIM – statinė (liuciferazė)	Oksidacinis dekarboksilinimas Šviesos emisija Baeyer–Villiger oksidacija, epoksidacija Desulfurizacija, sulfoksidacija Hidroksilinimas	Indol-3-piruvato monooksigenazė Alkanalio monooksigenazė Diketokamfano monooksigenazė Alkansulfonato monooksigenazė Ilgos grandinės alkano monooksigenazė
D	FAD/FMN	FADH ₂ /FMNH ₂	Acyl-CoA dehidrogenazė	Hidroksilinimas N-Hidroksilinimas	<i>p</i> -Hidroksifenilacetato 3-hidroksilazė KijD3 cukraus <i>N</i> -oksigenazė
E	FAD	FADH ₂	Rosmano (GR-2)	Epoksidacija	Stireno monooksigenazė
F	FAD	FADH ₂	Rosmano (GR-2)	Halogeninimas	Triptofano 7-halogenazė
G	FAD	Substratas	Rosmano (MAO)	Oksidacinis dekarboksilinimas	Triptofano 2-monooksigenazė
H	FMN	Substratas	TIM – statinė	Oksidacinis dekarboksilinimas Oksidacinė denitracija	Laktato 2-monooksigenazė Nitronato monooksigenazė

GR, glutationo reduktazė; FMO, flavino monooksigenazė; MAO, monoaminooksidazė;

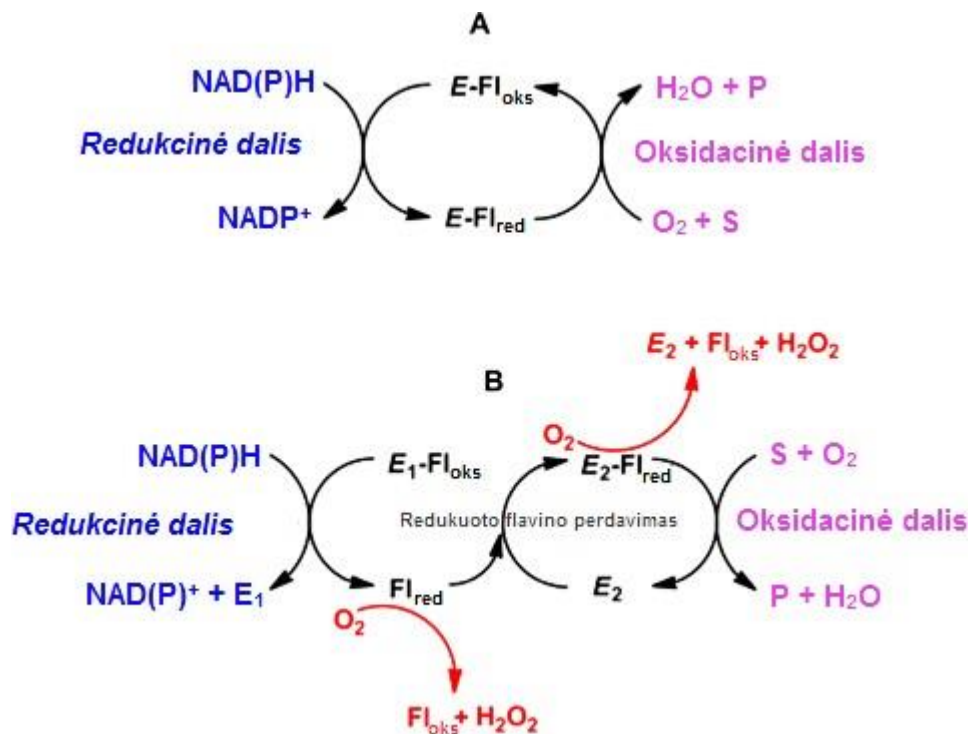
A – B grupės vienkomentės monooksigenazės

A grupės flavino monooksigenazės yra koduojamos vieno geno, jose yra glutationo reduktazės (GR-2) tipo Rosmano sankloda, skirta surišti FAD, o NAD(P)H naudojamas kaip elektronų donoras (Montersino et al., 2017). A grupės flavino monooksigenazės yra plačiai įsitraukusios į (poli)aromatinių junginių skaidymą ir natūralių produktų biosintezę. *p*-Hidroksibenzoato hidroksilazė yra A grupės monooksigenazės prototipas (Montersino et al., 2011). Fermentas katalizuoja 4-hidroksibenzoato *o*-hidroksilinimą, kad gautų 3,4-dihidroksibenzoatą. A grupės fermentai turi siaurą substratinį specifiškumą. Substrato surišimas stipriai stimuliuoja flavino redukcijos greitį ir susidaręs NAD(P)⁺ nedelsiant atpalaiduojamas. Šiuo metu žinoma beveik 60 A grupės monooksigenazių.

B grupės flavino monooksigenazės yra vienkomenčiai fermentai, turintys dvi a/b Rosmano tipo sankloda, skirtas atitinkamai FAD ir NAD(P)H prisijungimui. Priešingai nei A grupės fermentai, šios monooksigenazės katalizės metu išlaiko piridino nukleotido kofermentą surištą, o substratas jungiasi po to, kai susidaro flavino C(4a)-peroksidas. B grupę sudaro keturi su seka susiję pogrupiai: Baeyer – Villiger monooksigenazės (BVMO), flavino monooksigenazės (FMO), *N*-hidroksilinančios monooksigenazės (NHMOs) ir YUCCA (Ballou ir Entsch, 2013; Riebel et al., 2012).

C – F grupės dvikomponentės monooksigenazės sistemos

Esminis dvikomponentių monooksigenazių sistemų bruožas yra gebėjimas katalizę vykdyti tik su pagalbiniu fermentu – flavino reduktaze, kuri regeneruoja redukuotą flaviną ir perduoda jį monooksigenazės komponentui. Šias sistemas sudaro dvi polipeptidinės grandinės: reduktazės komponentas, atliekantis minėtą flavino redukciją, ir oksigenazės komponentas, oksiduojantis substratą molekuliniu deguonimi (Kirchner et al., 2003; Thotsaporn et al., 2004). Abu baltymų komponentai genome paprastai koduojami vienas šalia kito, atitinkamame genų klasteryje. Redukuojantys ekvivalentai, reikalingi oksigenezei, perkeliama iš NAD(P)H į flaviną, sujungtą su reduktazės komponentu. Su kai kuriomis reduktazėmis kompaktiškai surištas flavinas veikia kaip papildomas elektronų liukas (Van Den Heuvel et al., 2004). Vėliau redukuotas flavinas perkeliama į oksigenazės komponentą, kur vyksta molekulinio deguonies aktyvacija ir reakcija su substratu (Fraaije ir van Berkel, 2006; Heine et al., 2018). Vienkomponentių ir dvikomponentių monooksigenazų katalizinių reakcijų palyginimas pateiktas 1.4 paveiksle.



1.4 pav. Vienkomponenčių flavino monooksigenazių (A) ir dvikomponenčių flavino monooksigenazių (B) katalizinės reakcijos. Su fermentu surištą flaviną redukuoja išorinis reduktorius (NADH arba NADPH) redukcinėje dalyje (mėlyna spalva). Redukuotas fermentas reaguoja su deguonimi ir substratu (S), sudarydamas hidroksilintą produktą (P) oksidacinėje reakcijos pusėje (violetinė spalva). (A) Vieno komponento fermentų atveju oksiduotas ir redukuotas flavinas (FI_{red}) yra toje pačioje veikliojoje vietoje. (B) Dviejų komponentų fermentų atveju oksiduotas flavinas (FI_{oks}) ir redukuotas flavinas (FI_{red}) yra pernešami tarp reduktazės (E_1) ir oksigenazės (E_2). Raudona spalva parodo reakcijos kelius, per kuriuos deguonis gali reaguoti su laisvu redukuotu flavinu arba su E_2 surištu redukuotu flavinu, sudarydamas vandenilio peroksidą atjungimo kelyje be hidroksilinimo (modifikuota pagal Sucharitakul et al., 2014).

C grupės flavino monooksigenazės yra TIM-statinės sanklodos fermentai, kurie naudoja nuo NAD(P)H priklausomą flavino reduktazę redukuoto FMN generavimui. Šios grupės prototipas yra bakterinė liuciferazė – pirmoji flavoproteinų monooksigenazė, kuriai gauti tiesioginiai branduolių magnetinio rezonanso (BMR) tyrimų duomenys apie C4a - (hidro) peroksiflaviną (Brodli et al., 2018). Bakterinė liuciferazė katalizuoja redukuoto FMN ir ilgos grandinės alifatinio aldehido oksidaciją deguonimi, kad susidarytų FMN, alifatinė karboksirūgštis, vanduo ir šviesa ($\lambda_{max} \sim 490$ nm). Kinetiniai duomenys rodo, kad redukuoto FMN perkėlimas tarp liuciferazės ir flavino reduktazės vyksta laisvosios difuzijos būdu (Tinikul et al., 2013). Kitas gerai ištirtas C grupės narys yra alkanosulfonato monooksigenazė. Ši dviejų komponentų fermentų sistema katalizuoja daugelio organosulfonatų anglies ir sieros jungčių skilimą, susidarant aldehidams. Šie fermentai, be šviesos išsiskyrimo (aldehido oksidacija) ir desulfonizacijos (Baeyerio – Villigerio oksidacija), katalizuoja sulfoksidaciją, epoksidaciją ir hidroksilinimo reakcijas (H. R. Ellis, 2010).

D grupės flavino monooksigenazės yra fermentai, turintys acil-CoA dehidrogenazės sanklodą. Jie taip pat priklauso dvikomponentei sistemai, kuriai reikia pagalbinės flavino reduktazės. 2018 m. duomenimis žinoma 20 reprezentacinių D grupės fermentų (Heine et al., 2018). Jie katalizuoja aromatinės hidroksilinimo arba *N*-hidroksilinimo reakcijas. Fenolio-2-hidroksilazė ir 4-hidroksifenilacetato-3-hidroksilazė yra D grupės monooksigenazės prototipai. Daugybė D grupės monooksigenazių, kilusių iš *Streptomyces* genties, dalyvauja antrinių metabolitų (antibiotikų, priešnavikinių agentų) biosintezėje (Filisetti et al., 2003; Kugel et al., 2017; Lin et al., 2008). Pavyzdžiui, neseniai atrastas fermentas (XiaF) dalyvauja indolosekviterpeno biosintezėje (ksiamicino) (Kugel et al., 2017).

E grupės, dvikomponentės sistemos flavino monooksigenazės yra epoksidazės su PHBH (GR-2) sankloda. Kai kurios D grupės monooksigenazės gali naudoti FMN, o E grupės ir F grupės nariai yra griežtai priklausomi nuo FAD (Huijbers et al., 2014; Mascotti et al., 2016). Iki šiol E grupės nariams atstovavo tik stireno monooksigenazės (SMO). Jie konvertuoja stireno darinius į atitinkamus (*S*) – stireno oksidus (Kantz et al., 2005; Otto et al., 2004). E grupės struktūrinė informacija apsiriboja monooksigenazės (StyA) ir reduktazės (StyB) komponentu SMO iš *Pseudomonas putida* S12 (Huijbers et al., 2014; MonTERSINO et al., 2011; van Berkelet al., 2006).

F grupės flavino monooksigenazės katalizuoja aktyvuotų organinių molekulių regioselektyvų chlorinimą ir brominimą. Fermentai gauna redukuotą FAD iš flavino reduktazės ir yra svarbūs gaminant antibiotikus, priešnavikinius agentus ir kitus natūralius produktus. Triptofano 7-halogenazė atspindi F grupės prototipą. Katalitiniam triptofano 7-halogenazės mechanizme susidaro flavino C4a-hidroperoksidas, kuris reaguoja su chlorido anijonu, kad susidarytų hipochloro rūgštis (Yeh et al., 2007). Šiuo metu žinoma 15 F grupės fermentų (Heine et al., 2018).

G – H grupės vidinės flavino monooksigenazės

G grupę sudaro nuo FAD priklausomos monooksigenazės su monoamino oksidazės sankloda. Šių fermentų elektronų donoras yra aminorūgščių substratas. Manoma, kad G grupės monooksigenazių redukuojančioje reakcijoje vyksta aminorūgšties α -CH jungties suskaldymas ir hidrido ekvivalento pernešimas ant FAD, susidarant prie fermento prisijungusiai imino rūgščiai (Fitzpatrick, 2010). Susidariusi imino rūgštis dekarboksilinama iki amido. Šiuo metu yra žinomi 4 G grupės nariai. Trys iš jų jau buvo išgryninti daugiau nei prieš 40 metų, tačiau rekombinantinių formų trūkumas sulėtino jų išsamų biocheminį charakterizavimą. Triptofano 2-monooksigenazė (TMO) yra šios vidinių monooksigenazių grupės prototipas. Fermentas

katalizuoja oksigeninį dekarboksilinimą triptofane, susidarant indol-3-acetamidui (Ralph et al., 2006).

H grupės flavino monooksigenazės yra FMN turintys fermentai su TIM - statinės sankloda. Kaip ir G grupės nariai, jie redukuoja flavino kofaktorių per substrato oksidaciją. Pirmoji atrasta flavoproteinų monooksigenazė, laktato 2-monooksigenazė (LMO), ilgą laiką buvo vienintelis šios grupės atstovas. LMO katalizuoja L-laktato oksidaciją į acetatą, vandenį ir anglies dioksidą (Maeda-Yorita et al., 1995).

1.3 Flavino reduktazės ir taikymas biokatalizėje

Jau minėtose dvikomponentėse flavino monooksigenazių sistemose antrasis fermentas flavino reduktazė užtikrina redukuoto flavino regeneravimą. Šis komponentas yra pagalbinis ir tinkamas jo suderinimas lemia efektyvią katalizę. Reduktazės ir monooksigenazės reakcijų jungimosi procesas dažnai susijęs su pagrindiniais biologiniais virsmis, tokiais kaip katabolizmas, detoksikacija, biosintezė ir šviesos emisija (Maenpuen et al., 2019).

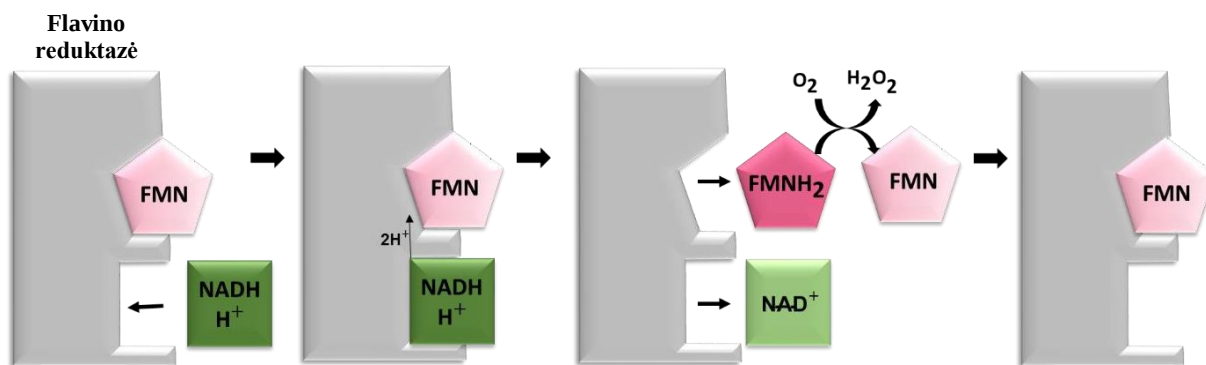
Kad fermentinis procesas būtų efektyvus ir naudingas, jis turi atitikti tam tikrus reikalavimus: virsmas turėtų vykti esant tinkamoms substrato koncentracijoms, kofaktoriai ir kiti reagentai turi būti tiekiami arba regeneruojami, reakcija turi būti labai regioselektyvi, chemoselektyvi ir (arba) stereoselektyvi, o procesas turi leisti lengvai ir švariai atskirti produktą. Reikalingomis reakcijos sąlygomis fermentas turi būti pakankamai aktyvus, stabilus ir pasižymėti gerais kinetiniais parametrais. Taip pat, pageidautina lengva ekspresija standartinėje raiškos sistemoje. Biokatalitinės kaskados, kuriose keli fermentai veikia tame pačiame reakcijos mišinyje, kad sudarytų daugybinius ryšius atskleidžia plačias biokatalizės galimybes ir perspektyvas. Kaskados gali sumažinti sintezės etapų skaičių ir palengvinti produktų izoliaciją taip padidindamos biokatalitinės gamybos efektyvumą ir sumažindamos sąnaudas (Prior ir Kosjek, 2019). 2016 m. paskelbtoje publikacijoje Bruhlmann ir Bosijokovic aprašė (Z)-3-heksenolio gamybą kaskadoje, naudojant inžineriniu būdu gautą hidroperoksido liažę ir ketoreduktazę (Brühlmann ir Bosijokovic, 2016). Jei reakcija vykdoma kaip kaskada, ji užkerta kelią tarpinio (Z)-3-heksenolio izomerizacijai nepageidaujamu E-alkenu. Be to, Li ir kt. yra sukūrę kelių fermentų kaskadą α -hidroksi rūgščių, 1,2-amino alkoholių ir α -amino rūgščių sintezei iš stirenų. Kaskadose dalyvauja keli pagalbiniai redukcijos fermentai su stireno monooksigenaze ir buvo įrodyta, kad *in vivo* susintetinta iki vieno gramo produkto (Wu et al., 2016).

1.3.1 Charakterizuotos flavino reduktazės

Per pastaruosius kelis dešimtmečius buvo rasta nemažai reaktyvių ir selektyvių dvikomponenčių flavino monooksigenazių sistemų, kurios parodė potencialiai platų taikymo sričių diapazoną. Tokio tipo monooksigenazė turi būti suderinta su pagalbine flavino reduktaze. Nors antrojo komponento savybių tyrimams skiriama gerokai mažiau dėmesio, jo charakterizavimas svarbus efektyvios katalizės užtikrinimui. Šiame skyrelyje pristatomi keli plačiausiai ištirtini flavino reduktazių pavyzdžiai.

Šiuo metu komerciškai prieinama FMN reduktazė iš *Vibrio fischeri* ATCC 7744, kurios produktas FMNH₂ liuminescencinėse bakterijose naudojamas bioluminescencijos reakcijai. Bakterinė liuciferazė jungiasi su redukuotu flavinu ir katalizuoja šviesos sklaidimo reakciją, naudodama FMNH₂, molekulinį deguonį ir alifatinį aldehydą (R-CHO). Nesant liuciferazės, redukuotos flavino molekulės nefermentiškai sureaguoja su vandenyje ištirpusiu deguonimi, susidarant vandenilio peroksidui ir oksiduotam flavinui (1.5 pav.).

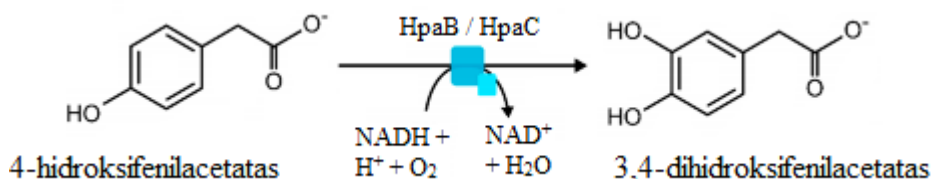
Šios rekombinantinės flavino reduktazės molekulinė masė, nustatyta NDS-PAGE būdu, yra 26 kDa. Naudojant NADPH, buvo nustatyta, kad reduktazės aktyvumas yra tris kartus mažesnis nei su NADH. Fermentas be FMN taip pat katalizavo FAD ir riboflavino redukciją (Inouye, 1994).



1.5 pav. Schematinis flavino reduktazės katalizuojamos reakcijos vaizdas aerobinėmis sąlygomis (modifikuota pagal Inouye 1994).

Antroji, šiuo metu plačiai aptariama, pagalbinė flavino reduktazė priklauso D grupės dviejų komponentų 4-hidroksifenilacetato-3-hidroksilazės sistemai (HPAH), kuri dalyvauja 4-hidroksifenilacetato hidroksilinime panaudojant molekulinį deguonį. Daugelis mikroorganizmų gali naudoti šį aromatinį junginį kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. HPAH produktas, 3,4-dihidroksifenilacetatas, gali būti *meta*- skaidomas ir yra įtraukiamas į trikarboksirūgščių ciklą (Pornsuwan et al., 2017). Yra du skirtingi D grupės HPAH tipai, jie turi panašias struktūras, tačiau naudoja skirtingas flavino ir substrato rišimo strategijas. *Acinetobacter baumannii* HPAH naudoja didelę FMN - specifinę reduktazę C1 (35 kDa),

Yra žinoma HpaB (oksigenazės) – HpaC (reduktazės) HPAH sistema iš *E.coli* W (Xun ir Sandvik, 2000), kuri parodė didelį panašumą į daugumą kitų dvikomponenčių sistemų iš *Arthrobacter* sp., *Geobacillus* sp., *Halomonas* sp., *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas* sp., *Sulfolobus tokodaii*, *Thermus thermophilus* bakterijų (Heine et al., 2018) (1.6 pav.).



HpaB monooksigenazės komponento dydis yra apie 54 – 65 kDa (Soulimane, Okane, ir Kolaj 2010), jis yra aktyvus kaip homodimeras ir gali surišti bei stabilizuoti redukuotą FAD be substrato, kad būtų išvengta kosubstrato autooksidacijos (Chakraborty et al., 2010; Xun ir Sandvik, 2000). Monooksigenazė gali veikti keletą kitų aromatinių junginių, įskaitant (halo)fenolius, (halo)catecholius, krezolius, aminorūgštis, fenilpropanoidus ir resveratrolį (Arunachalam et al., 1994; Furuya ir Kino, 2014). Pagalbinio sistemos komponento – flavino reduktazės dydis yra 16–19 kDa. Tikėtina, kad reduktazė yra aktyvi kaip homodimeras, nors tyrimais taip pat nustatyta monomerinė forma. Reduktazė teikia substratinę pirmenybę NADH vietoj NADPH. Ji jungiasi su FAD, esant žemam (μM) afiniškumo diapazonui, tačiau galimybė jungtis su kitais flaviniais išlieka (Chakraborty et al., 2010; Beatriz Galán, Díaz, Prieto, ir García, 2000).

Apibendrinant galima teigti, kad flavino monooksigenazės komponentas biokatalizėje yra esminis, o visos reduktazės iš principo atlieka tą pačią funkciją – redukuoja flaviną ir

užtikrina monooksigenazės veikimą. Gali susidaryti įspūdis, kad pagalbinei dvikomponentės sistemos daliai nereikia skirti dėmesio. Visgi, nesant reduktazių efektyvus dvikomponentių flavino monooksigenazių veikimas ir taikymas būtų neįmanomas.

1.3.2. Dvikomponentių flavino monooksigenazių sistemų taikymas biokatalizėje

Dvikomponentių flavino monooksigenazių taikymų apžvalgoje pagrindinis dėmesys skiriamas flavino monooksigenazėms ir yra aptariamos kelios dvikomponentės sistemos, kurios yra svarbios pramoniniams biokataliziniams procesams. Viena iš pirmųjų pramonėje pritaikytų dvikomponentių monooksigenazių yra stireno monooksigenazė – selektyvusis epoksidacijos katalizatorius. Šuo metu, enantiomeriškai grynį stireno oksidai yra svarbūs farmacijos pramonės elementai. Stireno monooksigenazė iš *Pseudomonas* sp. VLB120 (E klasės monooksigenazė) katalizuoja stireno pavertimą (S)-stireno oksidu, kai enantiomerinis perteklius didesnis kaip 99%. 2000 m. buvo sukurta rekombinantinė *E. coli*, ekspresuojanti StyA ir StyB, o vėliau gamyba sėkmingai padidinta iki pramoninio lygio (Panke et al., 2000). Pilotinio bandymo metu išgauti beveik 400 g (S)-stireno oksido (30 litrų *fed-batch* biokonversija, dvisluoksnės fazės sistema) (Panke et al., 2002).

Kitas gerai žinomas šios monooksigenazių klasės pavyzdys yra jau aptarta 4-hidroksifenilacetato-3-monooksigenazė iš *Acinetobacter baumannii*. Pagalbinė reduktazė C1 naudojama fermentinėse kaskadinėse reakcijose, susijusiose su bakterijų liuciferaze (luxAB) iš *Vibrio campbellii* ir monooksigenaze (C2), kad būtų gaunamas bioluminescencijos signalas kaip perspektyvus eukariotų genų reporteris ir sintetinės trihidroksifenolio rūgštys, tokios kaip 3,4,5 - trihidroksicinamono rūgštis (3,4,5-THCA) ir 2-(3,4,5-trihidroksifenil)acto rūgštis (3,4,5-THPA), kurios yra stiprūs antioksidantai (Maenpuen et al., 2019).

Be hidroksilinimo ir epoksidacijos reakcijų, su dvikomponentėmis flavino monooksigenazėmis taip pat galima atlikti ir sieros pašalinimo reakcijas. Dibenzotiofeno (DBT) desulfurizacija buvo tirta daugelyje mikroorganizmų (Gray et al., 2003). Genai, atsakingi už skaidymo kelią, buvo klonuoti iš *Rhodococcus* sp. IGTS8 (Denome, Oldfield, Nash, ir Young, 1994; Matsubara, Ohshiro, Nishina, ir Izumi, 2001). Sierai pašalinti iš substrato reikia dviejų monooksigenazės baltymų (DszA ir DszC), kurie priklauso nuo redukuoto FMN prieinamumo. Redukuotu FMN aprūpina flavino reduktazė (DszD), kuri naudoja NADH kaip elektronų šaltinį ir yra panaši į pagalbinius komponentus iš, anksčiau minėtų, 4-hidroksifenilacetato-3-monooksigenazės ir stireno monooksigenazės sistemų. Biokataliziniai procesai, naudojant desulfurizuojančias flavino monooksigenazes, gali būti naudojami sieros pašalinimui iš iškastinio kuro (Gray et al., 2003). Didensnio DszD ar kitos flavino reduktazės ekspresija *E. coli* ir *P. putida* padidina bendrą desulfurizacijos greitį (B.Galán et al. 2000). Tai

įrodo šių pagalbinių fermentų svarbą ir įtaką bendram sistemos darbui. Be to, buvo pagerinta veikla link (labai) alkilintų dibenzotiofeno molekulių naudojant chemostatinį metodą (Arendorf, Loomis, DiGrazia, Monticello, ir Pienkos, 2002) ir genų maišymą (angl. *gene - shuffling*) (Coco et al., 2001).

Svarbus dvikomponenčių monooksigenazių šeimos narys yra triptofano 7-halogenazė (Burd ir Van Pee, 2004; Yeh, Garneau, ir Walsh, 2005). Daugybė natūralių organinių junginių, naudojamų farmacijoje, įskaitant antibiotikus (chlortetracikliną ir vankomiciną), priešgrybelinius junginius (pirolitriną) ir chemoterapinius vaistus (salinosporamidą A ir rebekamiciną), yra chlorinami (Ainsley et al., 2018). Halogeninantys fermentai, tokie kaip triptofano 7-halogenazė atlieka regioselektyvų triptofano halogeninimą, todėl šie fermentai turi daug perspektyvų biokatalizėje. Buvo rasti keli bakterijų fermentai, galintys įterpti halogeno atomą į organinį substratą (Unversucht et al., 2005).

Visais išvardintais atvejais efektyviai katalizei užtikrinti reikalinga stabili, aktyvi ir reakcijos greičio neribojanti pagalbinė flavino reduktazė, todėl šio darbo tikslas buvo charakterizuoti dar neištirtas flavino reduktazes ir apibūdinti jų veikimo galimybes. Nuolat tobulėjant heterologinei baltymų ekspresijai ir kofermento regeneracijai, net (dalinai) išgrynintos dvikomponentės monooksigenazės taps vis patrauklesnės ekologiškai ir ekonomiškai konkurencingai aukštos pridėtinės vertės cheminių medžiagų gamybai (Fraaije ir van Berkel, 2006).

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1. Naudotos medžiagos

2.1.1. Reagentai

Reagentai	Šaltinis
Glicinas, natrio dodecilsulfatas (NDS), tetrametiletilendiaminas (TEMED), flavino mononukleotidas (FMN), flavino adenino dinukleotidas (FAD), riboflavinai, 3-Acetilpiridino adenino dinukleotidas	Sigma-Aldrich, Vokietija,
Izopropil-β-D-galaktopiranozidas (IPTG), PageRuler™ Prestained Protein Ladder baltymų molekulinės masės žymenys, Coomassie Brilliant Blue R-250 dažai, Pierce™ Coomassie baltymų tyrimo rinkinys (Bradford reagentas ir jaučio albumino standartų rinkinys)	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
Glicerolis, ampicilinas, gliukozė, sacharozė, NaOH, KOH, natrio acetatas, imidazolas, β-merkaptioetanolis, amonio persulfatas (APS)	Fluka, Vokietija
Mielių ekstraktas, BHI (<i>brain-heart infusion broth</i>) terpė, triptonas	Oxoid, Anglija
<i>ZYMO Plasmid PREP</i> plazmidinės DNR skyrimo rinkinys	Zymo Research Corp., JAV
Kanamicinas, tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris)	AppliChem, Vokietija
NaCl, HCl, K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄	Reachim, Rusija ir Lachema, Čekija
NADH, NADPH	Reanal, Vengrija
Akrilamidas (AA)	Roth, Vokietija
Acto rūgštis	Chempur, Lenkija
Etanolis	Vilniaus degtinė, Lietuva
Agaras	Merck, Vokietija

2.1.2. Prietaisai

Prietaisas	Modelis ir šaltinis
AKTA skysčių chromatografijos sistema	AKTA Purifier 100 FPLC, GE Healthcare, Švedija
Autoklavas	Raypa AES – 75, Raypa, Ispanija
Didelės talpos termostatuojamos, rotacinės purtyklės	Innova 44, Biocompare, JAV
Didelės talpos šaldanti centrifuga	Eppendorf 5804R, Marshall Scientific, JK
Vertikali elektroforezės sistema	Bio-Rad, JAV
Elektroporatorius	Eppendorf electroporator 2510, Sigma-Aldrich, Vokietija
Elektros srovės šaltinis	Pharmacia EPS 400/500
Laminarinis boksas	Biowizard, II saugumo klasė, Kojair, Suomija
Ni ²⁺ -IMAC HP kolonėlė (1 ml) ir HiTrap nudruskinimo kolonėlė (5 ml)	Sigma-Aldrich, Vokietija
pH matuoklis	Orion 320 PerpHect LogR, Thermo Fisher, JAV
Stalinė centrifuga	Eppendorf, Thermo Fisher Scientific, JAV
Termostatuojama purtyklė	Biosan, Latvija
Termostatas	Binder FD 23, Binder, Vokietija
Ultragarsinis dezintegratorius	VC750, Sonics ir Materials Inc., JAV
Spektrofotometras	Lambda 25, PerkinElmer, JAV

2.1.3. Bakterijos

Bakteriniai kamieniai	Genotipas	Šaltinis
<i>Escherichia coli</i> BL21	(DE3) [F ⁻ ompT gal hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm lon (DE3)]	Avidis, Prancūzija
<i>Escherichia coli</i> DH5α	[φ80dlacZΔM15 Δ(lacZY-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) sup E44 thi-1 gyrA96 relA1]	Pharmacia, Švedija

2.1.4. Plazmidiniai vektoriai

Plazmidinis vektorius	Savybės	Šaltinis
pET-28 b (+)	Km ^r , T7 promotorius, poli-His seka baltymo C gale	Novagen, Vokietija
pET-21 a (+)	Ap ^r , T7 promotorius, poli-His seka baltymo C gale	Novagen, Vokietija

2.1.5. Terpės

Luria Bertani terpė (LB): triptono – 10 g/l, mielių ekstrakto – 5 g/l, NaCl – 3 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 1 g/l.

Brain-heart infusion (BHI): terpė paruošta pagal gamintojo (Oxoid, Anglija) nurodymus.

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

2.2. Metodai

2.2.1. Plazmidinės DNR skyrimas

Plazmidinė DNR iš *Escherichia coli* bakterijų skiriama naudojant ZR Plasmid MiniprepTM (Zymo Research) rinkinį, pagal pateiktas gamintojo rekomendacijas. Išskyrimo eiga:

- 1) 0,5–5 ml *E. coli* DH5 α kultūros centrifuguojama 1,5 ml mėgintuvėlyje 15–20 s (11,000 – 16,000 x g). Supernatantas išpilamas.
- 2) Pridedama 200 μl P1 buferinio tirpalo ir pakartotinai suspenduojama.
- 3) Pridedama 200 μl P2 buferinio tirpalo, sumaišoma lengvai apverčiant 2–4 kartus ir inkubuojama 1 – 2 min. Ląstelės visiškai lizuotos, kai mišinys tampa skaidrus, violetinės spalvos.
- 4) Pridedama 400 μl P3 buferinio tirpalo ir lengvai sumaišoma. Inkubuojama 1–2 min esant kambario temperatūrai (įvykus neutralizacijai, mėginys taps geltonas).
- 5) Mėginiai centrifuguojami 2–4 min $\geq 11,000 \times g$.
- 6) Zymo – SpinTM INN kolonėlė patalpinama į surinkimo mėgintuvėlį ir į ją perkeliamas supernatantas iš 5 žingsnio.
- 7) Viskas centrifuguojama 30 s $\geq 11,000 \times g$.
- 8) Pratekėjęs skystis išpilamas ir Zymo – SpinTM INN kolonėlė grąžinama į surinkimo mėgintuvėlį.
- 9) Pridedama 200 μl plovimo buferinio tirpalo ir vėliau 400 μl plazmidžių plovimo buferinio tirpalo, kiekvieną kartą centrifuguojant 1 min $\geq 11,000 \times g$.
- 10) Kolonėlė perkeliama į švarų 1,5 ml talpos mėgintuvėlį ir tiesiai ant jos užpilama 30 μl DNR eliacijos buferinio tirpalo. Inkubuojama 1 min esant kambario temperatūrai. Po to plazmidinė DNR surenkama centrifuguojant 30 s $\geq 11,000 \times g$.

2.2.2. Elektrokompentinių ląstelių paruošimas

E. coli BL21 (DE3) ląstelės užsėjamos į 25 ml BHI terpės ir auginamos esant 30 °C temperatūrai, per naktį, purtyklėje aeruojant (180 aps./min). 1 ml naktinės kultūros perkeliamas į 50 ml BHI terpės ir auginama purtyklėje, kai temperatūra 30 °C, kol optinis tankis (OT_{600}) pasiekia 0,5–0,8. Tada ląstelės šaldant centrifuguojamos 20 min 4000 aps./min, supernatantas nupilamas. Ląstelės plaunamos 2 kartus šaltu 10 % glicerolio tirpalu, pilant 20 ml, vėliau 10 ml. Paskutiniame etape ląstelės suspenduojamos 2 ml 10 % glicerolio tirpalo (šalto) ir išpilstomos 100 µl porcijomis į 1,5 ml mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai saugomi, kai temperatūra -80 °C.

2.2.3. Elektroporacija

Elektroporacijai reikalingos atšaldytos sterilios kiuvetės. Į 100 µl kompetentinių *E. coli* BL21 (DE3) ląstelių įdedama 1 µl plazmidinės DNR, sumaišoma ir perpilama į kiuvetę. Elektroporatorius generuodamas 2 kV/cm² 4–5 ms elektrinio lauko impulsus atveria ląstelių membranose poras, dėl kurių ši tampa pralaidi jonams ir įvairioms molekulėms, pvz., baltymams, DNR, kurios gali patekti į ląstelės vidų. Įterpus plazmidinę DNR, ant ląstelių užpilama 1 ml gaivinamosios BHI terpės ir visas mišinys perkeliamas į mėgintuvėlį. Suspensija inkubuojama esant 37 °C temperatūrai 30 min. Tada ląstelės centrifuguojamos 1 min, supernatantas nupilamas vienu staigiu judesiu. Ląstelės suspenduojamos ~150 µl likusios terpės ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su atitinkamu antibiotiku.

2.2.4. Rekombinantinių baltymų sintezė ir sąlygų optimizavimas

Bakterijos nuo lėkštelių kelpė užsėjamos į 20 ml LB terpės su atitinkamu antibiotiku (50 µg/ml ampicilino arba 40 µg/ml kanamicino).

Kultūros auginamos per naktį esant 30 °C temperatūrai aeruojant. Po 20–24 val. bakterijos persėjamos į 200 ml tūrio LB terpę su atitinkamu antibiotiku. Persėjant inokuliuojama po 1 ml kiekvienos terpės su transformantais. Po 2–3 val. bakterijų kiekis skystoje terpėje nustatomas spektrofotometriškai matuojant optinį tankį, esant 600 nm bangos ilgiui. Kontrolei naudojama sterili terpė. HpyE, PyrE ir IifD sintezė indukuojama su IPTG, optiniam tankiui pasiekus 0,6–1,0 vertę.

Sintezės sąlygų optimizavimas atliekamas keičiant 3 parametrus. Pasirinktos induktoriaus IPTG koncentracijos: 0,2, 0,5, 1 mM. Po indukcijos auginama 3, 6, 18 ir 24 val. Taip pat pasirinktos skirtingos auginimo po indukcijos temperatūros: 16 °C arba 20 °C, 30 °C ir 37

°C. Po numatyto periodo bakterijų kultūros surinktos terpę centrifuguojant 15 min 4000 aps./min greičiu.

2.2.5. Beląstelinių ekstraktų ruošimas

Po centrifugavimo terpę nupilama. Nusodintos ląstelės suspenduojamos 5 ml 50mM Tris-HCl buferinio tirpalo, pH 7,5, ir ardamos ultragarsiniu dezintegratoriumi VC750 (Sonics ir Materials Inc.). Ardymas trunka 4 min 30 s, periodiškai ardant 5 s impulsais su 10 s pertraukomis. Ardomas turinys laikomas vandens-ledo vonelėje.

Po ardymo surenkama po 50 µl kiekvieno mėginio biomasės. Likusi dalis pavyzdžių centrifuguojama 20 min 10 000 aps./min greičiu. Tirpi dalis (superntantas) atskiriama nuo nuosėdų perpilant į atskirus mėgintuvėlius. Nuosėdų suspendavimui paliekama iki 1 ml supernatanto. Suspenduotos nuosėdos surenkamos po 1 ml į 1,5 ml talpos mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 2 min 4000 aps./min greičiu. Tirpi dalis atskiriama, o nuosėdos pakartotinai suspenduojamos 50mM Tris-HCl buferiniame tirpale, pH 7,5.

2.2.6. Fermentų gryninimas ir dializė

Centrifuguojant iš mišinio yra pašalinamos visos netirpios dalelės ir gaunamas beląstelinis ekstraktas, kuris gryninamas giminigumo (afininės) chromatografijos būdu. Baltymų gryninimui naudota AKTA Purifier 100 skysčių chromatografijos sistema ir Ni²⁺-IMAC HP kolonėlė (1 ml). Gryninimo metu naudojami buferiniai tirpalai: A – Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, ir B – eliucijos buferinis tirpalas, kuris paruošiamas į A buferinį tirpalą pridėjus 0,5 M imidazolo. Titravimo būdu, naudojant HCl, pasiekama pH 7,5 vertė.

Frakcijos su tiksliniais baltymais, turinčiais 6 histidinių inkarą C gale, prisijungia prie sorbento kolonėlėje, o visi neprisijungę baltymai išplaunami buferiniu tirpalu A. Tikslinės frakcijos surenkamos taikant smūginę eliuciją, kai A buferinis tirpalas iš karto pakeičiamas B buferiniu tirpalu. Renkamos frakcijos po 1 ml, kol sugerties intensyvumas, kai $\lambda = 280$ nm, nukrenta iki bazinės linijos.

Siekiant pašalinti imidazolą, tikslinės frakcijos dializuojamos. Dializė vyksta per naktį Tris-HCl 50 mM, 7,5 pH vertės buferiniame tirpale, kurio tūris 50 kartų didesnis nei mėginio. Kaip alternatyva dializei, taikoma nudruskinimo procedūra naudojant *Desalting* 5 ml HiTrap kolonėlę. Po dializės baltymų frakcijos išskirstomos po 500 µl ir laikomos –20 °C. Baltymo aktyvumas vertinamas atliekant fermentinio aktyvumo matavimus, grynumas nustatomas elektroforeziškai.

2.2.7. Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje (NDS-PAGE) denatūruojančiomis sąlygomis

Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje atliekama naudojant 4,5 % koncentruojantį ir 12 % skirstomąjį gelius.

Skirstomasis 12% gelis:	Koncentruojantis 4,5 % gelis:
3,10 ml H ₂ O	3,10 ml H ₂ O
2,8 ml 40 % Akrilamido (AA)	562 µl 40 % AA
2,0 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8
80 µl 10 % NDS	50 µl 10 % NDS
80 µl 10 % APS	50 µl 10 % APS
8 µl TEMED	5 µl TEMED

Prieš elektroforezę baltymų mėginiai nudažomi Coomassie Brilliant Blue R-250 dažo tirpalu. Dažų tirpalą sudarė 4 % NDS ir 6 % β-metkaptanoetanolio. Mėginiai 2–3 min inkubuojami verdančio vandens vonelėje. Į elektroforezės aparato šulinėlius po 5–15 µl įnešami pavyzdžiai ir PageRuler™ *Prestained Protein Ladder* baltymų molekulinės masės žymuo. Elektroforezė vykdoma esant 70 mA stiprumo srovei 1 val. 20 min. Po elektroforezės baltymai dažomi Coomassie Brilliant Blue R-250 dažais. Po to gelis 5 min. blukinamas 7 % acto rūgšties tirpalu ir skalaujamas vandeniu (Leammli, 1970).

2.2.8. Baltymų koncentracijos nustatymas

Baltymų koncentracija buvo nustatyta Bradford (Bradford M., 1976) metodu. Bradford metodas pagrįstas dažų Coomassie Brilliant Blue G-250 sugerties poslinkiu. Į mėginių paletę įnešama 4 µl baltymo ir 196 µl reagento, laikoma 2 min. esant kambario temperatūrai. Matuojama sugertis, esant 595 nm bangos ilgiui. Baltymų koncentracija nustatoma pagal kalibracinę kreivę. Kreivė sudaroma naudojant jaučio serumo albumino standartinius tirpalus, kurių koncentracijos 25–2000 µg/ml.

2.2.9. Flavino reduktazių charakterizavimo tyrimai

Flavino reduktazių HpyE, PyrE ir IifD fermentinis aktyvumas matuojamas spektrofotometru *Lambda* 25 (PerkinElmer, JAV), kai temperatūra 30 °C, nustatant sugerties pokytį, kai $\lambda=340$ nm. Reakcijos metu flavino reduktazė katalizuoja oksidacijos – redukcijos reakciją, FMN redukuojant iki FMNH₂, o NADH oksiduojant iki NAD⁺ ($\epsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reakcijos mišinio bendras tūris – 1 ml. Jį sudarė 50 mM Tris-HCl buferinis tirpalas (Tris-HCl, pH 7,5, jeigu nenurodyta kitaip), 50 μM FMN, 150 μM NADH ir atitinkamas fermento kiekis. Reakcija pradedama pridėdant baltymo, išskyrus tuos atvejus, kai nurodyta kitaip. Aktyvumas matuojamas 30 s. Visi matavimai pakartoti mažiausiai tris kartus.

Vienas flavino reduktazės aktyvumo vienetas – tai fermento kiekis katalizuojantis 1 μmol produkto (FMNH₂) susidarymą per 1 minutę, esant 25 °C temperatūrai.

2.2.9.1 Substratinis specifiškumas ir koncentracijos įtaka fermentiniam aktyvumui

Nustatant tinkamiausius flavino reduktazių substratus oksidacijos – redukcijos reakcijai buvo pasirinkti elektronų donorai: NADH ir NADPH (10 mM). 3-Acetilpiridino adenino nukleotidas (100 mM) FAD, FMN ir riboflavinai (5 mM) buvo naudoti kaip elektronų akceptoriai. 3-Acetilpiridino adenino nukleotidas buvo inkubuotas su HpyE, PyrE arba IifD baltymu ir NADH 30 s, 5 min, 30 min ir 1 val. po reakcijos iniciacijos fermentu.

Atitinkamos flavino reduktazės aktyvumas matuojamas 2.2.9. skyriuje aprašytu būdu nustatant sugerties pokytį vykstant NAD(P)H oksidacijai. Naudojant NADH arba NADPH pasirenkamas bangos ilgis $\lambda=340$ nm, o naudojant 3-Acetilpiridino adenino nukleotidą, $\lambda=365$ nm ($\epsilon_{365}=5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Nustatant substratų koncentracijos įtaką fermentinės reakcijos eigai buvo pasirinktos 50–400 μM NADH koncentracijos ir 25–150 μM FMN koncentracijos reakcijos mišinyje.

Atliekant eksperimentus su skirtingais substratais taip pat buvo nustatinėjama NADPH, kaip galimo fermento slopiklio, įtaka fermentinės reakcijos greičiui. Pasirinktos koncentracijos reakcijos mišinyje: 50–150 μM . Reakcijos mišinį sudarė 50 mM Tris-HCl buferinis tirpalas, charakterizuojamas fermentas, 50 μM FMN, 150 μM NADH ir pasirinkta NADPH koncentracija.

2.2.9.2 Flavino reduktazių termostabilumo įvertinimas

Flavino reduktazių HpyE, PyrE ir IifD mėginiai inkubuoti 1, 5, 10 ir 15 min esant skirtingai temperatūrai (23–50 °C). Inkubuojamų mėginių tūris Tris-HCl buferiniame tirpale – 100 μl . Reakcijos mišinį sudarė 50 mM Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 7,5, 50 μM FMN, 150

μM NADH, atitinkamas fermentas. Reakcija inicijuota fermentu (po inkubavimo). Aktyvumas matuotas, kai buferinio tirpalo temperatūra buvo 30 °C.

2.2.9.3. Flavino reduktazių aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros

Buferiniai Tris-HCl 50 mM, 7,5 pH tirpalai buvo inkubuojami esant skirtingoms temperatūroms nuo 23 °C iki 60 °C. Pasiiekus reikiamą temperatūrą, vykdyta reakcija. Reakcijos mišinį sudarė 50 mM Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 7,5, 50 μM FMN, 150 μM NADH, atitinkamas fermentas. Reakcija inicijuojama fermentu.

2.2.9.4. Buferinio tirpalo prigimties ir pH įtakos flavino reduktazių aktyvumui nustatymas

Fermentinio aktyvumo priklausomybės nuo buferinių tirpalų prigimties ir pH vertės tyrimui buvo naudoti tokie buferiniai tirpalai: natrio acetatinis, pH intervale 5–6; kalio fosfatinis (K–P), pH intervale 6–8; Tris-HCl, pH intervale 7–8 ir glicino-NaOH, pH intervale 8–9,5. Naudojant skirtingus buferinius tirpalus, matuojamas atitinkamos flavino reduktazės aktyvumas 2.2.10. skyriuje aprašytu būdu.

2.2.9.5. Išgrynintų rekombinantinių flavino reduktazių priklausomybė nuo stabilizatorių ir laikymo sąlygų

Atliekant stabilumo ekperimentą, rekombinantinės flavino reduktazės HpyE, PyrE ir IifD buvo maišomos su gliceroliu arba sacharoze. Buvo paruošti 50 % glicerolio ir 100 % sacharozės tirpalai. Stabilizatorių koncentracijos galutiniame 100 μl tūrio mėginyje buvo 5–25 %. Fermentai buvo laikomi esant 4 °C ir –20 °C temperatūroms. Periodiškai matuojamas fermento aktyvumas esant 30 °C temperatūrai, kaip aprašyta 2.2.10 skyriuje. Matavimai atlikti po 2 kartus. Mėginių, laikytų esant 4 °C temperatūrai, aktyvumas matuotas po 3 ir 12 dienų nuo eksperimento pradžios, o laikytų esant –20 °C matavimai atlikti po 14 ir 80 dienų. 100 % – pradinis fermento aktyvumas prieš saugojimą.

2.2.9.6. Flavino reduktazių fermentinio aktyvumo ir kinetinių parametrų nustatymas

Redukcijos reakcijų kinetiniai matavimai atlikti spektrofotometru, 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale, pH 7,5. Kinetinės kreivės registruotos pagal sugerties intensyvumo mažėjimą dėl NADH oksidacijos, kai bangos ilgis $\lambda=340$ nm, esant 30 °C temperatūrai. Kinetiniai parametrai flavino reduktazėms nustatyti esant 150 μM NADH ir 50 μl FMN koncentracijoms reakcijos mišinyje. Visi matavimai pakartoti mažiausiai tris kartus.

Fermento specifinis aktyvumas (U/mg) apskaičiuojamas aktyvumą (U/ml) padalinus iš baltymo koncentracijos (mg/ml). Baltymo koncentracija nustatyta bradford metodu pagal kalibracinę kreivę, o baltymo aktyvumas pagal (1) formulę, kur A – sugerties pokytis, l – kiuvetės plotis (1 cm), V_t – tirpalo (mišinio) tūris, V_E – fermento tūris mišinyje, t – reakcijos trukmė, ε – ekstinkcijos koeficientas ($\varepsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Formulė pagrįsta Beer-Lambert dėsniu, kuris aprašo empirinį sąryšį tarp medžiagos sugertos šviesos ir tos medžiagos savybių.

$$\text{Aktyvumas (U/ml)} = \frac{\Delta A_{340} \cdot V_t}{\varepsilon \cdot V_E \cdot t \cdot l} \quad (1)$$

Pradinio reakcijos greičio priklausomybės nuo substrato koncentracijos skaičiavimai bei $V_{\max}$ ir K_M nustatymas atlikti naudojantis Michaelio-Menten lygtimi (2), kur V_0 – pradinis reakcijos greitis, S – substratas, $V_{\max}$ – maksimalus reakcijos greitis, K_m – Michaelio konstanta.

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

2.3. Kompiuteriniai flavino reduktazių sekų analizės metodai

Baltymų sekų homologų paieška vykdyta NCBI BLAST duomenų bazėje (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Filogenetinio medžio konstravimas atliktas naudojant MEGA X programą (Kumar et al. 1994). Struktūrinių homologų paieška vykdyta PDB duomenų bazėje. Flavino reduktazių erdvinės struktūros prognozavimui ir homologiniam modeliavimui naudotas interaktyvus serveris SWISS-MODEL. Struktūrinių modelių analizei ir palyginimui su žinomomis struktūromis naudota PyMOL programa (1.2r3pre versija, Schrödinger, LLC).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Tyrimo objektai

Pagalbiniai fermentai flavino reduktazės patenkina šiuolaikinės biokatalizės poreikį ekologišku ir specifiniu būdu regeneruoti redukuotus flavino junginius tolesnei dvikomponentės FMO vykdomai katalizei. Šie fermentai gali būti derinami su skirtingomis flavino monooksigenazėmis, taip išplečiant pritaikymo sritis (Heine et al., 2018). Tokių fermentų charakterizuota palyginus nedaug. VU GMC Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje nagrinėjant 2-hidroksipiridno, 2-metilpiridino ir indolo skaidymo kelius *Athrobacter* spp. ir *Acinetobacter* sp. gentyse, buvo identifikuoti už šių junginių katabolizmą atsakingi genai (Sadauskas et al., 2017; Stanislauskienė et al., 2012). Atlikus palyginamąją sekų analizę, paaiškėjo, jog visais minėtais atvejais skaidymo keliuose dalyvauja FMO ir flavino reduktazių genai.

Arthrobacter sp. PY22 bakterija gali panaudoti 2-hidroksipiridiną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. Klonuotame 6 kb DNR fragmente iš *Arthrobacter* sp. PY22 nustatyti aštuoni galimi atviri skaitymo rėmeliai (ORF), susiję su 2-hidroksipiridino katabolizmu. Tarp jų identifikuotas *hpyB* genas, koduojantis galimą monooksigenazę, ir *hpyE* – flavino reduktazę. *hpyB* koduojama monooksigenazė priklauso dvikomponenčių flavino monooksigenazių šeimai ir fermentinę funkciją atlieka kartu su flavino reduktaze, koduojama *hpyE* (Stanislauskienė et al., 2012). Taip pat buvo nustatyta, kad *Arthrobacter* 68b kamienas geba panaudoti 2 – metilpiridiną, kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį (Stanislauskienė et al., 2012). Jo katabolizme, kaip pagalbinis fermentas, dalyvauja flavino reduktazė PyrE.

Tyrinėjant indolo skaidymą *Acinetobacter* sp. O153 kamienne nustatyta, kad katabolinė kaskada prasideda nuo oksidacijos, kurią vykdo nuo flavino priklausoma dviejų komponentų oksigenazės sistema. Klonuoto 12 kb DNR fragmento sekos analizės duomenys parodė, kad yra devyni ORF, o tolesnė bioinformatinė analizė leido identifikuoti du skirtingus genų rinkinius – *iif* ir *ant*. Operonas *iif* koduoja penkis galimus fermentus, tarp kurių *iifC* koduojama oksigenazė, o *iifD* – flavino reduktazė (Sadauskas et al., 2017).

Šiam darbui buvo pasirinktos trys naujai identifikuotos flavino reduktazės ir atliktas jų biocheminis charakterizavimas. Fermento apibūdinimas reiškia įvairių cheminių ir fizikinių fermento savybių nustatymą, šiuo atveju, substrato specifiškumo, optimalaus pH ir temperatūros, temperatūrinio stabilumo, Michaelio konstantų ir fermentino aktyvumo. Šiame darbe atlikti klasikiniai kinetiniai matavimai siekiant apibūdinti optimalias sąlygas flavino reduktazių veikimui, ateityje jas potencialiai pritaikant biokatalizės sistemų kūrimui.

Šio darbo objektas yra rekombinantinės flavino reduktazės – HpyE iš *Arthrobacter* sp. PY22 , PyrE iš *Arthrobacter* sp. 68b ir IifD iš *Acinetobacter* sp. O153 (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Bakterinės flavino reduktazės, identifikuotos 2-hidroksipiridno, 2-metilpiridino ir indolo skaidymo keliuose.

Trumpinys	Mikroorganizmas šaltinis	NCBI prieigos numeris
HpyE	<i>Arthrobacter</i> sp. PY22	CAR47879.1
PyrE	<i>Arthrobacter</i> sp. 68b	AKG47384.1
IifD	<i>Acinetobacter</i> sp. O153	ARO76329.1

Pagal atliktus tyrimus darbo rezultatus galima suskirstyti į keturias pagrindines dalis: 1) bioinformatinė analizė ir baltymų struktūrų modeliavimas pagal artimiausius homologus, 2) rekombinantinių baltymų sintezės parametrų optimizavimas siekiant gauti kuo didesnę aktyvių fermentų kiekį 3) flavino reduktazių vykdomų oksidacijos-redukcijos reakcijų charakterizavimas pagal pasirinktas ypatybes ir 4) numatyti eksperimentai. Skyriaus pabaigoje aptariami gauti rezultatai.

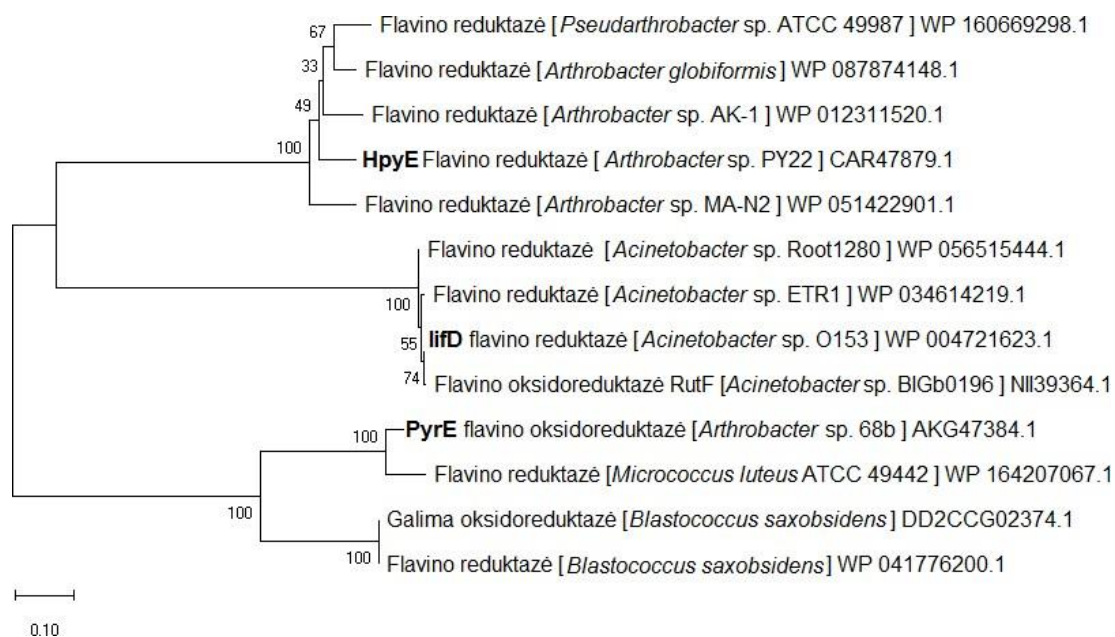
3.2. Bakterinių flavino reduktazių bioinformatinė analizė

Atliekant flavino reduktazių HpyE, PyrE ir IifD sekų analizę, aminorūgščių sekos buvo palygintos su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis (BLASTp įrankis). Gautų palyginių pagrindu buvo sudarytas charakterizuojamų flavino reduktazių filogenetinis medis (3.1 pav.). Filogenetinio medžio konstravimui ir sekų palyginimui naudota molekulinės evoliucijos genetikos analizės programa MEGA X (Kumar et al., 1994).

Paašškėjo, kad tiriamasis baltymas HpyE (19,7 kDa) yra panašiausias į galimą flavino reduktazę iš *Arthrobacter* MA-N2 kamieno ir su ja formuoja atskirą šaką. Tuo tarpu su kitomis flavino reduktazių sekomis HpyE homologija žema.

Genas *pyrE* koduoja baltymą (19,8 kDa), kuris yra labiausiai panašus į flavino reduktazę iš *Micrococcus luteus* ATCC 49442. Pastarasis baltymas priklauso dvikomponentei fermentų sistemai, katalizuojančiai izobutilamino oksidaciją susidarant izobutilhidroksilaminui. Su šia reduktaze PyrE formuoja atskirą filogenetinę šaką.

Geno *iifD* koduojamas baltymas (18,8 kDa) parodė žemą homologiją su kitomis aminorūgščių sekomis NCBI duomenų bazėje, tačiau buvo panašiausias į flavino reduktazių (DIM6/NTAB) šeimos NADH-FMN oksidoreduktazę RutF iš *Acinetobacter* sp. BIGb0196.



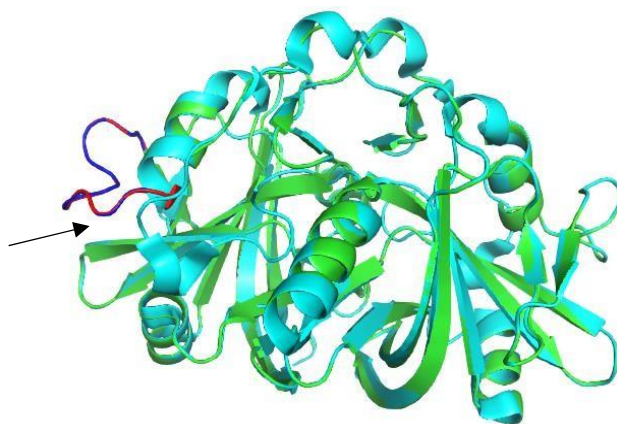
3.1 pav. HpyE, PyrE ir lifD flavino reduktazių aminorūgščių sekų giminingumo filogenetinis medis. Medis suformuotas artimiausių grupių apjungimo metodu. Šalia atsišakojimų nurodyta procentinė sutapimo su tiriamu baltymu išraiška. Evoliuciniai atstumai buvo apskaičiuoti naudojant Puasono metodą, mastelis atitinka pakeistų aminorūgščių skaičių, tenkantį vienai vietai. Šioje analizėje panaudota 13 aminorūgščių sekų. Šalia tiriamo baltymo homologų nurodyti prieigos numeriai genų banke.

Siekiant rasti aminorūgščių sekų homologus, kurių struktūros yra nustatytos ir patvirtintos, HpyE, PyrE ir lifD flavino reduktazų sekos buvo palygintos su PDB duomenų bazėje esančiomis sekomis. Pagal gautus rezultatus nebuvo baltymų, kurių sekų panašumas didesnis nei 43 %.

Nustatyta, kad artimiausias, struktūriškai patvirtintas HpyE sekos homologas yra į flaviną panašus, FMN surišantis baltymas NTA-MoB iš *Mycobacterium thermoresistibile* ATCC 19527 (PDB ID: 3NFW_A), sekų sutapimas 38,10 %, o RMSD yra lygus 0,096 Å. Šis parametras nurodo šaknies vidurkio nuokrypį tarp anglies atomų padėties, kuo mažesnė reikšmė, tuo labiau abi šios struktūros yra susijusios. Struktūrinis tapatumas yra patikimas, jei RMSD vertė nesiekia 1. Atsižvelgiant į tai, galima teigti, kad šios struktūros yra glaudžiai susijusios.

NTA-MoB priklauso fermentų klasei, kurią sudaro du komponentai: A ir B. A – substrato oksidaciją vykdanti monooksigenazė, o B – flavino reduktazė, kuri naudoja kofaktorių redukuoto flavino regeneravimui. Dėl NTA-MoB dvikomponenčio fermento vykdomos katalizės *M. thermoresistibile* bakterijos geba panaudoti alternatyvius anglies šaltinius. Visas NTA-MoB junginys priskiriamas C klasės flavoproteinų monooksigenazėms, dėl to, atsižvelgiant į homologiją, HpyE taip pat galėtų būti priskirti C klasei. NTA-MoB kristalinė struktūra atskleidė, kad tai yra homodimerinis baltymas su flavino reduktazėms būdingu

perskirtos statinės (*angl. split-barrel*) sanklodos motyvu. Galima daryti prielaidą, jog tiriamasis baltymas HpyE taip pat yra homodimeras. Tam patvirtinti planuojama atlikti gelfiltracijos eksperimentą. NTA-MoB baltymo struktūroje esanti kilpos sritis ties aminorūgščių liekanomis Gly88 – Asp99 (tarp 3 α -spiralės ir 6 β -klostės) sudaro kritinę jungiamosios kišenės dalį, kurią atpažįsta FMN, o analogiška kilpa yra susijusi su FAD arba FMN surišimu fenolio 2-hidroksilazės B komponente iš *Bacillus thermoglucosidasius*. Atlikus HpyE struktūros modeliavimą, analogiška kilpa buvo suformuota ties Ala95 – Glu106 aminorūgščių liekanomis (3.2 pav.). Ši kilpa buvo apibūdinta kaip rečiau pasitaikanti, jei nėra FMN, tačiau labai dažna FMN rišančiose struktūrose (Zhang et al., 2011). Remiantis HpyE struktūriniu modeliu ir literatūros duomenimis buvo daroma prielaida, kad flavino reduktazė HpyE yra priklausoma nuo FMN.

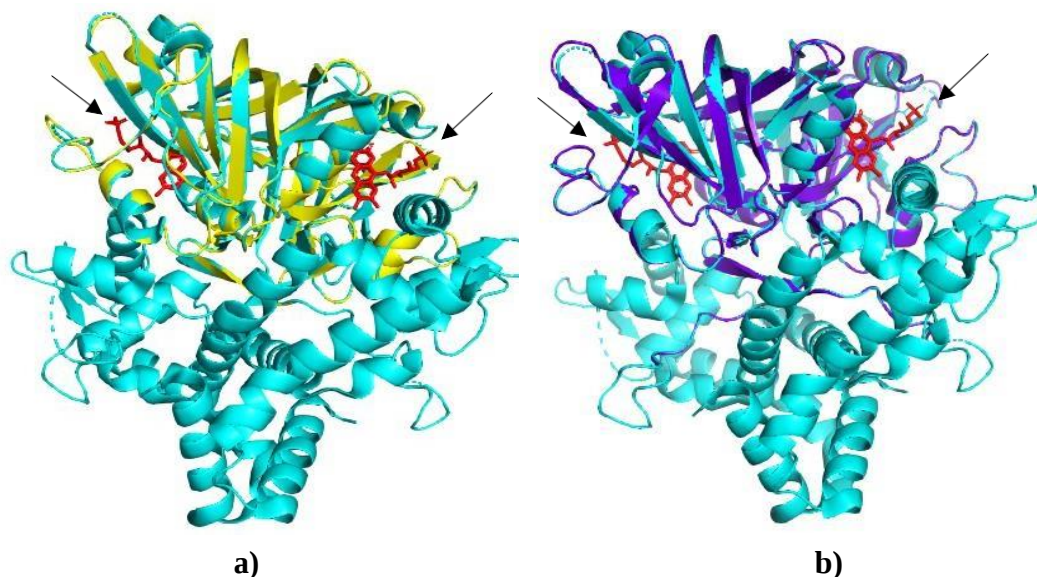


3.2 pav. Flavino reduktazės HpyE ir baltymo homologo NTA-MoB struktūrų sugretinimas. Žalia spalva žymi HpyE, mėlyna – NTA-MoB. Juoda rodyklė žymi FMN jungiančios kišenės dalį. Baltymas NTA-MoB yra homodimeras. Raudonai pažymėta FMN surišimo vieta NTA-MoB baltymo struktūroje, ties aminorūgščių liekanomis Gly88 – Asp99. Tamsiai mėlyna spalva žymi analogišką kilpą HpyE baltymo struktūroje ties Ala95 – Glu106.

Flavino reduktazių PyrE ir IifD struktūrinis homologas sutampa ir yra, literatūros apžvalgoje minėta, dvikomponenčio fermento *p*-hidroksifenilacetato 3-hidroksilazės (HPAH) reduktazė C1 (PDB ID: 5ZC2_A) iš *Acinetobacter baumannii*. Aminorūgščių sekos analizė atskleidė, kad C1 turi du domenų: N-galo flavino reduktazės domeną (NTD) ir C-galo MarR (*angl. Multiple Antibiotic Resistance Regulator Protein* domeną (CTD)). Nurodoma, jog MarR domenas, C1 baltymo kontekste, skirtas fermentų aktyvumui kontroliuoti. Visi artimiausi NTD struktūriniai homologai yra flavino reduktazės, kelios iš jų: tariama oksidoreduktazė iš *Rickettsia felis*, jau aptartas *M. thermoresistibile* nitrilotriacetato monooksigenazės B komponentas (NTA-MoB) ir *Thermus thermophilus* HB8 flavino reduktazė HpaC. Molekulinės masės skaičiavimai parodė, kad C1 baltymas tirpale yra dimeras, todėl galime daryti prielaidą, kad tiriamieji baltymai PyrE ir IifD yra taip pat dimerinės struktūros, tačiau, tam patvirtinti reiktų atlikti gelfiltracijos eksperimentais paremtą analizę. Nustatyta, kad PyrE ir HPAH C1

baltymo sekų sutapimas 34,61 %, o RMSD yra lygus 0,074 Å. Baltymo IifD sekų sutapimas su minėtu homologu yra 42,24 %, o RMSD yra lygus 0,132 Å. Nors PyrE sekų sutapimas buvo mažesnis, tačiau RMSD atskleidžia, kad modelis yra patikimesnis ir glaudžiau susijęs.

Ankstesnuose C1 baltymo charakterizavimo tyrimuose buvo nustatyta, kad natūralus C1 kofaktorius yra FMN. 3.3 paveiksle rodyklėmis pažymėtos HPAH C1 baltymo struktūroje esančios FMN rišimosi kišenės ir FMN struktūrinės formulės (raudona spalva).



3.3 pav. Flavino reduktazių a) PyrE ir b) IifD sugretinimas su baltymu homologu HPAH C1. Geltona spalva žymi PyrE, violetinė – IifD, melsva - HPAH C1 baltymus. Raudonai pažymėtos FMN struktūrinės formulės, rodyklės žymi FMN surišimo kišenes.

Sugretinus tiriamuosius baltymus PyrE ir IifD su homologu HPAH C1, FMN surišimo vietos erdvinė struktūra sutapo (Yuenyao et al., 2018). Pagal analogiją galima teigti, kad labiausiai tikėtinas PyrE ir IifD baltymų kofaktorius yra FMN.

3.3. Sintezės parametrų optimizavimas

Tam, kad tiriamas flavino reduktazės būtų galima pritaikyti biokatalizėje ir siekiant efektyvių procesų, pirmiausiai reikia užtikrinti optimalią rekombinantinių baltymų sintezę, gaunant santykinai didelius tirpaus ir aktyvaus tikslinio baltymo kiekius. Dėl šios priežasties buvo pasirinkti skirtingi sintezės parametrai ir aiškintasi, kokiomis sąlygomis rekombinantinių fermentų gaunama daugiausiai.

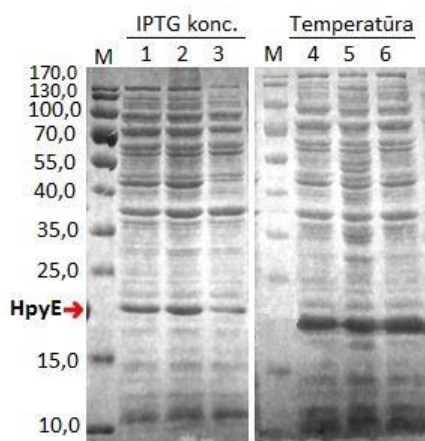
3.3.1 Rekombinantinių baltymų sintezės priklausomybė nuo temperatūros ir induktoriaus koncentracijos

Metodinėje dalyje aprašytu būdu buvo užaugintos *E. coli* BL21 (DE3) kultūros, turinčios rekombinantines pHPyE ir pPyrE plazmides (pET-21 a (+) plazmidinis vektorius, į kurį

atitinkamai klonuotas *hpyE* arba *pyrE* genas). Norint sužinoti, kaip rekombinantinių flavino reduktazių sintezė priklauso nuo induktoriaus koncentracijos, augimo temperatūros ir trukmės po indukcijos buvo atlikta keletas eksperimentų.

Prieš optimizuojant sąlygas buvo stebimi itin dideli netirpaus baltymo kiekiai (nuosėdose) lyginant su mažu tikslino HpyE kiekiu. Taip pat, nebuvo aptiktas rekombinantinio baltymo aktyvumas. Dėl šių priežasčių buvo reikalingi sintezės optimizavimo tyrimai.

Optimizuojant sąlygas *E. coli* BL21 (DE3) bakterijos augintos esant 30 °C temperatūrai, kol pasiekė OT₆₀₀ 0,6–1,0. IPTG koncentracijos – 0,2; 0,5 ir 1,0 mM, baltymų ekspresijai pasirinktos temperatūros po indukcijos: 16–22 °C, 30 °C ir 37 °C, o inkubavimo trukmės po indukcijos iki biomasės surinkimo buvo 3, 6, 18 ir 24 val. Rezultatai buvo analizuoti baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis būdu. HpyE baltymo molekulinė masė nustatyta elektroforeziškai (~20 kDa) atitiko molekulinę masę, apskaičiuotą pagal baltymo seką (19,7 kDa) (3.4 pav.).

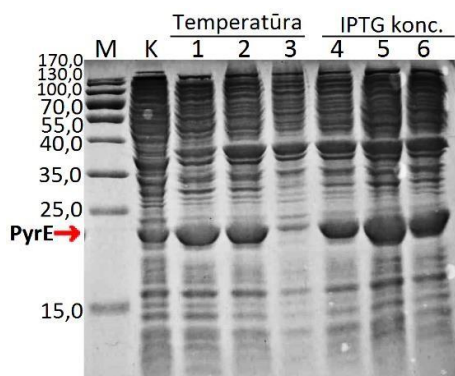


3.4 pav. Rekombinantinės flavino reduktazės HpyE iš *Arthrobacter* sp. PY22 biosintezės *E. coli* BL21 (DE3) kamieno priklausomybė nuo induktoriaus koncentracijos (1 – 0,2 mM, 2 – 0,5 mM, 3 – 1,0 mM) ir temperatūros po indukcijos (4 – 20 °C, 5 – 30 °C, 6 – 37 °C). M – molekulinį masių žymuo (kDa).

Buvo nustatyta, kad temperatūros po indukcijos skirtumai HpyE baltymo sintezei neturi reikšmingos įtakos: visais atvejais buvo gaunamas panašus tirpaus baltymo kiekis. Tačiau žemesnėje temperatūroje buvo stebimas mažesnis suminis baltymo kiekis. Tai greičiausiai reiškia, kad žemesnė temperatūra sulėtina ląstelių dalijimosi procesus, tačiau baltymo sintezės neslopina. Daugiausiai tirpaus baltymo susintetinta, kai geno raiška buvo indukuota 0,5 mM IPTG (3.4 pav. 2). Taip pat, pastebėta, jog didesnė induktoriaus koncentracija neigiamai veikė tirpaus baltymo sintezę, o suminio baltymo kiekiui įtakos nedarė.

PyrE flavino reduktazės atveju nustatėme, jog 37 °C auginimo temperatūra neigiamai veikia tirpaus tikslinio fermento sintezę, o suminis baltymo kiekis išliko panašus. Aukštesnė temperatūra galimai paskatina tikslinio baltymo sintezės procesą, tuo pačiu lemdama gausesnį

netirpaus ir neteisingos konformacijos baltymo susidarymą. Esant žemesnėms temperatūroms buvo susintetinamas panašus kiekis tirpaus baltymo, o mažesnio suminio baltymų kiekio, kaip HpyE atveju, pastebėta nebuvo. (3.5 pav.).

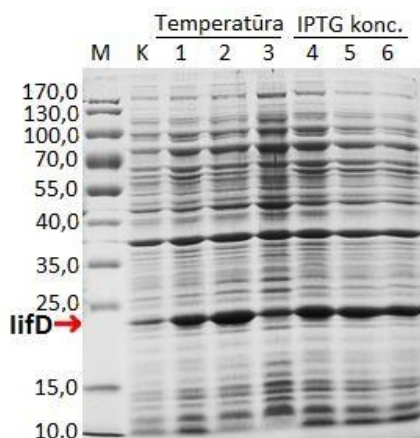


3.5 pav. Rekombinantinės flavino reduktazės PyrE iš *Arthrobacter* sp. 68b biosintezės priklausomybė nuo temperatūros po indukcijos (1 – 16 °C, 2 – 30 °C, 3 – 37 °C) ir induktoriaus koncentracijos (4 – 0,2 mM, 5 – 0,5 mM, 6 – 1,0 mM). M – molekulių masių žymuo (kDa), K – kontrolė, neindukuotos *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės augintos esant 30 °C temperatūrai.

Induktoriaus koncentracijos įtaka baltymui PyrE buvo mažesnė nei HpyE, daugiausiai sintezės produkto buvo gauta indukavus 0,5 mM IPTG. PyrE baltymo molekulinė masė nustatyta elektroforeziškai (~20 kDa) atitiko molekulinę masę, apskaičiuotą pagal baltymo seką (19,8 kDa).

Jau minėtu principu buvo užaugintos *E. coli* BL21 (DE3) kultūros su rekombinantine IifD flavino reduktaze (Plazmidinis vektorius, į kurį klonuotas *IifD* genas – pET-28 b (+)).

Atlikus elektroforezę nustatyta, kad baltymo IifD molekulinė masė (~20 kDa) atitiko molekulinę masę, apskaičiuotą pagal baltymo seką (18,0 kDa) (3.6 pav.).

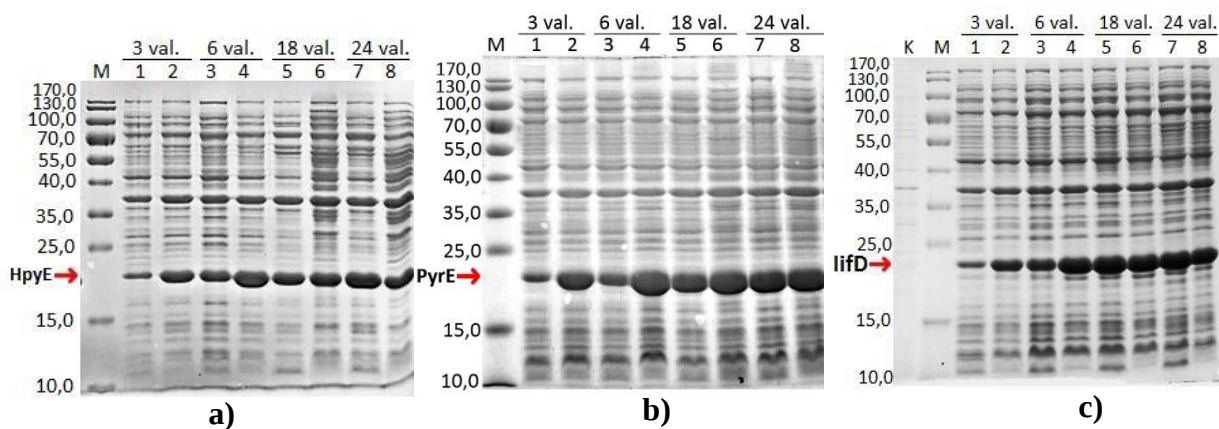


3.6 pav. Rekombinantinės flavino reduktazės IifD iš *Acinetobacter* O153 sp. biosintezės priklausomybė nuo temperatūros po indukcijos (1 – 16 °C, 2 – 30 °C, 3 – 37 °C) ir induktoriaus koncentracijos (4 – 0,2 mM, 5 – 0,5 mM, 6 – 1,0 mM). M – molekulių masių žymuo (kDa), K – kontrolė, neindukuotos *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės augintos esant 30 °C temperatūrai.

Buvo nustatyta, kad tinkamiausia temperatūra rekombinantinės flavino reduktazės IifD sintezei yra 16–30 °C intervale, o aukštesnė (37 °C) slopina tikslinio baltymo sintezę. Panaši tendencija anksčiau pastebėta su PyrE baltymu. Remiantis 3.6 paveikslo duomenimis galima teigti, kad aukštesnė temperatūra suintensyvino bakterijų augimo, o ne tikslinio baltymo sintezės procesus, nes suminis kitų ląstelių baltymų kiekis buvo didesnis nei žemesnės temperatūros atveju. Gauti rezultatai parodė, jog skirtingos induktoriaus koncentracijos, priešingai nei HpyE baltymo atveju, rekombinantinio IifD baltymo kiekiui įtakos nedarė. Vizualiai įvertinus tirpaus tikslinio baltymo santykį su kitais ląstelės baltymais, nustatyta, kad IifD sintezei tinkamiausia IPTG koncentracija yra 0,5 mM.

3.3.2 Trukmės po indukcijos įtaka tirpaus baltymo kiekiui

Siekiant nustatyti, ar transformuotų *E. coli* BL21 (DE3) bakterijų inkubavimo trukmė po baltymo sintezės indukavimo daro įtaką jo galutiniam kiekiui, buvo atlikta keletas eksperimentų. Remiantis 3.3.1 skyriuje aprašytais tikslinių flavino reduktazių sintezės optimizavimo duomenimis, baltymų sintezei pasirinktos dvi palankiausios temperatūros: 16–20 °C ir 30 °C, ir skirtinga sintezės trukmė (3, 6, 18 ir 24 val.). Naudota induktoriaus koncentracija buvo 0,5 mM. Gauti rezultatai atskleidė tendenciją, kad visų trijų tiriamųjų flavino reduktazių, HpyE, PyrE ir IifD, sintezei reikalingas ne mažesnis nei 6 val. trukmės po-indukcinis ląstelių inkubavimas. Didesnis baltymų kiekis buvo stebimas kultūros laikius esant 30 °C temperatūrai. Toks rezultatas paaiškinamas tuo, kad esant aukštesnei temperatūrai baltymų sintezė vyksta greičiau. *E. coli* BL21 (DE3) su rekombinantinėmis plazmidėmis inkubuojant 18 ir 24 val. po indukavimo, temperatūra nebedarė esminės įtakos: tiek esant 16–20 °C, tiek 30 °C temperatūrai sintezę vykdant ilgesnį laiką tikslinio baltymo kiekis nebesiskyrė (3.7 pav. a), b), c)).



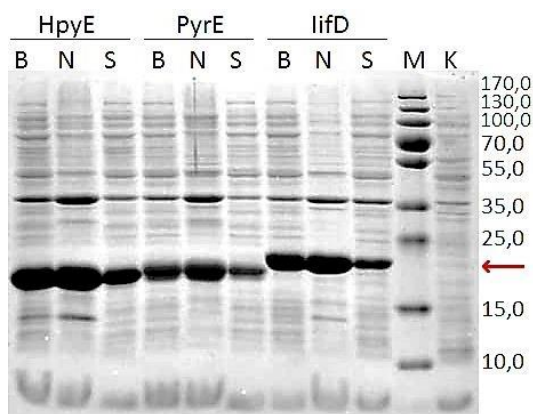
3.7 pav. Rekombinantinių flavino reduktazių HpyE (a), PyrE(b) ir IifD (c) biosintezės priklausomybė nuo temperatūros ir inkubavimo trukmės po indukcijos. 1,3,5,7 – 16 °C ((a) atveju 20 °C); 2,4,6,8 – 30 °C; 1,2 – 3 val.; 3,4 – 6 val.; 5,6 – 18 val.; 7,8 – 24 val. IPTG koncentracija – 0,5 mM. M – molekulinio masių žymuo (kDa), K – kontrolė, neindukuotos *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės.

Pamatavus suardytos biomasės tirpios dalies aktyvumą, paaiškėjo, kad baltymas HpyE ir PyrE buvo aktyvus tik auginus 18 val. esant 16–20 °C temperatūrai ir 24 val. auginus esant 16 °C arba 30 °C temperatūroms, o baltymas IifD buvo aktyvus auginus 18 arba 24 val. esant 16 °C temperatūrai po indukavimo. Sintezę po indukacijos vykdžius trumpiau aktyvumas nebuvo aptiktas. Ilgesnė sintezės trukmė galimai lemia didesnius baltymo kiekius ir užtikrina aktyvumą. Rekombinantinio baltymo ekspresija esant žemesnei augimo temperatūrai turi bendrą pranašumą, nes padidėja agregacijai linkusių rekombinantinių baltymų tirpumas ir ribojamas jų skaidymasis dėl šiluminio šoko proteazių, kurios indukuojamos padidintos ekspresijos sąlygomis.

Rekombinantinių flavino reduktazų HpyE, PyrE ir IifD sintezės sąlygų optimizavimo rezultatai atskleidė, kad daugiausiai tikslinio baltymo gaunama *E. coli* BL21 (DE3) bakterijas su rekombinantinėmis plazmidėmis po indukavimo inkubuojant 18–24 val., esant 16–20 °C arba 30 °C temperatūrai. Tinkamiausia IPTG koncentracija norint gauti daugiausiai aktyvių tikslinių flavino reduktazių yra 0,5 mM.

3.3.3. Rekombinantinių flavino reduktazių HpyE, PyrE ir IifD gryninimas

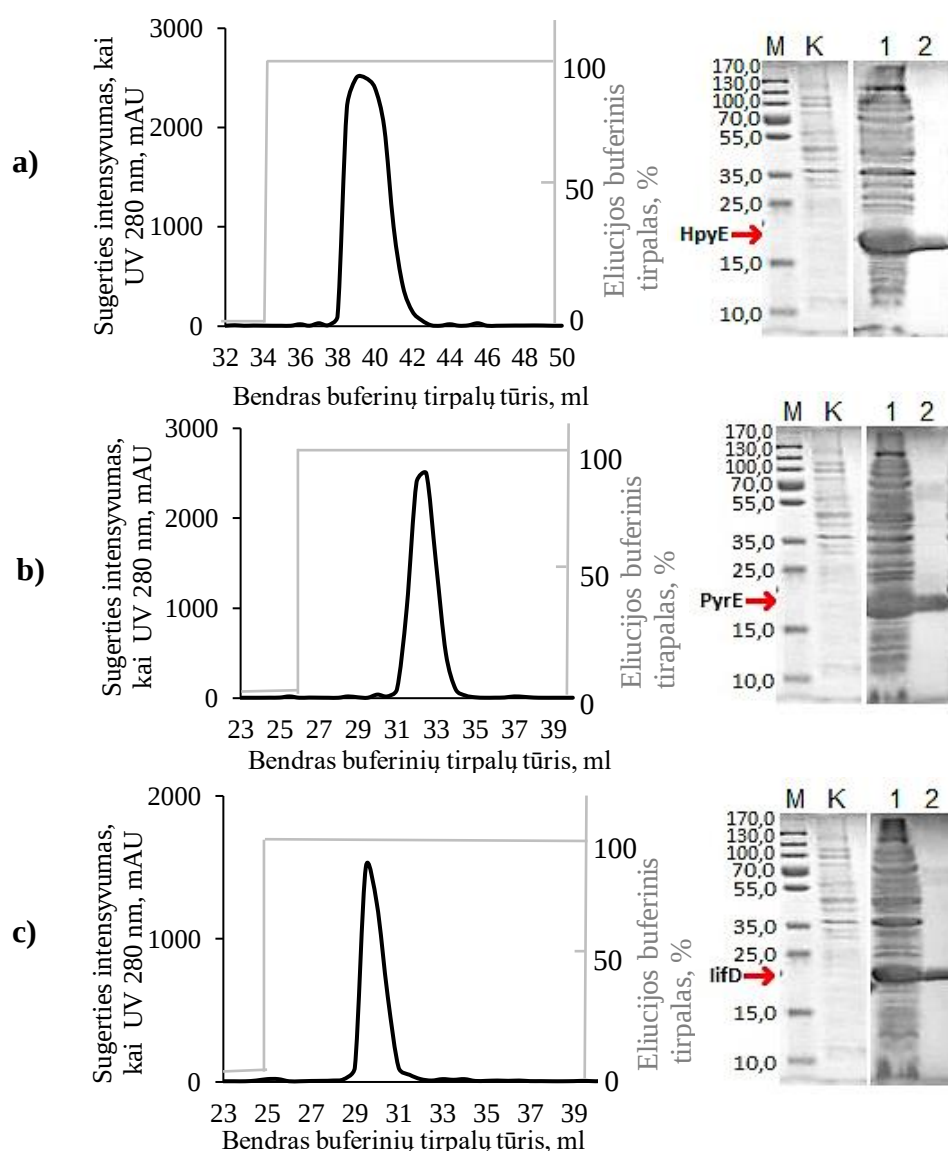
Rekombinantinių flavino reduktazių gryninimo darbams naudota biomasė, kuri gauta 200 ml LB terpės. Biomasė buvo surinkta centrifuguojant, suspenduota 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, buferiniame tirpale ir suardyta ultragarsu, kaip aprašyta metodinėje dalyje. Siekiant įvertinti santykinį tirpaus tikslinio baltymo kiekį, palyginus su netirpia dalimi, bendras ląstelių lizatas, nuosėdos ir tirpi frakcija buvo analizuojami elektroforezės būdu denatūruojančiomis sąlygomis. Eksperimentui visi mėginiai buvo skiesti 5 kartus, gautas elektroforezės vaizdas pateiktas 3.8 pav.



3.8 pav. Rekombinantinių flavino reduktazių HpyE, PyrE ir IifD bendros biomasės, nuosėdų ir tirpios dalies santykinis kiekis po ardymo. B – bendra biomasė po ardymo, N – nuosėdos suspenduotos Tris-HCl, pH 7,5 buferiniame tirpale, S – tirpi dalis (superntantas), gautas po centrifugavimo. M – molekulinį masių žymuo (kDa), K – kontrolė, suardytų, netransformuotų *E. coli* BL21 (DE3) ląstelių tirpi dalis.

Sprendžiant iš gautų rezultatų netirpaus baltymo (nuosėdose) buvo daugiau, tačiau sąlygų pakeitimas leido pasididinti aktyvaus baltymo išeigą ir pavyko pasiekti sintezės lygius, pakankamus tolesniems darbams.

Rekombinantinės flavino reduktazės HpyE, PyrE, IifD buvo sintetinės su 6 histidinių inkaru baltymo C gale. Dėl šios priežasties, gryninimui buvo pasirinkta giminingumo chromatografija ir Ni^{2+} chelatinė kolonėlė. Po vieno gryninimo etapo, visų flavino reduktazių atveju, buvo pasiektas didesnis nei 80% grynumas. Atsižvelgiant į tai, kad gryninimo metu tiksliniai baltymai susikonsentavo, atliekant baltymų elektroforezę į takelius buvo įnešta 10 kartų skiestų baltymų frakcijų po gryninimo. Tirpi, negryninta dalis elektroforezei skiesta nebuvo (3.9 pav. a), b), c)).



3.9 pav. Rekombinantinių flavino reduktazių gryninimo chromatogramos schematinis vaizdas ir elektroforezinis vaizdas prieš bei po gryninimo. **a), b), c)** – atitinkamai HpyE, PyrE, IifD baltymai. 1 – tirpi dalis prieš gryninimą, 2 – sujungtos eliuacijos frakcijos po gryninimo, naudojant Ni^{2+} chelatinę kolonėlę. M – molekulinį masių žymuo. K – kontrolė, suardytų, netransformuotų *E. coli* BL21 (DE3) ląstelių tirpi dalis.

Siekiant pašalinti imidazolą, po gryninimo buvo atlikta dializės procedūra. Baltymas IifD, atlikus dializę dviem atvejais iš trijų gryninimų iškrito į nuosėdas, todėl vėlesniuose eksperimentuose buvo pasirinkta nudruskinimo strategija naudojant nudruskinimo 5 ml HiTrap kolonėlę. Galima teigti, kad flavino reduktazė IifD yra jautri dializės procedūroms.

Nustatyta, kad iš 200 ml *E. coli* BL21 (DE3) biomasės gaunama 3,1 g HpyE flavino reduktazės, kurios specifinis aktyvumas 136,4 U/mg. Iš tokio paties tūrio PyrE baltymo gaunama 2,6 kartus mažiau (1,2 g), o specifinis aktyvumas mažesnis 13,4 kartus (10,2 U/mg). PyrE baltymo gaunamas kiekis 1,4 kartus didesnis nei IifD (0,83 g), tačiau IifD baltymo specifinis aktyvumas (55,8 U/mg) 5,5 kartus viršijo PyrE. Tai reiškia, kad tikslinio aktyvaus IifD baltymo buvo išgryninta daugiau. HpyE iš tokio paties tūrio buvo gauta 3,8 kartus daugiau nei IifD, o specifinis aktyvumas buvo 2,4 kartus didesnis (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Rekombinantinių flavino reduktazių gryninimas. Fermentai buvo gryninami iš 200 ml *E. coli* BL21 (DE3) biomasės.

Gryninimas		Baltymo kiekis, mg/ml	Bendras aktyvumas, U	Specifinis aktyvumas, U/mg
HpyE	I)	0,50	74,60	147,40
	II)	16,62	2 186	131,52
	III)	14,80	2 090	141,21
PyrE	I)	5,65	33,40	5,90
	II)	6,62	114,40	17,28
	III)	5,65	41,50	7,34
IifD	I)	2,96	110,60	37,36
	II)	5,31	394,00	74,19

Aktyvumas ir baltymo kiekis taip pat buvo įvertintas po 15 dienų išgrynintų flavino reduktazių saugojimo -20 °C temperatūroje. Atlikus analizę pastebėtas reikšmingas PyrE baltymo kiekio (73,5 %) ir specifinio aktyvumo (24,8 %) praradimas. Tai gali būti siejama su denatūracijos efektais. HpyE ir IifD atveju tokių pokyčių pastebėta nebuvo. Kitame darbo etape išgrynintos flavino reduktazės buvo naudojamos fermentų biocheminiam charakterizavimui.

3.4. Rekombinantinių flavino reduktazių biocheminis charakterizavimas

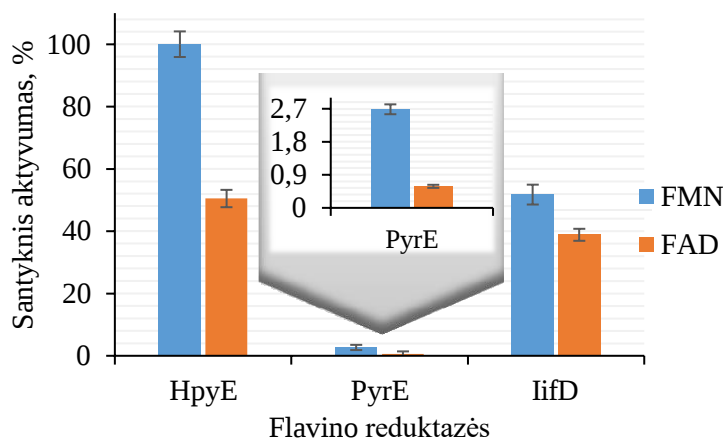
3.4.1 HpyE, PyrE ir IifD substratinio specifiškumo nustatymas

Substratinis specifiškumas yra fermento savybė pasirinkti konkretų substratą iš panašių cheminių junginių grupės. Ši charakteristika fermentus padaro svarbiais diagnostiniais ir kataliziniais įrankiais (Heine et al., 2018). Tuo remiantis biocheminį flavino reduktazių charakterizavimą nuspręsta pradėti nuo substratinio specifiškumo tyrimų.

Atlikti fermentinio aktyvumo matavimai potencialiais substratais panaudojant FMN, FAD, riboflaviną (5 mM) ir 3-acetilpiridino adenino dinukleotidą (100 mM). Pastarasis buvo pasirinktas kaip alternatyva flavinams. Eksperimentas atliktas pasirinkus 1,5 – 3 mM koncentracijas reakcijos mišinyje ir 30 s, 5 min, 30 min ir 1 val inkubacijos trukmes po reakcijos inicijavimo atitinkamu fermentu. Gauti rezultatai atskleidė, jog panaudojus 3-acetilpiridino adenino dinukleotidą, kaip potencialų substratą sugerties pokytis visų flavino reduktazių atveju nesiekė 3 %. Atsižvelgiant į šiuos rezultatus galima daryti išvadą, jog 3-acetilpiridino adenino dinukleotidas nėra tinkama alternatyva. Reakcija taip pat nevyko substratu pasirinkus riboflaviną, o didžiausias fermentinis aktyvumas aptiktas su FMN.

Ankstesnių eksperimentų metu paaiškėjo, kad iš trijų tiriamų flavino reduktazių HpyE baltymas pasižymi didžiausiu aktyvumu, todėl būtent HpyE aktyvumas reakciją vykdant su FMN buvo prilygintas 100 % (3.10 pav).

HpyE baltymo atveju santykinis aktyvumas substratu panaudojus FAD buvo 51 ± 3 % mažesnis, palyginus su FMN. PyrE santykinis aktyvumas reakciją vykdant su FAD substratu buvo 4,6 karto mažesnis nei su FMN. Pastebėta, kad baltymo IifD santykinis aktyvumas panaudojus FMN arba FAD substratą skyrėsi mažiausiai. IifD, substratu naudodamas FMN, reakciją vykdė 25 ± 3 % greičiau nei su FAD.

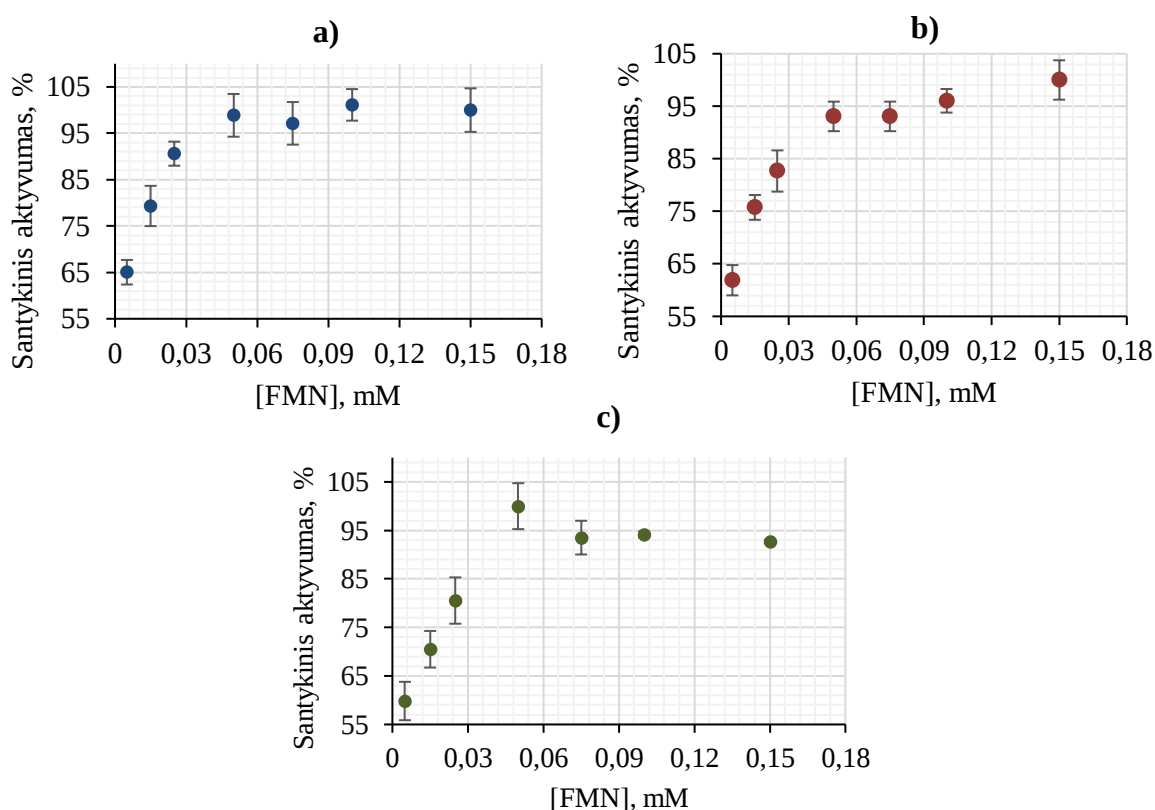


3.10 pav. Rekombinantinių HpyE, PyrE ir IifD aktyvumų priklausomybė nuo substrato pasirinkimo. Substratų koncentracija tirpale 50 μ M. 100 % – HpyE specifinis aktyvumas, substratu naudojant FMN. Reakcija inicijuota fermentu. Aktyvumo matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

Tiriamų flavino reduktazių polinkis reakciją geriau vykdyti su FMN substratu gali būti aiškinamas jų homologų tyrimų rezultatais, nes tiek NTA-MoB, tiek HPAH C1 pirmenybę teikia FMN. Be to, tokie rezultatai leidžia manyti, jog flavino reduktazės HpyE, PyrE ir IifD gali būti priskiriamos C grupės dvikomponenčių monooksigenazių sistemoms.

Palyginus tiriamuosius fermentus tarpusavyje nustatyta, kad HpyE buvo ~ 2 kartus aktyvesnis už IifD ir net $\sim 37, 26$ kartus aktyvesnis už flavino reduktazę PyrE.

Kitame rekombinantinių flavino reduktazių tyrimų etape buvo siekiama išsiaiškinti FMN koncentraciją, kuriai esant fermentas yra aktyviausias. Eksperimentų pradžioje buvo pasirinkta 3 min inkubuoti fermentą su FMN ir reakciją inicijuoti su NADH kosubstratu, tačiau rezultatams ir paklaidoms tai reikšmingos įtakos nepadarė, todėl pateikti rezultatai gauti be inkubacijos. Nustatyta, kad maksimalus HpyE aktyvumas pasiektas panaudojus 50 μ M FMN koncentraciją, o koncentracijų intervale 50 – 150 μ M aktyvumas beveik nesikeitė (augimas 1–4 %) (3.11 pav. a). Baltymas PyrE pasiekė 93 ± 3 % aktyvumą esant 50 μ M FMN koncentracijai, o didžiausias PyrE aktyvumas buvo reakcijos mišinyje esant 150 μ M FMN (3.11 pav. b). Visgi, 50–150 μ M FMN intervale PyrE aktyvumas svyravo paklaidų ribose, todėl tolesniuose eksperimentuose naudota 50 μ M FMN koncentracija. Tiriamojo baltymo IifD maksimalus aktyvumas buvo pasiektas panaudojus 50 μ M FMN ir nuo 50 μ M iki 150 μ M netgi sumažėjo 6–8 % ribose (3.11 pav. c). Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad visoms tiriamoms flavino reduktazėms tinkamiausia FMN koncentracija yra 50 μ M, kuri ir naudota tolesniuose eksperimentuose.



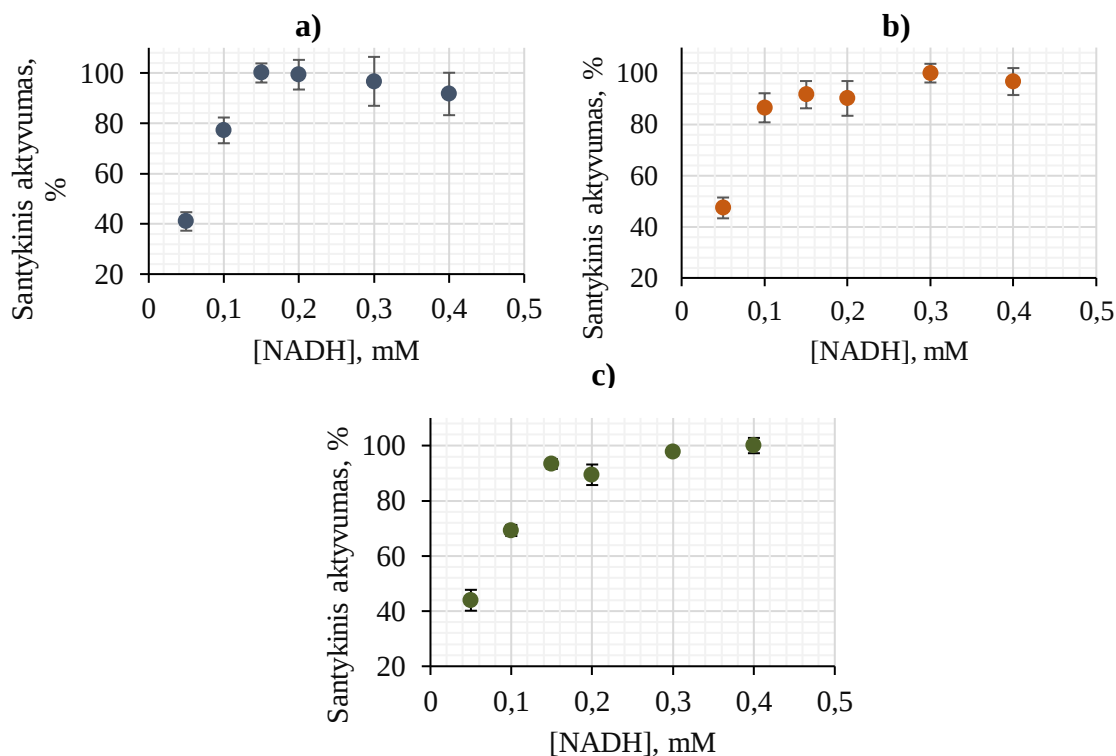
3.11 pav. Rekombinantinių **a)** HpyE, **b)** PyrE, **c)** IifD aktyvumo priklausomybė nuo FMN koncentracijos. 100 % laikoma koncentracija su kuria pasiektas didžiausias aktyvumas kiekvieno baltymo atveju (HpyE – 100 μ M, PyrE – 150 μ M, IifD – 50 μ M). Reakcija inicijuota fermentu. Aktyvumo matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

Flavino reduktazės katalizuoja oksidacijos-redukcijos reakciją, kurios metu flavinas redukuojamas, o oksiduojamas NADH arba NADPH kosubstratas.

Atliekant fermentinių aktyvumų matavimus panaudojus NADPH (10 mM), kaip kosubstratą, pasirinktos 150–300 μM koncentracijos. Nei vienu tirtu atveju fermentinis aktyvumas su NADPH nebuvo aptiktas, todėl galima teigti, kad NADPH nėra tinkamas kosubstratas HpyE, PyrE ir IifD flavino reduktazėms. Nustatyta, kad reakcija vyksta tik su NADH (10 mM).

Kitame rekombinantinių HpyE, PyrE ir IifD tyrimų etape buvo atlikti eksperimentai su skirtingomis kofaktoriaus NADH koncentracijomis siekiant išsiaiškinti, kada fermentas yra aktyviausias. Nustatyta, kad HpyE baltymas pasiekė didžiausią aktyvumą, kai NADH koncentracija buvo 150 μM . Aktyvumas išliko paklaidų ribose NADH koncentracijų intervale 150 μM – 400 μM aktyvumas reikšmingai nebesikeitė (3.12 pav. a)).

Baltymas PyrE didžiausiu aktyvumu pasižymėjo su 300 μM NADH koncentracija, tačiau tiesinė fermento aktyvumo priklausomybė nuo NADH yra 150 – 400 μM koncentracijų intervale, o nuo 150 μM pasiekiamas fermento įsotinimas substratu, todėl greitis reikšmingai nesikeičia (3.12 pav. b)). Nors rezultatų analizė atskleidė, kad baltymas IifD didžiausią aktyvumą pasiekė, kai NADH koncentracija buvo 400 μM , buvo pastebėta analogiška tendencija kaip ir PyrE baltymo atveju (3.12 pav. c)).



3.12 pav. Rekombinantinių HpyE, PyrE, IifD aktyvumo priklausomybė nuo NADH koncentracijos. 100 % laikoma koncentracija su kuria pasiektas didžiausias aktyvumas kiekvieno baltymo atveju (HpyE – 150 μM , PyrE – 300 μM , IifD – 400 μM). Reakcija inicijuota fermentu. Aktyvumo matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

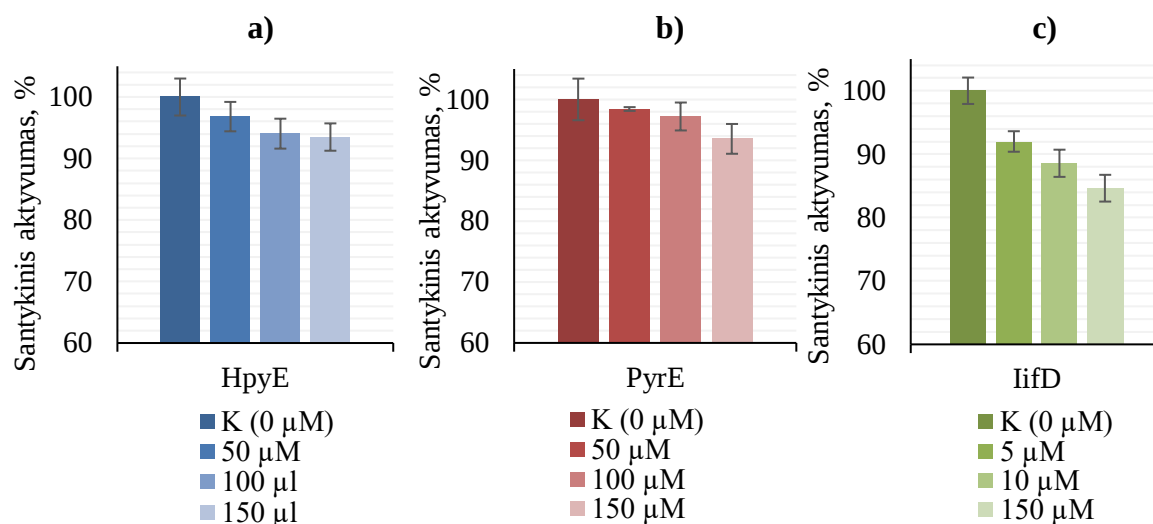
HpyE, PyrE ir IifD kinetiniai parametrai buvo įvertinti matuojant pradinio reakcijos (FMN redukcijos arba NADH oksidacijos) greičio priklausomybę nuo substrato koncentracijos, esant fiksuotai NADH arba FMN koncentracijai. Ši priklausomybė buvo hiperbolinė, todėl jai glodinti pritaikyta Michaelio-Menten lygtis. K_M ir k_{kat} vertės pateiktos 3.3 lentelėje. Iš rezultatų matyti, kad tiriamosios flavino reduktazės pasižymėjo geromis katalizinėmis savybėmis ir reakcijas vykdo labai aktyviai. Žemos K_m vertės parodo aukštą afiniškumą, o tai reiškia, kad substratas yra tvirtai surišamas.

3.3 lentelė. HpyE, PyrE, IifD kinetiniai parametrai pagal substratų redukciją ir oksidaciją.

Baltymas ir substratas arba kofaktorius	K_M , mM	k_{kat} , s ⁻¹	k_{kat}/K_M , mM ⁻¹ · s ⁻¹
HpyE			
FMN	$2,9 \times 10^{-3}$	12 058	4158×10^3
NADH	0,12		$100,5 \times 10^3$
PyrE			
FMN	$2,9 \times 10^{-3}$	3 503,4	1208×10^3
NADH	$6,3 \times 10^{-2}$		$55,6 \times 10^3$
IifD			
FMN	$3,2 \times 10^{-3}$	7 506,1	$2\,345,7 \times 10^3$
NADH	$7,9 \times 10^{-3}$		$950,2 \times 10^3$

NADPH tikrinant kaip substratą, jokio aktyvumo nefiksuota, todėl atsižvelgiant į struktūrinius panašumus iškelta hipotezė, kad NADPH gali turėti slopinantį poveikį tiriamoms flavino reduktazėms. Tam pasirinktos NADPH koncentracijos buvo palygintos su pradiniu aktyvumu be NADPH.

Sprendžiant iš gautų rezultatų, akivaizdu, kad NADPH įtaka reakcijos eigai nebuvo didelė. Santykinis HpyE aktyvumas, lyginant su pradiniu, sumažėjo 3 – 6 % (± 2 %), PyrE aktyvumo sumažėjimas taip pat buvo nedidelis, 2 – 6 % (± 4 %). IifD baltymo aktyvumui papildomas NADPH kosubstratas padarė daugiausiai įtakos, buvo stebimas 8 – 16 % (± 2 %) aktyvumo sumažėjimas. Taigi, galime daryti išvadą, jog baltymų HpyE ir PyrE aktyvumui NADPH nepadarė reikšmingos įtakos, o jautriausias šiuo atžvilgiu pasirodė baltymas IifD (3.13 pav. a), b), c)).



3.13 pav. Rekombinantinių **a)** HpyE, **b)** PyrE, **c)** IifD aktyvumo slopinimo priklausomybė nuo NADPH kofaktoriaus koncentracijos. NADPH koncentracija tirpale 50–150 μM. 100 % laikomas pradinis aktyvumas be papildomo NADPH, kai reakcijos mišinį sudarė baltymas, 50 μM FMN, 150 μM NADH ir atitinkamas buferinio tirpalo kiekis. Reakcija inicijuota su atitinkamu baltymu. Matavimų paklaidos neviršijo 4 %.

Tolesniuose HpyE, PyrE ir IifD flavino reduktazių tyrimuose naudotos 50 μM FMN ir 150 μM NADH koncentracijos.

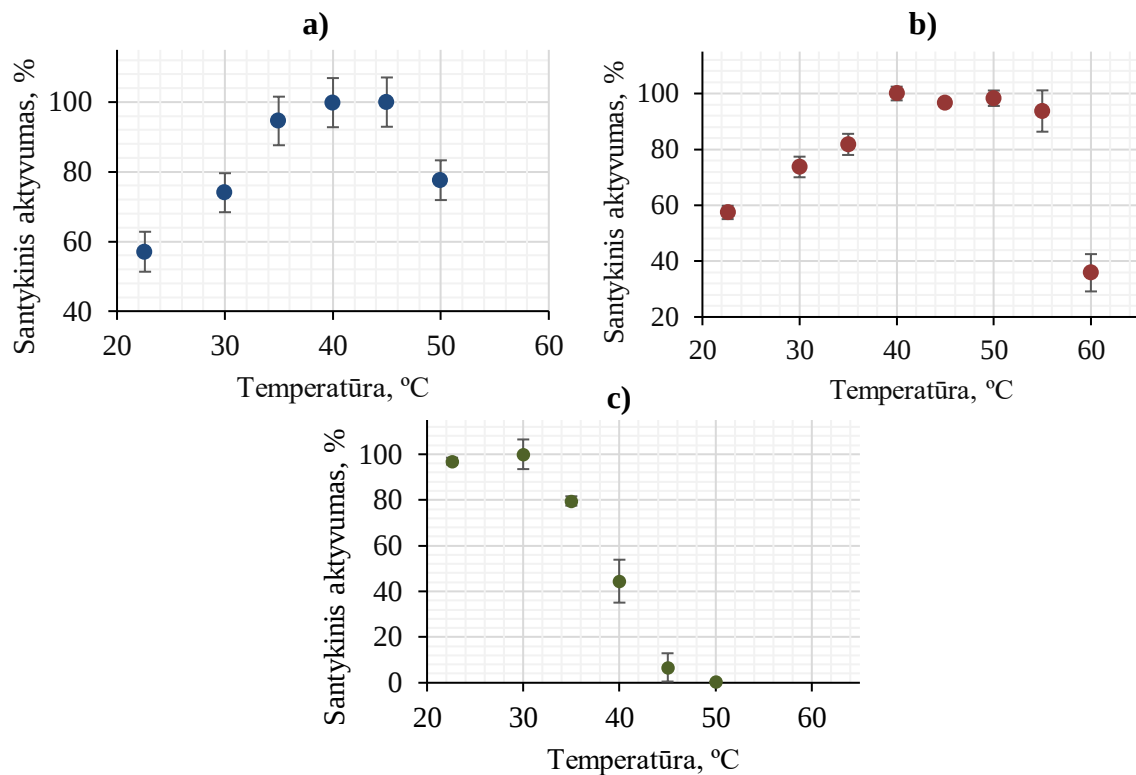
3.4.2. Flavino reduktazių aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros

Svarbus fermentus charakterizuojantis parametras yra optimali veikimo temperatūra. Dėl to, siekiant išsamiai apibūdinti HpyE, PyrE ir IifD, buvo atlikti eksperimentai, parodantys fermento aktyvumo ir stabilumo priklausomybę nuo temperatūros. 3.14 paveiksle pateikti rezultatai rodo, kaip fermento aktyvumas keitėsi reakcijos mišinio temperatūrų ribose nuo 20 iki 50 °C.

Didžiausiu aktyvumu HpyE pasižymėjo, kai reakcija buvo vykdyta esant 35–45 °C temperatūrai. Toliau keliant temperatūrą pastebėtas staigus aktyvumo verčių sumažėjimas. Tai greičiausiai galėjo lemti natyvios baltymo struktūros praradimas.

Baltymas PyrE reakciją vykdė aktyviausiai esant 40–45 °C reakcijos mišinio temperatūrai ir išlaikė iki 94 % aktyvumo temperatūrą keliant iki 55 °C. Nuo 55 °C baltymo aktyvumas ėmė staigiai mažėti ir esant 60 °C temperatūrai siekė tik 35 %.

Nustatyta, kad baltymas IifD didžiausiu aktyvumu pasižymėjo, kai reakcijos temperatūra buvo 30 °C. Toliau keliant temperatūrą aktyvumas kas 5 °C krito po 20–40 %. Gauti rezultatai leidžia daryti išvadą, kad baltymas IifD yra jautrus temperatūroms aukštesnėms nei 30 °C, o keliant temperatūrą galimai praranda savo natyvią struktūrą, taip pažeidžiant substratų surišimo vietas.



3.14 pav. Rekombinantinių HpyE, PyrE, IifD aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros. 100 % laikoma temperatūra, kuriai esant pasiektas didžiausias aktyvumas (HpyE ir PyrE – 40 °C, IifD – 30 °C). Reakcija inicijuota fermentu. Visi matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

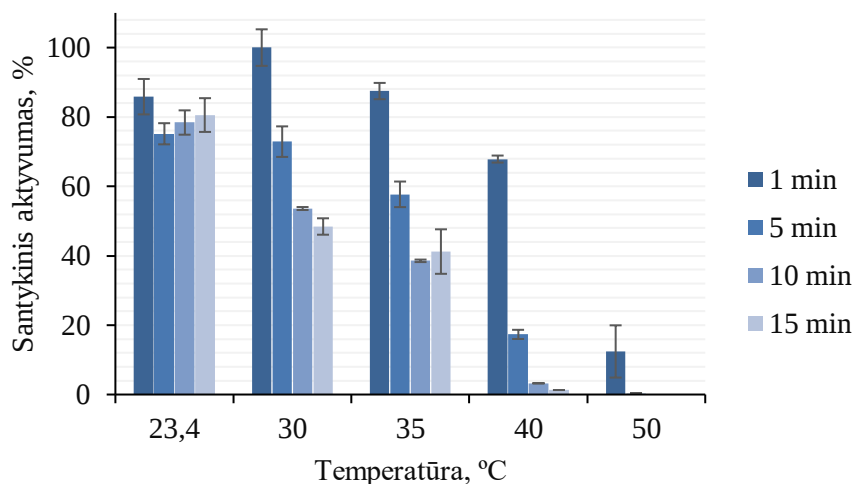
Nustatyta, kad baltymas IifD didžiausiu aktyvumu pasižymėjo, kai reakcijos temperatūra buvo 30 °C. Toliau keliant temperatūrą aktyvumas kas 5 °C krito po 20–40 %. Gauti rezultatai leidžia daryti išvadą, kad baltymas IifD yra jautrus temperatūroms aukštesnėms nei 30 °C, o keliant temperatūrą galimai praranda savo natyvią struktūrą, taip pažeidžiant substratų surišimo vietas.

3.4.3. Rekombinantinių HpyE, PyrE ir IifD termostabilumo įvertinimas

Flavino reduktazių aktyvumo priklausomybės nuo temperatūros eksperimentai leido nustatyti temperatūras, kurioms esant fermentas pasižymi didžiausiu aktyvumu reakciją stebint trumpą laiką, tačiau pastarieji rezultatai pilnai neatskleidė tinkamiausių tiriamų fermentų veikimo sąlygų ir nesuteikė informacijos apie tikslinių fermentų termostabilumą. Norint išsiaiškinti, kokiai temperatūrai esant HpyE, PyrE ir IifD nepraranda aktyvumo, baltymai buvo inkubuoti 23–50 °C temperatūrų intervale 1 – 15 min. Skirtingos inkubavimo trukmės buvo pasirinktos siekiant detalios termostabilumo analizės.

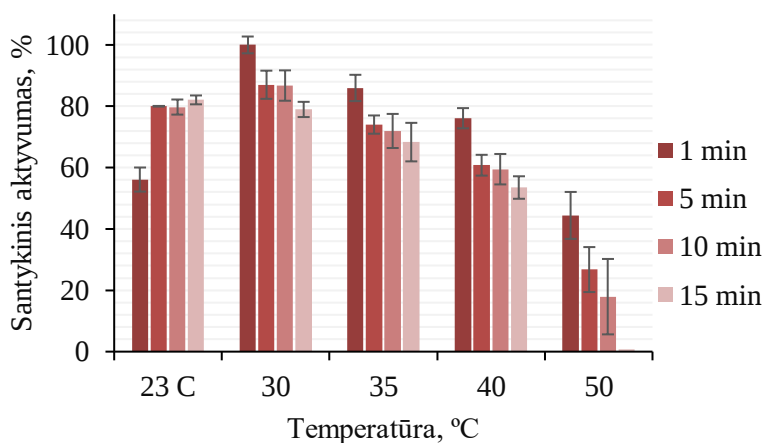
Kai prieš vykdant reakciją baltymas HpyE 1 min buvo inkubuotas esant 40 °C temperatūrai, jis neteko 32 % aktyvumo, o ir aukštesnė temperatūra beveik visiškai inaktyvuodavo HpyE. Reiškia šis baltymas yra jautrus aukštesnei nei 35 - 40 °C temperatūrai, įvyksta negrįžtamas natyvaus HpyE denatūravimas. Didžiausias HpyE aktyvumas buvo gautas,

baltymą prieš tai inkubavus 30 °C 1 min, o ilgesnė inkubacija lemdavo žemesnius aktyvumus. Didesnes paklaidas aukštesnėse temperatūrose greičiausiai lėmė baltymo denatūravimo efektai ir aktyvumo praradimas (3.15 pav.)



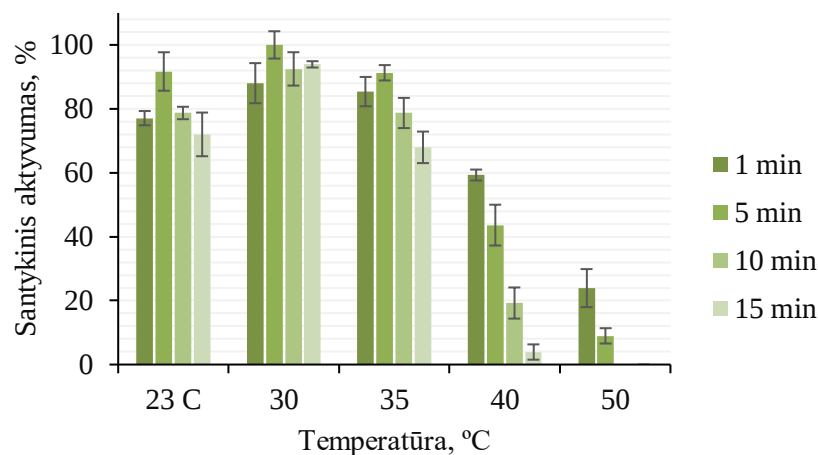
3.15 pav. Rekombinantinio HpyE stabilumo priklausomybė nuo temperatūros. 100 % laikoma temperatūra ir inkubavimo periodas, kuriems esant pasiektas didžiausias aktyvumas (30 °C, 1 min). Reakcija inicijuota fermentu. Visi matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

Baltymas PyrE didžiausią aktyvumą išlaikė prieš tai jį inkubavus 30 °C 1 min, o ilgesnė inkubavimo trukmė lėmė aktyvumo sumažėjimą vos 13–21 %. Taip pat pastebėtas tik pradinis aktyvumo išlaikymas po inkubacijos aukštesnėse temperatūrose (inkubavus 1 min). Inkubavus PyrE esant 40 °C temperatūrai 5–15 min, baltymas prarado 39–46 % aktyvumo (3.16 pav.). Didesnes paklaidas aukštesnėse temperatūrose galėjo lemti aktyvių centrų konformaciniai pokyčiai ir denatūravimo efektai.



3.16 pav. Rekombinantinio PyrE stabilumo priklausomybė nuo temperatūros. 100 % laikoma temperatūra ir inkubavimo periodas, kuriems esant pasiektas didžiausias aktyvumas (30 °C, 1 min). Reakcija inicijuota fermentu. Visi matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

Atlikus rezultatų analizę, paaiškėjo, kad baltymas IifD aktyvumą geriausiai išlaikė jį inkubavus 30–35 °C. Esant 30 °C temperatūrai baltymas greičiausiai buvo stabilus, o po 5 min inkubavimo pasiektas aukštas fermentinis aktyvumas buvo paklaidų ribose. Tačiau aukštesnės temperatūros ir ilgesnė inkubavimo trukmė beveik visiškai inaktyvuodavo baltymą. Taip pat, aukštesnėse temperatūrose buvo stebimos didesnės paklaidos. Reiškia, šis baltymas yra labai jautrus aukštesnėms temperatūroms ir pasireiškia denatūracija ir aktyvumo praradimas.



3.16 pav. Rekombinantinio IifD stabilumo priklausomybė nuo temperatūros. 100 % laikoma temperatūra ir inkubavimo periodas, kuriems esant pasiektas didžiausias aktyvumas (30 °C, 5 min). Reakcija inicijuota fermentu. Visi matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

Apibendrinus temperatūros įtaką rekombinantinių flavino reduktazių aktyvumui ir stabilumui, galima teigti, kad optimaliausia fermentų veikimo temperatūra yra 30–35 °C. Esant aukštesnei temperatūrai reakcija vyksta greičiau, bet fermentas tampa nestabilus, todėl didesnis greitis nekompensuoja aktyvumo nuostolių, atsiradusių dėl baltymo denatūracijos.

3.4.4. Rekombinantinių flavino reduktazių aktyvumo ir stabilumo priklausomybė nuo buferinio tirpalo prigimties ir pH

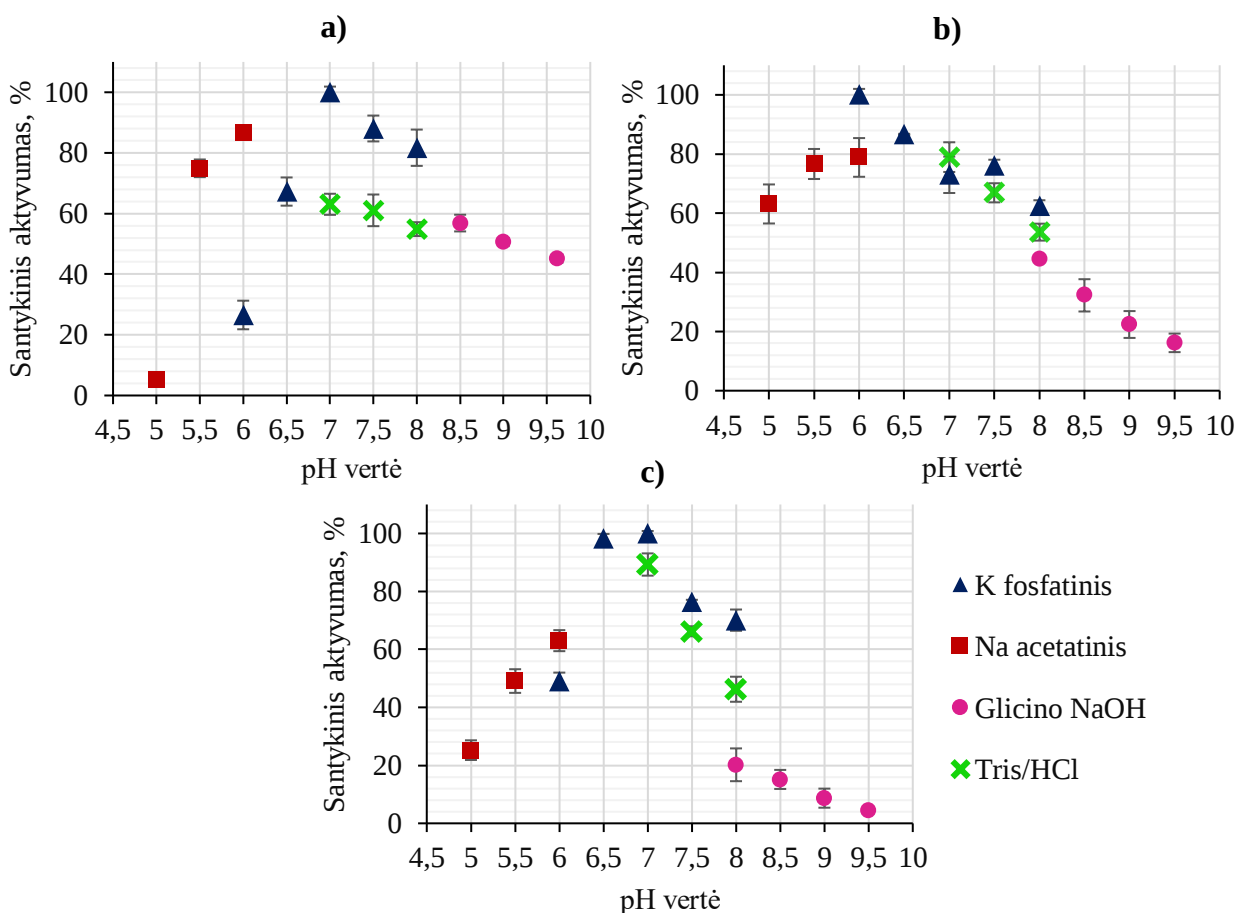
HpyE, PyrE ir IifD aktyvumo priklausomybė nuo pH buvo nustatoma naudojant K-fosfato, Na-acetato, Tris-HCl ir Gly-NaOH buferinius tirpalus (pH 5,0–9,5). Fermentų aktyvumas matuotas esant 30 °C temperatūrai.

Rezultatų analizė parodė, kad daugiau nei 50 % aktyvumo HpyE išlaikė, kai pH buvo tarp 5,5 ir 8,5 (3.18 a) pav.). Didžiausias FMN redukcijos aktyvumas nustatytas, kai buferinio tirpalo pH buvo 7. Iš gautų rezultatų matyti, kad HpyE buvo aktyviausias reakciją vykdant Na-acetato ir K-fosfato buferiniuose tirpaluose.

Nustatyta, kad baltymas PyrE didesnę nei 50 % aktyvumą išlaikė ir buvo aktyviausias naudojant K-fosfato, Na-acetato ir Tris-HCl buferinius tirpalus, kai pH vertės buvo tarp 5 ir 8 (3.18 b) pav.). Didžiausias aktyvumas nustatytas, kai buferinio tirpalo pH buvo 6. Gly-NaOH buferiniame tirpale, kai pH buvo aukštesnis nei pH 8, pastebėtas

fermentinio aktyvumo kritimas. Tai gali būti susiję su pasireiškusiais denatūravimo efektais.

IifD aktyvumas buvo didžiausias ir prilygo 98–100 %, kai reakcija vykdyta K-fosfato buferiniame tirpale, pH 6,5–7 intervale (3.18 c) pav.). Taip pat, rekombinantinis baltymas išlaikė didesnę nei 89 % aktyvumą Tris-HCl buferiniame tirpale, kai pH buvo 7. Nustatyta, kad Gly-NaOH buferiniame tirpale, kai pH buvo tarp 8 ir 9,5 baltymas neteko 80–96 % aktyvumo, todėl galima teigti, kad šis tirpalas nėra optimalus pasirinkimas vykdyti reakciją. Taip pat iš rezultatų akivaizdu, kad dalinai šarminės sąlygos inaktyvuoja IifD baltymą.



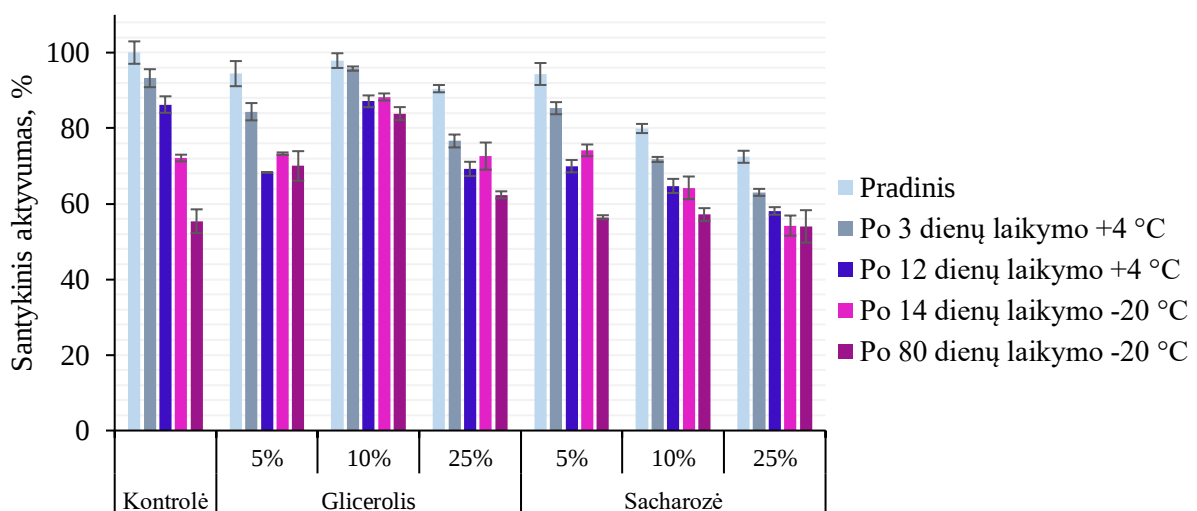
3.18 pav. Rekombinantinių HpyE, PyrE, IifD aktyvumo priklausomybė nuo buferinio tirpalo prigimtės ir pH. 100 % laikoma pH vertė ir buferinis tirpalas su kuriuo pasiektas didžiausias aktyvumas kiekvieno baltymo atveju (HpyE – K-fosfatinis, pH 7; PyrE – K-fosfatinis pH 6; IifD – K-fosfatinis pH 7). Reakcija inicijuota fermentu. Visi matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

Apibendrinus buferinio tirpalo ir pH įtaką rekombinantinių flavino reduktazių aktyvumui, galima teigti, kad tinkamiausias buferinis tirpalas visiems tiriamiesiems yra K- fosfatinis. HpyE baltymo optimalus pH intervalas yra 7–8, PyrE didžiausias santykinis aktyvumas stebėtas, kai pH buvo nuo 6 iki 7, o IifD, kai pH buvo 6,5–7. Taigi, visi tirti baltymai teikia pirmenybę neutraliam arba artimam neutraliam pH intervalui.

3.4.5. Fermentų stabilumo ir aktyvumo priklausomybė nuo stabilizatoriaus koncentracijos ir laikymo sąlygų

Išgryninus fermentą, visada svarbu išsaugoti jo pradinį aktyvumą ir laikyti tokiomis sąlygomis, kurios nesukeltų kritimo į nuosėdas ar denatūravimo efekto. Dažnai šiam tikslui yra naudojami stabilizatoriai, pavyzdžiui, glicerolis, sacharozė ar jaučio serumo albuminas – BSA. Šiame darbe buvo pasirinkti du iš jų: glicerolis ir sacharozė, ir pagaminti jų tirpalai. Fermentų aktyvumas matuotas esant 30 °C temperatūrai.

Išanalizavus rezultatus paaiškėjo, kad baltymui HpyE stabilizatorių naudojimas turėjo teigiamą įtaką, nes fermentų kontroliniai mėginiai, inkubuoti be priedų, po 80 dienų saugojimo -20 °C prarado daugiau kaip 45 % aktyvumo, o HpyE su stabilizatoriais išlaikė 2–29 % didesnę aktyvumą (3.19 pav.). Nustatyta, kad veiksmingiausia buvo 10 % glicerolio koncentracija, nes nepriklausomai nuo temperatūros ir laikymo trukmės, fermentas išlaikė aukštesnę nei 83 % aktyvumą.

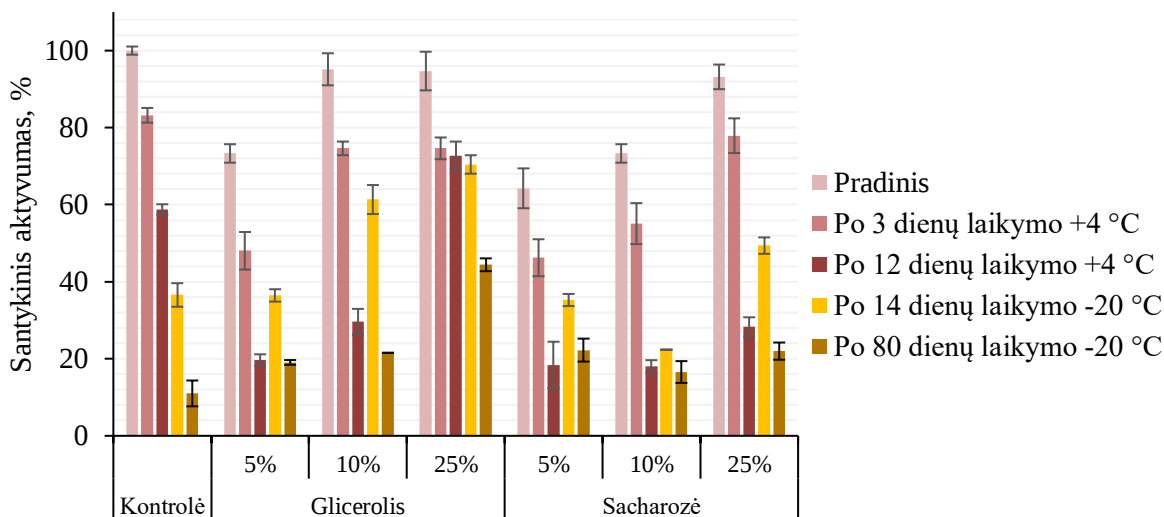


3.19 pav. Rekombinantinio HpyE saugojimo stabilumo priklausomybė nuo stabilizatorių ir laikymo sąlygų. Glicerolio ir sacharozės koncentracija tirpale 5–25 %. 100 % laikomas pradinis fermento aktyvumas be stabilizatoriaus. Reakcijos mišinį sudarė HpyE, 50 μ M FMN, 150 μ M NADH ir atitinkamas buferinio tirpalo kiekis. Reakcija inicijuota fermentu. Visi matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

Kontroliniai mėginiai laikyti 3 dienas esant +4 °C temperatūrai, didžiąja dalimi atvejų išlaikė 9–21 % didesnę aktyvumą nei fermentai su stabilizatoriais. Baltymas su 25 % sacharozės, po 3 dienų prarado net 27 % aktyvumo. Kontroliniai mėginiai laikyti 12 dienų, esant +4 °C temperatūrai, išlaikė 16–28 % didesnę aktyvumą. Mažiausiai veiksminga buvo sacharozės 25 % koncentracija, nes net 27 % aktyvumo buvo prarasta iškart po mėginio paruošimo. Akivaizdu, kad aukštesnė sacharozės koncentracija turi neigiamą poveikį HpyE fermentiniam aktyvumui, galimai inaktyvindama baltymą. Taip pat, verta paminėti, jog baltymo

HpyE tiek kontrolinis mėginys tiek mišiniai su stabilizatoriais neiškrito į nuosėdas po 80 dienų inkubavimo, o su kitais tiriamais baltymais tai buvo pastebėta.

Rezultatų analizė atskleidė, kad baltymo PyrE aktyvumą geriausiai stabilizavo 25 % glicerolio koncentracija. Nustatyta, kad po 12 dienų laikymo +4 °C baltymas prarado 27 % aktyvumo, o po 14 dienų laikymo -20 °C prarado 30 % (3.20 pav.). Tai greičiausiai lėmė apsaugojimas nuo baltymo užšalimo, dėl ko nebuvo pastebėta kritimo į nuosėdas.

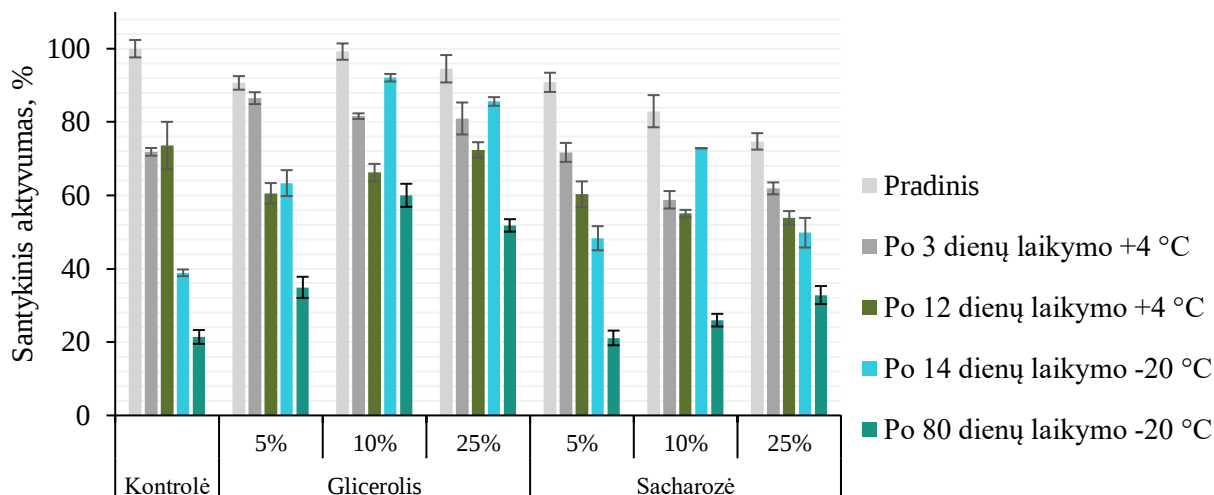


3.20 pav. Rekombinantinio PyrE saugojimo stabilumo priklausomybė nuo stabilizatorių ir laikymo sąlygų. Glicerolio ir sacharozės koncentracija tirpale 5–25 %. 100 % laikomas pradinis fermento aktyvumas be stabilizatoriaus. Reakcijos mišinį sudarė PyrE, 50 μM FMN, 150 μM NADH ir atitinkamas buferinio tirpalo kiekis. Reakcija inicijuota fermentu. Visi matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

Tačiau, ilgesnis laikymas esant -20 °C temperatūrai vistik padarė reikšmingesnę įtaką ir baltymas prarado net 55 % aktyvumo. Kiti tiriamieji mėginiai jau po 3 dienų buvo drumzlini, o baltymas iškritęs į nuosėdas. Baltymui PyrE 5 % glicerolio ir 5 % sacharozės koncentracija padarė panašią įtaką, buvo stebimas 81–82 % aktyvumo praradimas po 12 dienų laikymo +4 °C ir 78–81 % aktyvumo praradimas po 80 dienų laikymo -20 °C. Taip pat nustatyta, kad dauguma PyrE baltymų su skirtingomis stabilizatoriaus koncentracijomis, laikytų 80 dienų, -20 °C, išlaikė 6–11 % didesnę aktyvumą už pradinį kontrolinį mėginį.

Atlikus rezultatų analizę paaiškėjo, kad tiriamasis baltymas IfD išlaikė daugiau nei 60 % aktyvumą po inkubacijos su 10 % gliceroliu 12 dienų +4 °C ir 80 dienų -20 °C. Palyginus su sacharozė (5–25 %) ir kitomis glicerolio koncentracijomis, tai tinkamiausias stabilizatorius ir koncentracija (3.21 pav.). Taip pat, iš gautų duomenų tapo aišku, kad 25 % sacharozės

koncentracija padėjo išlaikyti 7–12 % didesnę aktyvumą, nei 5–10 % sacharozė po 80 dienų laikymo - 20 °C. Tačiau, skirtingos sacharozės koncentracijos po 12 dienų inkubacijos +4 °C neparodė reikšmingo skirtumo ir aktyvumas buvo paklaidų ribose, skirtumas 5–6 %.



3.21 pav. Rekombinantinio lfdD saugojimo stabilumo priklausomybė nuo stabilizatorių ir laikymo sąlygų. Glicerolio ir sacharozės koncentracija tirpale 5–25 %. 100 % laikomas pradinis fermento aktyvumas be stabilizatoriaus. Reakcijos mišinį sudarė lfdD, 50 μ M FMN, 150 μ M NADH ir atitinkamas buferinio tirpalo kiekis. Reakcija inicijuota fermentu. Visi matavimai pakartoti mažiausiai 3 kartus.

Baltymo lfdD ir glicerolio arba sacharozės mišiniuose buvo pastebėti denatūravimo efektai ir kritimas į nuosėdas. Vieninteliai mėginiai, kurie šių požymių neparodė buvo su 10 % ir 25 % glicerolio koncentracija. Tai galėjo lemti geresnį aktyvumo išlaikymą palyginus su kitomis tiriamomis stabilizatorių koncentracijomis.

3.5. Numatyti eksperimentai

Be jau atliktų eksperimentų šiame darbe taip pat buvo numatyti keli esminiai tyrimai, kuriuose būtų aiškinamasi fermentų stabilumas organiniuose tirpikliuose, o geriausiu aktyvumu ir stabilumu pasižymėjusi rekombinantinė flavino reduktazė būtų derinama su flavino monooksigenaze.

Monooksigenazių substratai dažnai yra netirpūs arba prastai tirpūs vandenyje junginiai ir tai tampa kliūtim jų efektyviai katalizei, todėl atsiranda poreikis katalizės darbus perkelti (iš dalies) į organinę aplinką. Vienas iš problemos sprendimo būdų yra fermentų, gebančių dirbti organinių tirpiklių aplinkoje taikymas arba mutantinių fermentų kūrimas jau esamų pagrindu. Dėl šios priežasties šiame darbe būtų tiriama flavino reduktazių stabilumas ir gebėjimas reakciją vykdyti ne tik vandeninėje aplinkoje bet ir organiniuose tirpikliuose, dimetilsulfoksido, dimetilformamide, metanolyje ar acetonitrile.

Gauti rezultatai atskleidė, kad tiriamosios reduktazės yra aktyvūs fermentai, tačiau jų pagrindinė funkcija yra regeneruoti redukuotą flaviną pritaikyti flavino monooksigenazei, kuri užtikrintų esminio katalizės produkto gavimą. Kadangi pasirinkta monooksigenazė būtų iš kito mikroorganizmo, būtų labai svarbu parinkti geriausias reakcijos sąlygas, derinant fermentų kiekius, parenkant optimalią temperatūrą, buferinį tirpalą ir pH vertę. Taip pat būtų vertinamas stabilumas ir biokonversijos ciklų skaičius (kiek šie fermentai geba dirbti kartu).

3.6. Rezultatų aptarimas

Aktyvių ir biochemiškai apibūdintų fermentų poreikis tiek didelio masto pramoniniuose procesuose, tiek labai specifinėse srityse sparčiai auga. Dėl šios priežasties, naujų ir aktyvių fermentų charakterizavimas yra aktualus ir skatina biokatalizės raidą.

Šiame darbe buvo pirmą kartą charakterizuotos naujos bakterinės flavino reduktazės ir aiškinasi optimalios jų sintezės ir veikimo sąlygos. Nustatyta, jog aktyviausia flavino reduktazė yra HpyE, kurios specifinis aktyvumas buvo 13,4 kartų didesnis už PyrE ir 2,4 kartus didesnis už IifD. Rekombinantinio baltymo HpyE sintezei ląstelių augimo temperatūra didelės įtakos neturėjo, tačiau baltymų PyrE ir IifD sintezę vykdžius, kai temperatūra 37 °C, buvo stebimas mažesnis tikslinio baltymo kiekis. Aukštesnė temperatūra galimai paskatino tikslinio baltymo sintezės procesą ir tuo pačiu lėmė gausesnį netirpaus ir neteisingos konformacijos baltymo susidarymą. Didesnė nei 0,5 mM IPTG koncentracija lėmė mažesnę sintezės produkto HpyE kiekį, tačiau kitų tirtų baltymų rezultatuose tokios priklausomybės nepastebėta. Visų tyrimo objektų atveju sintezės trukmė po indukcijos turėtų būti ne trumpesnė nei 6 val. 30 °C arba 18–24 val. 16–30 °C. Optimizavus sintezės sąlygas visais trimis atvejais pasiekti pakankami tirpių baltymų kiekiai, reikalingi efektyviam tikslinių reduktazių gryninimui ir tolimesniems tyrimams.

Charakterizavus tiriamuosius objektus paaiškėjo, kad baltymai HpyE, PyrE ir IifD teikia substratinę pirmenybę FMN palyginus su FAD: HpyE reakciją vykdo 51 % greičiau, o PyrE 78 % greičiau. Visgi, FAD, kaip alternatyva, yra tinkamas substratas IifD, nes reakcija su šiuo substratu vyko tik 25 % lėčiau nei su FMN. Taip pat paaiškėjo, kad visais tirtais atvejais tinkamiausias kosubstratas yra NADH. Visų flavino reduktazių atveju tinkamiausios substrato (FMN) ir kosubstrato (NADH) koncentracijos efektyviam oksidacijos – redukcijos užtikrinimui yra, atitinkamai, 50 mM ir 150 mM. NADPH, kaip slopiklis, nepadarė reikšmingos įtakos flavino reduktazių vykdomoms reakcijoms, o jautriausias šiam papildomam kofaktoriui buvo IifD. Iš trijų flavino reduktazių IifD yra jautriausias temperatūrai, nes pakėlus temperatūrą iki 40 °C, IifD prarado net 55 % aktyvumo. Kitų baltymų denatūracijos požymiai pasireiškė tik pasiekus 50–55 °C temperatūrą. Visgi, 1–15 min inkubavimas skirtingose temperatūrose

atskleidė daugiau informacijos ir paaiškėjo, kad kai temperatūra aukštesnė nei 40 °C stabiliausias yra PyrE, o HpyE ir IifD inkubavus ilgiau nei 1 min praranda didžiąją dalį aktyvumo.

Taip pat nustatyta, kad tinkamiausi buferiniai tirpalai efektyviai fermentų PyrE ir IifD katalizei yra kalio fosfatinis arba Tris-HCl. PyrE reakciją aktyviausiai vykde 6–7 pH, o IifD 6,5–7 pH intervaluose. Baltymo HpyE charakterizavimas atskleidė kiek kitokius rezultatus ir nustata, kad kalio fosfatinis buferinis tirpalas yra tinkamesnis už Tris-HCl, o geriausios sąlygos užtikrinamos 7–8 pH intervale. Reiškia, visų tiriamųjų objektų atveju reikalinga sąlyginai neutrali pH vertė, o rūgštingesnė arba šarmingesnė aplinka lemia konformacinius pokyčius ir aktyvumo praradimą.

Dirbant su flavino reduktazėmis, ypač PyrE ir IifD atvejais, susidurta su fermentų stabilumo problema juos saugojant ilgesnį laiką. Atlikus tyrimą, vertinant baltymų stabilumą ir gebėjimą išlaikyti aktyvumą inkubavus skirtingose temperatūrose ir panaudojus glicerolio ar sacharozės stabilizatorius, paaiškėjo, kad gerokai stabilesnis už kitus tiriamuosius yra baltymas HpyE, o 10 % glicerolio koncentracija padėjo išlaikyti net 83 % HpyE aktyvumą po 80 dienų laikymo -20 °C. Tuo tarpu baltymas PyrE jau po 3 dienų inkubavimo +4 °C krito į nuosėdas ir greitai prarado fermentines savybes. Visgi, 20 % glicerolio koncentracija padėjo išvengti užšalimo efektų laikant, kai temperatūra -20 °C, ir tai galimai lėmė iki 45 % aktyvumo išlaikymą po 80 dienų. Baltymas IifD buvo mažiau stabilus nei HpyE, bet 10 % glicerolio koncentracija padėjo išlaikyti 60 % aktyvumą po 80 dienų.

Atlikti tyrimai atskleidė, kad HpyE flavino reduktazė yra aktyviausias ir stabiliausias baltymas ir turi reikšmingą potencialą būti pritaikytas specifinėse srityse ar netgi pramoniniuose procesuose. Šiuo metu komerciškai prieinama, litertūros apžvalgoje aptarta, flavino reduktazė iš *Vibrio fischeri*. Ši oksidoreduktazė taip pat teikia substratinę pirmenybę FMN, o jos aktyvumas naudojant NADPH yra 3 kartus mažesnis nei su NADH. Šio fermento komerciniame aprašyme teigiama, kad vienas FMN reduktazės aktyvumo vienetas (U/mg) paverčia 1 μmol FMN ir NADH į FMNH₂ ir NAD⁺ per 1 minutę, kai pH 7,0 esant 25 °C temperatūrai. Rekomenduojama laikyti esant 2–8 °C temperatūrai, o per 12 mėnesių aktyvumas gali sumažėti maždaug 20%. Didžiausias HpyE privalumas lyginant su šia flavino reduktaze yra jos itint didelis specifinis fermentinis aktyvumas. Pagal gautus rezultatus HpyE specifinis aktyvumas po gryninimo yra vidutiniškai 136,36 U/mg, o flavino reduktazės iš *V.fischeri* yra ~7 U/mg, tai reiškia, kad net ir neatlikus papildomų koncentravimo procedūrų gaunamas HpyE fermentinis preparatas yra beveik 20 kartų aktyvesnis už komerciškai prieinamą. Galime užtikrintai teigti, kad gausėjantys detalūs biocheminiai flavino reduktazių charakterizavimai padės išplėsti turimų ir komerciškai prieinamų fermentų rinkinį, taip reikalingą biokatalizėje.

IŠVADOS

1. Bioinformatinė HpyE, PyrE ir IifD struktūrinių modelių analizė leidžia patikimai prognozuoti flavino reduktazių specifiskumą FMN.
2. Didžiausi tirpių rekombinantinių flavino reduktazių HpyE, PyrE ir IifD kiekiai *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse gaunami, kai IPTG koncentracija yra 0,5 mM, sintezę vykdant ne trumpiau kaip 18 valandų ir temperatūra ne aukštesnė kaip 30 °C.
3. Rekombinantinės flavino reduktazės HpyE, PyrE ir IifD didžiausiu aktyvumu pasižymi reakciją vykdant kalio fosfatiniame buferiniame tirpale, pH 7, kai temperatūra ne aukštesnė kaip 30 °C.
4. Glicerolis yra tinkamas stabilizatorius ilgalaikiam HpyE, PyrE ir IifD saugojimui.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo darbo vadovei dr. Jonitai Stankevičiūtei už suteiktą galimybę atlikti šį darbą, suteiktas žinias, vertingus patarimus, nuoširdžią pagalbą ir palaikymą. Taip pat esu dėkinga visiems Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbuotojams ir studentams.

Už ne tik mokslines diskusijas esu dėkinga studijų kolegėms Giedrei Jakubauskaitei ir Eivina Radzevičiūtei.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOCHEMIJOS INSTITUTAS

Rasa Vitėnaitė
Magistro baigiamasis darbas

Rekombinantinių flavino reduktazių iš *Arthrobacter* spp. ir *Acinetobacter* sp. bakterijų sintezė ir charakterizavimas

Dvikomponentės flavino monooksigenazės katalizuoja hidroksilinimo, epoksidacijos, halogeninimo, sieros pašalinimo reakcijas ir dalyvauja daugelyje biologinių procesų, tokių kaip natūralių ir antropogeninių junginių katabolizmas, vitaminų ar antibiotikų biosintezė. Tačiau, tokio tipo monooksigenazėms yra reikalingas antras fermentas – pagalbinė flavino reduktazė, kuri užtikrina redukuoto flavino regeneravimą ir be kurios veikimas būtų neįmanomas. Visgi pastebima, kad išsamiai charakterizuotų flavino reduktazių įvairovė yra nepakankama. Šio darbo tikslas ir uždaviniai buvo nustatyti optimalias sąlygas rekombinantinių flavino reduktazių HpyE iš *Arthrobacter* sp. PY22, PyrE iš *Arthrobacter* sp. 68b ir IifD iš *Acinetobacter* sp. O153 sintezei *E.coli* BL21 (DE3) bakterijose ir atlikti jų charakterizavimą. Šiam tikslui pasiekti buvo pasitelkti plazmidinės DNR skyrimo, giminingumo chromatografijos, baltymų elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis metodai, reakcijų kinetiniai parametrai įvertinti spektrofotometriškai. Atlikus tyrimą buvo nustatyta, kad optimalūs tirpaus baltymo kiekiai pasiekiami rekombinantinių HpyE, PyrE ir IifD sintezės indukcijai pasirinkus 0,5 mM IPTG koncentraciją ir sintezę vykdant ne trumpiau nei 18 val. po indukcijos pradžios, esant 16 – 30 °C. HpyE buvo aktyviausia flavino reduktazė, visi tiriamieji fermentai geriausiu aktyvumu pasižymėjo reakciją vykdant su FMN substratu ir NADH kofaktoriumi. HpyE aktyviausia buvo esant 23–30 °C temperatūrai, K-fosfatiniame buferiniame tirpale, kai pH 7, o po ilgalaikio saugojimo geriausiai aktyvumą išlaikė su 10% gliceroliu. PyrE ir IifD pasižymėjo panašomis charakteristikomis ir aktyviausios buvo esant 30 °C temperatūrai, K-fosfatiniame arba Tris-HCl buferiniame tirpale, kai pH 6–7 PyrE atveju ir pH 6,5–7 IifD. Didžiausias aktyvumas išlaikytas su 25 % gliceroliu.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCES CENTER

INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

Rasa Vitėnaitė

Master thesis

**Synthesis and Characterization of Recombinant Flavin Reductases from
Arthrobacter spp. and *Acinetobacter* sp. Bacteria**

Two-component flavin monooxygenases catalyze hydroxylation, epoxidation, halogenation, desulfurization reactions and are involved in many biological processes such as catabolism of natural and anthropogenic compounds, biosynthesis of vitamins or antibiotics. However, this type of monooxygenase requires a second auxiliary enzyme, flavin reductase, which ensures the regeneration of reduced flavin. However, the diversity of flavin reductases characterized in detail is insufficient. The aim and objectives of this work were to determine the optimal synthesis conditions for the recombinant flavin reductase HpyE from *Arthrobacter* sp. PY22, PyrE from *Arthrobacter* sp. 68b and IifD from *Acinetobacter* sp. O153 in *E. coli* BL21 (DE3) bacteria and perform their biochemical characterization. To achieve this goal, methods of plasmid DNA separation, affinity chromatography, protein electrophoresis under denaturing conditions were performed, and the kinetic parameters of the reactions were evaluated spectrophotometrically. The study showed that optimal amounts of soluble protein were achieved by inducing the synthesis of recombinant HpyE, PyrE and IifD at a concentration of 0.5 mM IPTG and carrying out the synthesis for at least 18 h. after the start of induction at 16 - 30 °C. HpyE was the most active flavin reductase. Best activity of all flavin reductases was recorded when the reaction was carried out with FMN substrate and NADH cofactor. HpyE was most active at 23–30 °C, in potassium-phosphate buffer at pH 7, and was best maintained with 10% glycerol after long-term storage. PyrE and IifD had similar characteristics and were most active at 30 °C in K-phosphate or Tris-HCl buffer at pH 6-7 for PyrE and pH 6.5–7 for IifD. Maximum activity was maintained with 25% glycerol.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Abdelraheem, E. M. M., Busch, H., Hanefeld, U., ir Tonin, F. (2019).
2. Biocatalysis explained: From pharmaceutical to bulk chemical production. *Reaction Chemistry and Engineering*, 4(11), 1878–1894. <https://doi.org/10.1039/c9re00301k>
3. Ainsley, J., Mulholland, A. J., Black, G. W., Sparagano, O., Christov, C. Z., ir Karabenchewa-Christova, T. G. (2018). Structural Insights from Molecular Dynamics Simulations of Tryptophan 7-Halogenase and Tryptophan 5-Halogenase. *ACS Omega*, 3(5), 4847–4859. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00385>
4. Arensdorf, J. J., Loomis, A. K., DiGrazia, P. M., Monticello, D. J., ir Pienkos, P. T. (2002). Chemostat approach for the directed evolution of biodesulfurization gain-of-function mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 691–698. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.691-698.2002>
5. Arunachalam, U., Massey, V., ir Miller, S. M. (1994). Mechanism of p-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. A two-protein enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 269(1), 150–155. Gauta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276789>
6. Baker Dockrey, S. A., ir Narayan, A. R. H. (2019). Flavin-dependent biocatalysts in synthesis. *Tetrahedron*, 75(9), 1115–1121. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.01.008>
7. Ballou, D. P., ir Entsch, B. (2013). The reaction mechanisms of groups A and B flavoprotein monooxygenases. *Handbook of Flavoproteins: Complex Flavoproteins, Dehydrogenases and Physical Methods* (T. 2, p. 1–28). <https://doi.org/10.1515/9783110298345.1>
8. Bommarius, A. S., ir Riebel, B. R. (2005). Front Matter. *Biocatalysis*. <https://doi.org/10.1002/3527602364.fmatter>
9. Brodl, E., Winkler, A., ir Macheroux, P. (2018, sausio 1). Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, T. 16, p. 551–564. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.003>
10. Brühlmann, F., ir Bosijokovic, B. (2016). Efficient Biochemical Cascade for Accessing Green Leaf Alcohols. *Organic Process Research and Development*, 20(11), 1974–1978. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00303>
11. Burd, V. N., ir Van Pee, K. H. (2004). Cloning and sequencing of the gene of tryptophan-7-halogenase from pseudomonas fluorescens strain CHA0. *Biochemistry (Moscow)*, 69(6), 674–677. <https://doi.org/10.1023/B:BIRY.0000033741.42224.d1>
12. Chakraborty, S., Ortiz-Maldonado, M., Entsch, B., ir Ballou, D. P. (2010). Studies on the mechanism of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from Pseudomonas aeruginosa: A system composed of a small flavin reductase and a large flavin-dependent oxygenase. *Biochemistry*, 49(2), 372–385. <https://doi.org/10.1021/bi901454u>
13. Chapman, J., Ismail, A. E., ir Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 20–29. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>
14. Cirino, P. C., ir Arnold, F. H. (2002, balandžio 1). Protein engineering of oxygenases for biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, T. 6, p. 130–135. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00305-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00305-8)
15. Coco, W. M., Levinson, W. E., Crist, M. J., Hektor, H. J., Darzins, A., Pienkos, P. T., Monticello, D. J. (2001). DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nature Biotechnology*, 19(4), 354–359. <https://doi.org/10.1038/86744>
16. de Gonzalo, G., ir Domínguez de Maria, P. (2018). *Biocatalysis - An Industrial Perspective*.
17. de Souza, R. O. M. A., Miranda, L. S. M., ir Bornscheuer, U. T. (2017). A Retrosynthesis Approach for Biocatalysis in Organic Synthesis. *Chemistry - A European Journal*, 23(50), 12040–12063. <https://doi.org/10.1002/chem.201702235>
18. DeBarber, A. E., Mdluli, K., Bosman, M., Bekker, L. G., ir Barry, C. E. (2000).

- Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9677–9682. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.17.9677>
19. Denome, S. A., Oldfield, C., Nash, L. J., ir Young, K. D. (1994). Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Journal of Bacteriology*, 176(21), 6707–6716. <https://doi.org/10.1128/jb.176.21.6707-6716.1994>
 20. Drauz, K., Gröger, H., ir May, O. (2012). Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Third Edition. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Third Edition* (T. 1). <https://doi.org/10.1002/9783527639861>
 21. Ellis, E. M. (2002). Microbial aldo-keto reductases. *FEMS Microbiology Letters*, 216(2), 123–131. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11425.x>
 22. Ellis, H. R. (2010). The FMN-dependent two-component monooxygenase systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 497(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.02.007>
 23. Entsch, B., ir van Berkel, W. J. (1995). Structure and mechanism of para-hydroxybenzoate hydroxylase. *The FASEB Journal*, 9(7), 476–483. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.7.7737455>
 24. Fetzner, S. (2002). Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 243–257. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1123-4>
 25. Filisetti, L., Fontecave, M., ir Nivière, V. (2003). Mechanism and substrate specificity of the flavin reductase ActVB from *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 296–303. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209689200>
 26. Finnigan, W., Thomas, A., Cromar, H., Gough, B., Snajdrova, R., Adams, J. P., ... Harmer, N. J. (2017). Characterization of Carboxylic Acid Reductases as Enzymes in the Toolbox for Synthetic Chemistry. *ChemCatChem*, 9(6), 1005–1017. <https://doi.org/10.1002/cctc.201601249>
 27. Fitzpatrick, P. F. (1999). Tetrahydropterin-Dependent Amino Acid Hydroxylases. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1), 355–381. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.355>
 28. Fitzpatrick, P. F. (2010, sausio 1). Oxidation of amines by flavoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, T. 493, p. 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.07.019>
 29. Fraaije, M. W., ir van Berkel, W. J. H. (2006). Flavin-containing oxidative biocatalysts. *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, (January), 181–202.
 30. Furuya, T., ir Kino, K. (2014). Regioselective synthesis of piceatannol from resveratrol: Catalysis by two-component flavin-dependent monooxygenase HpaBC in whole cells. *Tetrahedron Letters*, 55(17), 2853–2855. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.03.076>
 31. Galán, B., Díaz, E., ir García, J. L. (2000). Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environmental Microbiology*, 2(6), 687–694. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00151.x>
 32. Galán, Beatriz, Díaz, E., Prieto, M. A., ir García, J. L. (2000). Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: A prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. *Journal of Bacteriology*, 182(3), 627–636. <https://doi.org/10.1128/JB.182.3.627-636.2000>
 33. Ghisla, S., ir Massey, V. (1989). Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *European Journal of Biochemistry*, 181(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14688.x>
 34. Gray, K. A., Mrachko, G. T., ir Squires, C. H. (2003). Biodesulfurization of fossil fuels. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 229–235. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00065-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00065-1)
 35. Heine, T., van Berkel, W. J. H., Gassner, G., van Pée, K. H., ir Tischler, D. (2018). Two-component fad-dependent monooxygenases: Current knowledge and biotechnological

- opportunities. *Biology*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/biology7030042>
36. Heuts, D. P. H. M., Scrutton, N. S., McIntire, W. S., ir Fraaije, M. W. (2009, liepos). What's in a covalent bond?: On the role and formation of covalently bound flavin cofactors. *FEBS Journal*, T. 276, p. 3405–3427. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07053.x>
 37. Holtmann, D., ir Hollmann, F. (2016). The Oxygen Dilemma: A Severe Challenge for the Application of Monooxygenases? *ChemBioChem*, 1391–1398. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600176>
 38. Huang, C. H., Lai, W. L., Lee, M. H., Chen, C. J., Vasella, A., Tsai, Y. C., ir Liaw, S. H. (2005). Crystal structure of glucooligosaccharide oxidase from *Acremonium strictum*: A novel flavinylation of 6-S-cysteinyl, 8 α -N1-histidyl FAD. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38831–38838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506078200>
 39. Huijbers, M. M. E., Montersino, S., Westphal, A. H., Tischler, D., ir Berkel, W. J. H. Van. (2014). Flavin dependent monooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544, 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.005>
 40. Illanes, A. (2008). Enzyme biocatalysis: Principles and applications. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>
 41. Imhoff, R. D., Power, N. P., Borrok, M. J., ir Tipton, P. A. (2003). General base catalysis in the urate oxidase reaction: Evidence for a novel Thr-Lys catalytic diad. *Biochemistry*, 42(14), 4094–4100. <https://doi.org/10.1021/bi027377x>
 42. Inouye, S. (1994). NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Letters*, 347(2–3), 163–168. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00528-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00528-1)
 43. Jansson, A., Koskiniemi, H., Erola, A., Wang, J., Mäntsälä, P., Schneider, G., ir Niemi, J. (2005). Aclacinomycin 10-hydroxylase is a novel substrate-assisted hydroxylase requiring S-adenosyl-L-methionine as cofactor. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3636–3644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412095200>
 44. Jansson, A., Niemi, J., Lindqvist, Y., Mäntsälä, P., ir Schneider, G. (2003). Crystal structure of aclacinomycin-10-hydroxylase, a S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase homolog involved in anthracycline biosynthesis in *Streptomyces purpurascens*. *Journal of Molecular Biology*, 334(2), 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.061>
 45. Jones, O. T. G. (1981). Enzymes (Third Edition). *FEBS Letters*, 130(1), 160–160. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80688-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80688-6)
 46. Kantz, A., Chin, F., Nallamotheu, N., Nguyen, T., ir Gassner, G. T. (2005). Mechanism of flavin transfer and oxygen activation by the two-component flavoenzyme styrene monooxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 442(1), 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.07.020>
 47. Keller, N. P., Watanabe, C. M. H., Kelkar, H. S., Adams, T. H., ir Townsend, C. A. (2000). Requirement of monooxygenase-mediated steps for sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 359–362. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.359-362.2000>
 48. Kirchner, U., Westphal, A. H., Müller, R., ir Van Berkel, W. J. H. (2003). Phenol Hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a Two-protein Component Monooxygenase with a Dual Role for FAD. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47545–47553. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307397200>
 49. Kugel, S., Baunach, M., Baer, P., Ishida-Ito, M., Sundaram, S., Xu, Z., ... Hertweck, C. (2017). Cryptic indole hydroxylation by a non-canonical terpenoid cyclase parallels bacterial xenobiotic detoxification. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15804>
 50. Kumar, S., Tamura, K., ir Nei, M. (1994). MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Bioinformatics*, 10(2), 189–191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/10.2.189>

51. Leahy, J. G., Batchelor, P. J., ir Morcomb, S. M. (2003, spalio). Evolution of the soluble diiron monooxygenases. *FEMS Microbiology Reviews*, T. 27, p. 449–479. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00023-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00023-8)
52. Leammli, U. K. (1970). © 1970 Nature Publishing Group. *Nature Publishing Group*, 228, 726–734. Gauta <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>
53. Levin, E. Y., Levenberg, B., ir Kaufman, S. (1960). The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *The Journal of biological chemistry*, 235, 2080–2086.
54. Lin, S., Van Lanen, S. G., ir Shen, B. (2008). Characterization of the two-component, FAD-dependent monooxygenase SgcC that requires carrier protein-tethered substrates for the biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic C-1027. *Journal of the American Chemical Society*, 130(20), 6616–6623. <https://doi.org/10.1021/ja710601d>
55. Littlechild, J. (1999). Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Current opinion in chemical biology*, 3(1), 28–34. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(99\)80006-4](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(99)80006-4)
56. MacHeroux, P., Kappes, B., ir Ealick, S. E. (2011, rugpjūčio). Flavogenomics - A genomic and structural view of flavin-dependent proteins. *FEBS Journal*, T. 278, p. 2625–2634. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08202.x>
57. Maeda-Yorita, K., Aki, K., Sagai, H., Misaki, H., ir Massey, V. (1995). L-lactate oxidase and L-lactate monooxygenase: Mechanistic variations on a common structural theme. *Biochimie*, 77(7–8), 631–642. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)88178-8](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)88178-8)
58. Maenpuen, S., Pongsupasa, V., Pensook, W., Anuwat, P., Kraivisitkul, N., Pinthong, C., Kraivisitkul, N. (2019). Rational-design engineering to create the flavin reductase variants with thermostable and solvent-tolerant properties. *ChemBioChem*. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900737>
59. Mascotti, M. L., Juri Ayub, M., Furnham, N., Thornton, J. M., ir Laskowski, R. A. (2016). Chopping and Changing: the Evolution of the Flavin-dependent Monooxygenases. *Journal of Molecular Biology*, 428(15), 3131–3146. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.003>
60. Massey, V. (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, T. 269, p. 22459–22462.
61. Matsubara, T., Ohshiro, T., Nishina, Y., ir Izumi, Y. (2001). Purification, Characterization, and Overexpression of Flavin Reductase Involved in Dibenzothiophene Desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1179–1184. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1179-1184>
62. McDonald, A. (2019). *The Enzyme List Class 1-Oxidoreductases Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) L A T E X version prepared by.*
63. Montersino, S., te Poele, E., Orru, R., Westphal, A. H., Barendregt, A., Heck, A. J. R., van Berkel, W. J. H. (2017). 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Rhodococcus jostii* RHA1 contains a phosphatidylinositol cofactor. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01110>
64. Montersino, S., Tischler, D., Gassner, G. T., ir Van Berkel, W. J. H. (2011, rugsėjo). Catalytic and structural features of flavoprotein hydroxylases and epoxidases. *Advanced Synthesis and Catalysis*, T. 353, p. 2301–2319. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100384>
65. Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Nebert, D. W. (1996). P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, T. 6, p. 1–42. <https://doi.org/10.1097/00008571-199602000-00002>
66. Otto, K., Hofstetter, K., Röthlisberger, M., Witholt, B., ir Schmid, A. (2004). Biochemical characterization of StyAB from *Pseudomonas* sp. strain VLB120 as a two-component flavin-diffusible monooxygenase. *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5292–5302.

- <https://doi.org/10.1128/JB.186.16.5292-5302.2004>
67. Panke, S., Held, M., Wubbolts, M. G., Witholt, B., ir Schmid, A. (2002). Pilot-scale production of (S)-styrene oxide from styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(1), 33–41. <https://doi.org/10.1002/bit.10346>
 68. Paul, P. E. V., Sangeetha, V., ir Deepika, R. G. (2018). Emerging trends in the industrial production of chemical products by microorganisms. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00009-X>
 69. Phongsak, T., Sucharitakul, J., Thotsaporn, K., Oonasant, W., Yuvaniyama, J., Svasti, J., Chaiyen, P. (2012). The C-terminal domain of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Acinetobacter baumannii* is an autoinhibitory domain. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 26213–26222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.354472>
 70. Pornsuwan, S., Maenpuen, S., Kamutira, P., Watthaisong, P., Thotsaporn, K., Tongsook, C., Chaiyen, P. (2017). 3,4-Dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*: An Fe(II)-containing enzyme with fast turnover. *PLoS ONE*, 12(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171135>
 71. Prier, C. K., ir Kosjek, B. (2019, balandžio 1). Recent preparative applications of redox enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, T. 49, p. 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.11.011>
 72. Prieto, M. A., ir Garcia, J. L. (1994). Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. A two-protein component enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 269(36), 22823–22829. Gauta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8077235>
 73. Ralph, E. C., Anderson, M. A., Cleland, W. W., ir Fitzpatrick, P. F. (2006). Mechanistic studies of the flavoenzyme tryptophan 2-monooxygenase: Deuterium and ¹⁵N kinetic isotope effects on alanine oxidation by an L-amino acid oxidase. *Biochemistry*, 45(51), 15844–15852. <https://doi.org/10.1021/bi061894o>
 74. Reichmuth, D. S., Hittle, J. L., Blanch, H. W., ir Keasling, J. D. (2000). Biodesulfurization of dibenzothiophene in *Escherichia coli* is enhanced by expression of a *Vibrio harveyi* oxidoreductase gene. *Biotechnology and bioengineering*, 67(1), 72–79. Gauta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10581437>
 75. Riebel, A., Dudek, H. M., de Gonzalo, G., Stepniak, P., Rychlewski, L., ir Fraaije, M. W. (2012). Expanding the set of rhodococcal Baeyer–Villiger monooxygenases by high-throughput cloning, expression and substrate screening. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(6), 1479–1489. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3823-0>
 76. Roper, L., ir Grogan, G. (2016). Biocatalysis for Organic Chemists: Hydroxylations. *Organic Synthesis Using Biocatalysis*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411518-7.00008-1>
 77. Sadauskas, M., Vaitekunas, J., Gasparavičiute, R., ir Meškys, R. (2017). Indole biodegradation in *Acinetobacter* sp. strain O153: Genetic and biochemical characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01453-17>
 78. Sheldon, R. A., ir Brady, D. (2018). The limits to biocatalysis: Pushing the envelope. *Chemical Communications*, 54(48), 6088–6104. <https://doi.org/10.1039/c8cc02463d>
 79. Shen, B., ir Hutchinson, C. R. (1993). Tetracenomycin F1 Monooxygenase: Oxidation of a Naphthacene to a Naphthacenequinone in the Biosynthesis of Tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens*. *Biochemistry*, 32(26), 6656–6663. <https://doi.org/10.1021/bi00077a019>
 80. Soulimane, T., Okane, S. R., ir Kolaj, O. (2010). Isolation and purification of *Thermus thermophilus* HpaB by a crystallization approach. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(3), 352–356. <https://doi.org/10.1107/S1744309110003714>
 81. Stanislauskienė, R., Gasparavičiute, R., Vaitekunas, J., Meskiene, R., Rutkienė, R., Casaite,

- V., ir Meskys, R. (2012). Construction of *Escherichia coli*-*Arthrobacter-Rhodococcus* shuttle vectors based on a cryptic plasmid from *Arthrobacter rhombi* and investigation of their application for functional screening. *FEMS Microbiology Letters*, 327(1), 78–86. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02462.x>
82. Sucharitakul, J., Chaiyen, P., Entsch, B., ir Ballou, D. P. (2006). Kinetic mechanisms of the oxygenase from a two-component enzyme, p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17044–17053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512385200>
 83. Sucharitakul, J., Tinikul, R., ir Chaiyen, P. (2014). Mechanisms of reduced flavin transfer in the two-component flavin-dependent monooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, T. 555–556, p. 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.009>
 84. Suh, J. K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M., ir Robertus, J. D. (1999). Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 2687–2691. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2687>
 85. Sutton, W. B. (1957). Mechanism of action and crystallization of lactic oxidative decarboxylase from *Mycobacterium phlei*. *The Journal of biological chemistry*, 226(1), 395–405.
 86. Tao, Z., Dong, B., Teng, Z., ir Zhao, Y. (2020). The Classification of Enzymes by Deep Learning. *IEEE Access*, 1–1. <https://doi.org/10.1109/access.2020.2992468>
 87. Tathe, A., Nikalje, A. P. G., ir Ghodke, M. (2011). *Biocatalysis: A Brief Review Biocatalysis: A Brief Review*. (January).
 88. Thotsaporn, K., Sucharitakul, J., Wongratana, J., Suadee, C., ir Chaiyen, P. (2004). Cloning and expression of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Acinetobacter baumannii*: Evidence of the divergence of enzymes in the class of two-protein component aromatic hydroxylases. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1680(1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.08.003>
 89. Tinikul, R., Pitsawong, W., Sucharitakul, J., Nijvipakul, S., Ballou, D. P., ir Chaiyen, P. (2013). The transfer of reduced flavin mononucleotide from luxG oxidoreductase to luciferase occurs via free diffusion. *Biochemistry*, 52(39), 6834–6843. <https://doi.org/10.1021/bi4006545>
 90. Torres Pazmiño, D. E., Winkler, M., Glieder, A., ir Fraaije, M. W. (2010). Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, T. 146, p. 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.021>
 91. Tramper, J. (1996). Chemical versus biochemical conversion: When and how to use biocatalysts. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(2), 290–295. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19961020\)52:2<290::AID-BIT8>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19961020)52:2<290::AID-BIT8>3.0.CO;2-L)
 92. Turner, N. J. (Nicholas J. ., ir Humphreys, L. (2018). *Biocatalysis in organic synthesis : the retrosynthesis approach*.
 93. Unversucht, S., Hollmann, F., Schmid, A., ir Van Pée, K. H. (2005). FADH₂-dependence of tryptophan 7-halogenase. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 347(7–8), 1163–1167. <https://doi.org/10.1002/adsc.200505029>
 94. van Berkel, W. J. H., Kamerbeek, N. M., ir Fraaije, M. W. (2006). Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, T. 124, p. 670–689. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.044>
 95. Van Den Heuvel, R. H. H., Westphal, A. H., Heck, A. J. R., Walsh, M. A., Rovida, S., Van Berkel, W. J. H., ir Mattevi, A. (2004). Structural Studies on Flavin Reductase PheA2 Reveal Binding of NAD in an Unusual Folded Conformation and Support Novel Mechanism of Action. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12860–12867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313765200>
 96. Wallar, B. J., ir Lipscomb, J. D. (1996). Dioxygen activation by enzymes containing

- binuclear non-heme iron clusters. *Chemical Reviews*, 96(7), 2625–2657. <https://doi.org/10.1021/cr9500489>
97. Wieser, M., Wagner, B., Eberspächer, J., ir Lingens, F. (1997). Purification and characterization of 2,4,6-trichlorophenol-4- monooxygenase, a dehalogenating enzyme from *Azotobacter* sp. strain GP1. *Journal of Bacteriology*, 179(1), 202–208. <https://doi.org/10.1128/jb.179.1.202-208.1997>
 98. Williams, G., ir Hall, M. (2008). Modern Biocatalysis. *Modern Biocatalysis*. <https://doi.org/10.1002/9783527623839>
 99. Wu, S., Zhou, Y., Wang, T., Too, H. P., Wang, D. I. C., ir Li, Z. (2016). Highly regio- and enantioselective multiple oxy- and amino-functionalizations of alkenes by modular cascade biocatalysis. *Nature Communications*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms11917>
 100. Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: Recent progress . *Industrial Biotechnology*, 1(1), 38–50. <https://doi.org/10.1089/ind.2005.1.38>
 101. Xun, L., ir Sandvik, E. R. (2000). Characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (HpaB) of *Escherichia coli* as a reduced flavin adenine dinucleotide-utilizing monooxygenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 481–486. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.481-486.2000>
 102. Yamamoto, S., Katagiri, M., Maeno, H., ir Hayaishi, O. (1965). Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide. I. Purification and general properties. *The Journal of biological chemistry*, 240, 3408–3413. [Gauta http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14321380](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14321380)
 103. Yeh, E., Blasiak, L. C., Koglin, A., Drennan, C. L., ir Walsh, C. T. (2007). Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases. *Biochemistry*, 46(5), 1284–1292. <https://doi.org/10.1021/bi0621213>
 104. Yeh, E., Garneau, S., ir Walsh, C. T. (2005). Robust in vitro activity of RebF and RebH, a two-component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(11), 3960–3965. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500755102>
 105. Yuenyao, A., Petchyam, N., Kamonsutthipajit, N., Chaiyen, P., ir Pakotiprapha, D. (2018). Crystal structure of the flavin reductase of *Acinetobacter baumannii* p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (HPAH) and identification of amino acid residues underlying its regulation by aromatic ligands. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 653, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.010>
 106. Zhang, Y., Edwards, T. E., Begley, D. W., Abramov, A., Thompkins, K. B., Ferrell, M., Myler, P. J. (2011). Structure of nitrilotriacetate monooxygenase component B from *Mycobacterium thermoresistibile*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(9), 1100–1105. <https://doi.org/10.1107/S1744309111012541>
 107. Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D., Weigel, D., ir Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, 291(5502), 306–309. <https://doi.org/10.1126/science.291.5502.306>
 108. Ziegler, D. M. (1990, rugpjūčio 1). Flavin-containing monooxygenases: enzymes adapted for multisubstrate specificity. *Trends in Pharmacological Sciences*, T. 11, p. 321– 324. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90235-Z](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90235-Z)