

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Ana Marija J. Balaž

Proteinski inženjering celobioza – dehidrogenaze
iz *Phanerochaete chrysosporium* u cilju
povećanja oksidativne stabilnosti za primenu u
biokatalizi

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Ana Marija J. Balaž

Protein engineering of cellobiose dehydrogenase
from *Phanerochaete chrysosporium* for higher
oxidative stability in biocatalysis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentor, član komisije:

dr Radivoje Prodanović

Vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u
Beogradu

Član komisije:

dr Marija Gavrović Jankulović

Redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u
Beogradu

Član komisije:

dr Natalija Polović

Vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u
Beogradu

Član komisije:

dr Olivera Prodanović

Naučni saradnik

Institut za multidisciplinarna
istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Oktobar, 2019 u Beogradu

Posvećeno mami i bati bez kojih ništa ne bi bilo...

Moguće, posebno i divno.

Hvala na svemu.

Vreme je da odrastem...

Zahvaljujem se...

Svom mentoru, vanrednom profesoru dr Radivoju Prodanoviću, na pruženoj prilici da ostvarim svoj san, da se bavim naukom. Na neizmernoj pomoći tokom izrade ove disertacije, na idejama i savetima, na sugestijama i kritikama koje su u mnogome doprinele da moja disertacija danas ima ovakav sadržaj i formu, ali da i ja sazrim i odrastem kao budući naučnik ali i kao čovek.

Redovnom profesoru dr Mariji Gavrović – Jankulović, šefu katedre za Biohemiju, na pruženom znanju tokom osnovnih, a nakon toga i na master studijama. Na pruženoj mogućnosti da svoje prve naučne korake započnem upravo u njenoj laboratoriji kao deo grupe profesora Prodanovića i što je pristala da bude deo komisije za odbranu i ocenu ove doktorske disertacije.

Vanrednom profesoru dr Nataliji Polović, na pruženom znanju tokom studija, ali i korisnim savetima tokom izrade doktorske disertacije, kao i što je pristala da bude deo komisije za odbranu i ocenu ove doktorske teze.

Naučnom saradniku dr Oliveri Prodanović koja mi je učinila veliku čast i pristala da bude deo komisije za odbranu i ocenu ove doktorske disertacije i koja je svojim komentarima i savetima učinila da ova teza bude poboljšana.

Svoj doktorat sam započela i završila u maloj ali slatkoj laboratoriji 412, odmah pored ženskog toaleta, kako smo uvek objašnjavali ljudima gde da nas nađu. Preselili smo se. Sada imamo novu, još lepšu laboratoriju, značajno veću nego prethodnu, a broj dragih ljudi podjednako velik čak i za novu labu, lab 434. Naučili smo da funkcionišemo zajedno, da se snalazimo, malo guramo ponekad čak i malo svađamo i nerviramo, ali kažu da je to normalno. Uglavnom smo se smejali toliko glasno da je odzvanjalo bezbroj kvadrata prostora oko nas. Bez obzira u kojoj smo prostoriji, to je moja laba i ljudi u njoj, kolege i prijatelji. Dragi ljudi, hvala vam na svim momentima

koje smo prošli zajedno, na guranju kao u GSP i jel može samo malo, na podršci i pomoći, savetima. Hvala vam na svim tim grohotom propraćenim momentima, šalama samo nama smešnim, hvala na svim tim lepim i manje lepim momentima.

Veliku zahvalnost dugujem i diplomcima Nedi i Kristini, čiji su završni radovi deo ove doktorske disertacije i koje su svojim radom i trudom, umnogome potpomogle i doprinele da ova teza ima upravo ove rezultate. Hvala vam na pomoći ali i na ukazanom poverenju i tome što se izabrale da baš samnom radite svoje završne radove.

Tokom svih ovih godina provedenih u zgradi Hemijskog fakulteta, upoznala sam mnoštvo kolega i prijatelja. Veliko hvala kolegama i prijateljima iz laboratorije 429, na druženjima i pomoći tokom svih tih godina. Veliko hvala i kolegama iz laboratorija 403, 421 i 416 na ukazanoj pomoći, savetima i podršci kada je bilo najpotrebnije.

Ponekad zaboravimo na važnost tehničara sa našeg fakulteta tokom studiranja, a i kasnije kada postajemo istraživači oni su uvek bili tu da potpomognu eksperimente, da nam daju nešto što nam nedostaje od hemikalija, da nam obezbede i pruže prostor za rad. Dragi moji tehničari, beskrajno vam hvala na svemu tome, što se uvek bili tu da mi pomognete kad je trebalo, hvala za sve one momente „ma niko ne mora da zna“, hvala vam i za prijateljski razgovor uz kafu nakon čega sve bude malo lakše.

Veliku zahvalnost dugujem i drugim tehnicarima sa fakulteta, Miri i Milošu. Hvala vam na pomoći kad je trebalo i hvala na vremenu provedenom zajedno.

Dragi prijatelji Andrijana, Ivana, Nevena, Bojane, Nikola, Biljana i Dunja hvala na dugogodišnjem prijateljstvu tokom kog smo zajedno odrastali, sazrevali, završavali fakultete, a evo sad i doktorate. Hvala vam na pomoći, podršci, ljubavi, nezaboravnim momentima i da, pravi prijatelji postoje, vi ste dokaz za to.

Nakon svih ovih godina ne postoji osoba koja me zaista poznaje, onako kako me samo znaju mama i bata, kojoj bezuslovno verujem i bez koje moj život ne bi bio potpun, osim tebe. Život me je naučio da ljudi dolaze i prolaze i ništa ne traje večno ali posle svih ovih godina shvatam da postoje doživotna prijateljstva i da je naše jedno od tih. Proživeli smo mnogo, pregurali svašta, bili jedno uz drugo kad je bilo najteže, bio si mi podrška i motivacija, pomagao si mi bezuslovno, bio rame za plakanje i ostvarivao moje najsitnije želje. Hvala za sve godine iza nas, za godine koje dolaze, za svaki osmeh, za sve kafe i za beskonačno mnogo četvrtaka koje smo i koje ćemo provesti zajedno. Hvala ti na svemu. Always and forever!

Posebnu, a opet rečima neopisivu zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami i bati. Malo je reci hvala vam za sve, jer to neće ni približno iskazati koliko sam zahvalna što sam deo jedne predivne porodice, koja se žrtvovala i odricala kako bi ja što lepše i ugodnije živela, odrastala, studirala. Hvala vam na bezuslovnoj pomoći, podršci i motivaciji, da čak i kad nisam videla izlaz i rešenje, vi ste mi pomagali da ga zajedno nađemo. Hvala vam na tome što ste verovali u mene, podržavali moje snove i ambicije, govorili da ću uspeti, čak i kad sama nisam verovala u to, bili moj oslonac i snaga da ostvarim svoje snove. Bezgraničnu ljubav koju mi pružate, samo je motivacija da nikad ne odustanem i da budem bolja. Hvala malo je reći, ali hvala!

Ana Marija

SAŽETAK

Celobioza – dehidrogenaza poreklom iz *Phanerochaete chrysosporium*, gljive bele truleži, pripada ekstracelularnim oksidoredukcionim enzimima i katalizuje oksidaciju β – 1,4 – glikozidno vezanih oligosaharida poput celobioze i laktoze. Oksidacijom laktoze dolazi do formiranja laktobionske kiseline koja pronalazi veliku primenu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji gde se koristi prilikom distribucije lekova i za hidrataciju kože kao sastavni deo različitih krema, gde zajedno sa hijaluronskom kiselinu ima ulogu u smanjenju bora.

Celobioza – dehidrogenaza prilikom oksidacije laktoze ili celobioze, kao prirodnih supstrata, katalizuje redukciju jednog dvoelektronskog ili dva jednoelektronska akceptora elektrona. Jedan od najkorišćenijih dvoelektronskih akceptora elektrona je upravo dihlor fenol indofenol (DCIP), dok jednoelektronski akceptori elektrona mogu biti citohrom c, ABTS, ali i Fe^{3+} i Mn^{3+} joni. Redukcijom Fe^{3+} jona u prisustvu molekulskog kiseonika dolazi do formiranja vodonik peroksida i posredstvom Fentonove reakcije do generisanja hidroksil radikala.

Polazeći od ove činjenice, iskoristili smo upravo Fentonovu reakciju za razvoj fluorescentnog eseja za visoko efikasnu pretragu biblioteka gena celobioza – dehidrogenaze, baziranog na detekciji proizvedenih hidroksil radikala fluorogenom probom aminofenil – fluoresceinom (APF).

Primena celobioza – dehidrogenaze u konstruisanju biosenzora i biogorivnih ćelija leži upravo u njenoj sposobnosti da katalizuje oksidaciju laktoze, celobioze i β – 1,4 – vezanih oligosaharida do odgovarajućih laktona koji potom spontano hidrolizuju do aldonskih kiselina. Enzimi koji nalaze primenu u konstruisanju biosenzora i biogorivnih ćelija, moraju da zadovoljavaju nekoliko kriterijuma,

odnosno moraju da imaju veliku osetljivost i supstratnu specifičnost, ali i da pokazuju povećanu stabilnost.

Povećana stabilnost enzima za biosenzore je posebno važna u pogledu njihove stabilnosti u odnosu na reaktivne kiseonične vrste. Uvođenjem mutacija na pozicijama metionina 65, 685, 738 celobioza – dehidrogenaze želeli smo da dobijemo mutante koji bi pokazivali povećanu stabilnost u prisustvu vodonik peroksida. Analizom saturacionih biblioteka na pozicijama metionina 65, koji je ujedno i jedini metionin unutar citohrom domena, kao i na pozicijama 685 i 738 koje se nalaze unutar flavinskog domena u blizini katalitički aktivnog mesta, detektovali smo tri mutanta celobioza – dehidrogenaze koji pokazuju povećanu stabilnost u prisustvu 0,3 M vodonik peroksida ali i povećanu aktivnost u odnosu na prirodni oblik enzima. Mutant M65F nakon 6 sati inkubacije u vodonik peroksidu je pokazivao 70% rezidualne aktivnosti u odnosu na wtCDH koji je zadržao 40% svoje početne aktivnosti. Mutanti M685Y i M738S su pokazivali 90% odnosno 80% aktivnosti nakon inkubacije u vodonik peroksidu.

Proizvodnja enzima u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* je zadovoljavajuća za detekciju i ispitivanje karakteristika mutiranih formi enzima, dok je za dobijanje većih količina enzima koji se potom mogu koristiti za proizvodnju biosenzora neophodna ekspresija u kvascu *Pichia pastoris*. Trostruki mutant celobioza – dehidrogenaze (D20N, A64T i V592M), i oksidativni mutanti (M65F, M685Y, M738S) konstruisani u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, su reklonirani u *Pichia pastoris*, gde su produkovani, prečišćeni i okarakterisani. Trostruki mutant pokazuje specifičnu aktivnost od 14,1 IU/mg proteina, dok oksidativni mutanti u poređenju sa trostrukim mutantom pokazuju manju specifičnu aktivnost koja iznosi između 4 i 13 IU/mg proteina.

Kako bismo uspostavili kontinualni proces proizvodnje laktobionske kiseline upotrebom trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze (D20N, A64T i V592M) i laktoze kao supstrata, neophodno je bilo da uključimo i lakazu koja katalizuje regeneraciju redoks medijatora, dihlor fenol indofenol (DCIP), koji potom ima sposobnost da kontinualno preuzima elektrone prilikom oksidacije laktoze. Ekspresijom celobioza – dehidrogenaze kao i lakaze na površini ćelija kvasca, a potom njihovim mešanjem, proizvedena je laktobionska kiselina upotrebom enzima imobilizovanih na ćelijskim zidovima kvasaca.

Lakaza eksprimirana na ćelijskim zidovima nije pokazala dovoljno brzu re – oksidaciju DCIP – a u odnosu na brzinu sinteze laktobionske kiseline dejstvom trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze, usled čega nije bilo moguće dobiti zadovoljavajuće količine laktobionske kiseline. Kako bismo uspostavili kontinualnu proizvodnju laktobionske kiseline, ćelijskim zidovima sa eksprimiranim trostrukim mutantom celobioza – dehidrogenaze, dodali smo komercijalnu lakazu i kao rezultat toga proizveli laktobionsku kiselinu u većem prinosu.

Ključne reči: celobioza – dehidrogenaza, oksidativna stabilnost, kvasac, mutanti, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, fluorescentni esej, laktobionska kiselina, Fentonova reakcija

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

ABSTRACT

Cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*, a white rot fungus, belongs to the extracellular oxidoreductive group of enzymes and catalyzes the oxidation of the β - 1,4 - glycoside bond of oligosaccharides such as cellobiose and lactose. During oxidation of lactose, formation of lactobionic acid occurs which has many applications in pharmaceutical and cosmetic industry. Such applications include the distribution of medicine, a component responsible for skin hydration and when combined with hyaluronic acid as an agent against wrinkles.

During oxidation of lactose or cellobiose by cellobiose dehydrogenase, reduction catalysis occurs of one two electron or two one electron acceptors. One of the most utilized two electron acceptors is DCIP, while one electron acceptors are usually cytochrome c, ABTS, Fe^{3+} and Mn^{3+} ions. During reduction of Fe^{3+} ions in the presence of molecular oxygen, H_2O_2 is formed and due to the Fenton reaction formation of hydroxyl radicals occurs. Due to this occurrence we wanted to use the Fenton reaction in order to develop a fluorescent assay based on the production of hydroxyl radicals and the fluorescence of aminophenyl fluorescein (APF). This would allow us to efficiently analyze cellobiose dehydrogenase gene libraries.

With this fact in mind, the Fenton reaction was used to develop a fluorescent assay for the high throughput screening of cellobiose dehydrogenase genes, based on the detection of hydroxyl radicals with the fluorescent probe APF.

The possible application of cellobiose dehydrogenase in the construction of various biosensors and biofuel cells is due to its ability to catalyze the oxidation of lactose, cellobiose and similar β - 1,4 - oligosaccharides to their corresponding lactones which then spontaneously hydrolyze to aldonic acids. Enzymes used in such

applications need to satisfy certain criteria, such as exceptional sensitivity, substrate selectivity, stability and activity.

Increased stability of enzymes used in biosensors is especially important due to the large amounts of reactive oxygen species produced during biosensor use. Introduction of mutations on methionine positions 65, 685 and 738 of cellobiose dehydrogenase we aimed to develop mutants which would show an increase in stability while in the presence of H₂O₂. Analyzing saturation libraries of methionine at position 65, which is the only methionine in the cytochrome domain, as well as methionine on positions 685 and 738, which are located in the flavin domain active site, we detected 3 cellobiose dehydrogenase mutants which showed an increase in stability in the presence of 0.3 M H₂O₂ and an increase in activity with respect to the wild type enzyme. Mutant M65F showed 70% residual activity after 6 hours of incubation in H₂O₂, while the wild type showed 40% residual activity. Mutants M685Y and M738S showed 90% and 80% respectively after incubation in H₂O₂.

Production of cellobiose dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* is satisfactory concerning the detection and analysis of characteristics of mutated forms of the enzyme, however larger amounts of the enzyme are needed for application in biosensors. Thus, a different expression system is needed, such system is *Pichia pastoris*. Cellobiose dehydrogenase triple mutant (D20N, A65T, V592M) as well as oxidative mutants (M65F, M685Y and M738S) were constructed in *Saccharomyces cerevisiae* and were cloned into *Pichia pastoris*, where they were subsequently produced, isolated and characterized. The triple mutant showed specific activity 14.1 IU/mg, while the oxidative mutants compared to triple mutant, showed a smaller specific activity 4 – 13 IU/mg.

In order to facilitate a continual production of lactobionic acid by use of a cellobiose dehydrogenase triple mutant (D20N, A64T and V592M) and lactose as a substrate, it is imperative that we include laccase as a way of regenerating redox mediator, dichlorophenolindophenol (DCIP), which later have the ability of continuously accepting electrons during oxidation of lactose. We aimed to induce expression of cellobiose dehydrogenase as well as laccase on the yeast's surface and their subsequent mixing, thus immobilizing the enzymes on the yeast's cell wall and using them to produce lactobionic acid.

Laccase expressed on the cell wall did not show a sufficient reoxidation rate of DCIP with regard to synthesis of lactobionic acid by the cellobiose dehydrogenase triple mutant, resulting in a less than adequate amount of product. As our aim was to continually produce lactobionic acid, we added commercial laccase to our cell wall with expressed cellobiose dehydrogenase triple mutant, and successfully synthesized lactobionic acid.

Key words: cellobiose dehydrogenase, oxidative stability, yeast, mutants, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, fluorescent assay, lactobionic acid

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Lista skraćénica

ABTS	2,2' - azino - bis (3 - etilbenzotiazolin - 6 - sulfonska kiselina)
AOX	alkohol oksidaza
APF	eng. <i>aminophenyl fluorescein</i>
APS	amonijum persulfat
BFP	Brom Fenol Plavo
BMG	eng. <i>Buffered Minimal Glycerol</i>
BMM	eng. <i>Buffered Minimal Methanol</i>
CAA	eng. <i>casamino acids</i>
CBB	eng. <i>Comasie Brilliant Blue</i>
CBLM	celobionolaktam
CDH	celobioza - dehidrogenaza
CYT_{CDH}	citohrom domen celobioza - dehidrogenaze
DCIP	dihloroindofenol
DEAE	dietilaminoetil
DET	eng. <i>Direct Electron Transfer</i>
DH_{CDH}	flavinski domen celobioza - dehidrogenaze
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTT	ditiotreitol

EDTA	etilendiamin tetrasirćetna kiselina
EGDMA	etilen – glikol – dimetakrilat
EGFP	eng. <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ET	eng. <i>Electron Transfer</i>
FACS	eng. <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
Gal	galaktoza
GFP	eng. <i>Green Fluorescent Protein</i>
Glc	glukoza
GMA	glicidil – metakrilat
HA	hemaglutinin
HPLC	eng. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IET	eng. <i>Inter Electron Transfer</i>
LB	Luria – Bertani
LPMO	Litička Polisaharidna Monooksigenaza
MET	eng. <i>Mediated Electron Transfer</i>
PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza
PBS	eng. <i>Phosphate Buffered Saline</i> (puferisani fiziološki rastvor)
PCR	eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i>

SDS	eng. <i>Sodium Dodecil Sulfat</i>
TEMED	1,2 – <i>Bis(dimetilamino)etan</i>
TRIS	<i>tris(hidroksimetil)aminometan</i>
wt	eng. <i>wild type</i>
yEGFP	eng. <i>yeast Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
YNB	eng. <i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	eng. <i>Yeast Peptone Dextrose</i>
YSD	eng. <i>Yeast Surface Display</i>

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski deo.....	5
2.1. Mikrobiološka razgradnja drveta.....	6
2.1.1. Celuloza.....	8
2.1.2. Celobioza i laktoza: supstrati celobioza – dehidrogenaze.....	10
2.2. Celobioza – dehidrogenaza.....	11
2.2.1. Opšte karakteristike celobioza – dehidrogenaze.....	11
2.2.2. Strukturne karakteristike celobioza – dehidrogenaze	13
2.2.2.1. Citohrom domen celobioza – dehidrogenaze (CYT _{CDH})	14
2.2.2.2. Flavinski domen celobioza – dehidrogenaze (DH _{CDH})	15
2.2.3. Katalitički mehanizam celobioza – dehidrogenaze	17
2.2.4. Biološka funkcija celobioza – dehidrogenaze	23
2.2.5. Primena celobioza – dehidrogenaze	27
2.2.5.1. Laktobionska kiselina	28
2.3. Zeleni fluorescentni protein	29
2.4. Proteinski inženjering	32
2.4.1. Dirigovana evolucija proteina	34
2.4.2. Racionalni dizajn	35
2.4.3. Proteinski inženjering celobioza – dehidrogenaze.....	37
2.5. Ekspresioni sistemi	38
2.5.1. Prokariotski ekspresioni sistemi	39
2.5.2. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kao ekspresioni sistem.....	40
2.5.2.1. Ekspresija proteina na površini ćelija kvasca	41
2.5.3. Kvasac <i>Pichia pastoris</i> kao ekspresioni sistem	44
3. Ciljevi istraživanja.....	47
4. Materijal i metode	50
4.1. Materijal	51
4.1.1. Oprema	51
4.1.2. Hemikalije	52
4.1.3. Izvor gena za celobioza – dehidrogenazu	52
4.1.4. Izvor gena za zeleni fluorescentni protein.....	53
4.1.5. Vektori i sojevi	53
4.2. Mikrobiološke metode	53

4.2.1. Medijumi za rast bakterija.....	54
4.2.1.1. Super optimalni tečni medijum za rast bakterija (SOC medijum).....	54
4.2.1.2. Luria – Bertani medijum za rast bakterija (LB medijum).....	54
4.2.1.3. Luria – Bertani čvrst medijum za rast bakterija (LA medijum).....	54
4.2.1.4. Luria – Bertani medijum za rast bakterija sa rezistencijom na ampicilin (LB – ampicilin).....	55
4.2.1.5. Luria – Bertani čvrst medijum za rast bakterija sa rezistencijom na ampicilin (LA – ampicilin).....	55
4.2.1.6. Luria – Bertani medijum za rast bakterija sa rezistencijom na zeocin (LB – zeocin)....	55
4.2.1.7. Luria – Bertani čvrst medijum za rast bakterija sa rezistencijom na zeocin (LA – zeocin).....	56
4.2.2. Medijumi za rast kvasaca.....	56
4.2.2.1. YPD tečni medijum za rast kvasaca.....	56
4.2.2.2. YPD tečni medijum za rast kvasaca sa rezistencijom na zeocin.....	56
4.2.2.3. YPD čvrsti medijum za rast kvasaca.....	57
4.2.2.4. YPD čvrsti medijum za rast kvasaca sa rezistencijom na zeocin.....	57
4.2.2.5. 2xYPAD tečni medijum za rast kvasaca.....	57
4.2.2.6. Tečni selektivni medijum za rast kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> InvSc1 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A + W).....	58
4.2.2.7. Tečni selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> InvSc1 soja (YNB – CAA medijum sa Gal + A + W).....	58
4.2.2.8. Čvrsti selektivni medijum za rast kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> InvSc1 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A + W).....	59
4.2.2.9. Čvrsti selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> InvSc1 soja (YNB – CAA medijum sa Gal + A + W).....	59
4.2.2.10. Tečni selektivni medijum za rast kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A).....	60
4.2.2.11. Tečni selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Gal + A).....	60
4.2.2.12. Čvrsti selektivni medijum za rast kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A).....	61
4.2.2.13. Čvrsti selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Gal + A).....	61
4.2.2.14. Tečni selektivni medijum za rast kvasca <i>Pichia pastoris</i> KM71H soja (BMG medijum).....	62

4.2.2.15. Tečni selektivni medijum za rast kvasca <i>Pichia pastoris</i> KM71H soja (BMM medijum)	62
4.2.3. Kompetentne ćelije	62
4.2.3.1. Hemijski kompetentne ćelije bakterija <i>Escherichia coli</i> DH5 α i XL10 gold soja	62
4.2.3.2. Hemijski kompetentne ćelije kvasaca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> InvSc1 i EBY100 soja	63
4.2.3.3. Elektro kompetentne ćelije kvasaca <i>Pichia pastoris</i> KM71H soja	64
4.3. Molekularno – biološke metode	65
4.3.1. Kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pYES2 vektor	65
4.3.1.1. Umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom	65
4.3.1.2. Dvostruka digestija restrikcionim enzimima umnoženog gena za celobioza – dehidrogenazu i pYES2 vektora	66
4.3.1.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pYES2 vektora	66
4.3.2. Kreiranje saturacionih biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pYES2 vektoru	67
4.3.2.1. Kreiranje kombinovanih mutanata iz saturacionih biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pYES2 vektoru	67
4.3.3. Kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pCTCON2 vektor	68
4.3.3.1. Umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom	68
4.3.3.2. Dvostruka digestija restrikcionim enzimima umnoženog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON2 vektora	69
4.3.3.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON2 vektora	69
4.3.4. Kreiranje <i>error – prone</i> biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pCTCON2 vektoru	70
4.3.4.1. Umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom	70
4.3.4.2. Dvostruka digestija restrikcionim enzimima umnoženog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON2 vektora	71
4.3.4.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON2 vektora	71
4.3.5. Kloniranje gena za zeleni fluorescentni protein u pCTCON2 vektor	72
4.3.5.1. Umnožavanje gena za zeleni fluorescentni protein PCR reakcijom	72
4.3.5.2. Dvostruka digestija restrikcionim enzimima umnoženog gena za zeleni fluorescentni protein i pCTCON2 vektora	73
4.3.5.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za zeleni fluorescentni protein i pCTCON2 vektora	73
4.3.6. Kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u GFP – pCTCON2 vektor	74

4.3.6.1. Umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom	74
4.3.6.2. Dvostruka digestija restrikcijom enzimima umnoženog gena za celobioza – dehidrogenazu i GFP – pCTCON ₂ vektora.....	75
4.3.6.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i GFP – pCTCON ₂ vektora.....	75
4.3.7. Kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pPICZ α A vektor.....	76
4.3.7.1. Umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom	76
4.3.7.2. Dvostruka digestija restrikcijom enzimima umnoženog gena za celobioza – dehidrogenazu i pPICZ α A vektora	77
4.3.7.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pPICZ α A vektora.....	77
4.3.8. Kreiranje mutiranih gena za celobioza – dehidrogenazu u pPICZ α A vektor	78
4.3.9. Transformacija kompetentnih ćelija <i>Escherichia coli</i>	78
4.3.10. Transformacija kompetentnih ćelija <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
4.3.11. Transformacija kompetentnih ćelija <i>Pichia pastoris</i>	79
4.3.12. Izolovanje plazmida.....	80
4.3.12.1. Izolovanje plazmida iz bakterija	80
4.3.12.2. Izolovanje plazmida iz kvasaca	80
4.3.13. Analiza izolovanih plazmida.....	81
4.3.13.1. Enzimski restrikcija izolovanih plazmida.....	81
4.3.13.2. Detekcija restrikovanih plazmida na agaroznoj DNK elektroforezi	81
4.3.14. Proizvodnja celobioza – dehidrogenaze u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> InvSci soju	82
4.3.15. Proizvodnja celobioza – dehidrogenaze u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 soju.....	82
4.3.16. Proizvodnja celobioza – dehidrogenaze u <i>Pichia pastoris</i> KM71H soju.....	82
4.4. Preparativne metode.....	83
4.4.1. Jonoizmenjivačka hromatografija.....	83
4.4.2. Gel filtraciona hromatografija	83
4.5. Analitičke metode.....	84
4.5.1. Određivanje enzimskih aktivnosti	84
4.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina	84
4.5.3. Određivanje oksidativne stabilnosti celobioza – dehidrogenaze u prisustvu vodonik peroksida	84
4.5.4. Denaturišuća elektroforeza (SDS – PAGE)	85
4.5.5. Nativna elektroforeza	86

4.5.6. Detekcija aktivnosti celobioza – dehidrogenaze u nativnom gelu (zimogram).....	86
4.5.7. Karakterizacija celobioza – dehidrogenaze.....	87
4.5.7.1. Određivanje kinetičkih parametara celobioza – dehidrogenaze	87
4.5.7.2. Određivanje temperaturne stabilnosti celobioza – dehidrogenaze	87
4.5.7.3. Određivanje pH optimuma celobioza – dehidrogenaze.....	88
4.6. Imobilizacija enzima na makroporoznom nosaču	88
4.7. Razvoj fluorescentnog eseja za određivanje aktivnosti celobioza – dehidrogenaze	89
4.8. Proizvodnja laktobionske kiseline	90
4.8.1. Proizvodnja liziranih ćelijskih zidova sa eksprimiranom celobioza – dehidrogenazom	90
4.8.2. Proizvodnja liziranih ćelijskih zidova sa eksprimiranom lakazom	90
4.8.3. Detekcija aktivnosti celobioza – dehidrogenaze eksprimirane na liziranim ćelijskim zidovima	91
4.8.4. Detekcija aktivnosti lakaze eksprimirane na liziranim ćelijskim zidovima	91
4.8.5. Detekcija produkovane laktobionske kiseline.....	92
5. Rezultati i diskusija	93
5.1. Razvoj i optimizacija fluorescentnog eseja za pretraživanje biblioteke mutanata celobioza – dehidrogenaze.....	94
5.2. Ekspresija celobioza – dehidrogenaze na površini ćelija kvasca.....	103
5.2.1. Kloniranje prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze u pCTCON2 vektor i kreiranje <i>error</i> – <i>prone</i> biblioteke mutanata.....	103
5.2.2. Ekspresija <i>error</i> – <i>prone</i> varijanti celobioza – dehidrogenaze i prirodnog oblika enzima na površini ćelija kvasca	104
5.2.3. Ekspresija trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze sa zelenim fluorescentnim enzimom na površini ćelija kvasca.....	107
5.3. Semi – racionalni dizajn celobioza – dehidrogenaze u cilju povećanja oksidativne stabilnosti.....	108
5.3.1. Odabir i selekcija metionininskih ostataka celobioza – dehidrogenaze	108
5.3.2. Pretraživanje saturacionih biblioteka celobioza – dehidrogenaze.....	112
5.3.3. Merenje oksidativne stabilnosti selektovanih mutanata i prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze.....	114
5.3.4. Prečišćavanje oksidativno stabilnih mutanta i prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze	118
5.3.5. Karakterizacija oksidativno stabilnih mutanata i prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze.....	119
5.3.5.1. Određivanje kinetičkih parametara	119
5.3.5.2. Određivanje temperaturne stabilnosti	121

5.3.5.3. Određivanje pH optimuma.....	121
5.3.6. Proizvodnja kombinovanih mutanata	122
5.4. Kloniranje i ekspresija prirodnog oblika i mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze u <i>Pichia pastoris</i> KM71H soju.....	123
5.4.1. Kloniranje mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze u pPICZ α A vektor	123
5.4.2. Ekspresija i prečišćavanje prirodnog oblika i mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze	123
5.4.3. Karakterizacija prirodnog oblika i mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze	130
5.4.3.1. Određivanje kinetičkih parametara	130
5.4.3.2. Određivanje temperaturne stabilnosti.....	133
5.4.3.3. Određivanje pH optimuma	133
5.5. Proizvodnja laktobionske kiseline	135
6. Zaključci	141
7. Literatura.....	144
8. Prilog	156
8.1. Prilog 1	157
Prajmeri za kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pYES2 vektor	157
Prajmeri za kreiranje saturacionih biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pYES2 vektoru.....	157
Prajmeri za kreiranje kombinovanih mutanata celobioza – dehidrogenaze u pYES2 vektoru....	157
Prajmeri za kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pCTCON2 vektor	158
Prajmeri za kreiranje error – prone biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pCTCON2 vektor .	158
Prajmeri za kloniranje gena za zeleni fluorescentni protein u pCTCON2 vektor.....	158
Prajmeri za kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u GFP – pCTCON2 vektor.....	158
Prajmeri za kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pPICZ α A vektor	158
Prajmeri za kloniranje mutiranih gena za celobioza – dehidrogenazu u pPICZ α A vektor.....	159
8.2. Prilog 2.....	160

1. Uvod

Enzimi predstavljaju visoko efikasne biokatalizatore, koji zahvaljujući svojoj sposobnosti da funkcionišu u blagim reakcionim uslovima, ali i visokoj selektivnosti za dobijanje proizvoda, kao i zbog veoma niske fiziološke toksičnosti i toksičnosti prema okruženju, pronalaze značajnu ulogu u katalizi na industrijskoj skali za proizvodnju različitih proizvoda¹⁻⁴. Zbog svojih karakteristika, enzimi nalaze primenu u farmaceutskoj industriji, ali i u industriji hrane i pića⁵⁻¹¹.

Upotreba mikroorganizama za fermentaciju hrane je poznata od najranijeg doba, ali i dan danas mikroorganizmi predstavljaju jedan od efikasnih načina za obradu hrane¹². Enzimi dobijeni od strane mikroorganizama imaju veoma važnu ulogu u industriji kao i u medicini upravo zbog svoje povećane stabilnosti, katalitičke aktivnosti i relativno lake proizvodnje u odnosu na enzime iz biljnog ili životinjskog porekla¹³. Dobijanje enzima iz mikroorganizama pomoću fermentacionih tehnologija predstavlja ekonomski dostupan pristup, a ujedno i zbog lakoće modifikacije i optimizacije proizvodnje enzima¹⁴, pronalazi primenu u različitim granama industrije, kao što su industrija hrane, detergenata, papirne i tekstilne industrije¹⁵.

Razvojem rekombinantne DNK tehnologije i proteinskog inženjeringa omogućena je modifikacija mikroorganizama u cilju povećanja proizvodnje željenih proizvoda¹⁶. Genskom manipulacijom, omogućeno je dobijanje mikroorganizama kao i enzima koji poseduju poboljšane osobine u odnosu na prirodni oblik, čime enzimi poput celobioza – dehidrogenaze, glukoza – oksidaze, peroksidaze, lakaze, dobijaju značajnu ulogu u farmaceutskoj, tekstilnoj i papirnoj industriji kao i u industriji za obradu kože¹⁴.

Phanerochaete chrysosporium, najviše izučavana gljiva bele truleži, predstavlja jedan od najefikasnijih organizama za razgradnja lignoceluloznog materijala. Sposobnost *Phanerochaete chrysosporium* ali i drugih sojeva gljiva bele truleži, da degraduju fenolne i nefenolne strukture lignina, uticala je na razvoj

biotehnoloških pristupa za njihovu primenu u papirnoj industriji i industriji celuloze. Sistemi za razgradnju lignina podrazumevaju nekoliko ekstracelularnih enzima kao što su lignin peroksidaza, mangan peroksidaza, lakaza kao i celobioza – dehidrogenaza¹⁷⁻²².

Celobioza – dehidrogenaza je ekstracelularni enzim koji kao supstrat uglavnom koristi celobiozu i njoj slične šećerne komponente i katalizuje njihovu oksidaciju do odgovarajućih laktona, nakon čega dolazi do sponatane hidrolize i do nastanka aldonske kiseline. Prilikom oksidacije supstrata, celobioza – dehidrogenaza vrši redukciju dvoelektronskih ili jednoelektronskih akceptora elektrona, poput Fe³⁺. Upravo redukcijom Fe³⁺ u prisustvu vodonik peroksida posredstvom Fentonove reakcije, dolazi do formiranja hidroksil radikala, što se smatra jednim od mogućih mehanizama za razgradnju kako celuloze tako i lignina^{20, 22-29}.

Celobioza – dehidrogenaza katalizuje oksidaciju β – 1,4 – vezanih disaharida kao što su celobioza i laktoza prevodeći ih do celobionske i laktobionske kiseline³⁰. Laktobionska kiselina pronalazi veliku primenu u farmaceutskoj i biomedicinskoj industriji za dostavu lekova ali i kao antikoagulans, dok u kozmetičkoj industriji služi kao jedan od agenasa za hidrataciju kože, za uklanjanje bora odnosno kao *anti – aging* agens, ali nalazi primenu i u hemijskoj industriji i industriji hrane³¹.

Proizvodnja laktobionske kiseline upotrebom celobioza – dehidrogenaze i laktoze kao supstrata, je moguća ukoliko se u čitav proces uključi i lakaza koja ima ulogu da katalizuje regeneraciju redoks medijatora kako bi on bio u mogućnosti da kontinualno preuzima elektrone nastale oksidacijom laktoze³².

Oksidoredukциони enzimi u zavisnosti od svoje funkcije mogu da katalizuju oksidaciju ili redukciju nekog određenog supstrata ili grupe strukturno veoma sličnih supstrata, a shodno tome nalaze primenu za dizajniranje biosenzora^{33, 34} ili biogorivnih ćelija³⁵⁻³⁸. Kako bi bili korišćeni kao biosenzori, neophodno je da enzimi

poseduju visoku senzitivnost kao i supstratnu specifičnost ali kao i za biogorivne ćelije, poželjna je povećana stabilnost ali i aktivnost enzima³⁹.

Cilj ovog rada je bio povećanje aktivnosti i posebno stabilnosti celobioza dehidrogenaze u cilju dobijanja biokatalizatora pogodnog za proizvodnju aldobionskih kiselina i primenu u biosenzorima i biogorivnim ćelijama. U tu svrhu su korišene metode proteinskog inženjeringa, visoko – efikasne pretrage biokatalizatora i ekspresije proteina na površini ćelija kvasca i ekstracelularno u sojevima pogodnim za industrijsku proizvodnju enzima.

2. Teorijski deo

2.1. Mikrobiološka razgradnja drveta

Drvo predstavlja jedan od najkorišćenijih prirodnih materijala, međutim kao organski, heterogeni i biodegradibilni materijal, ujedno predstavlja i hranljivi izvor za gljive koje učestvuju u razgradnji drveta. Gljive imaju sposobnost da razgrađuju kompleksne polimere koji učestvuju u izgradnji drveta. Kako bi došlo do rasta i razvoja gljiva na kori drveta neophodna je određen stepen vlažnosti, odgovarajuća temperatura, kao i dovoljan protok kiseonika⁴⁰.

Određene vrste gljiva koje imaju sposobnost da se razvijaju na drvetu, koriste specifičan set enzima koje oslobađaju u okruženje čak i prilikom svog rasta, kako bi došlo do razgradnje ćelijskog zida i oslobađanja prostih šećera, koje gljive potom koriste kao izvor ugljenika. Razgradnja drveta je energetski veoma bogat proces, ali ujedno i veoma kompleksan jer se ćelijski zid drvenastih biljaka sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina koji zajedno formiraju kompaktan i nepropustljiv lignocelulozni matriks⁴¹.

Ćelijski zid drvenastih biljaka predstavlja fizički veoma čvrstu, a hemijski veoma stabilnu barijeru koja ima zaštitnu ulogu. Osnovna komponenta ćelijskog zida je celuloza, koja je izgrađena od linearnih β - 1,4 - glukanskih lanaca koji zajedno sa hemiceluloznim lancima koji su razgranati i znatno amorfni od celuloze i ligninom, formiraju čvrste snopove. Ćelijski zid sadrži i veoma male količine proteina, skroba, pektina kao i voska²⁶.

Razgradnja drveta se u velikoj meri odvija pomoću aerobnih gljiva bele i braon truleži (*Basidiomycetes*) kao i meke truleži (*Ascomycetes*) koje učestvuju u razgradnji celuloze kao i hemiceluloze do rastvornih ugljenih hidrata⁴²⁻⁴⁴ upotrebom nekoliko različitih enzima kao što su celulaza, ksilanaza, mangan - peroksidaza, lakaza, kao i celobiza - dehidrogenaza^{26, 45}.

Glavna osobina gljiva koje učestvuju u razgradnji drveta je njihova sposobnost da pored celuloze i hemiceluloze, degraduju i lignin, razgranati aromatični heteropolimer izgrađen od *p* – kumaril alkohola, koniferil alkohola i sinapil alkohola²⁶, koji zbog svoje strukture ima zaštitnu ulogu. Uočavanjem makroskopskih promena na strukturi drveta, gljive koje učestvuju u razgradnji se dele na gljive bele, braon i meke truleži^{46, 47}.

Gljive bele truleži učestvuju u razgradnji svi komponenti koje učestvuju u izgradnji drveta, zbog čega razgradnjom lignina dolazi do gubitka karakteristične braon boje drveta i dolazi do potpunog raspadanja drveta. Za razliku od gljiva bele truleži, gljive braon truleži imaju osobinu da učestvuju u razgradnji samo celuloze i hemiceluloze, pri čemu lignin ostaje intaktan, a samim tim ne dolazi do promene boje drveta. Gljive meke truleži, takođe degraduju samo celulozu i hemicelulozu ali pretežno rastu na drveću koje se nalazi u veoma vlažnim predelima^{40, 48}.

Do sada su najviše istražene gljive bele truleži, zahvaljujući ogromnom potencijalu enzima sekretovanih od strane ovih gljiva u biotehnološkim procesima posebno u industriji papira kao i u industriji za obradu drveta⁴⁹.

Razgradnja drveta od strane gljiva bele truleži, se lako uočava na kori samog drveta i zavisi kako od vrste drveta, uslova u kojima drvo raste tako i od gljive koja ga nastanjuje. U zavisnosti od stepena razgradnje celuloze, hemiceluloze odnosno lignina, gljive ostavljaju karakterističan trag, što se najbolje uočava tokom razgradnje lignina usled čega dolazi do izbeljivanja kore drveta^{42, 50, 51}.

Način na koji gljive bele truleži vrše razgradnju komponenti drveta se, na osnovu mikroskopskih i hemijskih analiza, klasifikuje na simultani i selektivni put razgradnje. Simultani put razgradnje podrazumeva podjednaki stepen razgradnje celuloze, hemiceluloze kao i lignina, za razliku od selektivnog puta razgradnje gde uglavnom dolazi do razgradnje hemiceluloze i lignina⁵⁰⁻⁵⁴.

Gljive bele truleži *Phanerochaete chrysosporium* pripadaju grupi gljiva koje simultano vrše razgradnju komponenti ćelijskog zida drveta zajedno sa *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Heterobasidion annosum* i *Irpex lacteus*. Dok *C. subvermispora*, *Phellinus pini*, *Phlebia spp.* i *Pleurotus spp.* pripadaju grupi gljiva koja selektivno razgrađuje komponente ćelijskog zida drveta⁵⁵.

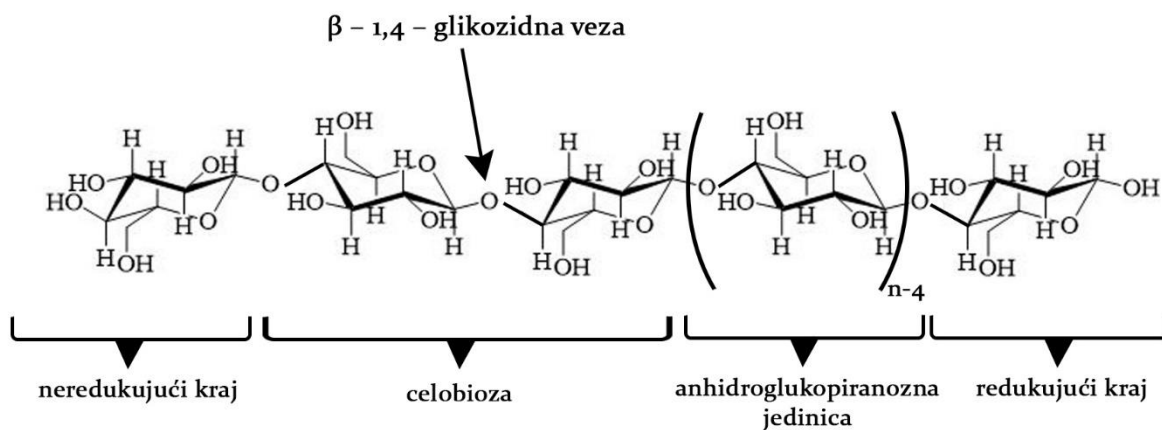
Celobioza – dehidrogenaza je proizvedena i izlučena od strane mnogih gljiva u ekstracelularni prostor, ali najviše je proučena kod gljive bele truleži *Phanerochaete chrysosporium* i predstavlja 0,5 – 2,5% ukupno izlučenih proteina^{22, 56, 57}. Uočeno je da se ekspresija i sekrecija celobioza – dehidrogenaze kod gljiva bele truleži odvija u kasnijim stadijumima, čime se implicira na učešće celobioza – dehidrogenaze u celuloznoj razgradnji nakon završene razgradnje lignina⁵⁸.

2.1.1. Celuloza

Celuloza predstavlja osnovnu šećernu komponentu biljaka, čineći razgradnju celuloze veoma važnim segmentom u ciklusu ugljenika unutar biosfere. Razgradnja celuloze, celulolitičkim enzimima za direktnu primenu u biotehnologiji, privlači sve više pažnje međutim nedovoljno poznavanje samog procesa razgradnje celuloze, smanjuje brzinu napretka i istraživanja celulolitičkih enzima. Upotrebom molekulske genetike, biohemije kao i strukturne biologije dobijeni su podacio o strukturi i funkciji celulolitičkih enzima⁵⁹⁻⁶².

Glukozne jedinice međusobno povezane β – 1,4 vezama, predstavljaju osnovnu gradivnu jedinicu celuloze formirajući proste, linearne lance izgrađene od 100 do 1400 glukoznih jedinica (Slika 1). Polimerni lanci celuloze međusobno formiraju veliki broj intramolekularnih i intermolekularnih vodoničnih veza, usled čega dolazi do formiranja nerastvornih i strukturno rigidnih mikro vlakana. Uočeno je da organizmi koji imaju sposobnost da razgrađuju celulozu, proizvode veliku grupu enzima koji su strukturno i funkcionalno različiti ali sinergističkim delovanjem katalizuju razgradnju celuloze. Upravo rigidna i nerastvorna struktura

celuloze, čini je veoma otpornu na enzimsku hidrolizu zbog čega je veliki broj enzima uključen upravo u razgradnju celuloznih vlakana^{45, 61, 63}.



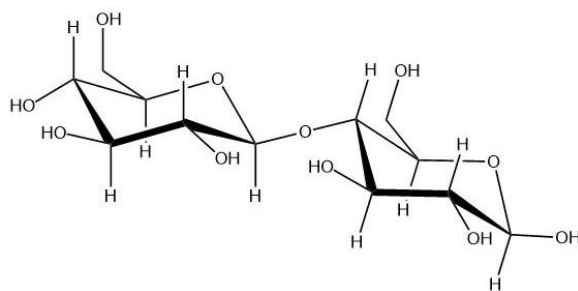
Slika 1: Strukturna građa celuloze¹ sa definisanim glukoznim jedinicama međusobno povezanim β - 1, 4 - glikozidnim vezama; celuloza na jednom kraju ima D - glukozu sa slobodnom OH grupom na C4 atomu, čime se ovaj kraj lanca naziva ne redukujući kraj, dok se drugi kraj lanca naziva redukujući zbog slobodne OH grupe na C1 atomu D - glukoze.

Slojevi celuloznih mikro vlakana, koji su međusobno paralelno postavljeni i suprotno orijentisani u odnosu na prethodni sloj formiraju, zajedno sa matriksom izgrađenim od hemiceluloze i lignina, ćelijski zid biljaka. Zbog svoje rigidne strukture celuloza formira veoma čvrstu gradivnu strukturu biljnih ćelija koja im omogućava da izdrže osmotski pritisak, kao i da budu veoma izdržljive i čvrste usled mehaničkog stresa. Mehaničku izdržljivost i čvrstinu celuloze, najbolje uočavamo kod drvenastih biljaka ali i kod tekstilnih vlakana poput pamuka i lana⁴⁵.

¹ Struktura kreirana u ChemDraw programu.

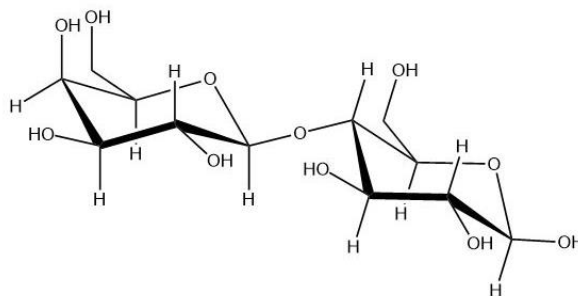
2.1.2. Celobioza i laktoza: supstrati celobioza – dehidrogenaze

Celulazama posredovanom razgradnjom celuloze dolazi do formiranja celobioze, disaharida izgrađenog od dve glukoze međusobno povezanih β – 1, 4 – glikozidnom vezom (Slika 2), koja predstavlja prirodni supstrat celobioza – dehidrogenaze⁶⁴.



Slika 2: Strukturna građa celobioze².

Celobioza – dehidrogenaza pored celobioze može da koristi i laktozu (Slika 3) kao supstrat koja je izgrađena od galaktoze i glukoze međusobno povezane β – 1, 4 – glikozidnim vezama.



Slika 3: Strukturna građa laktoze³.

² Za kreiranje strukture korišćen je ChemDraw program.

³ Za kreiranje strukture korišćen je ChemDraw program.

2.2. Celobioza – dehidrogenaza

2.2.1. Opšte karakteristike celobioza – dehidrogenaze

Celobioza – dehidrogenaza (CDH, EC 1.1.99.18.) je prvi put okarakterisana kao deo enzimske mašinerije produkovane od strane gljive bele truleži *Phanerochaete shrysosporium*⁶⁵. Pokazano je da u prisustvu izolovane celobioza – dehidrogenaze dolazi do oksidacije rastvornih produkata nastalih razgradnjom celuloze tokom raspadanja drveta. Oksidacijom celobioze, može doći do redukcije različitih ligninskih komponenti, te se inicijalno smatralo da je redukcija lignina neophodna kako bi se upotpunio katalitički ciklus^{66, 67}. Kasnije je otkriveno da celobioza – dehidrogenaza ima je katalitička funkciju dehidrogenazna sa oksidaznom aktivnošću usled slabe interakcije sa molekulskim kiseonikom⁵⁶.

Celobioza – dehidrogenaza privlači veliku pažnju istraživača upravo jer poseduje dva domena, mali elektron – transferujući domen koji sadrži citohrom (CYT_{CDH}) i flavodehidrogenazni domen koji poseduje flavin (DH_{CDH}) i katalizuje oksidaciju šećernih komponenti⁶⁵.

Celobioza – dehidrogenaza je izgrađena od 752 amino kiseline koje čine da molekulska masa enzima iznosi 80 kDa, međutim u zavisnosti od organizma iz kog potiče enzim kao i iz kog ekspresionog sistema je izolovan, masa enzima varira u zavisnosti od stepena glikozilacije^{24, 68, 69}. Strukturno celobioza – dehidrogenaza predstavlja monomerni enzim kod kog se uočavaju dva strukturno i funkcionalno različita domena⁵⁶, flavinski domen (DH_{CDH}) koji ima nekovalentno vezan FAD i citohrom domen (CYT_{CDH}) koji sadrži citohrom b tip hema heksakoordinisan unutar domena, koji su međusobno povezani fleksibilnim linkerom dužine 15 amino kiselina. Flavinski domen ima duplo veću molekulsku masu od citohrom domena, ali ono što je karakteristično jeste znatno veći stepen glikozilacije citohrom domena u odnosu na flavinski domen²⁴.

Izoelektrična tačka celobioza – dehidrogenaze iznosi 4,2, dok nezavisni flavinski domen ima izoelektričnu tačku 5,45, dok ona za hem domen iznosi 3,42⁷⁰. Celobioza – dehidrogenaza pokazuje značajnu stabilnost u odnosu na različite pH vrednosti kao i temperaturu^{24, 56, 71}. Inkubiranjem celobioza – dehidrogenaze na sobnoj temperaturi tokom 24 časa u puferima pH vrednosti od 3 do 10, enzim zadržava u potpunosti svoju aktivnost, međutim prilikom inkubacije na pH 2 nakon samo 2 časa dolazi do potpune inaktivacije enzima usled otpuštanja FAD^{56, 71}. Iako je pokazano da celobioza – dehidrogenaza ima aktivnost u širokom opsegu pH vrednosti, uočavaju se male razlike po pitanju stabilnosti u različitim pH vrednostima. Pokazano je da enzim ima najveću stabilnost u opsegu pH od 3 – 5, dok u opsegu od 5 – 8 pokazuje neznatno manju aktivnost, međutim u opsegu pH od 8 – 10 se uočava smanjena stabilnost enzima²⁴. Enzim pokazuje značajnu stabilnost na temperaturama do 60°C u puferu pH 4,5^{56, 71}.

Celobioza – dehidrogenaza poreklom iz *Phanerochaete chrysosporium* pokazuje različite vrednosti K_m za laktozu i za celobiozu, kao dva osnovna supstrata, pa tako K_m vrednost za laktozu iznosi 0,27 mM, dok za celobiozu iznosi 0,016 mM. Vrednosti k_{cat} za celobiozu i laktozu su vrlo slične i za celobiozu iznosi 15,5 s⁻¹, dok je za laktozu 14,3 s⁻¹. Efikasnost celobioza – dehidrogenaze odnosno odnos k_{cat}/K_m za celobiozu iznosi 960 mM⁻¹s⁻¹, dok za laktozu iznosi 46 mM⁻¹s⁻¹⁵⁷.

Bez obzira na uloženi trud i istraživanja, funkcija celobioza – dehidrogenaze ostaje predmet istraživanja već nekoliko decenija. Nekoliko istraživačkih grupa je sugerisalo moguću fiziološku ulogu celobioza – dehidrogenaze koja je podrazumevala redukciju aromatičnih radikala nastalih reakcijom lakaze odnosno peroksidaza kako bi se sprečila ponovna polimerizacija degradovanih polimerima dejstvom ovih enzima⁷². Smatra se da celobioza – dehidrogenaza sprečava inhibiciju celulaza u prisustvu visokih koncentracija celobioze katalizujući njenu oksidaciju do celobionske kiseline^{66, 73}. Na ovaj način generisana celobionska kiselina potom efikasno helira mangan, čime se potpomaže i aktivnost mangan peroksidaza⁷⁴.

Iako je do sada postavljeno mnoštvo hipoteza o funkciji celobioza – dehidrogenaze, ni jedna nije obezbedila objašnjenje o funkciji citohrom domena ali jedna od najrasprostranjenijih hipoteza jeste da celobioza – dehidrogenaza ima ulogu u Fentonovoj reakciji kako bi došlo do generisanja veoma reaktivnih hidroksil radikala usled redukcije Fe^{3+} ^{29, 75, 76}. Poznato je da hidroksil radikali učestvuju u razgradnji celuloze i pojedinih komponenti lignina⁷⁷ i da shodno tome predstavljaju osnovni mehanizam razgradnje lignoceluloznog materijala⁷⁸.

Novija istraživanja ukazuju na ulogu celobioza – dehidrogenaze kao katalitičkog aktivatora litički polisaharidnih monooksigenaza (LPMO) ukazujući da je učestvovanje celobioza – dehidrogenaze u Fentonovoj reakciji kinetički nepovoljno usled veoma brze reakcije celobioza – dehidrogenaze i LPMO⁷⁹. LPMO katalizuju isecanje celuloze formirajući slobodne krajeve koji potom postaju meta delovanja celulaza⁶⁵, čineći ih u kombinaciji sa celobioza – dehidrogenazom veoma efikasnom enzimskom mašinerijom za razgradnju celuloze u odsustvu jona gvožđa^{80, 81}.

2.2.2. Strukturne karakteristike celobioza – dehidrogenaze

Genom *Phanerochaete chrysosporium* sadrži čak dva gena koja kodiraju za celobioza – dehidrogenazu⁸², što ukazuje da je ekspresija celobioza – dehidrogenaze pod kontrolom dva različita promotora, jedan koji indukuje ekspresiju celobioza – dehidrogenaze prilikom rasta *Phanerochaete chrysosporium* na celulozi, dok uslovi pri kojima dolazi do aktivacije drugog promotora, a samim tim i do ekspresije enzima još uvek nije poznat²⁴.

Poređenjem genske sekvence celobioza – dehidrogenaze sa proteinima koji poseduju flavin i hem, uočeno je nekoliko sličnosti između flavinskog domena celobioza – dehidrogenaze i GMC (glukoza – metanol – holin) oksidoreduktazne porodice proteina u koje spada i glukoza – oksidaza iz *Aspergillus niger* kao i metanol oksidaza iz *Hansenula polymorpha*⁶⁸. Ovi proteini imaju 50 % homologu sekvencu sa flavinskim domenom celobioza – dehidrogenaze i pokazuju slične

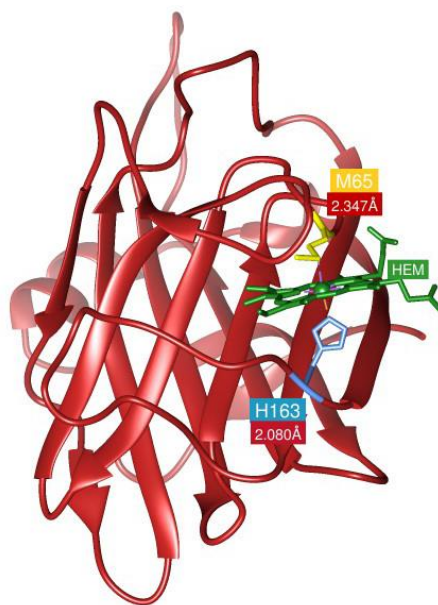
oksidazne osobine. Citohrom domen pokazuje veoma malu homologiju u sekvenci u poređenju sa drugim poznatim proteinima koji poseduju hem kao prostetičnu grupu²⁴.

Bez obzira na to iz kog organizma potiče, celobioza – dehidrogenaza na C – terminusu ima katalitički aktivan flavinski domen, na koji se nastavlja citohrom domen, pri čemu su oba domena kodirana jednim polipeptidnim lancem⁸³. Domeni su međusobno povezani linearnim papain – osetljivim peptidnim linkerom koji se uglavnom sastoji od 15 – 33 amino kiselinska ostatka, čime je omogućena velika fleksibilnost domena jednog u odnosu na drugi. Pretpostavlja se da toliki stepen mobilnosti domena međusobno, predstavlja ključnu osobinu za celobioza – dehidrogenaznu funkciju, međutim upravo zbog prevelike mobilnosti dva domena, nije moguće dobiti kristalografsku sliku nativnog proteina⁸⁴. Kristalne strukture pojedinačnih domena celobioza – dehidrogenaze su objavljene, hem domen CYT_{CDH} ⁸⁵ i flavinski domen DH_{CDH} ⁸⁶.

Kristalna struktura intaktnog enzima nije dobijena jer linker koji povezuje dva domena onemogućava dobijanje kristalne strukture, zbog čega su urađene kristalne strukture domena zasebno^{85, 86}.

2.2.2.1. Citohrom domen celobioza – dehidrogenaze (CYT_{CDH})

Citohrom domen je izgrađen od 190 amino kiselina koje formiraju β – burence, koje poseduje hidrofobni hem b – vezujući džep koji se nalazi na površini domena (Slika 4). Gvožđe unutar hema je heksakoordinisano sa metioninom na poziciji 65, koji je ujedno i jedini metionin prisutan u CYT_{CDH} ^{87, 88} i histidinom na poziciji 163⁶⁴ postavljenim aksijalno jedan u odnosu na drugi⁸⁷ čineći jedinstvenu koordinaciju hema⁶⁴.



Slika 4: Prikaz strukture citohrom domena celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium*⁴.

Pokazano je da zamenom bilo koje od ove dve amino kiseline alaninom, unutar celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium*, dolazi do slabijeg vezivanja hema, a samim tim i do destabilizacije citohrom domena. Destabilizacijom citohrom domena on postaje podložan razgradnji posredstvom proteolitičkih enzima prisutnih u kultivacionom medijumu⁸⁹. Pored celobioza – dehidrogenaze, svega nekoliko enzima koji sadrže hem kao prostetičnu grupu poseduju Met/His interakciju sa gvožđem iz hema⁹⁰.

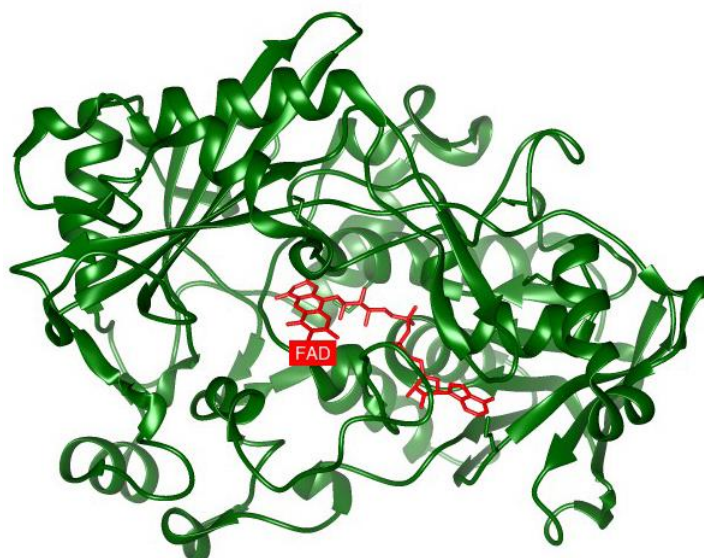
2.2.2.2. Flavinski domen celobioza – dehidrogenaze (DH_{CDH})

U izgradnji flavinskog domena učestvuje oko 550 amino kiselina⁶⁹. Flavinski domen po strukturi pripada GMC oksidoreduktaznoj porodici proteina, zajedno sa ostalim proteinima koji kao prostetičnu grupu sadrže flavin, kao što je glukoza –

⁴ Struktura citohrom domena je konstruisana upotrebom PDB fajla 1D7C. Za kreiranje strukture korišćen je UCSF Chimera program.

oksidaza iz *Aspergillus niger*^{69, 91}. Homologija unutar GMC familije proteina se odnosi na segment koji odgovara flavin – vezujućem domenu glukoza – oksidaze⁶⁹.

Unutar flavinskog domena celobioza – dehidrogenaze očavaju se dva strukturno različita pod – domena, flavin – vezujući domen (F – domen) i supstrat – vezujući domen (S – domen). Karakteristike F – domena su tipične za sve flavin vezujuće proteine, pa se tako uočava vezujući $\beta\alpha\beta$ motiv, a FAD je nekovalentno vezan za protein i nalazi se u unutrašnjosti enzima (Slika 5)⁶⁵.



Slika 5: Prikaz strukture flavinskog domena celobioza - dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium*⁵.

Iako enzimi koji pripadaju GMC familiji katalizuju oksidaciju različitih supstrata, analizom njihovih sekvenci primećena je sličnost u supstrat – vezujućem domenu, dok tercijerne strukture flavinskog domena celobioza – dehidrogenaze⁸⁶, glukoza – oksidaze^{92, 93} i holesterol oksidaze^{94, 95} pokazuju veoma konzervirano katalitičko mesto u kojem se nalaze dve amino kiseline od kojih obe mogu biti histidin ili histidin i asparagin. Unutar flavinskog domena celobioza –

⁵ Struktura citohrom domena je konstruisana upotrebom PDB fajla 1KDG. Za kreiranje strukture korišćen je UCSF Chimera program.

dehidrogenaze, His689 i Asn732 se nalaze u blizini flavinskog prstena, čime se ukazuje da očuvanjem ovih amino kiselina kod GMC proteina postoji sličnost u mehanizmu aktivacije oksidacije supstrata⁵⁷.

2.2.3. Katalitički mehanizam celobioza – dehidrogenaze

Nekoliko vrsti gljiva proizvode celobioza – dehidrogenazu, međutim u zavisnosti od organizma koji proizvode enzim zavise i same karakteristike enzima. Okarakterisani enzimi izolovani iz različitih organizama, pokazivali su različite strukturne i katalitičke osobine što je dovelo do podele enzima na dve klase^{22, 96}, klasu I *Basidiomycete* i klasu II *Ascomycete*. Celobioza – dehidrogenaza koja pripada *Basidiomycete* klasi, pokazuje veliku diskriminaciju prema glukozi kao supstratu i unutrašnji transfer elektrona (IET) sa flavinskog domena na citohrom domen se odvija jedino pri kiselim uslovima na pH vrednostima nižim od 5,5, pri čemu je optimalna pH vrednost između 3,5 do 4,0⁹⁷.

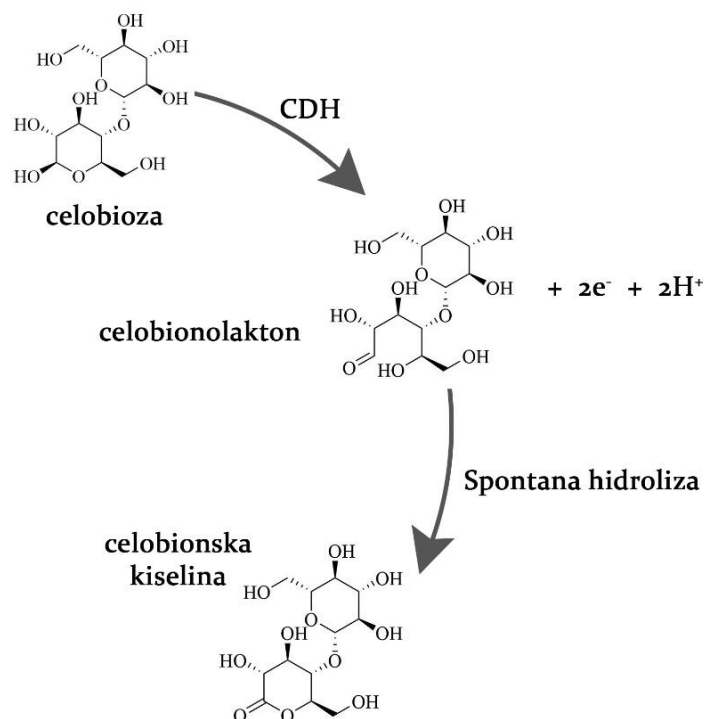
Za razliku od *Basidiomycete*, celobioza – dehidrogenaza poreklom iz klase *Ascomycete* pokazuje širi spektar supstrata koje može da oksiduje, veoma malu diskriminaciju glukoze kao supstrata, a u zavisnosti iz kog organizma potiče, do unutrašnjeg transfera elektrona dolazi pri neutralnim ili alkalnim pH uslovima, što može biti objašnjeno adaptacijom gljiva na prirodno stanište gde se nalaze i na mehanizam razgradnje polimera²².

Upotrebom kompetitivnog inhibitora, celobionolaktama (CBLM) i njegovom kristalizacijom sa celobioza – dehidrogenazom, dobijeni su podaci o strukturi aktivnog mesta kao i o amino kiselinama odgovornim za vezivanje supstrata ali i o amino kiselinama koje učestvuju u katalitičkom mehanizmu^{79, 98}.

Pokazano je da se unutar aktivnog mesta uočavaju dva segmenta, katalitički segment C i supstrat – vezujući segment B. Vezivanjem celobionolaktama unutar aktivnog mesta, C1 ugljenik koji odgovara redukujućem kraju celobioze, je bio pozicioniran u blizini N5 atoma flavinskog prstena, čime je omogućena oksidacija supstrata posredstvom histidina koji se nalazi u katalitičkom mestu i ujedno je

jedina bazna amino kiselina koja se nalazi u blizini C1 atoma. Na osnovu vezivanja i orijentacije inhibitora unutar aktivnog mesta, pretpostavlja se da histidin preuzima proton sa C1 hidroksilne grupe i prebacuje ga na N5 atom na FAD, nakon čega dobijamo redukovani FAD i oksidovani supstrat. Mutacijom na poziciji His689, dobijen je kinetički oslabljen enzim, što ukazuje da histidin ima veoma važnu ulogu u katalitičkom mehanizmu celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium*⁵⁷.

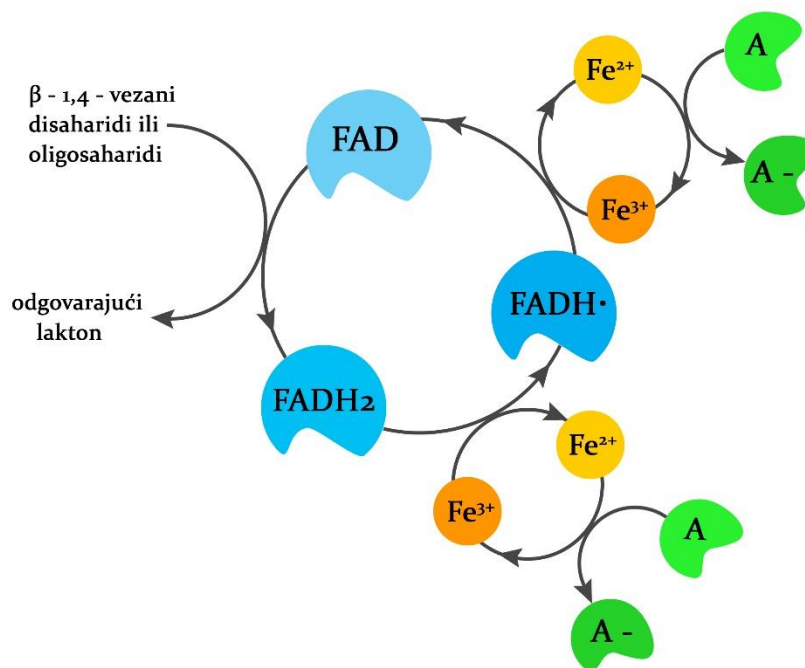
Katalitički mehanizam celobioza – dehidrogenaze se može podeliti na oksidativnu i reduktivnu polu – reakciju koje mogu da se analiziraju i izučavaju pojedinačno. Tokom oksidativne polu – reakcije dolazi do oksidacije supstrata na C1 poziciji pri čemu dolazi do prevođenja supstrata do odgovarajućeg laktona, koji potom podleže spontanoj hidrolizi do karboksilne kiseline (Slika 6). Prilikom oksidacije dolazi do redukcije FAD do FADH₂, nakon čega se elektroni transferuju na jedan dvoelektronski akceptor ili na dva jednoelektronska akceptora elektrona^{99, 100}.



Slika 6: Šematski prikaz oksidativne polu – reakcije prilikom koje dolazi do oksidacije supstrata do odgovarajućeg laktona, a potom i do njegove hidrolize do aldonske kiseline⁶.

Oksidacija supstrata se odvija posredstvom FAD grupe, koja se konvertuje u FADH₂⁷⁰, nakon čega se elektroni dalje transferuju na hem⁹⁹⁻¹⁰². Mišljenja su prilično podeljena po pitanju transfera elektrona sa FADH₂ grupe, zbog čega su pretpostavljena dva modela transfera elektrona. Po modelu „lanac elektrona“ (*eng.* Electron chain model) (Slika 7) elektroni su sa flavinskog domena transferovani na hem, a odatle na neki spoljašnji akceptor elektrona¹⁰².

⁶ Za kreiranje struktura korišćen je ChemDraw program.



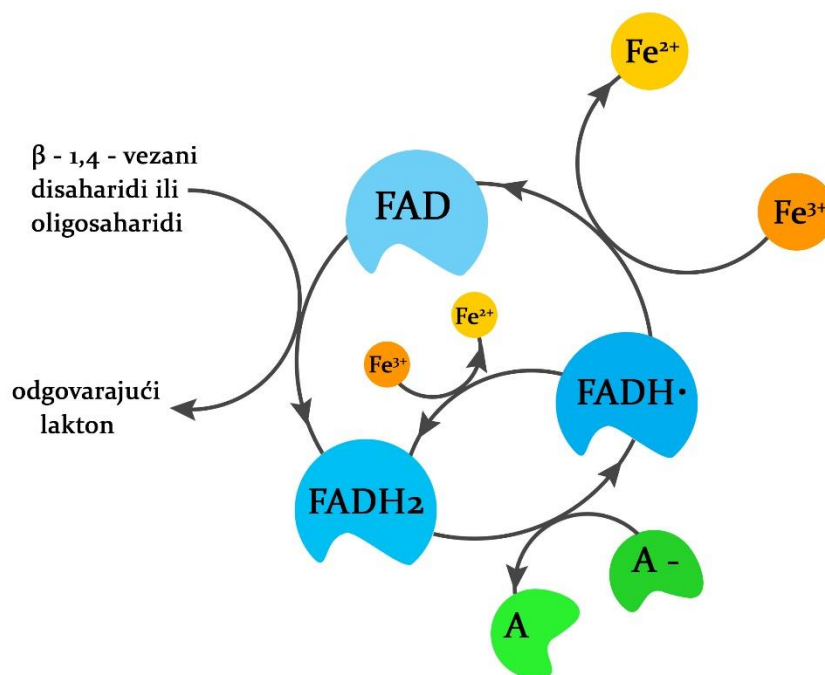
Slika 7: Šematski prikaz transfera elektrona po modelu „lanac elektrona“. Flavinski domen je obeležen u skladu sa oksidacionim stanjem flavina; citohrom domen je prikazan u skladu sa oksidacionim stanjem gvožđa iz hema; spoljašnji akceptor elektrona je prikazan i obeležen kao A.

Međutim, ovo je u suprotnosti sa činjenicom da flavinski domen celobioza – dehidrogenaze u odsustvu hem domena ima sposobnost da redukuje sve poznate akceptore elektrona^{70, 99}. Do redukcije jednoelektronskih akceptora elektrona, poput fericijanida, fenoksi radikala i citohroma c, se odvija sporije u prisustvu samo flavinskog domena u odnosu na intaktni enzim, dok je redukcija dvoelektronskih akceptora elektrona, kao što su hinoni i trijodid jon, ne izmenjena u odsustvu hem domena u odnosu na intaktni enzim^{70, 103}.

Ovo ukazuje da se transfer elektrona na neki od spoljašnjih akceptora elektrona može odvijati direktno sa FAD grupe bez posredstva hem domena. Ukoliko dolazi do redukcije jednoelektronskog akceptora elektrona, posredstvom FADH• sporije u odnosu na FADH₂¹⁰⁴, pretpostavlja se da uloga hema može da bude da služi kao prenosnik elektrona, čime se podstiče brzina reakcije za

jednoelektronske akceptore elektrona (model „prenošenja elektrona“, *eng.* electron sink) (Slika 8)⁹⁹.

Za razliku od modela „prenošenje elektrona“ kod kog u zavisnosti od akceptora elektrona može da dođe do direktnog transfera elektrona sa flavinskog domena na akceptor elektrona, a može da dođe i do transfera elektrona sa flavinskog domena na hem, a potom na akceptor elektrona, model „lanac elektrona“⁹⁹ podrazumeva direktni transfer elektrona sa FADH₂ na hem koji potom elektrone prebacuje na jednoelektronske akceptore elektrona. Pretpostavlja se da do redukcije dvoelektronskih akceptora elektrona dolazi posredstvom samo flavinskog domena bez učestvovanja citohrom domena⁹⁹.



Slika 8: Šematski prikaz transfera elektrona po modelu „prenošenje elektrona“. Flavinski domen je obeležen u skladu sa oksidacionim stanjem flavina; citohrom domen je prikazan u skladu sa oksidacionim stanjem gvožđa iz hema; spoljašnji akceptor elektrona je prikazan i obeležen kao A.

Kod modela „prenošenje elektrona“, dolazi do transfera elektrona sa potpuno redukovanoj flavina na elektron akceptor i ovaj model se zasniva na pretpostavci da

generisani FADH \cdot reaguje znatno sporije sa akceptorom elektrona za razliku od potpuno redukovanog flavina. Teorija o posredovanom transferu elektrona kod modela „prenošenje elektrona“ je potpomognuta činjenicom da svi poznati elektron akceptori, uključujući i citohrom c, mogu biti redukovani u prisustvu samo flavinskog domena celobioza – dehidrogenaze⁹⁹.

Celobioza – dehidrogenaza, kao ekstracelularni protein koji sadrži i flavinski i hem domen, predstavlja jedinstveni elektron transferni protein, međutim uloga citohrom domena u kompleksom katalitičkom mehanizmu enzima i dalje ostaje neobjašnjena u potpunosti. Uklanjanjem citohrom domena, upotrebom papaina za digestiju linkera koji spaja dva domena, dolazi do dobijanja potpuno aktivnog flavinskog domena koji je ujedno i katalitički aktivan odnosno katalizuje oksidaciju supstrata⁷⁰.

Tokom godina istraživanja, pokazano je da citohrom domen igra značajnu ulogu u interakciji sa spoljašnjim akceptorima elektrona, odnosno da oksidacijom supstrata odmah dolazi do redukcije FAD kofaktora, nakon čega sledi veoma spor transfer elektrona sa flavinskog domena na hem unutar citohrom domena^{105, 106}.

Nekoliko istraživačkih grupa je ukazalo na činjenicu da dolazi do naglog pada brzine transfera elektrona sa flavinskog domena na hem domen pri pH vrednostima većim od 5,0 odnosno da dolazi do potpune inhibicije pri vrednostima pH iznad 6,0^{97, 107}. Iako pri baznijim pH vrednostima dolazi do inhibicije unutrašnjeg transfera elektrona, katalitička sposobnost flavinskog domena ostaje intaktna. Moguće objašnjenje za pH zavisni unutrašnji transfer elektrona, leži u činjenici da elektrostatičko odbijanje između flavinskog i hem domena pri baznijim pH vrednostima može da dovede do inhibicije transfera elektrona između domena¹⁰⁸.

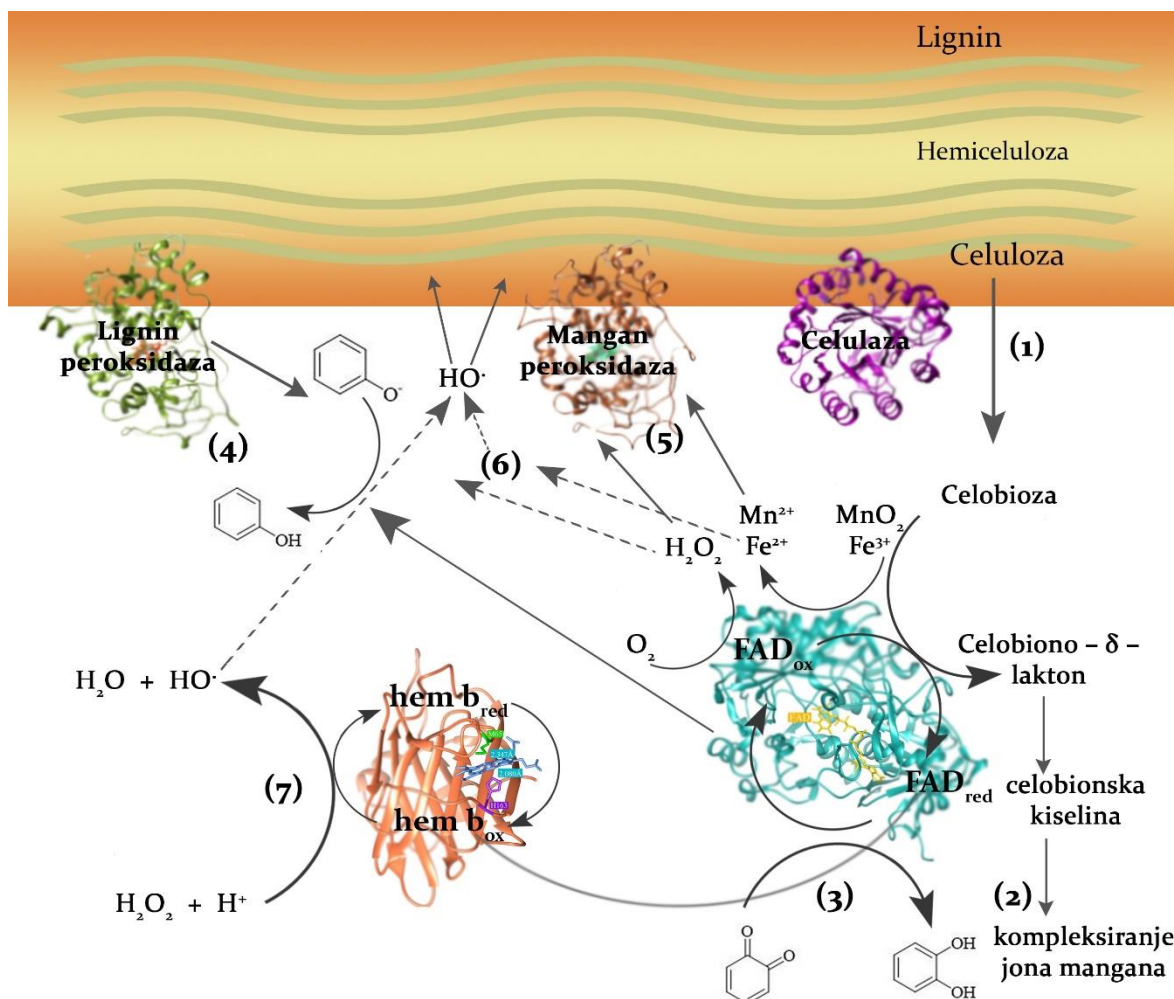
Eksperimentalno dobijeni podaci za izoelektrične tačke pojedinačnih domena celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium*, koje iznose 5,45 za flavinski domen i 3,42 za citohrom domen⁷⁰, pokazuju da su na pH vrednostima iznad 6 pojedinačni domeni negativno naelektrisani usled čega dolazi do njihovog

odbijanja čime je sprečeno blisko postavljanje domena, a samim tim i efikasni unutrašnji transfer elektrona⁶⁵.

2.2.4. Biološka funkcija celobioza – dehidrogenaze

Iako je postavljeno mnoštvo hipoteza o biološkoj funkciji celobioza – dehidrogenaze, ona još uvek nije do kraja istražena i definisana, međutim poznato je da proizvodnja celobioza – dehidrogenaze od strane *Phanerochaete chrysosporium* predstavlja oko 0,5% ukupne mase sekretovanih proteina, čime se ukazuje na značaj i važnu ulogu ovog enzima. Iako su rađena mnoga istraživanja po pitanju biološke funkcije celobioza – dehidrogenaze, njenu funkciju je moguće u potpunosti definisati shvatanjem i istraživanjem osnovnih osobina enzima kao što je prisustvo celuza – vezujućeg mesta, prisustvo hem grupe, kao i diskriminacija glukoze kao elektron donora²⁶.

Prisustvo različitih supstrata za celobioza – dehidrogenazu koji se nalaze u lignoceluloznom matriksu, ukazuje na moguću funkcionalnu raznolikost enzima. Na slici 9 prikazano je nekoliko osnovnih bioloških procesa u kojima se pretpostavlja da učestvuje celobioza – dehidrogenaza.



Slika 9: Šematski prikaz bioloških funkcija celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochate chrysosporium*: (1) smanjenje supstratne inhibicije celulaza, konverzijom celobioze nastale celulaznom razgradnjom celuloze, do celobiono – δ – laktone⁶⁶; (2) hidrolizom celobiono – δ – laktone nastaje celobionska kiselina koja učestvuje u snižavanju pH vrednosti i ima sposobnost da helira metalne jone prisutne u drvetu; (3) celobioza – dehidrogenaza redukuje toksične hinone do difenola¹⁰⁹; (4) redukcijom fenoksi radikala nastalih dejstvom lignin peroksidaze i lakaze, posredstvom celobioza – dehidrogenaze sprečava se ponovna polimerizacija prekinutih celuloznih lanaca⁷²; (5) celobioza – dehidrogenaza katalizuje oksidaciju celobioze i dolazi do formiranja celobionske kiseline koja potom helira Mn (III) jone, a ujedno dolazi i do proizvodnje vodonik peroksida i do redukcije MnO₂ kao i toksičnih hinona nastalih dejstvom mangan peroksidaze⁷⁴; (6) celobioza – dehidrogenaza prilikom oksidacije supstrata, u prisustvu Fe³⁺ jona i molekularnog kiseonika, katalizuje

proizvodnju Fe^{2+} jona i vodonik peroksida posredstvom Fentonove reakcije usled čega dolazi do nastanka hidroksil radikala $\text{OH}\cdot^{28}$, (5) koji potom ima sposobnost da direktno učestvuje u razgradnji lignoceluloznog matriksa¹¹⁰ ili (7) da učestvuje u proizvodnji reaktivnih kiseoničnih vrsta posredstvom citohrom fomena^{64, 111, 112}.

Oksidacijom celobioze nastale celulaznom razgradnjom celuloze, dejstvom celobioza – dehidrogenaze, sprečava se inhibicija celulaza⁶⁶ međutim to je energetski veoma nepovoljan proces, pri čemu β – glukozidaza može na znatno lakši način da hidrolizuje celobiozu do glukoze. Takođe nije u potpunosti razjašnjeno da li je u *in vivo* uslovima koncentracija celobioze može da bude toliko velika da može da dovede do značajne inhibicije celulaza proizvodom²⁶.

Celobioza – dehidrogenaza sprečava ponovno formiranje glikozidnih veza unutar lanaca celuloze, hidrolizovanih dejstvom endoglukanaza, čime se povećava efikasnost razgradnje celuloze⁶⁶.

Celobioza – dehidrogenaza redukuje aromatične radikale nastale razgradnjom lignina dejstvom lignolitičkih enzima^{72, 113}. Pretpostavlja se da lignolitički enzimi lignin peroksidaza i lakaza oksiduju redoks medijatore, različite aromatične monomere, do reaktivnih radikalski vrsta koje potom imaju sposobnost da oksiduju lignin. Međutim, u *in vitro* uslovima, radikali koji nastaju dejstvom enzima često predovode do polimerizacije lignina nego do njegove razgradnje. Celobioza – dehidrogenaza može da inhibira polimerizaciju redukujući radikale nastale dejstvom lignolitičkih enzima²⁶.

Celobioza – dehidrogenaza redukuje toksične hinone do fenolnih jedinjenja koji potom mogu da se koriste kao redoks medijatori za lignolitičke enzime^{26, 100, 109}, međutim mnoštvo oksidoreduktaza poseduje ovu osobinu, stoga nije čudno što se ona uočava i kod celobioza – dehidrogenaze²⁶.

Celobioza – dehidrogenaza potpomaže aktivnost mangan peroksidaze (MnP)⁷⁴, koja učestvuje u razgradnji lignina oksidujući Mn(II) do reaktivnog Mn(III) koji potom učestvuje u jednoelektronskoj oksidaciji lignina. Pretpostavlja se da

celobioza – dehidrogenaza može da učestvuje u razgradnji redukujući mangan dioksid čime on postaje rastvoran, produkujući celobionsku kiselinu koja ima sposobnost da kompleksira reaktivne vrste poput Mn(III), ali i redukujući hinone²⁶.

Prilikom oksidativne razgradnje supstrata dejstvom celobioza – dehidrogenaze dolazi do formiranja vodonik peroksida i superoksid anjona posredstvom Fentonove reakcije¹¹⁴, iako enzim nije dizajniran za proizvodnju vodonik peroksida. Nastanak radikala može dovesti do uklanjanja drugih mikroorganizama, ali će dovesti i do narušavanja same gljive²⁶.

Celobioza – dehidrogenaza posredstvom hidroksil radikala nastalih Fentonovom reakcijom katalizuje razgradnju i modifikuje celuloze, hemiceluloze i lignina^{28, 77, 110}. Oksidacijom celobioze može doći do redukcije Fe(III) do Fe(II), ili Cu(II) do Cu(I) gde u prisustvu vodonik peroksida dolazi do formiranja hidroksil radikala. U prisustvu reaktivnih radikalskih vrsta može da dodje do iniciranja modifikacije i depolimerizacije celuloze, hemiceluloze i lignina²⁶.

Depolimerizacija u prisustvu celobioza – dehidrogenaze, celobioze, Fe(III) i vodonik peroksida je prvo pokazana na karboksimetil celulozi, ksilanu rastvornom u vodi i radioaktivno obeleženom sintetičkom ligninu⁷⁷. Uočeno je da dolazi do depolimerizacije čak i bez dodatog vodonik peroksida usled proizvodnje vodonik peroksida od strane same celobioza – dehidrogenaze²⁶, međutim u odsustvu bilo koje druge komponente ili u prisustvu DMSO kao neutralizatora radikala, ne dolazi do depolimerizacije⁷⁷.

Iako postoje mnoge predložene funkcije celobioza – dehidrogenaze, mora se uzeti u obzir da iako gljiva proizvodi celobioza – dehidrogenazu ona ne mora nužno da produkuje i neki od ostalih lignocelulolitičkih enzima, usled čega se onda i funkcija celobioza – dehidrogenaze može menjati od vrste do vrste gljiva koja sekretuje enzim⁶⁴.

2.2.5. Primena celobioza – dehidrogenaze

Raznolika biološka funkcija celobioza – dehidrogenaze kao i osobine mehanizma dejstva enzima pronalaze veliku primenu. Poznato je da je sve rasprostranjenija intolerancija na laktozu, zbog čega biosenzori bazirani na celobioza – dehidrogenazi mogu da se koriste upravo za detekciju laktoze u hrani kao i u kontroli nivoa laktoze prilikom proizvodnje sira²⁶.

Celobioza – dehidrogenaza može da se koristi za izbeljivanje pulpe u prisustvu gvožđa jer tada pokazuje mehanizam dejstva veoma sličan lignolitičkim enzimima poput lakaze i mangan peroksidaze⁷⁷. Hidroksi radikal koji nastaje oksidacijom supstrata posredstvom Fentonove reakcije je ujedno i nespecifičan i može da dovede do depolimerizacije celuloze i hemiceluloze dovodeći do narušavanja vlakana^{77, 110} što celobioza – dehidrogenazu čini neodgovarajućom za izbeljivanje pamuka. Međutim celobioza – dehidrogenaza može da učestvuje u reduktivnom izbeljivanju, redukujući hinone i slična jedinjenja koja su prisutna u pulpi^{109, 115}, iako je redukciju hinona i njemu sličnih molekula znatno jednostavnije inicirati dodatkom vodonik peroksida zbog čega upotreba celobioza – dehidrogenaze predstavlja ekonomski nepovoljan sistem za izbeljivanje²⁶.

Redoks enzimi katalizuju oksidaciju ili redukciju specifičnih supstrata ili grupe supstrata koji poseduju slične strukturne osobine, a u zavisnosti od bioloških funkcija, oni mogu da se primenjuju u proizvodnji biosenzora^{33, 34, 39} odnosno u proizvodnji biogorivnih ćelija^{36-38, 116}. Za proizvodnju biosenzora, neophodno je da enzimi imaju veoma veliku osetljivost ali i supstratnu specifičnost, dok biogorivne ćelije podrazumevaju upotrebu modifikovanih elektroda koji rade u uslovima veoma velike struje, dok je istovremeno neophodno je postići i dugoročnu stabilnost. Biosenzori su uglavnom dizajnirani tako da obezbeđuju veoma brz odgovor, pri čemu bi trebalo da budu jeftini kao i da imaju jednokratnu upotrebu. Bilo da enzim želimo da iskoristimo za konstruisanje biosenzora ili biogorivnih ćelija,

elektrohemijske osobine samog redoks enzima moraju biti zadovoljene, što se može postići upotrebom redoks medijatora^{117, 118}.

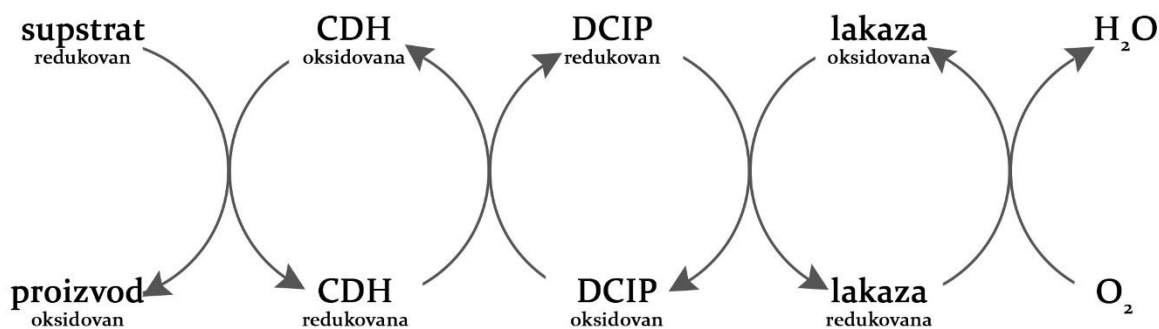
Povezivanjem enzima na osmijumske redoks polimere, dolazi do transfera elektrona (ET) posredovanog fleksibilnim $Os^{2+}/3+$ redoks centrima koji imaju sposobnost da transportuju elektrone sa elektrohemijski aktivnog dela enzima na elektrodu^{37, 119}, ovo se naziva posredovani transfer elektrona (MET). Pojedini enzimi imaju sposobnost da direktno prebacuju elektrone na elektrodu prilikom oksidacije supstrata (DET). Konstruisanje i struktura same elektrode je značajno pojednostavljena, ukoliko se ne koriste redoks medijatori, kako u biogorivnim ćelijama tako i u biosenzorima, čime je ujedno i smanjen broj komponenti koje moraju biti optimizovane. Upotrebom manjeg broja komponenti prilikom konstruisanja biogorivnih ćelija smanjuje se i maksimalna ćelijska voltaža³⁷.

Celobioza – dehidrogenaza je jedan od redoks enzima koji pronalaze primenu u razvoju amperometrijskih biosenzora baziranih na direktnom elektron transferu^{108, 120-122}.

2.2.5.1. Laktobionska kiselina

Laktobionska kiselina nalazi veliku primenu u industriji hrane, kozmetičkoj, farmaceutskoj i hemijskoj industriji ali i u medicini. Novija istraživanja su ukazala na potencijalnu upotrebu laktobionske kiseline kao bioaktivne komponente za sintezu novih i potencijalno biokompatibilnih i biodegradibilnih nosača za transfer lekova³¹.

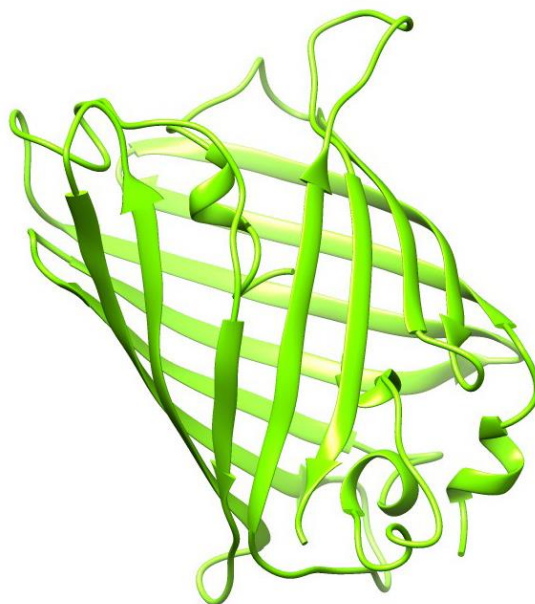
Jedan od mehanizama za dobijanje laktobionske kiseline je upotrebom enzima, celobioza – dehidrogenaza koja katalizuje oksidaciju laktoze do laktobionolaktona koji potom spontano hidrolizuje do laktobionske kiseline i lakaze koja ima ulogu da oksiduje redoks medijator (Slika 10)²⁶.



Slika 10: Šematski prikaz enzimske proizvodnje laktobionske kiseline upotrebom celobioza - dehidrogenaze i lakaze.

2.3. Zeleni fluorescentni protein

Zeleni fluorescentni protein (GFP), poreklom iz *Aequera victoria*, molekulske mase 27 kDa, se sastoji od 238 amino kiselina koje formiraju cilindričnu strukturu, izgrađenu od 11 β - pločica, unutar koje se nalazi α heliks čije amino kiseline Ser65 - Tyr66 - Gly67 predstavljaju sastavni deo hromofore (Slika 11)¹²³. Prilikom sinteze i uvijanja proteina, dolazi i do simultanog formiranja hromofore i orijentacije neophodnih amino kiselina u odgovarajući položaj čime se dodatno inicira sinteza hromofore. Formiranjem hromofore unutar rigidne strukture β - burenceta, obezbeđuje se odgovarajuća sredina neophodna za funkcionisanje hromofore pri čemu se ograničava fleksibilnost hromofore, ali ujedno ne dolazi do njenog narušavanja usled promena u okruženju samog proteina¹²⁴⁻¹²⁶.



Slika 11: Prikaz strukture zelenog fluorescentnog proteina iz *Aequera victoria*⁷.

Iako hromofora predstavlja sastavni deo samog zelenog fluorescentnog proteina, uvijanje proteina i formiranje hromofore predstavljaju dva potpuno nezavisna procesa¹²⁷. Amino kiselinški ostaci koji direktno učestvuju u formiranju hromofore, utiču i na determinisanju fotohemijskih osobina pojedinačnih varijanti zelenog fluorescentnog proteina^{128, 129}. Zamenom amino kiselina koje su sastavni deo hromofore dolazi do promena i u spektralnim osobinama samog proteina, ukazujući na sponu između strukture i optičkih osobina fluorescentnih proteina. Modifikacijama na amino kiselinskom sastavu zelenog fluorescentnog proteina, došlo je do formiranja velikog broja različitih fluorescentnih proteina čime je paleta boja fluorescentnih proteina, koji nalaze primenu za detekciju različitih ćelijskih mehanizama znatno unapređena^{124, 130-133}.

Različite varijante fluorescentnih proteina poseduju i različit amino kiselinski sastav, međutim Gly 67, koji učestvuje u formiranju hromofore je jedina konzervirana

⁷ Struktura zelenog fluorescentnog proteina je konstruisana upotrebom PDB fajla 1EMA. Za kreiranje strukture korišćen je UCSF Chimera program.

amino kiselina koja se javlja u svim varijantama proteina. Zajedno sa Gly67, Tyr66 se takođe nalazi na svim prirodno sintetisanim GFP – sličnim proteinima, međutim upotrebom proteinskog inženjeringa moguće je zameniti ga nekom drugom aromatičnom amino kiselinom usled čega dolazi do formiranja strukturno i hemijski različitih hromofora koje emituju svetlost plave boje¹³⁴⁻¹³⁶.

Denaturacijom zelenog fluorescentnog proteina dolazi do gubitka fluorescencije usled narušavanja strukture samog proteina pa samim tim i hromofore, međutim renaturacijom proteina dolazi i do formiranja funkcionalnog proteina sa ne izmenjenom fluorescencijom¹³⁷.

Zeleni fluorescentni protein ima sposobnost da absorbuje svetlost na dve različite talasne dužine u zavisnosti od toga da li se hromofora nalazi u protonovanom (neutralnom) obliku ili u deprotonovanom (anjonskom) obliku. Ukoliko je hromofora u neutralnom obliku dolazi do absorpcije svetlosti na 395 nm, dok ukoliko je hromofora u anjonskom obliku absorbuje se svetlost na 475 nm¹³⁸.

Zeleni fluorescentni protein zbog svoje sposobnosti da formira fluorescentno aktivnu hromoforu u odsustvu kofaktora, nalazi veliku primenu u *in situ* eksperimentima kao biohemijski marker¹³⁹. Zeleni fluorescentni protein služi kao reporter protein prilikom genske distribucije, za proučavanje unutarćelijskih reakcija, ali i za detekciju kompartmentalizacije proteina sa kojima formira himerni oblik¹⁴⁰⁻¹⁴².

Iako se GFP uspešno koristi kao marker protein, uočeno je da je proizvodnja solubilnog, sekretovanog zelenog fluorescentnog proteina ili GFP – sličnih proteina u himernom obliku sa proteinima od interesa veoma teško postići. Kako bi se poboljšala proizvodnja zelenog fluorescentnog proteina i kako bi se dobile velike količine proteina, eksperimenti su bazirani na njegovu proizvodnju u *Saccharomyces cerevisiae*. Uprkos svim naporima i upotrebom različitih lider sekvenci za ekspresiju poput *inui*, *suc2*, *pho5* i *mel1*, nivo ekspresije u *Saccharomyces cerevisiae* je bio zanemarljivo mali^{138, 143}.

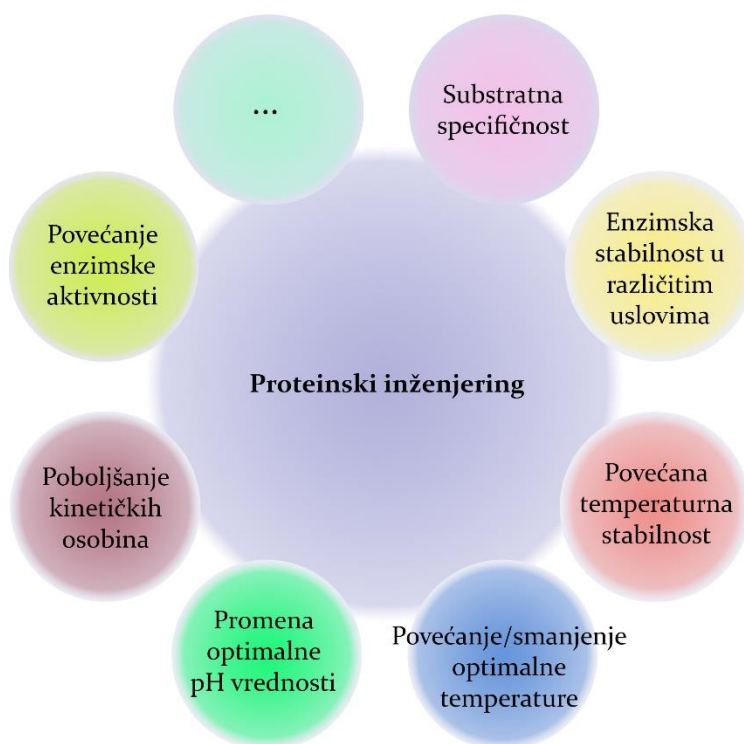
Pokazano je da ćelije kvasca imaju sposobnost da produkuju zeleni fluorescentni protein ali u veoma malom prinosu, međutim dosadašnja istraživanja nisu ukazala na mogući problem, pa samim tim i na rešenje. Uprkos činjenici da je veoma teško produkovati rastvorni GFP u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, detektovana je ekspresija zelenog fluorescentnog proteina u himernom obliku na C – terminalnom kraju R – aglutinina¹³⁸, kao i njegova ekspresija sa *Flo1p* adhezinom¹³⁸ kao i sa manoproteinima na ćelijskom zidu¹⁴⁴.

Istraživanja bazirana na ekspresiji zelenog fluorescentnog proteina su ukazala da veoma važnu ulogu u ekspresiji solubilnog zelenog fluorescentnog proteina imaju lider sekvenca kao i protein od interesa koji zajedno sa GFP formira himerni oblik¹³⁸.

Kako bi se poboljšala ekspresija zelenog fluorescentnog proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* uvedene su mutacije S65G i S72A unutar prirodnog oblika proteina čime je konstruisan unapređen GFP (EGFP) čime je omogućena povećana fluorescencija i stabilnost prilikom ekspresije u *Escherichia coli*¹⁴⁵, ali i prilikom ekspresije kao himere sa Agazp proteinom na površini ćelija kvasca^{146, 147}.

2.4. Proteinski inženjering

Proteinskim inženjeringom moguće je konstruisati proteine sa tačno definisanim osobinama upotrebom rekombinantne DNK tehnologije. Poznavanje genske sekvence, a samim tim i amino kiselinske sekvence proteina od interesa je neophodno kako bi bilo omogućeno konstruisanje proteina sa izmenjenim osobinama kao i odabir odgovarajuće tehnike proteinskog inženjeringa. Proteinski inženjering podrazumeva upotrebu tehnika za manipulaciju na nivou sekvence gena proteina, što dovodi do promena kako u strukturi tako i u karakternim osobinama proteina. Upotrebom proteinskog inženjeringa, moguće je poboljšati kinetičke osobine enzima, izmeniti supstratnu specifičnost, optimalnu pH vrednost za rad enzima, povećati temperaturnu stabilnost¹⁴⁸, a ujedno je moguće povećati i oksidativnu stabilnost enzima (Slika 12).



Slika 12: Šematski prikaz potencijalnih osobina proteina koje mogu biti modifikovane i poboljšane upotrebom proteinskog inženjeringa.

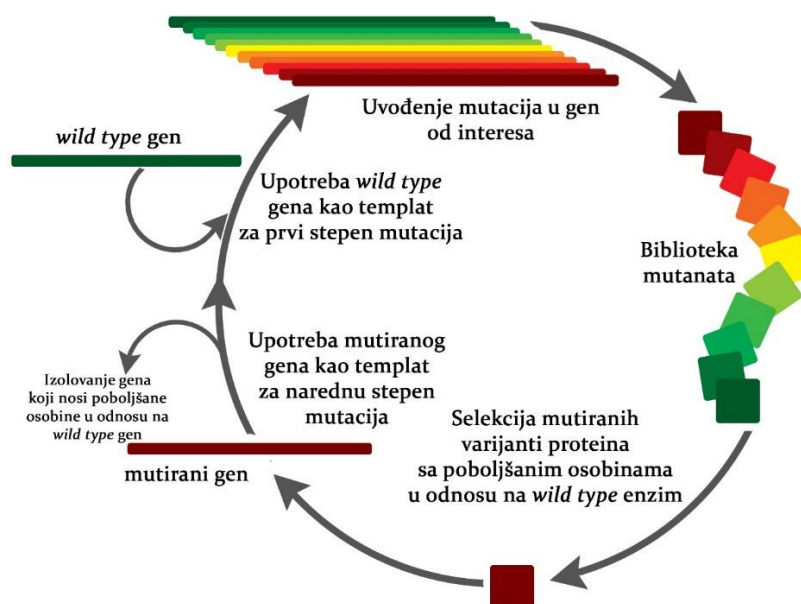
Unutar proteinskog inženjeringa moguće je definisati nekoliko tehnika za konstruisanje željenih varijanti enzima poput, dirigovane evolucije, racionalnog dizajna i polu – racionalnog dizajna koji se naziva još i mesto specifična mutageneza¹⁴⁸. Pored ovih metoda moguće je koristiti i druge tehnike proteinskog inženjeringa kao što su nasumična mutageneza¹⁴⁹, molekulska dinamika i homologo modelovanje^{150, 151}, *de novo* enzimski inženjering^{152, 153} kao i mnoge druge metode u cilju poboljšanja enzimskih karakteristika. U zavisnosti od karakteristika samog enzima koji želimo da modifikujemo kao i od osobina koje želimo da dobijemo upotrebom proteinskog inženjeringa, zavisi i izbor metode koja će se koristiti¹⁵⁴.

Proteini predstavljaju biopolimere izgrađene tačno definisanom kombinacijom dvadeset amino kiselina, čineći ih evolutivno lakim materijalom za uvođenje mutacija direktno kodiranim sekvencom gena. Do evolucije proteina u beskonačnom broju generacija, čineći da dolazi do formiranja proteina koji poseduju

nove, poboljšane osobine ili usled promena u okruženju i trenutnih potreba domaćina, mogu i da izgube neku od svojih osobina. Upotrebom tehnika za manipulaciju gena u laboratorijskim uslovima dolazi do kreiranja različitih biblioteka gena koji poseduju čitav opseg različitih osobina proteina koji kodiraju¹⁵⁵.

2.4.1. Dirigovana evolucija proteina

Dirigovanom evolucijom nakon selekcije targetnog biomolekula ili organizma, pristupa se njihovoj modifikaciji upotrebom ponavljajućih rundi genske modifikacije, skeniranju i selekciji mutanata sa poboljšanim osobinama, nakon čega sledi upotreba poboljšanih mutanata kao templatata prilikom nove runde uvođenja mutacija^{155, 156}. Dirigovanom evolucijom moguće je uvoditi nove mutacije sve dok se ne dobije željena osobina ili sve dok dalje uvođenje mutacija ne dovede do potpunog gubitka aktivnosti proteina, nepravilnog uvijanja ili dok nove mutacije nimalo ne unapređuju karakterne osobine proteina (Slika 13)¹⁵⁶.



Slika 13: Šematski prikaz dirigovane evolucije proteina u cilju dobijanja varijanti enzima sa poboljšanim osobinama u odnosu na prirodni oblik enzima.

2.4.2. Racionalni dizajn

Upotrebom različitih kompjuterskih softvera i programa, moguće je simulirati uvijanje proteina^{157, 158}, međutim naše dosadašnje poznavanje proteinskog uvijanja kao i odnos strukture proteina sa funkcijom koju obavlja, nije dovoljno kako bismo bili u mogućnosti da konstruišemo racionalni *de novo* dizajn proteina sa specifičnim biološkim i fizičkim osobinama. Racionalni dizajn podrazumeva zamenu tačno definisanih amino kiselina drugim amino kiselinama, na osnovu informacija o strukturi i funkciji enzima čije osobine želimo da promenimo¹⁵⁹.

Poznavanje i razumevanje osobina enzima od interesa, poput supstratne specifičnosti ali i katalitičkog mehanizma delovanja samog enzima, direktno utiče na mogućnost upotrebe racionalnog dizajna, čime je ograničena upotreba racionalnog dizajna samo na veoma dobro okarakterisane sisteme. Iako je za upotrebu racionalnog dizajna neophodno dobro poznavati strukturu i funkciju enzima, jedna od najvećih prednosti je što dolazi do uvođenja mutacija na tačno definisanom mestu enzima i ne dolazi do formiranja nasumičnih mutacija, čime je omogućena analiza veoma malog broja varijanti enzima kako bi se selektovali mutanti koji zadovoljavaju tražene osobine¹⁶⁰.

Upotrebom metoda racionalnog dizajna, često se dešava da je limitirajući faktor u stvari definisati koju specifičnu amino kiselinu želimo da zamenimo kako bismo dobili željene osobine čak i pri uslovi kada je veoma dobro poznata strukturna sekvenca i osobine samog enzima¹⁶⁰.

Prosta i jednostavna zamena neke od aminokiselina može da dovede do promena u tercijernoj strukturi proteina kao i u fleksibilnosti proteina što dalje utiče na katalitičku aktivnost ali i na supstratnu specifičnost na načine koje ne možemo ni da predvidimo. Shodno tome, razvoj i dizajniranje metoda kod kojih dolazi do nasumičnih mutacija individualnih amino kiselina u neku drugu aminokiselinu, je dovelo do toga da je neophodno imati veoma malo informacija o strukturi i funkciji proteina¹⁶⁰.

Upotrebom metoda racionalnog dizajna dolazi do konstruisanja biblioteka mutanata proteina koji se potom sekvenciraju i analiziraju u cilju detekcije i selekcije novih varijanti enzima koji ispoljavaju željene karakteristike. Nakon dizajniranja i konstruisanja biblioteka mutanata ono što je kritičan korak jeste analiza ogromnog broja mutanata u veoma kratkom vremenskom periodu uz upotrebu odgovarajućeg i pouzdanog sistema za detekciju enzimske aktivnosti¹⁶⁰.

Racionalni dizajn podrazumeva mesto – specifičnu mutagenezu proteina¹⁶¹ koja omogućava uvođenje tačno definisanih aminokiselina unutar gena od interesa. Prilikom mesto – specifične mutageneze moguće je koristiti dva pristupa za dobijanje željenog konstrukta, od kojih se jedan naziva „preklapajuće produžavanje“ gena (*eng.* overlap extension), a drugi pristup podrazumeva umnožavanje celog plazmida PCR reakcijom (*eng.* whole plasmid single round PCR)¹⁶².

Pristup „preklapajućeg produžavanja“ gena podrazumeva upotrebu dva para prajmera pri čemu u svakom paru jedan od prajmera sadrži željeni izmenjeni fragment sekvence gena. Oba para prajmera se koriste prilikom prve PCR reakcije, nakon čega se dobijaju dva dvolančana produkta gena. Daljom denaturacijom i vezivanjem prajmera za komplementarne delove DNK lanaca dolazi do formiranja dva heterodupleksa pri čemu svaki lanac heterodupleksa poseduje željeni mutirani DNK segment. Nakon završene delimične sinteze mutiranih gena, pristupa se drugoj rundi PCR reakcija u kojima se koristi set ne mutiranih prajmera kako bi se uradila potpuna sinteza željenog gena¹⁶⁰.

Prilikom umnožavanja celog plazmida PCR reakcijom se uglavnom koristi komercijalno dostupan kit „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ koji proizvodi kompanija Stratagene. Za potrebe PCR reakcije, neophodno je kreirati dva oligonukleotidna prajmera sa željenom mutacijom odnosno mutacijama koji su komplementarni suprotnim lancima dvolančane plazmidne DNK. Tokom samo jedne PCR reakcije dolazi do umnožavanja oba lanca plazmidne DNK pri čemu ne dolazi do pomeranja prajmera i dobijaju se mutirani plazmidi kod kojih ne postoje

dvolančani prekidi koji se ne preklapaju. Nakon umnožavanja plazmidne DNK i uvođenja mutacija koristi se *DpnI* metilaza koja vrši selektivnu digestiju cirkularne metilovane DNK pri čemu u reakcionoj smeši ostaje samo mutirana plazmidna DNK koja poseduje dvolančani prekid koji se popunjava nakon transformacije kompetentnih ćelija upotrebom DNK mašinerije samih ćelija, nakon čega se dobija cirkularna plazmidna DNK koja poseduje željene mutacije¹⁶⁰.

2.4.3. Proteinski inženjering celobioza – dehidrogenaze

Veoma je interesantan podatak da celobioza – dehidrogenaza ima sposobnost da u *in situ* uslovima vrši proizvodnju vodonik peroksida čime ona pronalazi primenu u biotehnoškim procesima poput izbeljivanje pamuka, detergentima za pranje veša, ali i nalazi primenu i kao antimikrobni agens u medicinske svrhe. Poznato je da celobioza – dehidrogenaza oksidacijom supstrata poput celobioze ili laktoze može da produkuje i vodonik peroksid, međutim ona za razliku od oksidaza, nema sposobnost da produkuje velike količine vodonik peroksida¹⁶³.

Modifikacijom amino kiselina unutar katalitički aktivnog mesta, moguće je dizajnirati upotrebom proteinskog inženjeringa enzim koji ima sposobnost da produkuje veće količine vodonik peroksida, a samim tim ovako mutirana celobioza – dehidrogenaza nalazi primenu u papirnoj industriji, pamučnoj industriji, za proizvodnju detergenata za pranje veša ali i za formiranje mikrofilma unutar urinarnih katetera kako bi se sprečio rast mikroorganizama¹⁶³.

Kreiranjem saturacionih biblioteka celobioza – dehidrogenaze, u kojima je mutirano pet amino kiselina koje se nalaze unutar katalitički aktivnog mesta (G323, A322, L324, N700, H701) dobijene su biblioteke u kojima veliki broj mutanata nije pokazivao enzimsku aktivnost merenu u prisustvu supstrata i DCIP – a kao redox medijatora. Međutim, merenjem produkovanog vodonik peroksida od strane mutanta, selektovano je čak 12 varijanti enzima na poziciji N700 i 7 varijanti na

poziciji G232 koje su pokazivale povećanu proizvodnju vodonik peroksida. Ponovnom analizom selektovanih mutanata, pokazano je da su mutanti na poziciji G232 dali lažno pozitivne rezultate, a sekvenciranjem analiziranih varijanti enzima na poziciji N700, pokazano je da su sve imale istu mutaciju N700S koja je dovela do povećane proizvodnje vodonik peroksida¹⁶³.

2.5. Ekspresioni sistemi

Razvoj rekombinantne DNK tehnologije, kloniranje i ekspresija velikog broja sisarskih gena upotrebom različitih ekspresionih sistema, omogućili su proizvodnju različitih rekombinantnih proteina koji imaju širok opseg primene. U zavisnosti od karakteristika proteina od interesa, zavisi i selekcija odgovarajućeg ekspresionog sistema. Iako proizvodnja rekombinantnih proteina na velikoj skali, predstavlja veliki izazov za istraživače usled striktnih kvalitativnih i kvantitativnih propisa koje je neophodno ispuniti, najveći izazov je pronalaženje uslova za optimizaciju i poboljšanje postojećih ekspresionih sistema, kao i razvoj novih mehanizama za proizvodnju kompleksnih rekombinantnih proteina¹⁶⁴.

Ekspresioni sistemi se koriste za proizvodnju rekombinantnih proteina koji potom nalaze primenu kako u medicinske svrhe u obliku različitih terapeutika, tako i u istraživačke svrhe. Potreba za pronalaženjem novih ekspresionih sistema povećava se linearno sa brojem potencijalnih genskih targeta koji mogu imati industrijsku primenu¹⁶⁴. Primenu u ekspresiji različitih proteina do sada su našli različiti ekspresioni sistemi poput bakterija¹⁶⁵, preko kvasaca^{166, 167} i filamentoznih gljiva¹⁶⁸ do ćelija viših eukariota^{164, 169}.

Odabir nekog od postojećih ekspresionih sistema, zavisi kako od kvaliteta proizvodnje proteina u određenom sistemu, tako i od ekonomičnosti same proizvodnje jer za industrijsku proizvodnju rekombinantnih proteina neophodna je upotreba jeftinih medijuma i komponenti koje ulaze u sastav medijuma. Industrijska proizvodnja rekombinantnih proteina podrazumeva visok prinos željenog proizvoda,

a ujedno je neophodno zadovoljiti i određene kriterijume što se tiče kvaliteta samog proizvoda, posebno ukoliko on nalazi primenu u medicinskim istraživanjima ili terapijama. S' obzirom na različite primene rekombinantnih proteina, odabir odgovarajućeg ekspresionog sistema će zavisiti upravo od same svrhe proteina i njegove primene¹⁶⁴.

Rekombinantnom DNK tehnologijom moguće je prevazići sve poteškoće vezane za kvalitetnu ekspresiju zadovoljavajućih količina željenih proteina, bilo da se kao ekspresioni sistem koriste bakterije, kvasci, biljke, insekti ili sisarski ekspresioni sistemi¹⁶⁴.

2.5.1. Prokariotski ekspresioni sistemi

Široku upotrebu u ekspresiji produkata rekombinantne DNK tehnologije imaju bakterijski ekspresioni sistemi, uglavnom zbog visokog nivoa ekspresije rekombinantnih proteina, veoma brzog umnožavanja i rasta ćelija ali i zbog veoma prostog i jeftinog medijuma koji se koristi za rast i ekspresiju proteina. Međutim, bakterije ne predstavljaju savršene ekspresione sisteme zbog upravo zbog intracelularne akumulacije heterolognih proteina, nepravilnog uvijanja proteina, kao i zbog nedostatka post – translacionih modifikacija¹⁶⁴.

Proizvodnja rekombinantnih proteina se u veliko meri radi upotrebom prokariotskih ekspresionih sistema koji omogućavaju laku genetsku manipulaciju željenog proteina upotrebom poznatih tehnika proteinskog inženjeringa, a ujedno se mogu proizvoditi na veoma jeftinim medijumima. Najrasprostranjeniji prokariotski sistem je gram negativna bakterija *Escherichia coli*, dok se kao gram pozitivna bakterija koristi *Bacillus subtilis*¹⁶⁴.

Kloniranje i ekspresija željenih proteina, poreklom iz eukariotskih izvora, upotrebom prokariotskih ekspresionih sistema, ne mora nužno da bude i odgovarajući sistem za ekspresiju upravo zbog činjenice da eksprimirani protein ne mora nužno posedovati željenu biološku aktivnost ili stabilnost, a ujedno bakterije proizvode izuzetno mnogo drugih proteina kao i toksične komponente koje mogu

da dovedu do kontaminacije finalnog produkta, što predstavlja glavni problem ukoliko se eksprimirani proteini koriste u terapijske svrhe. Upotrebom eukariotskih ekspresionih sistema, dolazi do prevazilaženja ograničenja koja postoje upotrebom prokariotskih ekspresionih sistema, zbog velike sličnosti po pitanju genetskih, biohemijskih i molekulskih osobina između eukariotskih organizama¹⁶⁴.

2.5.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao ekspresioni sistem

Soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, poznatiji kao pekarski kvasac, zbog svoje veoma rasprostranjene primene kako u prehrambenoj industriji, industriji alkoholnih pića ali i u istraživačke svrhe, se svrstava u ekspresioni sistem sa najvećom komercijalnom vrednošću. U istraživačkim laboratorijama, kvasac služi kao model sistem za istraživanja bazirana na funkciji ćelija, a i kao ekspresioni sistem za proizvodnju velikog broja rekombinantnih proteina, koji potom nalaze primenu u konstruisanju vakcina, različitih farmaceutskih proizvoda ali i u dijagnostici¹⁷⁰.

Modifikacijama kvasca, dobijen je ekspresioni sistem koji ima sposobnost da produkuje različite heterologne gene¹⁷¹, pri čemu dolazi do ispunjavanja kriterijuma za biokompatibilnost kao i da je bezbedan za humanu upotrebu, a ujedno da proizvodi produkovani od strane kvasaca budu u potpunosti netoksični i bezbedni za humanu upotrebu¹⁶⁴.

U poređenju sa ostalim eukariotskim ekspresionim sistemima, kvasac jedini poseduje prednosti kako i prokariotskih tako i eukariotskih ekspresionih sistema. Kao i prokariotski sistemi, kvasac je lak za korišćenje i ekspresiju proteina, koristi jeftine medijume i komponente za rast, ima veoma kratko vreme rasta i obezbeđuje veliki stepen ekspresije željenog proteina. Kvasac, kao i ostali eukariotski sistemi ima sposobnost da vrši veliki broj post – translacionih modifikacija koje su od posebnog

značaja za pravilnu ekspresiju i funkciju eukariotskih proteina, a ujedno obezbeđuju pravilno uvijanje proteina¹⁶⁴.

Sojevi kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenulla polymorpha* i *Pichia pastoris* iako predstavljaju najjednostavnije eukariotske organizme, pored sposobnosti da relativno brzo rastu, čime je omogućena proizvodnja proteina u veoma kratkom vremenskom periodu, mogu upotrebom dirigovane evolucije da se modifikuju i prilagode za proizvodnju proteina u industrijske svrhe. Pored već pomenutih prednosti kvasaca kao ekspresionih sistema, ono što ih karakteriše jeste i mesto – specifična integracija plazmidne DNK, povećan broj kopija gena od interesa, kao i prisustvo sekvence za sekreciju heterolognih proteina u vanćelijsku sredinu¹⁶⁴.

Poslednjih godina godina, došlo je do razvoja metilotrofnih kvasaca poput *Hansenulla polymorpha*, *Pichia pastoris* i *Candidia biodini*, i njihove upotrebe za proizvodnju rekombinantnih proteina. Kvasac, *Pichia pastoris* predstavlja jedan od najkorišćenijih ekspresionih sistema, obezbeđujući efikasnu proizvodnju velikih količina funkcionalno aktivnih rekombinantnih proteina¹⁷² u poređenju sa *Saccharomyces cerevisiae*. Ekspresija proteina u vanćelijsku sredinu obezbeđuje laku selekciju i odvajanje proteina od ostatka fermentacione kulture, čime je potom znatno olakšano i prečišćavanje eksprimiranih proteina¹⁶⁴. Sposobnost *Pichia pastoris* da vrši glikozilaciju proteina, veoma sličnim mehanizmom kao prilikom glikozilacije željenih proteina unutar životinjskih ćelija upotrebom šećernih komponenti, koje poseduju minimalne razlike u odnosu na one koje se koriste prilikom životinjskih post – translacionih modifikacija¹⁶⁴, čini da *Pichia pastoris* ima veoma važnu ulogu u ekspresiji proteina životinjskog ili humanog porekla.

2.5.2.1. Ekspresija proteina na površini ćelija kvasca

Modifikacijom proteina kako bi oni imali poboljšane osobine, u odnosu na osnovni tip enzima, koje mogu da podrazumevaju povećanu katalitičku aktivnost i supstratnu specifičnost, kao povećanu stabilnost u različitim uslovima, doprineli su

razvoju i definisali pravac kako bioloških istraživanja tako i medicinskih i biotehnoških istraživanja¹⁷³.

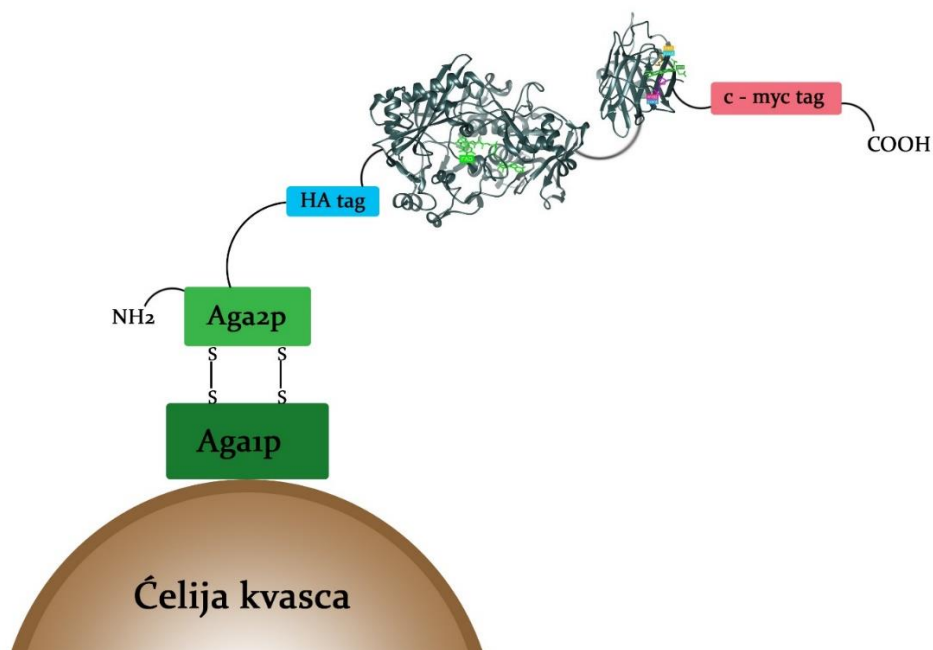
Kako bi se unapredile biološke funkcije, stabilnost i specifičnost nekog proteina, pored relativno dobrog poznavanja same strukture i funkcije proteina, neophodno je dobro poznavati i tehnike proteinskog inženjeringa, pomoću kojih je moguće generisati biblioteke mutanata željenog proteina. Kreirane biblioteke mutanata bivaju analizirane i varijante enzima sa željenim osobinama se selektuju upotrebom neke od visoko – efikasnih metoda za analizu i selekciju proteina. Nakon završene selekcije varijanti enzima, pristupa se sekvenciranju gena koji kodiraju za date enzime kako bi se dobile informacije o mutacijama koje su uvedene¹⁷³.

Tokom istraživanja, razvijeno je nekoliko ekspresionih sistema čijom upotrebom je moguće sačuvati vezu između genotipa i fenotipa i takvi ekspresioni sistemi uglavnom podrazumevaju ekspresiju proteina na površini ekspresione ćelije, poput ekspresije na površini faga^{174, 175}, bakterija¹⁷⁶, sisarskih ćelija^{177, 178} kao i ekspresija na površini ćelija kvasca¹⁷⁹.

Ekspresija na površini ćelija kvasca (YSD) podrazumeva da prevashodno svaka pojedinačna ćelija kvasca poseduje vektor koji u sebi nosi gen za neku od varijanti enzima, čime nakon inicirane sinteze proteina dolazi do njegove ekspresije na površini ćelije upotrebom fuzionih proteina kvasca. Posebno dizajnirani soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100, poseduje fuzione proteine koji imaju ulogu u ekspresiji željenih proteina na površini ćelija, što ujedno predstavlja i imobilizaciju enzima na ćeliji kao prirodnom nosaču, a ujedno je obezbeđen pristup enzima supstratima i okolnim rastvaračima koji se nalaze u ekstracelularnom prostoru¹⁷³.

Ekspresija na površini ćelija kvasca poput ostalih eukariotskih ekspresionih sistema omogućava uvođenje post – translacionih modifikacija, formiranje disulfidnih mostova, veoma su laki za upotrebu ali i za rast i ekspresiju proteina i upotrebom protočne citometrije moguće je simulatno analizirati željene osobine ekspimiranih proteina bez prethodnog prečišćavanja¹⁷³.

Ekspresija proteina na površini kvasca može da se vrši upotrebom nekoliko tipova fuzionih proteina vezivanjem preko N – ili C – terminalnog kraja fuzionog proteina¹⁴⁶. U zavisnosti od osobina samog enzima, zavisi i odabir fuzionog proteina, a najrasprostranjeniji mehanizam za ekspresiju proteina na površini ćelija kvasca podrazumeva upotrebu Aga proteina (Slika 14). Protein od interesa preko C – terminalnog kraja α – aglutinina Aga2p subjedinice biva ekspimiran na površinu ćelija kvasca¹⁷⁹, čime dolazi do obeležavanja ekspimiranog proteina hemaglutininom (HA) koji se nalazi između N – terminalnog kraja ekspimiranog proteina i Aga2p subjedinice ali i obeležavanja pomoću c – myc epitopa koji se nalazi na C – terminalnom kraju¹⁷³.



Slika 14: Šematski prikaz ekspresije celobioza - dehidrogenaze na površini ćelije kvasca upotrebom Aga proteina.

Kvantifikacija ekspresije proteina na površini kvasca je omogućena upravo prisustvom različitih molekula za obeležavanje, a ujedno se obezbeđuje i normalizacija funkcije proteina u zavisnosti od ekspresije. Upotrebom ekspimiranih epitopa, ne dobija se informacija o pravilnom uvijanju proteina ili o funkciji

proteina, zbog čega se preporučuje upotreba specifičnih liganada ili antitela specijalno dizajniranih za karakteristične strukturne segmente eksprimiranog proteina¹⁷³.

Veza između genotipa i fenotipa ostaje intaktna prilikom ekspresije proteina na površini ćelija kvasca, čime je omogućena laka detekcija i selekcija varijanti enzima kreiranih upotrebom metoda proteinskog inženjeringa. Biblioteke mutanata konstruisane i eksprimirane na površini ćelija kvasca mogu lako da budu analizirane upotrebom protočne citometrije odnosno fluorescencijom aktivirano ćelijsko sortiranje (FACS) u prisustvu fluorescentnog supstrata ili fluorescentnog proteina koji je zajedno sa proteinom od interesa eksprimiran na površini ćelija^{146, 180-183}, poput zelenog fluorescentnog proteina.

2.5.3. Kvasac *Pichia pastoris* kao ekspresioni sistem

Za kvasac *Pichia pastoris* kao eukariotski ekspresioni sistem, karakteristično je nekoliko osobina viših eukariotskih sistema poput pravilnog uvijanja proteina, njegove obrade i uvođenje post – translacionih modifikacija ali ono što dodatno čini *Pichia pastoris* veoma primamljivu kao ekspresioni sistem je upravo veoma laka manipulacija ovim sistemom poput *Escherichia coli* ili *Saccharomyces cerevisiae*. *Pichia pastoris* pored svih svojih prednosti, predstavlja ekspresioni sistem veoma lak za upotrebu, koji za relativno kratak vremenski period uz upotrebu prostih i jeftinih medijuma za gajenje i ekspresiju, daje veoma velike količine željenog proteina¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

Iako *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris* imaju mnoštvo zajedničkih osobina po pitanju molekularne i genske manipulacije, *Pichia pastoris* ima 10 do 100 puta veći stepen ekspresije rekombinantnih proteina, što je čini idealnim sistemom za ekspresiju većih količina proteina. Osnovni aspekt metabolizma *Pichia pastoris* je njena sposobnost da kao jedini izvor ugljenika koristi metanol, koji u prisustvu kiseonika podleže oksidaciji do formaldehida usled čega dolazi do formiranja i

vodonik peroksida koji je toksičan za ćelije, zbog čega se metabolizam metanola odvija u specijalizovanim organelama, peroksizomima¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

Alkohol oksidaza (AOX, EC 1.1.3.13) predstavlja prvi enzim u metaboličkom putu metanola i unutar genoma *Pichia pastoris* postoje dva gena koji kodiraju za alkohol oksidazu, AOX₁ i AOX₂ gen, pri čemu je najveća proizvodnja alkohol oksidaze regulisana AOX₁ genom. Alkohol oksidaza, ima veoma mali afinitet prema molekulskom kiseoniku, zbog čega *Pichia pastoris* generiše velike količine ovog enzima kako bi se uspešno vršio metabolizam metanola. Proizvodnja alkohol oksidaze je pod direktnom regulacijom promotora koji je odgovoran za inicijaciju heterologne ekspresije proteina. Visoke koncentracije metanola utiču na regulaciju ekspresije AOX₁ gena usled čega, gotovo 30% ukupnih solubilnih proteina čini upravo alkohol oksidaza¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

Iako je homologija između AOX₂ i AOX₁ skoro identična, ne uočava se ista brzina rasta pri upotrebi metanola kao izvor ugljenika, što omogućava izolovanje Mut^s sojeva^{185, 187}.

Na osnovu fenotipa, moguće je klasifikovati dva rekombinantna soja kvasca *Pichia pastoris*, Mut^s (eng. Methanol ut ilization slow) soj kod kog je gubitak AOX₁ gena doveo do veoma male proizvodnje alkohol oksidaze, čineći da ovaj soj ima veoma mali procenat rasta i ekspresije kada se gaji na metanolnom medijumu. Soj *Pichia pastoris* KM71H pripada upravo Mut^s soju kvasca, dok Mut⁺ (eng. Methanol ut ilization plus) soj predstavlja osnovni tip soja koji ima sposobnost da metaboliše metanol kao jedini izvor ugljenika i ovom soju pripadaju X – 33 ćelije kvasca^{187, 188}.

U zavisnosti od signalne sekvence koja se koristi za ekspresiju proteina, razlikujemo intracelularnu ili ekstracelularnu ekspresiju. Istraživanjima se došlo do zaključka da je signalna sekvenca, α – faktor, koji se koristi i prilikom ekstracelularne ekspresije proteina kod *Saccharomyces cerevisiae* kompatibilan i odgovarajuć i za ekspresiju proteina u *Pichia pastoris*^{187, 188}.

Ono što predstavlja jednu od osnovnih karakteristika kvasca *Pichia pastoris* i njenu najveću prednost u odnosu na ostale sojeve kvasca, jeste veoma mala sekrecija nativnih proteina samog kvasca u vanćelijsku sredinu, čime je većinski procenat sekretovanih proteina upravo protein od interesa. Prilikom ekspresije proteina upotrebom *Pichia pastoris*, usled veoma male koncentracije ostalih proteina u ekspresionom medijumu, smatra se da to predstavlja prvi korak u prečišćavanju proteina^{187, 188}.

Kao što je već pomenuto, eukariotski ekspresioni sistemi imaju sposobnost da vrše post - translacione modifikacije, pri čemu su najčešća mesta glikozilacije upravo Asn - X - Ser/Thr mesta unutar primarne sekvence proteina. Za razliku od *Saccharomyces cerevisiae* kod koga prilikom glikozilacije dolazi do kačenja između 50 i 150 manoznih ostataka, *Pichia pastoris* kači svega 8 do 14 manoznih ostataka po mestu glikozilacije^{189, 190}.

3. Ciljevi istraživanja

Predmet doktorske disertacije je dobijanje mutanata celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* u cilju povećanja oksidativne stabilnosti i aktivnosti enzima u odnosu na njegov prirodni oblik, za primenu u biokatalizi i produkciji laktobionske kiseline. Pored toga rađeno je i na razvoju i optimizaciji nove metode visoko efikasne pretrage biblioteke mutiranih varijanti gena celobioza – dehidrogenaze, zasnovane na detekciji aktivnosti enzima eksportovanog na površini ćelija kvasca fluorescentnim enzimskim esejem pogodnim za upotrebu u protočnoj citometriji.

U okviru ove doktorske disertacije postavljeno je nekoliko ciljeva:

1. Razvoj i optimizacija fluorescentnog enzimskog eseja za celobioza – dehidrogenazu pogodnog za korišćenje u protočnoj citometriji.
2. Kloniranje i ekspresija celobioza – dehidrogenaze u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY₁₀₀ u vidu himere sa AGA 2 i/ili zelenim fluorescentnim proteinom eksportovane na površinu ćelija kvasca.
3. Pravljenje biblioteke mutiranih varijanti gena celobioza – dehidrogenaze metodom slučajnih mutacija i njena ekspresija u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY₁₀₀ u vidu himere sa AGA 2 proteinom eksprimirane na površini ćelija kvasca.
 - a. Pretraživanje dobijenih biblioteka mutiranih varijanti gena celobioza – dehidrogenaze, eksprimiranih na površini kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY 100, za dobijanje mutiranih varijanti enzima sa povećanom aktivnošću u odnosu na prirodni oblik enzima.
4. Semi – racionalni dizajn celobioza – dehidrogenaze u cilju povećanja oksidativne stabilnosti.
 - a. Kreiranje biblioteka mutiranih varijanti gena celobioza – dehidrogenaze semi racionalnim pristupom za dobijanje slučajnih mutacija na tačno definisanim pozicijama i njihova ekspresija u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* Invsc1 u vidu vanćelijskog enzima.

- b. Testiranje aktivnosti mutiranih varijanti enzima u uslovima oksidativnog stresa i selekcija varijanti gena sa povećanom oksidativnom stabilnošću u odnosu na prirodni oblik enzima i konstruisanje varijanti enzima koji poseduju više od jedne selektovane mutacije koja je dovela do povećanje oksidativne stabilnosti.
 - c. Prečišćavanje i detaljna strukturna i kinetička karakterizacija mutiranih varijanti enzima.
- 5. Kloniranje i ekspresija prirodnog oblika enzima i odabranih mutanata celobioza – dehidrogenaze u kvascu *Pichia pastoris*, njihovo prečišćavanje i detaljna karakterizacija enzimskih varijanti.
 - 6. Primena dobijenih mutanata i prirodnog oblika enzima u biokatalizi za proizvodnju laktobionske kiseline.

4. Materijal i metode

4.1. Materijal

4.1.1. Oprema

Tehnička vaga: Kern 440 – 35A

Analitička vaga:

pH metar: Adwa AD8000

Centrifuga: Eppendorf minifuga

Centrifuga: BioSan LMC - 3000

Termostat: Enviromental Shaker – Inkubator ES – 20

Termostat sa mešanjem: Termo shaker TS – 100 Biosan

PCR mašina: Ependorf Mastercycler personal

Sistem za DNK elektroforezu: Hofer SE 600 Ruby

Sistem za proteinsku elektroforezu:

Uređaj za elektroporaciju: Eppendorf Electroporator 25

Uređaj za analizu agaroznih DNK elektroforeza: UV lampa VWR GenoSmart

Spektrofotometar: WPA Lightwave S2000 UV/VIS

Elisa čitač: LKB 5060-006

Peristaltička pumpa: Heidolf peristaltic pump

4.1.2. Hemikalije

Antibiotski selektabilni markeri, ampicilin i zeocin, naručeni su od kompanije Invitrogen, Kalifornija, SAD.

Komponente za pripremu medijuma, agar, pepton i tripton su naručeni od kompanije Torlak, Srbija, dok su kazamino kiseline (CAA) kao i azotne baze kvasca bez amonijum sulfata i amino kiselina (YNB) naručene od Roth, Nemačka. Soli za pripremu medijuma kao i puferskih rastvora su naručene od kompanije Centrohem, Srbija kao i od kompanije Superlab, Srbija.

Restrikcioni enzimi korišćeni za kloniranje (*BamHI*, *NheI*, *XhoI*, *EcoRI*, *XbaI*, *DpnI*) i *PmeI* enzim za linearizaciju plazmida, kao i odgovarajući puferi, naručeni su od kompanije Thermo Fisher Scientific, SAD. T4 DNK ligaza, *DreamTaq* polimeraza i puferi 10X pufer za T4 DNK ligazu, 10X pufer za *DreamTaq* polimerazu ali i smeša dezoksinukleotida su naručeni od kompanije Thermo Fisher Scientific, SAD.

Prečišćavanje PCR proizvoda kao i restrikovanih plazmida je rađeno pomoću *NucleoSpin Gel* and *PCR Clean – up* kita (Macherey – Nagel, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Za analizu plazmidne DNK kao i PCR proizvoda korišćena je komercijalna boja za DNK elektroforezu i DNK molekularni markeri (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Konstruisanje biblioteka mutanata kao i kloniranje mutanata je rađeno pomoću *QuikChange Lightning Site – Directed Mutagenesis* kita (Agilent Technologies, SAD) prema uputstvu proizvođača.

4.1.3. Izvor gena za celobioza – dehidrogenazu

Gen za celobioza – dehidrogenazu iz soja gljive bele truleži *Phanerochaete chrysosporium* sintetisan je od strane GenScrip kompanije (SAD), prema nukleotidnoj sekvenci zrelog proteina CDH dostupnoj u nukleotidnoj bazi podataka (NCBI) pod rednim brojem U46081.1.

4.1.4. Izvor gena za zeleni fluorescentni protein

Gen za zeleni fluorescentni protein je modifikovan u odnosu na prirodni protein iz meduze *Aequorea victoria* (P42212) kako bi se poboljšala njegova ekspresija u kvascima, kao i fluorescencija. Mutirani gen za zeleni fluorescentni protein sadrži tri mutacije na pozicijama S65G, S72A, A206K i dobijen je od profesora Erik Šust sa Univerziteta u Vinskonsinu, SAD¹⁹¹.

4.1.5. Vektori i sojevi

Sojevi *Escherichia coli* DH5 α i XL10gold korišćeni su za kloniranje željenih gena kao i za održavanje i čuvanje plazmida.

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* soj InvSc1 (Invitrogen, SAD) je korišćen za ekstracelularnu ekspresiju celobioza – dehidrogenaze, dok je za ekspresiju na površini ćelija kvasca korišćen pCTCON2 vektor i *Saccharomyces cerevisiae* soj EBY100 dobijeni od profesora Dejn Vitrap, MIT, SAD.

Ekstracelularna ekspresija celobioza – dehidrogenaze je rađena i u *Pichia pastoris* soju KM71H, kloniranjem gena u pPICZ α A vektor naručenih od kompanije Invitrogen, SAD.

4.2. Mikrobiološke metode

Prilikom rada sa mikrobiološkim metodama poštovana su sva propisana pravila rada u mikrobiološkoj hemiji.

Pripremanje mikrobioloških podloga je rađeno sa supstancama čistoće *pro analysis* i suspendovanjem definisane količine supstance u demineralizovanoj vodi, a pre upotrebe medijumi su prethodno sterilisani u autoklavu na 121°C u trajanju od 20 minuta. Pojedine komponente koje se dodaju u medijume, a ne smeju da se sterilišu na visokim temperaturama su sterilisane filter sterilizacijom upotrebom filtera od 0,22 mikrona.

4.2.1. Medijumi za rast bakterija

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

Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	0,5 g
Trypton	20 g

Suspendovati komponente u 960 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C su dodati prethodno sterilisani rastvori:

MgCl ₂ , 1M	10 mL
MgSO ₄ , 1 M	10 mL
Glukoza, 20% (w/v)	20 mL

4.2.1.2. Luria – Bertani medijum za rast bakterija (LB medijum)

Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g

Suspendovati komponente u 1000 mL demineralizovane vode i podesiti pH na 7,4.

4.2.1.3. Luria – Bertani čvrst medijum za rast bakterija (LA medijum)

Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g
Agar	20 g

Suspendovati komponente u 1000 mL demineralizovane vode i podesiti pH na 7,4.

4.2.1.4. Luria – Bertani medijum za rast bakterija sa rezistencijom na ampicilin (LB – ampicilin)

Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g

Suspendovati komponente u 1000 mL demineralizovane vode i podesiti pH na 7,4.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodat je sterilni rastvor ampicilina koncentracije 100 mg/mL, kako bi finalna koncentracija u medijumu bila 100 µg/mL.

4.2.1.5. Luria – Bertani čvrst medijum za rast bakterija sa rezistencijom na ampicilin (LA – ampicilin)

Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g
Agar	20 g

Suspendovati komponente u 1000 mL demineralizovane vode i podesiti pH na 7,4.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodat je sterilni rastvor ampicilina koncentracije 100 mg/mL, kako bi finalna koncentracija u medijumu bila 100 µg/mL.

4.2.1.6. Luria – Bertani medijum za rast bakterija sa rezistencijom na zeocin (LB – zeocin)

Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Trypton	10 g

Suspendovati komponente u 1000 mL demineralizovane vode i podesiti pH na 7,4.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodat je sterilni rastvor zeocina koncentracije 100 mg/mL, kako bi finalna koncentracija u medijumu bila 25 µg/mL.

4.2.1.7. Luria – Bertani čvrst medijum za rast bakterija sa rezistencijom na zeocin (LA – zeocin)

Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Tripton	10 g
Agar	20 g

Suspendovati komponente u 1000 mL demineralizovane vode i podesiti pH na 7,4.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodat je sterilni rastvor zeocina koncentracije 100 mg/mL, kako bi finalna koncentracija u medijumu bila 25 µg/mL.

4.2.2. Medijumi za rast kvasaca

4.2.2.1. YPD tečni medijum za rast kvasaca

Ekstrakt kvasca	10 g
Tripton	20 g

Suspendovati komponente u 900 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodat je prethodno sterilisan rastvor:

Glukoza, 20% (w/v)	100 mL
--------------------	--------

4.2.2.2. YPD tečni medijum za rast kvasaca sa rezistencijom na zeocin

Ekstrakt kvasca	10 g
Tripton	20 g

Suspendovati komponente u 900 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodat je prethodno sterilisan rastvor:

Glukoza, 20% (w/v)	100 mL
--------------------	--------

Kao i sterilni rastvor zeocina koncentracije 100 mg/mL, kako bi finalna koncentracija u medijumu bila 100 µg/mL.

4.2.2.3. YPD čvrsti medijum za rast kvasaca

Ekstrakt kvasca	10 g
Tripton	20 g
Agar	20 g

Suspendovati komponente u 900 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodat je prethodno sterilisan rastvor:

Glukoza, 20% (w/v)	100 mL
--------------------	--------

4.2.2.4. YPD čvrsti medijum za rast kvasaca sa rezistencijom na zeocin

Ekstrakt kvasca	10 g
Tripton	20 g
Agar	20 g

Suspendovati komponente u 900 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodat je prethodno sterilisan rastvor:

Glukoza, 20% (w/v)	100 mL
--------------------	--------

Kao i sterilni rastvor zeocina koncentracije 100 mg/mL, kako bi finalna koncentracija u medijumu bila 100 µg/mL.

4.2.2.5. 2xYPAD tečni medijum za rast kvasaca

Ekstrakt kvasca	20 g
Tripton	40 g
Adenin sulfat	0,08 g

Suspendovati komponente u 800 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodat je prethodno sterilisan rastvor:

Glukoza, 20% (w/v)	200 mL
--------------------	--------

4.2.2.6. Tečni selektivni medijum za rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A + W)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,1 g
Azotne baze kvasca bez (NH ₄) ₂ SO ₄ i amino kiselina	1,6 g
Kazamino kiseline	5 g

Suspendovati komponente u 880 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodati su prethodno sterilisani rastvori:

Glukoza (Glc), 20% (w/v)	100 mL
Adenin sulfat (A), 20 mg/mL	10 mL
Triptofan (W), 20 mg/mL	10 mL

4.2.2.7. Tečni selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 soja (YNB – CAA medijum sa Gal + A + W)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,1 g
Azotne baze kvasca bez (NH ₄) ₂ SO ₄ i amino kiselina	1,6 g
Kazamino kiseline	5 g

Suspendovati komponente u 880 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodati su prethodno sterilisani rastvori:

Galaktoza (Gal), 20% (w/v)	100 mL
Adenin sulfat (A), 20 mg/mL	10 mL
Triptofan (W), 20 mg/mL	10 mL

4.2.2.8. Čvrsti selektivni medijum za rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A + W)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,1 g
Azotne baze kvasca bez (NH ₄) ₂ SO ₄ i amino kiselina	1,6 g
Kazamino kiseline	5 g
Agar	20 g

Suspendovati komponente u 880 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodati su prethodno sterilisani rastvori:

Glukoza (Glc), 20% (w/v)	100 mL
Adenin sulfat (A), 20 mg/mL	10 mL
Triptofan (W), 20 mg/mL	10 mL

4.2.2.9. Čvrsti selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 soja (YNB – CAA medijum sa Gal + A + W)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,1 g
Azotne baze kvasca bez (NH ₄) ₂ SO ₄ i amino kiselina	1,6 g
Kazamino kiseline	5 g
Agar	20 g

Suspendovati komponente u 880 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodati su prethodno sterilisani rastvori:

Galaktoza (Gal), 20% (w/v)	100 mL
Adenin sulfat (A), 20 mg/mL	10 mL
Triptofan (W), 20 mg/mL	10 mL

4.2.2.10. Tečni selektivni medijum za rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,1 g
Azotne baze kvasca bez (NH ₄) ₂ SO ₄ i amino kiselina	1,6 g
Kazamino kiseline	5 g

Suspendovati komponente u 890 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodati su prethodno sterilisani rastvori:

Glukoza (Glc), 20% (w/v)	100 mL
Adenin sulfat (A), 20 mg/mL	10 mL

4.2.2.11. Tečni selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Gal + A)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,1 g
Azotne baze kvasca bez (NH ₄) ₂ SO ₄ i amino kiselina	1,6 g
Kazamino kiseline	5 g

Suspendovati komponente u 890 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodati su prethodno sterilisani rastvori:

Galaktoza (Gal), 20% (w/v)	100 mL
Adenin sulfat (A), 20 mg/mL	10 mL

4.2.2.12. Čvrsti selektivni medijum za rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Glc + A)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,1 g
Azotne baze kvasca bez (NH ₄) ₂ SO ₄ i amino kiselina	1,6 g
Kazamino kiseline	5 g
Agar	20 g

Suspendovati komponente u 890 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodati su prethodno sterilisani rastvori:

Glukoza (Glc), 20% (w/v)	100 mL
Adenin sulfat (A), 20 mg/mL	10 mL

4.2.2.13. Čvrsti selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja (YNB – CAA medijum sa Gal + A)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,1 g
Azotne baze kvasca bez (NH ₄) ₂ SO ₄ i amino kiselina	1,6 g
Kazamino kiseline	5 g
Agar	20 g

Suspendovati komponente u 890 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodati su prethodno sterilisani rastvori:

Galaktoza (Gal), 20% (w/v)	100 mL
Adenin sulfat (A), 20 mg/mL	10 mL

4.2.2.14. Tečni selektivni medijum za rast kvasca *Pichia pastoris*

KM71H soja (BMG medijum)

(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
Azotne baze kvasca bez (NH ₄) ₂ SO ₄ i amino kiselina	3,4 g

Suspendovati komponente u 800 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodati su prethodno sterilisani rastvori:

KH ₂ PO ₄ , 1 M, pH 6.0	100 mL
Glicerol, 10% (v/v)	100 mL
Biotin, 0,02% (w/v)	2 mL

4.2.2.15. Tečni selektivni medijum za rast kvasca *Pichia pastoris*

KM71H soja (BMM medijum)

(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
Azotne baze kvasca bez (NH ₄) ₂ SO ₄ i amino kiselina	3,4 g

Suspendovati komponente u 890 mL demineralizovane vode.

Nakon sterilizacije u medijum ohlađen na 50°C dodati su prethodno sterilisani rastvori:

KH ₂ PO ₄ , 1 M, pH 6.0	100 mL
Metanol, 50% (v/v)	10 mL
Biotin, 0,02% (w/v)	2 mL

4.2.3. Kompetentne ćelije

4.2.3.1. Hemijski kompetentne ćelije bakterija *Escherichia coli*

DH5α i XL10 gold soja

Kolonija *Escherichia coli* DH5α ili XL10gold soja sa LA medijuma je inokulirana u 10 mL LB medijuma i gajena u termostatu sa mešanjem na 37°C, pri

250 obrtaja/min tokom 8 h. U 100 mL svežeg LB medijuma, prebačen je 1 mL kulture i ćelije su ponovo gajene u termostatu sa mešanjem na 22°C, pri 250 obrtaja/min tokom 14 h sve dok optička gustina na 600 nm nije dostigla vrednost 0,55. Nakon što je postignuta odgovarajuća optička gustina, ćelijska kultura je inkubirana na ledu 10 minuta, a potom su ćelije centrifugirane na 4°C, 10 minuta na 3000 obrtaja/min. Supernatant iznad ćelija je odbačen i ćelije su resuspendovane u 40 mL ledeno – hladnog Inoue pufera (55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 10 mM PIPES, pH6,7), prethodno sterilisanog. Ćelije su ponovo centrifugirane na 4°C, 10 minuta na 3000 obrtaja/min i resuspendovane u 8 mL ledeno – hladnog Inoue pufera uz dodatak 0,7 mL sterilnog DMSO, nakon čega su ostavljene na ledu 10 minuta. Ćelijska suspenzija je podeljena u alikvote od po 100 µL koji su odmah zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na - 80°C.

4.2.3.2. Hemijski kompetentne ćelije kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 i EBY100 soja

Kolonija *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 ili EBY 100 soja sa YPD čvrstog medijuma je inokulirana u 2,5 mL 2xYPAD tečnog medijuma sa 12,5 µg/mL hloramfenikol i gajena u termostatu sa mešanjem na 30°C, pri 250 obrtaja/min tokom 14 h. Ćelijska kultura je prebačena u 50 mL svežeg 2xYPAD medijuma i ćelije su ponovo gajene u termostatu sa mešanjem na 30°C, pri 250 obrtaja/min. Praćena je optička gustina ćelija na 600 nm i kada je dostignuta gustina oko 1, ćelije su centrifugirane 5 minuta na 3000 obrtaja/min. Ćelije su potom resuspendovane u 25 mL sterilne demineralizovane vode i centrifugirane 5 minuta na 3000 obrtaja/min, nakon čega su jos jednom resuspendovane u 500 µL sterilne demineralizovane vode i centrifugirane 5 minuta na 6000 obrtaja/min. Ćelije su resuspendovane sa 500 µL sterilnog FCC rastvora (5% glicerol, 10% DMSO) i podeljene u alikvote od po 50 µL, koji su zamrznuti na - 80°C.

4.2.3.3. Elektro kompetentne ćelije kvasaca *Pichia pastoris* KM71H soja

Kolonija *Pichia pastoris* KM71H soja sa YPD čvrstog medijuma je inokulirana u 3 mL YPD tečnog medijuma sa 12,5 µg/mL hloramfenikol i gajena u termostatu sa mešanjem na 30°C, pri 250 obrtaja/min tokom 14 h. U 50 mL svežeg YPD medijuma je prebačeno 100 µL kulture i ćelije su opet gajene u termostatu sa mešanjem na 30°C, pri 250 obrtaja/min tokom 14 h. Kada je ćelijska kultura dostigla optičku gustinu od 1 do 1,5, ćelije su centrifugirane 10 minuta na 3000 obrtaja/min, nakon čega su resuspendovane u 10 mL DTT/LiAc rastvora (100 mM litijum – acetat, 0,6 M sorbitol, 10 mM TRIS pH 7,5, 10 mM ditiotreitol (dodaje se nakon sterilizacije)) i inkubirane na 22°C uz blago mesanje, tokom 30 minuta. Ćelije su potom tri puta centrifugirane 5 minuta na 3000 obrtaja/min i nakon svakog centrifugiranja isprane sa po 1 mL ledeno – hladnog 1 M sorbitola. Finalno, ćelije su resuspendovane u 500 µL ledeno – hladnog 1 M sorbitola sa 60 µL 100% glicerola i podeljene u alikvote od po 50 µL, koji su zamrznuti na - 80°C.

4.3. Molekularno – biološke metode

4.3.1. Kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pYES2 vektor

4.3.1.1. Umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom

Tabela 1: Smeša za umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>	<i>Finalna koncentracija</i>
MiliQ voda	41,25 μL	
10x pufer za <i>Dream Taq</i> polimerazu	5 μL	1x
Smeša dezoksinukleotida (dNTP, 10 mM)	1 μL	0,2 mM
<i>Forward</i> prajmer (25 μM)	1 μL	0,5 μM
<i>Reverse</i> prajmer (25 μM)	1 μL	0,5 μM
<i>Dream Taq</i> polimeraza (5 U/ μL)	0,25 μL	0,025 U/ μL
Templat	0,5 μL	0,5 ng/ μL
<i>Ukupna zapremina</i>	50 μL	

Prajmeri korišćeni u PCR reakciji su prajmeri za kloniranje celobioza – dehidrogenaze u pYES2 vektor (Prilog 1).

Tabela 2: Program za PCR reakciju.

Inicijalna denaturacija	94°C	4 min	30 ciklusa
Denaturacija	94°C	1 min	
<i>Annealing</i>	55°C	2 min, 15 sec	
Elongacija	72°C	1 min	
Terminalna elongacija	72°C	10 min	

4.3.1.2. Dvostruka digestija restrikcionim enzimima umnoženog gena za celobioza – dehidrogenazu i pYES2 vektora

Tabela 3: Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza – dehidrogenazu i pYES2 vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>PCR proizvod</i>	<i>Vektor</i>
MiliQ voda	3 μL	3 μL
10x <i>Tango</i> pufer	4 μL	4 μL
<i>EcoRI</i> restrikcioni enzim (10 U/ μL)	2 μL	2 μL
<i>XbaI</i> restrikcioni enzim (10 U/ μL)	1 μL	1 μL
Templat	10 μL	10 μL
<i>Ukupna zapremina</i>	20 μL	20 μL

Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza – dehidrogenazu kao i vektora je inkubirana na 37°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 80°C tokom 20 minuta.

4.3.1.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pYES2 vektora

Tabela 4: Smeša za ligaciju dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pYES2 vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>
MiliQ voda	5,5 μL
10x pufer za T4 DNK ligazu	2 μL
Dvostruko digestovan vektor	2 μL
Dvostruko digestovan PCR proizvod	10 μL
T4 DNK ligaza (5 U/ μL)	0,5 μL
<i>Ukupna zapremina</i>	20 μL

Ligaciona smeša je inkubirana na 16°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 70°C u trajanju od 5 minuta.

4.3.2. Kreiranje saturacionih biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pYES2 vektoru

Kreiranje saturacionih biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pYES2 vektoru je rađeno pomoću *QuikChange Lightning Site – Directed Mutagenesis* kita (Agilent Technologies, SAD) i odgovarajućih prajmera za metionine na pozicijama 65, 685 i 738 (Prilog 1). Kao templat korišćen je wtCDH gen u pYES2 vektoru. Prema uputstvu proizvođača pripremljena je PCR reakciona smeša.

Tabela 5: Program za PCR reakciju.

Inicijalna denaturacija	94°C	2 min	30 ciklusa
Denaturacija	94°C	30 min	
<i>Annealing</i>	55°C	30 sec	
Elongacija	65°C	5 min, 45 sec	
Terminalna elongacija	65°C	10 min	

Nakon transformacije *Escherichia coli* XL10gold kompetentnih ćelija, svi transformanti pojedinačnih biblioteka su spojeni, plazmidi za svaku biblioteku su izolovani i sa njima je urađena transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 soja.

4.3.2.1. Kreiranje kombinovanih mutanata iz saturacionih biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pYES2 vektoru

Nakon što smo detektovali pojedinačne mutante sa željenim osobinama, pristupili smo kreiranju kombinovanih mutanata sa odgovarajućim prajmerima sa mutacijama na 65, 685, 738 pozicijama metionina (Prilog 1). Kao i pri kreiranju saturacionih biblioteka, tako i pri kreiranju kombinovanih mutanata korišćen je *QuikChange Lightning Site – Directed Mutagenesis* kita (Agilent Technologies, SAD) prema uputstvu proizvođača. Dobijeni kombinovani mutanti su korišćeni za transformaciju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 soja, a potom su analizirani prema istom protokolu kao i saturacione biblioteke.

4.3.3. Kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pCTCON₂ vektor

4.3.3.1. Umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom

Tabela 6: Smeša za umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>	<i>Finalna koncentracija</i>
MiliQ voda	41,25 µL	
10x pufer za <i>Dream Taq</i> polimerazu	5 µL	1x
Smeša dezoksinukleotida (dNTP, 10 mM)	1 µL	0,2 mM
<i>Forward</i> prajmer (25 µM)	1 µL	0,5 µM
<i>Reverse</i> prajmer (25 µM)	1 µL	0,5 µM
<i>Dream Taq</i> polimeraza (5 U/µL)	0,25 µL	0,025 U/µL
Templat	0,5 µL	0,5 ng/µL
<i>Ukupna zapremina</i>	50 µL	

Prajmeri korišćeni u PCR reakciji su prajmeri za kloniranje celobioza – dehidrogenaze u pCTCON₂ vektor (Prilog 1).

Tabela 7: Program za PCR reakciju.

Inicijalna denaturacija	94°C	4 min	30 ciklusa
Denaturacija	94°C	1 min	
<i>Annealing</i>	50°C	2 min, 15 sec	
Elongacija	72°C	2 min, 45 sec	
Terminalna elongacija	72°C	10 min	

4.3.3.2. Dvostruka digestija restrikcijom enzimima umnoženog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON₂ vektora

Tabela 8: Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON₂ vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>PCR proizvod</i>	<i>Vektor</i>
MiliQ voda	6 µL	11 µL
10x Tango pufer	2 µL	2 µL
<i>Bam</i> HI restrikcioni enzim (10 U/µL)	1 µL	1 µL
<i>Nhe</i> I restrikcioni enzim (10 U/µL)	1 µL	1 µL
Templat	10 µL	5 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>20 µL</i>	<i>20 µL</i>

Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza – dehidrogenazu kao i vektora je inkubirana na 37°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 80°C tokom 20 minuta.

4.3.3.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON₂ vektora

Tabela 9: Smeša za ligaciju dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON₂ vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>
MiliQ voda	9,5 µL
10x pufer za T ₄ DNK ligazu	2 µL
Dvostruko digestovan vektor	2 µL
Dvostruko digestovan PCR proizvod	6 µL
T ₄ DNK ligaza (5 U/µL)	0,5 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>20 µL</i>

Ligaciona smeša je inkubirana na 16°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 70°C u trajanju od 5 minuta.

4.3.4. Kreiranje *error - prone* biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pCTCON₂ vektoru

4.3.4.1. Umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom

Prilikom kreiranja *error - prone* biblioteke celobioza – dehidrogenaze u pCTCON₂ vektoru korišćen je mangan (Mn²⁺) kako bi se nasumično uvodile mutacije u prirodni oblik enzima. Protokol za smešu za umnožavanje gena je prikazan u tabeli 10 uz dodatak mangana u koncentracijama od 0 mM do 0.2 mM mangana.

Tabela 10: Smeša za umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>	<i>Finalna koncentracija</i>
MiliQ voda	x μ L	
10x pufer za <i>Dream Taq</i> polimerazu	5 μ L	1x
Smeša dezoksinukleotida (dNTP, 10 mM)	1 μ L	0,2 mM
<i>Forward</i> prajmer (25 μ M)	1 μ L	0,5 μ M
<i>Reverse</i> prajmer (25 μ M)	1 μ L	0,5 μ M
<i>Dream Taq</i> polimeraza (5 U/ μ L)	0,25 μ L	0,025 U/ μ L
Templat	0,5 μ L	0,5 ng/ μ L
<i>Ukupna zapremina</i>	50 μL	

Prajmeri korišćeni u PCR reakciji su prajmeri za kloniranje celobioza – dehidrogenaze u pCTCON₂ vektor (Prilog 1).

Tabela 11: Program za PCR reakciju.

Inicijalna denaturacija	94°C	4 min	30 ciklusa
Denaturacija	94°C	1 min	
<i>Annealing</i>	50°C	2 min, 15 sec	
Elongacija	72°C	2 min, 45 sec	
Terminalna elongacija	72°C	10 min	

Nakon PCR reakcije, dobijeni proizvod je tretiran *DpnI* enzimom (New England Biolabs, Nemačka) kako bi se uklonio sav templat. PCR smeša je inkubirana na 37°C, 1 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 80°C, 20 minuta.

4.3.4.2. Dvostruka digestija restrikcijom enzimima umnoženog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON₂ vektora

Tabela 12: Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON₂ vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>PCR proizvod</i>	<i>Vektor</i>
MiliQ voda	6 µL	11 µL
10x <i>Tango</i> pufer	2 µL	2 µL
<i>BamHI</i> restrikcioni enzim (10 U/µL)	1 µL	1 µL
<i>NheI</i> restrikcioni enzim (10 U/µL)	1 µL	1 µL
Templat	10 µL	5 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>20 µL</i>	<i>20 µL</i>

Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza – dehidrogenazu kao i vektora je inkubirana na 37°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 80°C tokom 20 minuta.

4.3.4.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON₂ vektora

Tabela 13: Smeša za ligaciju dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON₂ vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>
MiliQ voda	9,5 µL
10x pufer za T ₄ DNK ligazu	2 µL
Dvostruko digestovan vektor	2 µL
Dvostruko digestovan PCR proizvod	6 µL
T ₄ DNK ligaza (5 U/µL)	0,5 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>20 µL</i>

Ligaciona smeša je inkubirana na 16°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 70°C u trajanju od 5 minuta.

4.3.5. Kloniranje gena za zeleni fluorescentni protein u pCTCON₂ vektor

4.3.5.1. Umnožavanje gena za zeleni fluorescentni protein PCR reakcijom

Tabela 14: Smeša za umnožavanje gena za zeleni fluorescentni protein PCR reakcijom.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>	<i>Finalna koncentracija</i>
MiliQ voda	41,25 µL	
10x pufer za <i>Dream Taq</i> polimerazu	5 µL	1x
Smeša dezoksinukleotida (dNTP, 10 mM)	1 µL	0,2 mM
<i>Forward</i> prajmer (25 µM)	1 µL	0,5 µM
<i>Reverse</i> prajmer (25 µM)	1 µL	0,5 µM
<i>Dream Taq</i> polimeraza (5 U/µL)	0,25 µL	0,025 U/µL
Templat	0,5 µL	0,5 ng/µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>50 µL</i>	

Prajmeri korišćeni u PCR reakciji su prajmeri za kloniranje zelenog fluorescentnog proteina u pCTCON₂ vektor (Prilog 1).

Tabela 15: Program za PCR reakciju.

Inicijalna denaturacija	94°C	4 min	30 ciklusa
Denaturacija	94°C	1 min	
<i>Annealing</i>	50°C	1 min	
Elongacija	72°C	1 min	
Terminalna elongacija	72°C	10 min	

4.3.5.2. Dvostruka digestija restrikcionim enzimima umnoženog gena za zeleni fluorescentni protein i pCTCON₂ vektora

Tabela 16: Smeša za dvostruku digestiju gena za zeleni fluorescentni protein i pCTCON₂ vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>PCR proizvod</i>	<i>Vektor</i>
MiliQ voda	3 µL	3 µL
10x <i>Tango</i> pufer	4 µL	4 µL
<i>Bam</i> HI restrikcioni enzim (10 U/µL)	2 µL	2 µL
<i>Xho</i> I restrikcioni enzim (10 U/µL)	1 µL	1 µL
Templat	10 µL	10 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>20 µL</i>	<i>20 µL</i>

Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza – dehidrogenazu kao i vektora je inkubirana na 37°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 80°C tokom 20 minuta.

4.3.5.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za zeleni fluorescentni protein i pCTCON₂ vektora

Tabela 17: Smeša za ligaciju dvostruko digestovanog gena za zeleni fluorescentni protein i pCTCON₂ vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>
MiliQ voda	5,5 µL
10x pufer za T ₄ DNK ligazu	2 µL
Dvostruko digestovan vektor	2 µL
Dvostruko digestovan PCR proizvod	10 µL
T ₄ DNK ligaza (5 U/µL)	0,5 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>20 µL</i>

Ligaciona smeša je inkubirana na 16°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 70°C u trajanju od 5 minuta.

4.3.6. Kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u GFP – pCTCON₂ vektor

4.3.6.1. Umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom

Tabela 18: Smeša za umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>	<i>Finalna koncentracija</i>
MiliQ voda	41,25 μL	
10x pufer za <i>Dream Taq</i> polimerazu	5 μL	1x
Smeša dezoksinukleotida (dNTP, 10 mM)	1 μL	0,2 mM
<i>Forward</i> prajmer (25 μM)	1 μL	0,5 μM
<i>Reverse</i> prajmer (25 μM)	1 μL	0,5 μM
<i>Dream Taq</i> polimeraza (5 U/ μL)	0,25 μL	0,025 U/ μL
Templat	0,5 μL	0,5 ng/ μL
<i>Ukupna zapremina</i>	50 μL	

Prajmeri korišćeni u PCR reakciji su prajmeri za kloniranje celobioza – dehidrogenaze u pCTCON₂ vektor (Prilog 1).

Tabela 19: Program za PCR reakciju.

Inicijalna denaturacija	94°C	4 min	30 ciklusa
Denaturacija	94°C	1 min	
<i>Annealing</i>	50°C	2 min, 15 sec	
Elongacija	72°C	2 min, 45 sec	
Terminalna elongacija	72°C	10 min	

4.3.6.2. Dvostruka digestija restrikcijom enzimima umnoženog gena za celobioza – dehidrogenazu i GFP – pCTCON₂ vektora

Tabela 20: Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza - dehidrogenazu i GFP – pCTCON₂ vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>PCR proizvod</i>	<i>Vektor</i>
MiliQ voda	6 µL	6 µL
10x Tango pufer	2 µL	2 µL
<i>Bam</i> HI restrikcioni enzim (10 U/µL)	1 µL	1 µL
<i>Xho</i> I restrikcioni enzim (10 U/µL)	1 µL	1 µL
Templat	10 µL	10 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>20 µL</i>	<i>20 µL</i>

Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza – dehidrogenazu kao i vektora je inkubirana na 37°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 80°C tokom 20 minuta.

4.3.6.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i GFP – pCTCON₂ vektora

Tabela 21: Smeša za ligaciju dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON₂ vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>
MiliQ voda	5,5 µL
10x pufer za T ₄ DNK ligazu	2 µL
Dvostruko digestovan vektor	2 µL
Dvostruko digestovan PCR proizvod	10 µL
T ₄ DNK ligaza (5 U/µL)	0,5 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>20 µL</i>

Ligaciona smeša je inkubirana na 16°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 70°C u trajanju od 5 minuta.

4.3.7. Kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pPICZ α A vektor

4.3.7.1. Umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom

Tabela 22: Smeša za umnožavanje gena za celobioza – dehidrogenazu PCR reakcijom.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>	<i>Finalna koncentracija</i>
MiliQ voda	41,25 μ L	
10x pufer za <i>Dream Taq</i> polimerazu	5 μ L	1x
Smeša dezoksinukleotida (dNTP, 10 mM)	1 μ L	0,2 mM
<i>Forward</i> prajmer (25 μ M)	1 μ L	0,5 μ M
<i>Reverse</i> prajmer (25 μ M)	1 μ L	0,5 μ M
<i>Dream Taq</i> polimeraza (5 U/ μ L)	0,25 μ L	0,025 U/ μ L
Templat	0,5 μ L	0,5 ng/ μ L
<i>Ukupna zapremina</i>	50 μL	

Prajmeri korišćeni u PCR reakciji su prajmeri za kloniranje celobioza – dehidrogenaze u pPICZ α A vektor (Prilog 1).

Tabela 23: Program za PCR reakciju.

Inicijalna denaturacija	94°C	4 min	30 ciklusa
Denaturacija	94°C	1 min	
<i>Annealing</i>	55°C	2 min, 15 sec	
Elongacija	72°C	2 min, 45 sec	
Terminalna elongacija	72°C	10 min	

4.3.7.2. Dvostruka digestija restrikcionim enzimima umnoženog gena za celobioza – dehidrogenazu i pPICZ α A vektora

Tabela 24: Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza – dehidrogenazu i pCTCON₂ vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>PCR proizvod</i>	<i>Vektor</i>
MiliQ voda	6 μ L	6 μ L
10x <i>Tango</i> pufer	2 μ L	2 μ L
<i>Bam</i> HI restrikcioni enzim (10 U/ μ L)	1 μ L	1 μ L
<i>Xho</i> I restrikcioni enzim (10 U/ μ L)	1 μ L	1 μ L
Templat	10 μ L	10 μ L
<i>Ukupna zapremina</i>	20 μL	20 μL

Smeša za dvostruku digestiju gena za celobioza – dehidrogenazu kao i vektora je inkubirana na 37°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 80°C tokom 20 minuta.

4.3.7.3. Ligacija u dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pPICZ α A vektora

Tabela 25: Smeša za ligaciju dvostruko digestovanog gena za celobioza – dehidrogenazu i pYES₂ vektora.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>
MiliQ voda	5,5 μ L
10x pufer za T ₄ DNK ligazu	2 μ L
Dvostruko digestovan vektor	2 μ L
Dvostruko digestovan PCR proizvod	10 μ L
T ₄ DNK ligaza (5 U/ μ L)	0,5 μ L
<i>Ukupna zapremina</i>	20 μL

Ligaciona smeša je inkubirana na 16°C tokom 16 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem na 70°C u trajanju od 5 minuta.

4.3.8. Kreiranje mutiranih gena za celobioza – dehidrogenazu u pPICZ α A vektor

Kreiranje mutiranih gena celobioza – dehidrogenaze u pPICZ α A vektoru je rađeno pomoću *QuikChange Lightning Site – Directed Mutagenesis* kita (Agilent Technologies, SAD) i odgovarajućih prajmera kako za metionine na pozicijama 65, 685 i 738, tako i za mutacije koje odgovaraju trostrukom mutantu CDH (Prilog 1). Kao templat korišćen je wtCDH gen u pYES2 vektoru. Prema uputstvu proizvođača pripremljena je PCR reakciona smeša.

Tabela 26: Program za PCR reakciju.

Inicijalna denaturacija	94°C	2 min	30 ciklusa
Denaturacija	94°C	30 min	
<i>Annealing</i>	55°C	30 sec	
Elongacija	65°C	5 min, 45 sec	
Terminalna elongacija	65°C	10 min	

Nakon transformacije *Escherichia coli* XL10 gold kompetentnih ćelija, svi transformanti pojedinačnih biblioteka su spojeni, plazmidi za svaku biblioteku su izolovani i sa njima je urađena transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 soja.

4.3.9. Transformacija kompetentnih ćelija *Escherichia coli*

Transformacija kompetentnih ćelija *Escherichia coli* je rađena sa prethodno izolovanim plazmidima ili ligacionim smešama. Dodavanjem plazmidne DNK u zamrznute kompetentne ćelije, transformaciona smeša je ostavljena na ledu 30 minuta, a potom su ćelije podvrgnute toplotnom šoku (42°C, 45 sekundi) i odmah nakon toga stavljene u led na 2 minuta. U transformisane ćelije dodat je 1 mL SOC medijuma, nakon čega su ćelije inkubirane na 37°C tokom 1h. Posle završene inkubacije, 100 μ L transformacione smeše je zasejano na LA medjum sa odgovarajućim antibiotikom i inkubirano 14h na 37°C.

4.3.10. Transformacija kompetentnih ćelija *Saccharomyces cerevisiae*

Kompetentne ćelije *Saccharomyces cerevisiae* su polako otapane na ledu, a zatim centrifugirane 2 minuta na 6000 obrtaja/min. Supernatant iznad kompetentnih ćelija je uklonjen, a ćelije su resuspendovane u 260 μL 50% rastvora PEG3350, 36 μL 1 M litijum acetata, 50 μL skuvane jednolančane DNK (2 mg/mL) i 14 μL plazmidne DNK. Ćelijska suspenzija je potom dobro promešana na vortexu i inkubirana 1h na 42°C. Nakon završene inkubacije, u ćelijsku suspenziju je dodat 1 mL odgovarajućeg medijuma za rast i 200 μL transformacione smeše je zasejano na odgovarajući čvrsti medijum za rast ćelija. Transformisane ćelije su inkubirane 2 dana na 28°C.

4.3.11. Transformacija kompetentnih ćelija *Pichia pastoris*

Tabela 27: Linearizacija plazmidne DNK za transformaciju kvasca *Pichia pastoris*.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>
MiliQ voda	7 μL
10x B pufer	2 μL
Plazmidna DNK	10 μL
<i>PmeI</i> (5U/ μL)	1 μL
<i>Ukupna zapremina</i>	20 μL

Smeša za linearizaciju plazmidne DNK je inkubirana 16 h na 37°C, a reakcija je prekinuta inkubiranjem na 80°C u trajanju od 20 minuta.

Odmah nakon završene linearizacije plazmidne DNK, 10 μL je dodato u sveže pripremljene kompetentne ćelije kvasca *Pichia pastoris* KM71H soja. Transformaciona smeša je potom prebačena u prethodno ohlađenu elektroporacionu kivetu (BioRad, Kalifornija, SAD) i inkubirano na ledu 5 minuta, nakon čega je kiveta prebačena u elektroporator gde su ćelije transformisane elektroporacijom na 2500 V. Nakon završene elektroporacije, ćelijama je dodat 1 mL ledeno hladnog 1 M sorbitola,

a potom su inkubirane na 30°C, 1 h bez mešanja. Čelijama je zatim dodato 2 mL YPD medijuma i inkubirane su na 30°C tokom 3h sa mešanjem od 250 obrtaja/min. Nakon završene transformacije, ćelije su centrifugirane na 5 minuta na 6000 obrtaja/min, resuspendovane u 200 µL YPD medijuma, zasejane na YPD čvrsti medijum sa 100 µg/mL zeocina i inkubirane na 30°C 3 dana.

4.3.12. Izolovanje plazmida

4.3.12.1. Izolovanje plazmida iz bakterija

Pojedinačna kolonija sa LA medijuma sa odgovarajućim antibiotikom, inokulisana je u 5 mL LB medijuma koji sadrži isti antibiotik i gajena u inkubatoru sa mešanjem 14h na 37°C pri 250 obrtaja/min. Prekonoćna kultura je centrifugirana 1 minut na 13000 obrtaja/min, kako bi se sve ćelije odvojile od supernatanta i potom resuspendovale u 150 µL hladnog GTE+ rastvora (25 mM TRIS, 10 mM EDTA, 50 mM glukoza, 100 µg/mL ribonukleaze, pH 8,0). Čelijama je potom dodato 300 µL sveže pripremljenog P2 rastvora (200 mM NaOH, 1% SDS) uz lagano promešanje dok se rastvor ćelija nije potpuno izbistrio, nakon čega je dodato 450 µL hladnog 4 M CH₃COOK, pH6,3, pri čemu uz lagano izvrtnje ependorfa dolazi do formiranja beličastog precipitata. Suspenzija je cetrifugirana 4 minuta na 13000 obrtaja/min. Dobijeni supernatant je prebačen u nov ependorf i plazmidna DNK je precipitirana dodatkom 400 µL izopropanola, sadržaj je promešan nekoliko puta i centrifugiran 4 minuta na 13000 obrtaja/min. Supernatant je uklonjen, a precipitat je ispran dodatkom 1 mL ledeno hladnog 75% etanola, koji je potom uklonjen centrifugiranjem 2 minuta na 13000 obrtaja/min, dok je precipitat odnosno plazmidna DNK osušena u vakuum uparivaču na 45°C, 30 min.

4.3.12.2. Izolovanje plazmida iz kvasaca

Pojedinačna kolonija sa selektivnog čvrstog medijuma za rast kvasaca je inokulisana u 5 mL istog selektivnog tečnog medijuma za rast kvasaca i inkubirana 2 dana na 28°C uz mešanje (250 obrtaja/min). Čelije su potom centrifugirane i isprane

3 puta sa 1 mL pufera za liziranje ćelija (10 mM EDTA, 0,5% β – merkaptoetanol) I finalno resuspendovane u 30 μ L istog pufera. U ćelijsku suspenziju je dodato 10 μ L litikaze (5 U/ μ L) i ostavljeno na 37°C tokom 1h30min. Nakon završene ćelijske lize, plazmidi su izolovani upotrebom *NucleoSpin Plasmid* kita (Macherey – Nagel, Nemačka) prema uputstvu proizvođača za *low – copy* plazmide.

4.3.13. Analiza izolovanih plazmida

4.3.13.1. Enzimska restrikcija izolovanih plazmida

Provera veličine dobijenih konstrukata je rađena enzimskom restrikcijom sa EcoRI restrikcionim enzimom.

Tabela 28: Smeša za enzimsku restrikciju izolovanih plazmida.

<i>Komponenta</i>	<i>Zapremina</i>
MiliQ voda	5 μ L
10x EcoRI pufer	1 μ L
Plazmidna DNK	4 μ L
EcoRI (10 U/ μ L)	0,5 μ L
Ukupna zapremina	10 μL

Restrikciona smeša je inkubirana na 37°C tokom 3 h, nakon čega je reakcija prekinuta inkubiranjem 20 minuta na 60°C, a linearizovana plazmidna DNK je analizirana na agaroznoj DNK elektroforezi.

4.3.13.2. Detekcija restrikovanih plazmida na agaroznoj DNK elektroforezi

Za analizu restrikovanih plazmida, kao i PCR proizvoda korišćena je 0,6% agarozna u TBE puferu (89 mM TRIS, 89 mM borna kiselina, 20 mM EDTA, pH 8,0) koja je prethodno pripremljena u kadu za elektroforezu. Uzorci su mešani sa bojom za DNK elektroforezu i nanošeni na gel zajedno sa DNK molekulskim markerima. Elektroforeza je rađena pod naponom od 80 V, nakon čega su DNK trake analizirane

potapanjem gela u rastvor etidijum – bromida (0,5 µg/mL) i vizuelizovane pod UV lampom.

4.3.14. Proizvodnja celobioza – dehidrogenaze u *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 soju

Nakon transformacije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 soja, pojedinačne kolonije su inokulisane u 25 mL tečnog YNB – CAA medijuma sa Glc + A + W i hloramfenikolom (12,5 µg/mL) i inkubirane 2 dana na 28°C uz mešanje od 250 obrtaja/min. Celokupna ćelijska suspenzija je prebačena u 225 mL tečnog YNB – CAA medijuma sa Glc + A + W i inkubirane su pri istim uslovima narednih 24h. Dodavanjem YNB – CAA medijuma sa Gal + A + W i razblaživanjem ćelijske suspenzije tako da finalno OD_{600nm} bude ~ 0,4 indukovana je expresija proteina. Expresija proteina je rađena na 28°C uz mešanje pri 250 obrtaja/min tokom 16 h.

4.3.15. Proizvodnja celobioza – dehidrogenaze u *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soju

Transformacijom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja, dobijene pojedinačne kolonije su inokulisane u 5 mL tečnog YNB – CAA medijuma sa Glc + A i hloramfenikolom (12,5 µg/mL) i inkubirane 2 dana na 28°C uz mešanje od 250 obrtaja/min. Ekspresija proteina je indukovana dodavanjem tečnog YNB – CAA medijuma sa Gal + A i razblaživanjem ćelijske suspenzije tako da finalno OD_{600nm} bude ~ 1,0. Expresija proteina je rađena na 25°C uz mešanje pri 250 obrtaja/min tokom 36 h.

4.3.16. Proizvodnja celobioza – dehidrogenaze u *Pichia pastoris* KM71H soju

Sa YPD čvrstog medijuma za rast kvasaca sa rezistencijom na zeocin, kolonija transformisane *Pichia pastoris* KM71H sa željenim konstruktom je inokulisana u 20 mL BMG medijuma sa zeocinom (100 µg/mL) i inkubirana na 28°C sa mešanjem pri

200 obrtaja/min tokom 24 h. Čelije su potom razblažene dodavanjem 180 mL BMG medijuma i gajene pri istim uslovima narednih 48 h. Optička gustina ćelija OD_{600nm} je bila između 5,0 – 6,0, nakon čega je ćelijskoj suspenziji dodato još 800 mL istog medijuma i ćelije su gajene narednih 48 h, nakon čega je OD_{600nm} je bilo između 5,0 – 6,0. Čelije su centrifugirane 30 minuta na 3000 obrtaja/min, a potom resuspendovane u 100 mL BMM medijuma i inkubirane na 28°C sa mešanjem pri 200 obrtaja/min narednih 6 dana. Indukcija ekspresije proteina je inicirana svakoga dana dodavanjem 50% metanola tako da finalna koncentracija bude 0,5%.

4.4. Preparativne metode

4.4.1. Jonoizmenjivačka hromatografija

Nakon završenih fermentacija sa vanćelijskom ekspresijom proteina, centrifugiranjem ćelijskih suspenzija dobijeni supernatant je koncentrovan na *Viva Flow 50* (Sartorius, Nemačka) ultrafiltracionoj membrani sa 50 kDa *cut – off*. Uzorci su prečišćavani na 10 mL *Toyopearl DEAE* jonoizmenjivačkoj koloni nakon što su dijalizovani naspram 10 mM natrijum – fosfatnog pufera pH 6,0. Ekvilibracija kolone je rađena sa 10 mM natrijum – fosfatnim puferom pH 6,0, dok je za eluciju proteina korišćen linearni gradijent od 0% do 50% koncentracije natrijum hlorida (1 M NaCl) u 10 mM natrijum – fosfatnom puferu pH 6,0. Elucija je rađena sa 10 zapremina kolone pri protoku od 0,5 mL/min, a sakupljene frakcije od 1 mL su kasnije analizirane na celobioza – dehidrogenaznu aktivnost.

4.4.2. Gel filtraciona hromatografija

Frakcije sa jonoizmenjivačke hromatografije koje su pokazale celobioza – dehidrogenaznu aktivnost su spojene i dodatno prečišćene na gel filtracionoj *Toyopearl HF55 gel exclusion* koloni zapremine 80 mL. Uzorci su pre nanošenja na kolonu dijalizovani naspram 10 mM natrijum – fosfatnog pufera pH 6,0 sa 0,1 M NaCl koji je ujedno korišćen kako za ekvilibraciju kolone tako i za eluciju proteina. Elucija

proteina je rađena pri protoku od 0,2 mL/min, a sakupljene frakcije od 1 mL su analizirane na celobioza – dehidrogenaznu aktivnost.

4.5. Analitičke metode

4.5.1. Određivanje enzimске aktivnosti

Određivanje enzimске aktivnosti celobioza – dehidrogenaze je rađeno na 22°C upotrebom 0,3 mM DCIP (Sigma chemicals; $\lambda_{ex}520nm$; $\epsilon_{520}=6,80 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kao electron akceptora u 0,1 M natrijum – acetatnom puferu pH 4,5, sa 30 mM laktozom kao supstratom. Jedna internacionalna jedinica (U) enzimске aktivnosti je definisana kao ona količina enzima koja redukuje 1 μmol DCIP tokom 1 minuta pri datim reakcionim uslovima³⁰.

4.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Prečišćen protein je korišćen za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina merenjem absorbance na 280nm, pri čemu je za izračunavanje koncentracije proteina korišćen objavljen molarni ekstencioni koeficient za celobioza – dehidrogenazu iz *Phanerochaete chrysosporium* na 280nm ($\epsilon_{280nm}=217 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁹².

4.5.3. Određivanje oksidativne stabilnosti celobioza – dehidrogenaze u prisustvu vodonik peroksida

Oksidativna stabilnost mutanata celobioza – dehidrogenaze je analizirana u prisustvu 0,3 M vodonik peroksida merenjem zaostale enzimске aktivnosti nakon 0, 2 i 6 sati inkubacije u vodonik peroksidu. Kako bi se prekinula inkubacija enzima i uklonio vodonik peroksid, reakcione smeše su inkubirane 30 minuta sa katalazom (1000 U/mL, 1 mg/mL) imobilizovanom na GMA – EGDMA polimeru. Nakon

uklanjanja vodonik peroksida, enzimska aktivnost celobioza – dehidrogenaze je merena prema opisanom protokolu (odjeljak 4.5.1.).

4.5.4. Denaturišuća elektroforeza (SDS – PAGE)

Provera prečišćenosti proteina je rađena pomoću denaturišuće poliakrilamidne gel elektroforeze, gde je za koncentrovanje uzoraka korišćen 4% gel, a za razdvajanje 10% gel, pripremljeni prema podacima datim u tabeli 29.

Tabela 29: Protokol za pripremu gelova za denaturišuću poliakrilamidnu elektroforezu.

<i>Komponenta</i>	<i>10% gel za razdvajanje</i>	<i>4% gel za koncentrovanje</i>
Akrilamidni rastvor (AA, 30% T, 2.7% C)*	3,33 mL	500 µL
1,5 M TRIS pufer pH 8,8	2,5 mL	/
0,5 M TRIS pufer pH 6,8	/	940 µL
Voda	4 mL	2,25 mL
10% SDS	100 µL	38 µL
TEMED	4 µL	2 µL
10% APS	75 µL	25 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>10 mL</i>	<i>4 mL</i>

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

Uzorci za SDS –PAGE su pripremani mešanjem jedne zapremine pufera za uzorke (PUZ; 60 mM TRIS pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 14,4 mM β – merkaptioetanol, 0,02% BFP) sa četiri zapremine uzorka, nakon čega su inkubirani 10 minuta na 95°C. Elektroforeza je rađena pod naponom od 80 V dok uzorci iz koncentrujućeg gela nisu usli u razdvajajući gel nakon čega je elektroforeza rađena pod naponom od 150 V. Prilikom elektroforeze korišćen je pufer za elektroforezu (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 0,1% SDS, pH 8,3). Nakon završene elektroforeze, gel je fiksiran i obojen rastvorom CBB G – 250 (0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina), dok je obezbojavanje rađeno u 7% rastvoru sirćetne kiseline do pojave plavo obojenih proteinski traka na gelu.

4.5.5. Nativna elektroforeza

Analiza prečišćenog proteina je rađena pomoću native poliakrilamidne gel elektroforeze, gde je za koncentrovanje uzoraka korišćen 4% gel, a za razdvajanje 10% gel, pripremljeni prema podacima datim u tabeli 30.

Tabela 30: Protokol za pripremu gelova za nativnu poliakrilamidnu elektroforezu.

<i>Komponenta</i>	<i>10% gel za razdvajanje</i>	<i>4% gel za koncentrovanje</i>
Akrilamidni rastvor (AA, 30% T, 2.7% C)	3,33 mL	500 µL
1,5 M TRIS pufer pH 8,8	2,5 mL	/
0,5 M TRIS pufer pH 6,8	/	940 µL
Voda	4,1 mL	2,29 mL
TEMED	4 µL	2 µL
10% APS	75 µL	25 µL
<i>Ukupna zapremina</i>	<i>10 mL</i>	<i>4 mL</i>

Uzorci za nativnu elektroforezu su pripremani mešanjem jedne zapremine pufera za uzorke (PUZ; 60 mM TRIS pH 6,8, 10% glicerol, 0,02% BFP) sa četiri zapremine uzorka, nakon čega su uzorci nanošeni na gel. Elektroforeza je rađena pod naponom od 80 V dok uzorci iz koncentrujućeg gela nisu usli u razdvajajući gel nakon čega je elektroforeza rađena pod naponom od 150 V. Prilikom elektroforeze korišćen je pufer za elektroforezu (25 mM TRIS, 192 mM glicin, pH 8,3). Nakon završene elektroforeze, gel je fiksiran i obojen rastvorom CBB G – 250 (0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina), dok je obezbojavanje rađeno u 7% rastvoru sirćetne kiseline do pojave plavo obojenih proteinski traka na gelu.

4.5.6. Detekcija aktivnosti celobioza – dehidrogenaze u nativnom gelu (zimogram)

Nakon završene native elektroforeze, pored bojenja gela rastvorom CBB G – 250 boje, odrađena je i detekcija aktivnosti celobioza – dehidrogenaze na gelu. Kako

bi ovo bilo omogućeno, postavljena su dva paralelna seta uzoraka na gelu pri čemu je jedan bojen rastvorom CBB G – 250 boje, dok je drugi korišćen za detekciju aktivnosti.

Gel je 3 puta ispran demineralizovanom vodom, potom je ispran sa 0,1 M natrijum – acetatnim puferom, nakon čega je ostavljen u istom puferu 15 minuta. Rastvor DCIP (0,3 mM) u 0,1 M natrijum – acetatnom puferu je korišćen za bojenje gela, inkubiranjem 15 minuta, nakon čega je gel ispran demineralizovanom vodom kako bi se uklonio višak boje. Gel je potom inkubiran u 0,3 M rastvoru laktoze do pojave obezbojenja na gelu gde se nalaze proteinske trake koje potiču od celobioza – dehidrogenaze.

4.5.7. Karakterizacija celobioza – dehidrogenaze

4.5.7.1. Određivanje kinetičkih parametara celobioza – dehidrogenaze

Kinetički parametri celobioza – dehidrogenaze su određivani na 22°C stepena u 0,1 M natrijum – acetatnom puferu pH 4,5 sa 0,3 mM DCIP kao akceptorom elektrona, dok su kao supstrati korišćene laktoza i celobioza u različitom opsegu koncentracija (0,2 mM do 20 mM za laktozu; 1 μM do 700 μM za celobiozu). Dobijene vrednosti za enzimsku aktivnost su analizirane fitovanjem u Mihaelis – Menteninu hiperbolu upotrebom Graph Pad Prism 6 programa. Za izračunavanje k_{cat} je korišćena koncentracija proteina dobijena merenjem absorbance na 280nm i upotrebom molarnog ekstencionog koeficienta za celobioza – dehidrogenazu iz *Phanerochaete chrysosporium* na 280nm ($\epsilon_{280nm}=217 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁹².

4.5.7.2. Određivanje temperaturne stabilnosti celobioza – dehidrogenaze

Temperaturna stabilnost celobioza – dehidrogenaze je analizirana inkubiranjem enzima na temperaturama od 25°C do 90°C u trajanju od 15 minuta,

nakon čega je reakcija prekinuta prebacivanjem enzima na led i merenjem zaostale enzimske aktivnosti po protokolu koji je opisan u odeljku 4.5.1.

4.5.7.3. Određivanje pH optimuma celobioza – dehidrogenaze

Kako bi se odredio pH optimum celobioza – dehidrogenaze korišćen je citratno – fosfatni pufer (McIlvaine pufer) u opsegu pH od 2 do 9, pri čemu je kao akceptor elektrona korišćen 0,3 mM DCIP, a kao supstrat 30 mM laktoza. Prilikom izračunavanja enzimske aktivnosti korišćeni su ekstencioni koeficienti za DCIP definisani za različite vrednosti pH iz razloga što je DCIP pH zavisian (tabela 31)⁸⁵.

Tabela 31: Ekstencioni koeficienti za DCIP pri različitim pH vrednostima.

<i>pH vrednosti</i>	<i>Absorbancija, nm</i>	<i>Ekstencioni koeficient, mM⁻¹cm⁻¹</i>
3,0 – 4,5	515	6,8
5,0	535	6,8
5,5	585	8,8
6,0	600	12,7
6,5	600	15,7
7,0	600	16,8
7,5 – 9,0	600	17,7

4.6. Imobilizacija enzima na makroporoznom nosaču

Imobilizacija enzima je rađena na makroporoznom nosaču baziranom na glicidil – metakrilatu i etilen – glikol – dimetakrilatu, koji je prethodno aminovan⁶⁴. Prilikom imobilizacije korišćen je 0,1 g suvog aminovanog polimera koji je suspendovan u 1 mL 0,1 M natrijum – fosfatnom puferu pH 8,0, a potom dezaerisan 10 minuta. Polimer je ispran još dva puta sa istim puferom, a potom inkubiran u 2 mL 2,5% (v/v) glutaraldehidnog rastvora u 0,1 M natrijum – fosfatnom puferu pH 8,0, 2 h na 22°C uz povremeno blago mešanje. Kako bi se uklonio glutaraldehid, polimer je ispran 3 puta sa 5 mL 0,1 M natrijum – fosfatnog pufera pH 7,0, nakon čega je polimer bio spreman za imobilizaciju enzima. Katalaza, 1 mL koncentracije 1

mg/mL (11000 U/mL) je pomešana sa prethodno pripremljenim polimerom i inkubirana 2 dana na 4°C uz povremeno blago mešanje. Nevezana katalaza je uklonjena ispiranjem polimera 2 puta sa 5 mL 1 M NaCl u 50 mM natrijum – acetatnom puferu pH 5,5, nakon čega je polimer inkubiran sa 2 mL 0,1 M etanolamina u 0,1 M natrijum – fosfatnom puferu pH 7,0, 2 h na 22°C kako bi se blokirala sva slobodna protein vezujuća mesta. Polimer sa imobilizovanom katalazom je ispran 2 puta sa 5 mL 0,1 M natrijum – fosfatnog pufera pH 7,0 i finalno resuspendovan u istom puferu i čuvan na 4°C.

4.7. Razvoj fluorescentnog eseja za određivanje aktivnosti celobioza – dehidrogenaze

Fluorescentni esej za određivanje aktivnosti celobioza – dehidrogenaze se bazira na oksidaciji supstrata u prisustvu Fe³⁺ jona i vodonik peroksida. Oksidacijom supstrata, elektroni sa flavinskog domena se prenose na jone gvožđa kao spoljašnji elektron akceptor i nastaje Fe²⁺ koji Fentonovom reakcijom formira hidroksil radikale koji potom interaguju sa aminofenil fluoresceinom. Kao krajnji proizvod nastaje fluorescein, čija fluorescencija predstavlja aktivnost celobioza – dehidrogenaze. Prilikom dizajniranja eseja koristili smo različite koncentracije vodonik peroksida i jona gvožđa što je prikazano u tabeli 32. Korišćen je 0,1 M natrijum – acetatni pufer pH 5,0. Kao supstrat je korišćena 30 mM laktoza. Celobioza – dehidrogenaza je dobijena iz *Pichia pastoris* i korišćen je koncentrovan uzorak, 10 puta razblažen, 100 puta razblažen uzorak enzima. APF ima ekscitaciju na , a emisiju na .

Tabela 32: Različite koncentracije vodonik peroksida i jona gvožđa korišćene prilikom razvoja fluorescentnog eseja.

Fe ²⁺ /Fe ³⁺	0.2 mM	2 mM
H ₂ O ₂	0.2 mM	2 mM

4.8. Proizvodnja laktobionske kiseline

4.8.1. Proizvodnja liziranih ćelijskih zidova sa eksprimiranom celobioza – dehidrogenazom

Ekspresija celobioza – dehidrogenaze, prirodnog oblika enzima, kao i trostrukog mutanta je rađena prema protokolu opisanom u odeljku 4.3.15. Nakon završene ekspresije, dobijene ćelije koje na svojoj površini imaju eksprimiran enzim, kao i prazne ćelije transformisane samo sa pCTCON₂ vektorom, isprane su 3 puta sa 0,1 M natrijum – acetatnim puferom pH 4,5. Ćelije su potom centrifugirane 10 minuta na 3000 obrtaja/min i resuspendovane u dejonizovanoj vodi tako da finalna koncentracija ćelija bude 0,1 g/mL, nakon čega je dodat toluen u finalnoj koncentraciji od 3%. Ćelijska liza je rađena na 25°C uz mešanje na 250 obrtaja/min tokom 24h, nakon čega je liza ćelija prekinuta centrifugiranjem ćelijskih zidova 15 minuta na 3000 obrtaja/min i ispiranjem 3 puta sa 0,1 M natrijum – acetatnim puferom pH 4,5. Dobijeni ćelijski zidovi su finalno resuspendovani u 0,1 M natrijum – acetatnom puferu pH 4,5 tako da finalna koncentracija bude 250 mg/mL.

4.8.2. Proizvodnja liziranih ćelijskih zidova sa eksprimiranom lakazom⁸

Ekspresija lakaze je rađena prema protokolu opisanom u odeljku 4.3.15. Nakon završene ekspresije, dobijene ćelije koje na svojoj površini imaju eksprimiran enzim isprane su 3 puta sa 0,1 M natrijum – acetatnim puferom pH 4,5. Ćelije su potom centrifugirane 10 minuta na 3000 obrtaja/min i resuspendovane u dejonizovanoj vodi tako da finalna koncentracija ćelija bude 0,1 g/mL, nakon čega je dodat toluen u finalnoj koncentraciji od 3%. Ćelijska liza je rađena na 25°C uz mešanje na 250 obrtaja/min tokom 24 h, nakon čega je liza ćelija prekinuta

⁸ Korišćeni protokol je dobijen od koleginice Nikoline Popović i predstavlja sastavni deo njene doktorske disertacije. Ovde je korišćeno samo kao sastavni deo proizvodnje laktobionske kiseline.

centrifugiranjem ćelijskih zidova 15 minuta na 3000 obrtaja/min i ispiranjem 3 puta sa 0,1 M natrijum – acetatnim puferom pH 4,5. Dobijeni ćelijski zidovi su finalno resuspendovani u 0,1 M natrijum – acetatnom puferu pH 4,5 tako da finalna koncentracija bude 250 mg/mL.

4.8.3. Detekcija aktivnosti celobioza – dehidrogenaze eksprimirane na liziranim ćelijskim zidovima

Merenje enzimske aktivnosti celobioza – dehidrogenaze eksprimirane na ćelijskim zidovima kvasca, koji su potom lizirani u prisustvu 3% toluena je rađeno u 1 mL reakcionoj smeši, koja sadrži 100 µL liziranih ćelijskih zidova i 900 µL rastvora za merenje aktivnosti (0,1 M natrijum – acetatni pufer pH 4,5, 0,3 mM DCIP, 30 mM laktozu). Ćelijski zidovi su pre svakog merenja centrifugirani 30 sekundi na 13000 obrtaja/min i 200 µL supernatanta iznad ćelijskih zidova je analizirano merenjem absorbance na 540 nm. Nakon svakog merenja, supernatant je vraćen u reakcionu smešu i ćelije su vorteksovane. Enzimska aktivnost je merena na 10 minuta tokom 30 minuta.

4.8.4. Detekcija aktivnosti lakaze eksprimirane na liziranim ćelijskim zidovima⁹

Merenje enzimske aktivnosti lakaze eksprimirane na ćelijskim zidovima kvasca, koji su potom lizirani u prisustvu 3% toluena je rađeno u 2 mL reakcionoj smeši, koja sadrži 13 µL liziranih ćelijskih zidova i 200 µL 20 mM CuCl₂, 700 µL 20 mM ABTS u 1087 µL 0,1 M natrijum – acetatnog pufera pH 4,5. Odmah nakon mešanja, 200 µL reakcione smeše je prebačeno u mikrotitar pločicu i praćena je promena absorbance na 405 nm na 2 minuta tokom 15 minuta.

⁹ Korišćeni protokol je dobijen od koleginice Nikoline Popović i predstavlja sastavni deo njene doktorske disertacije. Ovde je korišćeno samo kao sastavni deo proizvodnje laktobionske kiseline.

4.8.5. Detekcija produkovane laktobionske kiseline

Proizvodnja laktobionske kiseline je rađena u 20 mL reakcionoj zapremini i korišćen je 10 mM natrijum – acetatni pufer pH 4,5, 200 mM laktoze i 0,6 mM DCIP. Reakcije su postavljene sa eksprimiranom celobioza – dehidrogenazom i lakazom na ćelijskim zidovima, celobioza – dehidrogenazom na ćelijskim zidovima i komercijalnom lakazom (0,94 U/mg) kao i sa celobioza – dehidrogenazom dobijenom iz *Pichia pastoris* i liofilizovanom (3,1 U/mg) i komercijalnom lakazom. Detekcija produkovane laktobionske kiseline je praćena tokom vremena merenjem pH vrednosti reakcione smeše, a količina produkovane laktobionske kiseline je određena titracijom sa 0,1 M natrijum hidroksidom.

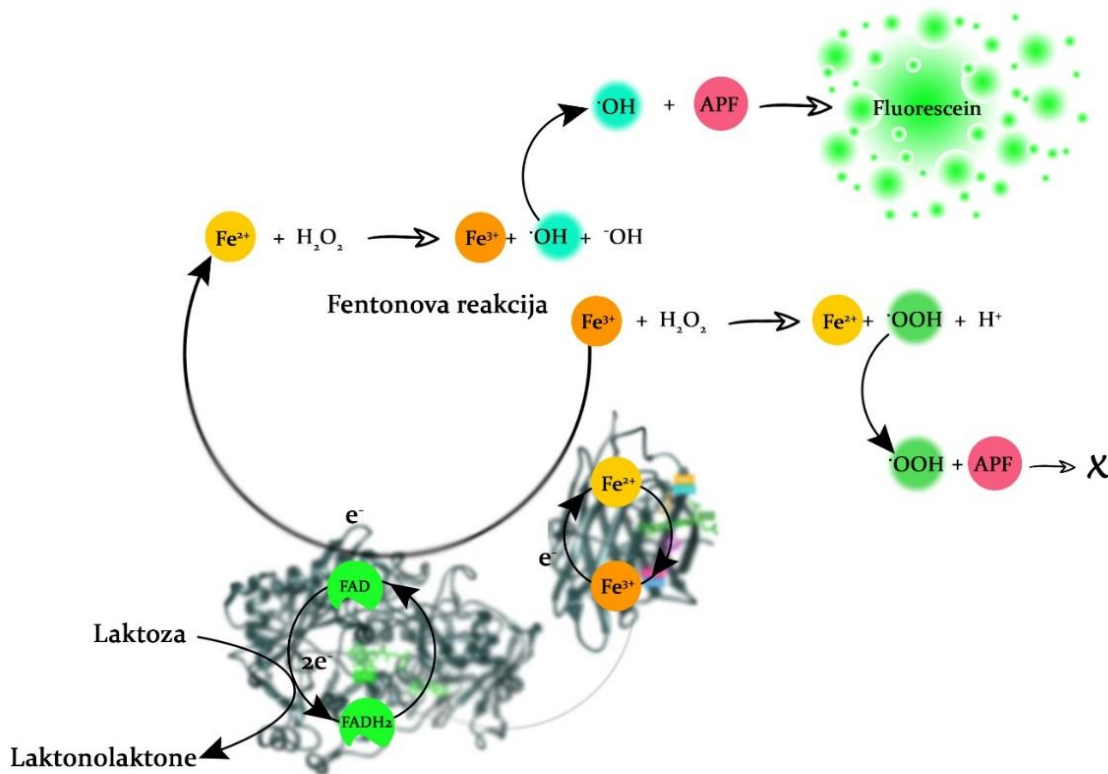
5. Rezultati i diskusija

5.1. Razvoj i optimizacija fluorescentnog eseja za pretraživanje biblioteke mutanata celobioza – dehidrogenaze

Posredstvom celobioza – dehidrogenaze dolazi do oksidacije supstrata, koji mogu biti laktoza, celobioza ili njima slične šećerne komponente do odgovarajućih laktona, a potom dolazi do njihove sponatne hidrolize i do nastanka aldonske kiseline. Pored oksidacije supstrata, celobioza – dehidrogenaza simultano vrši i redukciju dvoelektronskih ili jednoelektronski akceptora elektrona. Prilikom merenja enzimske aktivnosti, uglavnom se koristi DCIP kao dvoelektronski akceptor elektrona, dok jedan od jednoelektronski akceptora elektrona je uoravo Fe^{3+} , čijom redukcijom u prisustvu vodonik peroksida posredstvom Fentonove reakcije dolazi do formiranja hidroksil radikala ($\bullet OH$), koji potom u reakciji sa 3' – (p – aminofenil) – fluoresceinom (APF) katalizuje oslobađanje fluoresceina. Upravo ova sposobnost celobioza – dehidrogenaze je iskorišćena prilikom razvoja i optimizacije fluorescentnog eseja za visoko efikasnu pretragu biblioteka mutiranih varijanti enzima eksprimiranih na površini ćelija kvasca.

Celobioza – dehidrogenaza u prisustvu supstrata, u ovom slučaju laktoze, Fe^{3+} jona kao i vodonik peroksida, katalizuje redukciju gvođa do Fe^{2+} jona koji dovodi do stvaranja hidroksil radikala posredstvom Fentonove reakcije. U prisustvu APF, hidroksi radikal dobijen Fentonovom reakcijom, interaguje sa APF – om usled čega dolazi do kreiranja fluoresceina čiju fluorescenciju detektujemo i koja ukazuje na efikasnost enzima odnosno predstavlja proporcionalno aktivnost celobioza – dehidrogenaze. Pozitivna kontrola se bazira na prisustvu Fe^{2+} jona i vodonik peroksida u odsustvu enzima, pri čemu dolazi do formiranja hidroksil radikala, a samim tim i do njegove interakcije sa APF – om i formiranja fluorescentnog proizvoda. U odsustvu enzima, a u prisustvu Fe^{3+} jona, vodonik peroksida i supstrata,

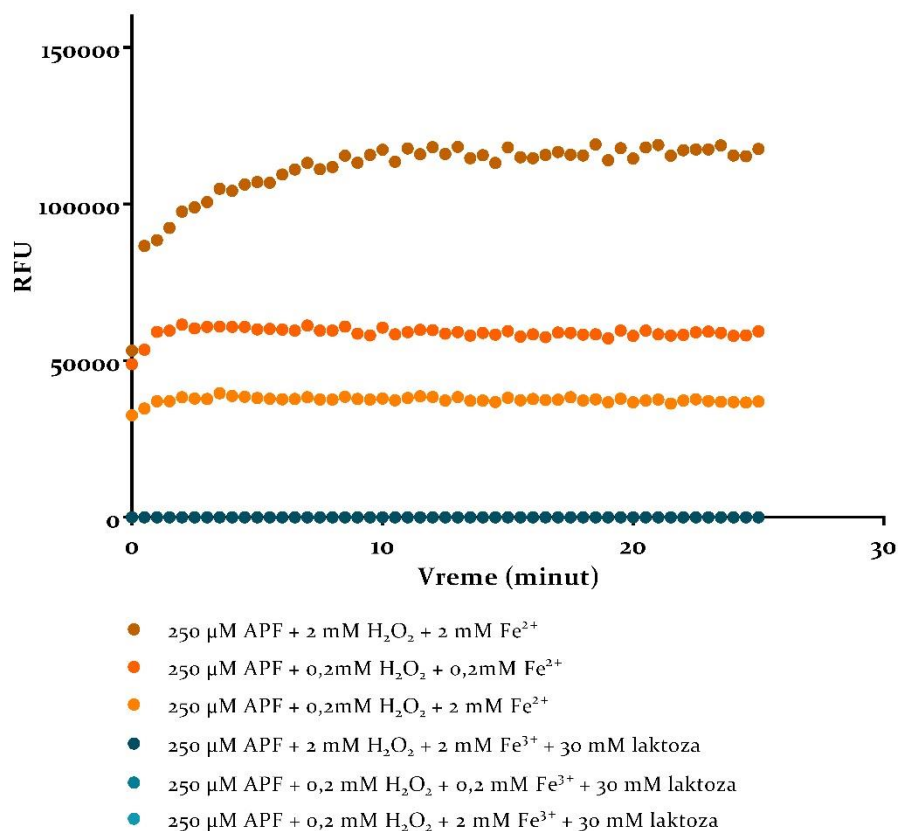
dolazi do formiranja superoksid radikala ($\cdot\text{OOH}$) koji ne interaguje sa APF i ne dolazi do formiranja fluoresceina, a samim tim ne dolazi do detekcije fluorescencije što ujedno predstavlja negativnu kontrolu (Slika 15).



Slika 15: Šematski prikaz fluorescentnog esaja baziranog na oksidaciji laktoze dejstvom celobioza – dehidrogenaze i redukciji Fe^{3+} jona koji u prisustvu vodonik peroksida posredstvom Fentonove reakcije katalizuju formiranje hidroksil radikala.

Fentonovom reakcijom, Fe^{3+} joni redukovani do Fe^{2+} jona u prisustvu vodonik peroksida, ponovo bivaju oksidovani do Fe^{3+} jona, usled čega prilikom dizajniranja fluorescentnog esaja veoma je bitan odnos molski odnos jona gvožđa i vodonik peroksida u reakcionoj smeši. Upravo zbog konstantne reoksidacije jona gvožđa, a zbog neprestanog trošenja vodonik peroksida prvi od koraka prilikom dizajniranja fluorescentnog esaja jeste uspostaviti odgovarajući molski odnos jona gvožđa i vodonik peroksida. Testirani su uslovi pri kojima je molski odnos identičan kao i

kada ima 10 puta više jona gvožđa u odnosu na vodonik peroksida. Postavljene su pozitivne kontrole, kao i kontrole bez enzima (Slika 16).

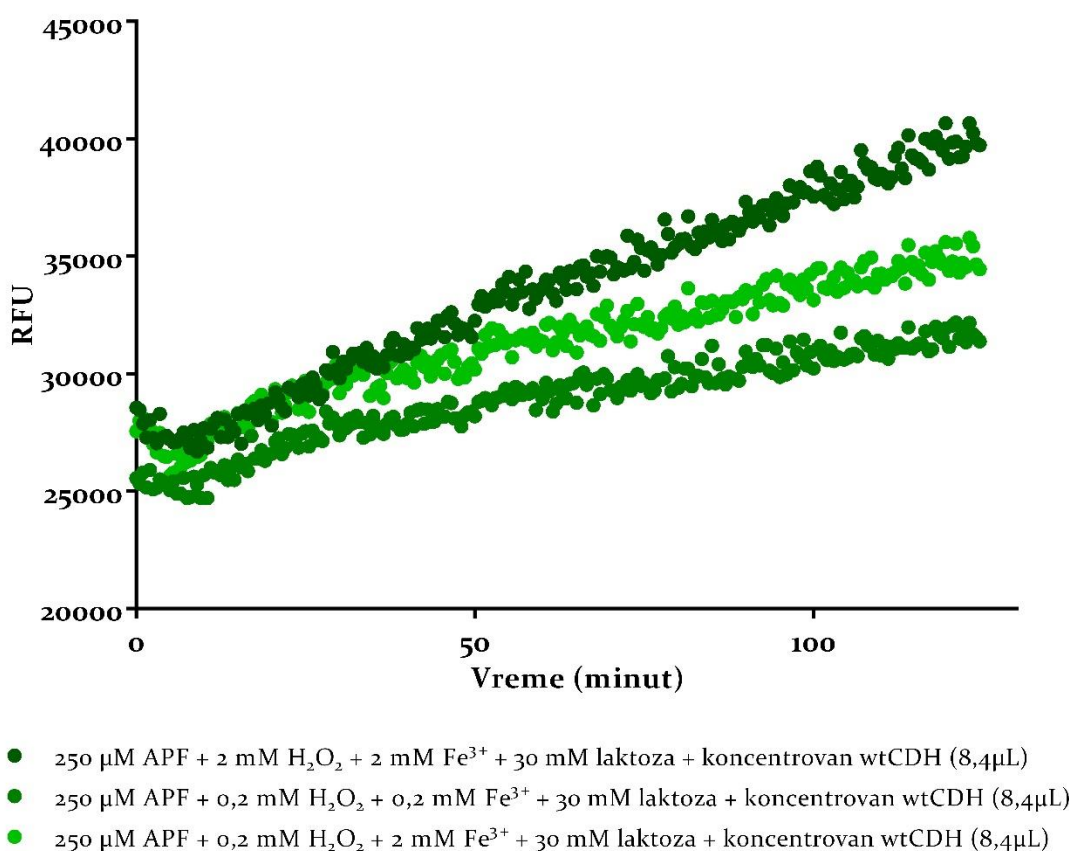


Slika 16: Prikaz promene fluorescencije u vremenu pri različitim odnosima molskih koncentracija jona gvožđa i vodonik peroksida za pozitivnu kontrolu i kontrolu bez enzima.

Primećuje se da prilikom upotrebe 2 mM koncentracije vodonik peroksida i Fe^{2+} jona dolazi do detekcije najvećeg stepena fluorescencije koja raste u vremenu, dok pri 0,2 mM koncentracijama za vodonik peroksid i jone gvožđa, fluorescencija se ne menja značajno u vremenu i primećuje se da je reakcija bila veoma brza i da je maksimum fluorescencije dostignut odmah na početku merenja. Najmanja fluorescencija je detektovana prilikom upotrebe 10 puta veće koncentracije gvožđa u odnosu na vodonik peroksid i uočeno je da se odmah na početku dostiže maksimum fluorescencije koji se ne menja se tokom vremena. Kontrole bez enzima nisu

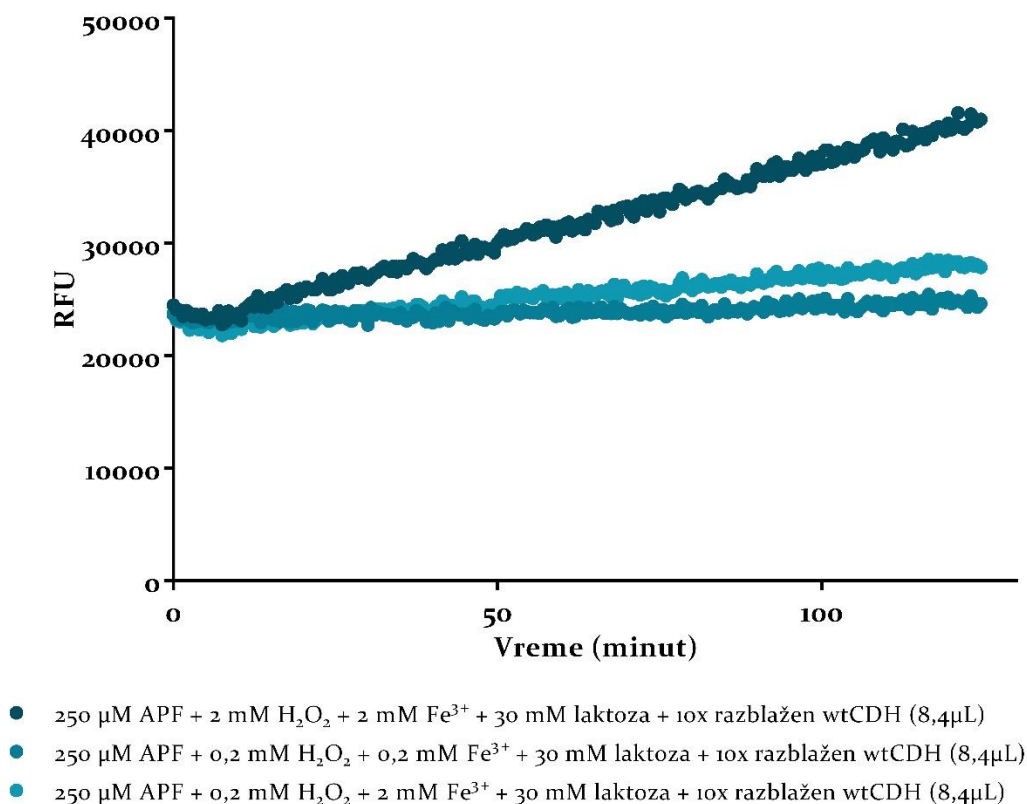
pokazivale fluorescenciju, što ukazuje da u odsustvu enzima ne dolazi do redukcije Fe^{3+} jona, a samim tim i do proizvodnje hidroksil radikala.

Zajedno sa analiziranjem odgovarajućih koncentracija za vodonik peroksid i jone gvožđa, analizirana je i koncentracija dodatog enzima u reakcionu smešu. Prilikom uspostavljanja fluorescentnog eseja korišćena je rekombinantni prirodni oblik celobioza – dehidrogenaze (wtCDH) produkovane u kvascu *Pichia pastoris*, a analiziran je koncentrovan uzorak (Slika 17), zatim koncentrovan uzorak razblažen 10 puta (Slika 18) i 100 puta (Slika 19).



Slika 17: Prikaz promene fluorescencije u vremenu pri različitim odnosima molskih koncentracija jona gvožđa i vodonik peroksida i prilikom upotrebe koncentrovanog wtCDH produkovanog u *Pichia pastoris*.

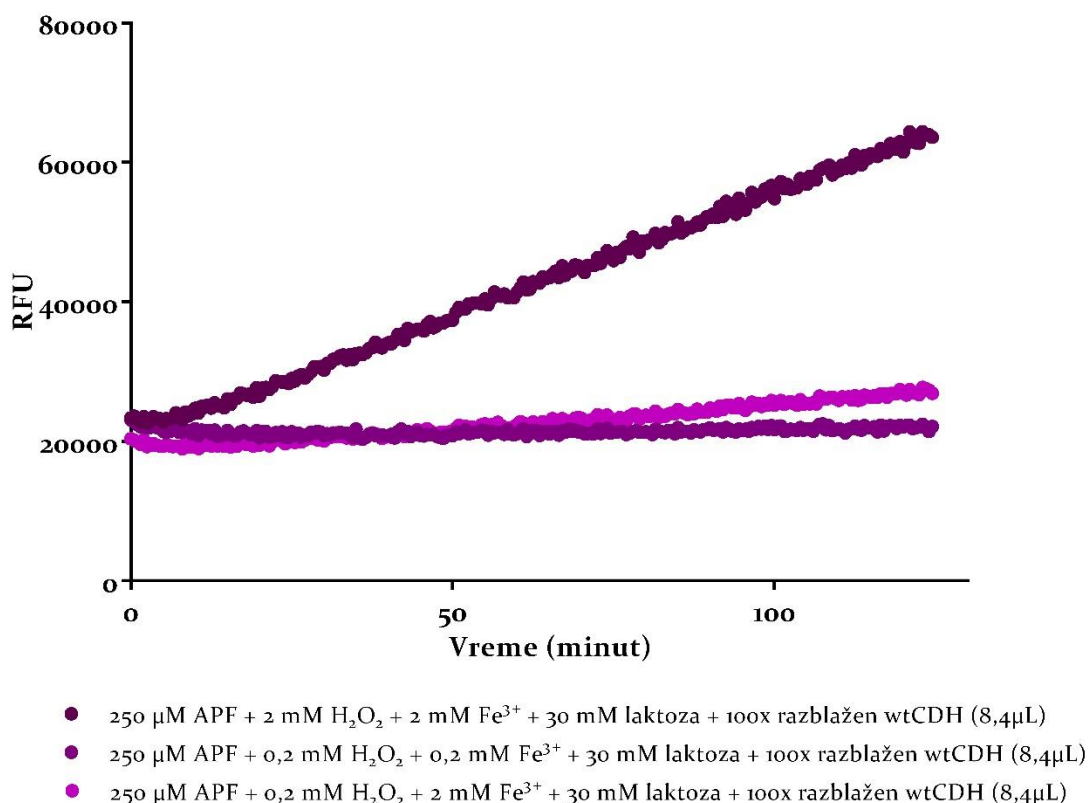
Upotrebom koncentrovanog enzima pri različitim koncentracijama vodonik peroksida i Fe^{3+} jona, primećujemo da sve tri reakcije pokazuju veoma sličan profil, kao i da prilikom upotrebe 2 mM koncentracija vodonik peroksida i Fe^{3+} jona dolazi do detekcije najveće fluorescencije.



Slika 18: Prikaz promene fluorescencije u vremenu pri različitim odnosima moljskih koncentracija jona gvožđa i vodonik peroksida i prilikom upotrebe koncentrovanog wtCDH produkovanog u *Pichia pastoris* koji je razblažen 10 puta.

Razblaženjem koncentrovanog enzima, uočava se da u uzorcima gde je korišćena 0,2 mM koncentracija vodonik peroksida i Fe^{3+} jona, kao i u reakcijama gde je korišćeno 10 puta više Fe^{3+} jona u odnosu na vodonik peroksid, ne dolazi do velike promene u fluorescenciji u odnosu na detektovanu fluorescenciju koncentrovanog uzorka, ali i tokom vremena ne dolazi do rasta fluorescencije.

Međutim, uočava se da prilikom upotrebe 2 mM vodonik peroksida i Fe^{3+} jona, dolazi do značajnog povećanja fluorescencije sa 10 puta razblaženim uzorkom u odnosu na koncentrovan uzorak, što može da ukaže da je razblaženjem došlo do smanjenja koncentracije potencijalno ometajućih jedinjenja koja se nalaze u koncentrovanom uzorku.



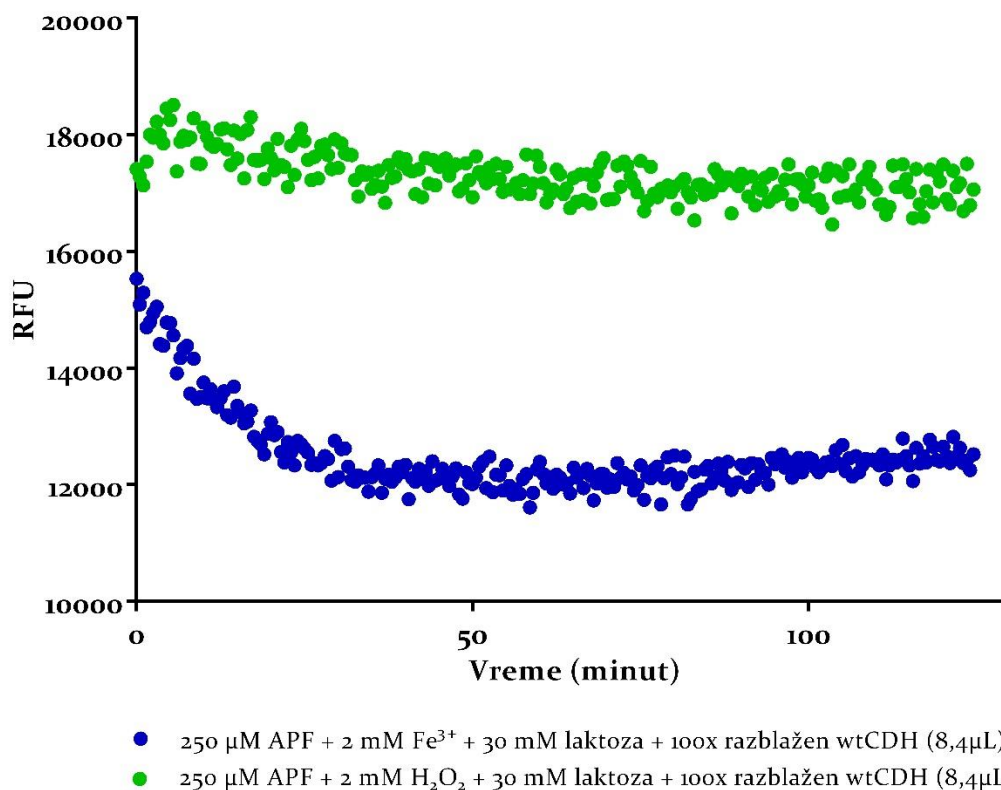
Slika 19: Prikaz promene fluorescencije u vremenu pri različitim odnosima molskih koncentracija jona gvožđa i vodonik peroksida i prilikom upotrebe koncentrovanog wtCDH produkovanog u *Pichia pastoris* koji je razblažen 100 puta.

Dodatnim razblaženjem enzima u prisustvu 2 mM vodonik peroksida i Fe^{3+} jona, primećuje se da dolazi do značajnog povećanja fluorescencije u odnosu na prethodna merenja gde je korišćen koncentrovan kao i 10 puta razblažen uzorak. Međutim, razblaženjem enzima u prisustvu 0,2 mM koncentracija vodonik peroksida

i jona gvožđa, kao i u prisustvu 10 puta veće koncentracije gvožđa u odnosu na vodonik peroksid, ne dolazi do promene fluorescencije u odnosu na prethodna merenja.

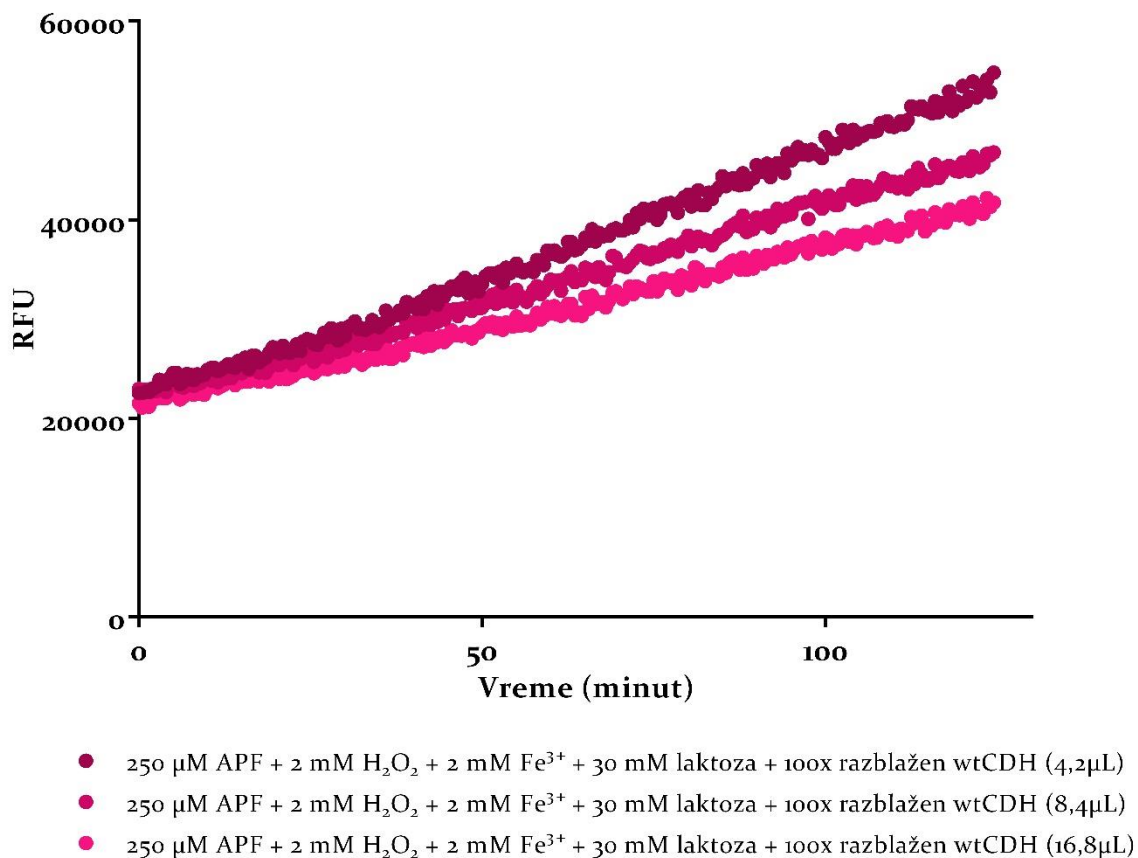
Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da se upotrebom 2 mM koncentracije vodonik peroksida i Fe^{3+} jona u prisustvu koncentrovane celobioza – dehidrogenaze razblažene 100 puta, dobija najveći stepen fluorescencije, što je potom iskorišćeno u daljim istraživanjima.

U odsustvu bilo 2 mM vodonik peroksida, bilo 2 mM Fe^{3+} , a u prisustvu enzima ne dolazi do promene fluorescencije, već je detektovana bazična fluorescencija (Slika 20).



Slika 20: Prikaz promene fluorescencije u vremenu u odsustvu 2 mM vodonik peroksida odnosno u odsustvu 2 mM Fe³⁺ jona prilikom upotrebe koncentrovanog wtCDH produkovanog u *Pichia pastoris* koji je razblažen 100 puta.

S'obzirom da je primećeno da upotrebom koncentrovanog enzima koji je razblažen 100 puta dolazi do detekcije najvećeg stepena fluorescencije u prisustvu 2 mM vodonik peroksida i gvožđa, ispitana je i zapremina dodatog enzima u reakcionu smešu (Slika 21).



Slika 21: Prikaz promene fluorescencije u vremenu u prisustvu 2 mM vodonik peroksida i 2 mM Fe^{3+} jona prilikom upotrebe različitih zapremina koncentrovanog prirodnog oblika enzima produkovanog u *Pichia pastoris* koji je razblažen 100 puta.

Upotrebom različitih zapremina enzima u reakcionoj smeši, pokazano je da u zavisnosti od dodate zapremine, ne dolazi do detekcije različitog stepena fluorescencije i da je u sva tri slučaja pokazan isti profil.

5.2. Ekspresija celobioza – dehidrogenaze na površini ćelija kvasca

Kako bi se kreirale različite mutirane varijante enzima, uglavnom se koriste neke od tehnika proteinskog inženjeringa poput dirigovane evolucije, koja podrazumeva uvođenje nasumičnih mutacija u prirodni oblik gena enzima upotrebom *error – prone* PCR. Nakon svakog ciklusa i selekcije dobijenih varijanti enzima, postupak uvođenja mutacija se ponavlja sve dok se ne dobije enzim koji poseduje željene osobine^{155, 156}. Upravo zbog svojih osobina dirigovana evolucija je postala jedna od najrasprostranjenijih i najkorišćenijih tehnika molekularne biotehnologije. Kako bi se mutirani geni eksprimirali uglavnom se koriste ekspresioni sistemi poput *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae* upravo zbog svoje velike efikasnosti transformacije koja je neophodna kako bi se kreirale velike biblioteke gena^{155, 197, 201}.

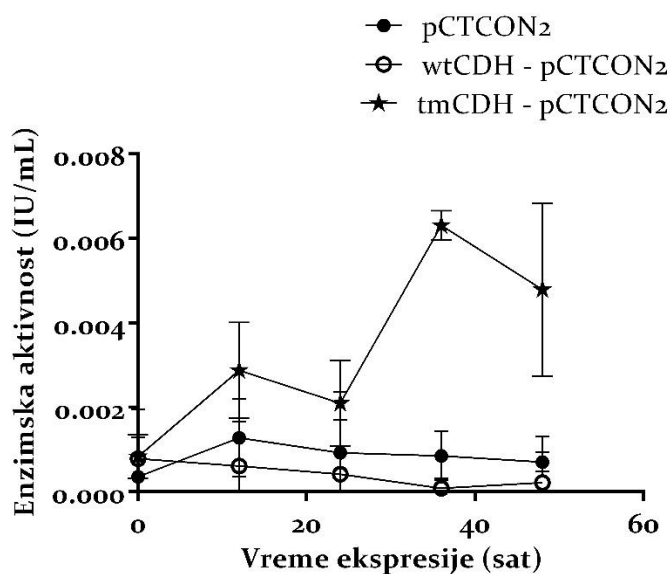
5.2.1. Kloniranje prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze u pCTCON₂ vektor i kreiranje *error – prone* biblioteke mutanata

Gen za celobioza – dehidrogenazu iz gljive bele truleži *Phanerochaete chrysosporium* je sintetisan i kloniran u pUC57 vektor od strane GenScript kompanije (SAD), prema nukleotidnoj sekvenci zrelog proteina CDH koja je dostupna u nukleotidnoj bazi podataka (NCBI) pod rednim brojem U46081.1. Gen je potom upotrebom odgovarajućih prajmera za kloniranje celobioza – dehidrogenaze u pCTCON₂ vektor, umnožen i kloniran u vektor, što je provereno DNK elektroforezom, a kasnije i sekvenciranjem dobijenog konstrukta.

Nakon uspešno kloniranog prirodnog oblika gena celobioza – dehidrogenaze u pCTCON₂ vektor, kreirane su *error – prone* biblioteke mutanata prema protokolu opisanom u odeljku 4.3.4. nakon čega je urađena transformacija kompetentnih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soj.

5.2.2. Ekspresija *error* – *prone* varijanti celobioza – dehidrogenaze i prirodnog oblika enzima na površini ćelija kvasca

Pojedinačne kolonije dobijene nakon transformacije kompetentnih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 soja potom su korišćene za ekspresiju prirodnog oblika enzima kao i *error* – *prone* varijanti enzima kako bi se detektovala aktivnost celobioza – dehidrogenaze eksprimirane na površini ćelija kvasca kao himerni protein sa Agaz proteinom. Analiziran je veliki broj kolonija od kojih je samo jedna varijanta enzima pokazivala aktivnost na površini ćelija kvasca. Uporedo sa mutiranom varijantom enzima, rađena je i ekspresija prirodnog oblika enzima koji ne pokazuje aktivnost na površini ćelija kvasca (Slika 22).

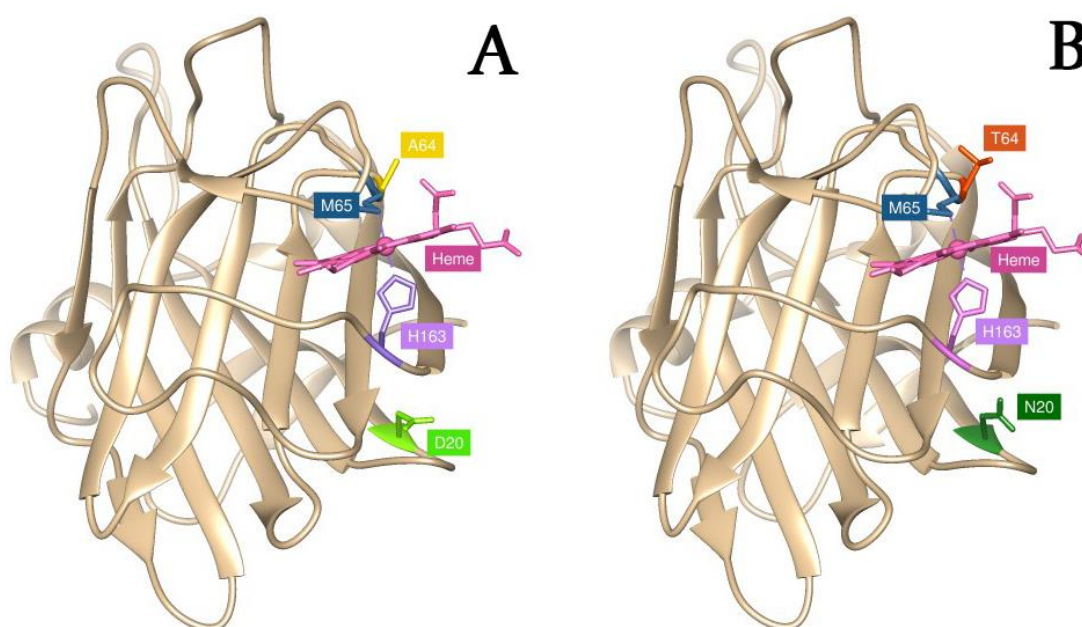


Slika 22: Merenje enzimske aktivnosti celobioza – dehidrogenaze trostrukog mutanta i prirodnog oblika enzima eksprimiranih na površini ćelija kvasca.

Uočava se da wtCDH ne pokazuje aktivnost, dok dobijeni mutant pokazuje da prilikom indukcije ekspresije u prisustvu galaktoze dolazi do najvećeg stepena ekspresije, a samim tim i do detekcije najveće enzimske aktivnosti nakon 36 sati od početka ekspresije. Prilikom merenja enzimske aktivnosti, ćelije kvasca sa

ekspimiranim enzimom su isprane 3 puta sa 0,1 M natrijum – acetatnim puferom pH 4,5, kako bi se uklonili svi tragovi fermentacionog medijuma.

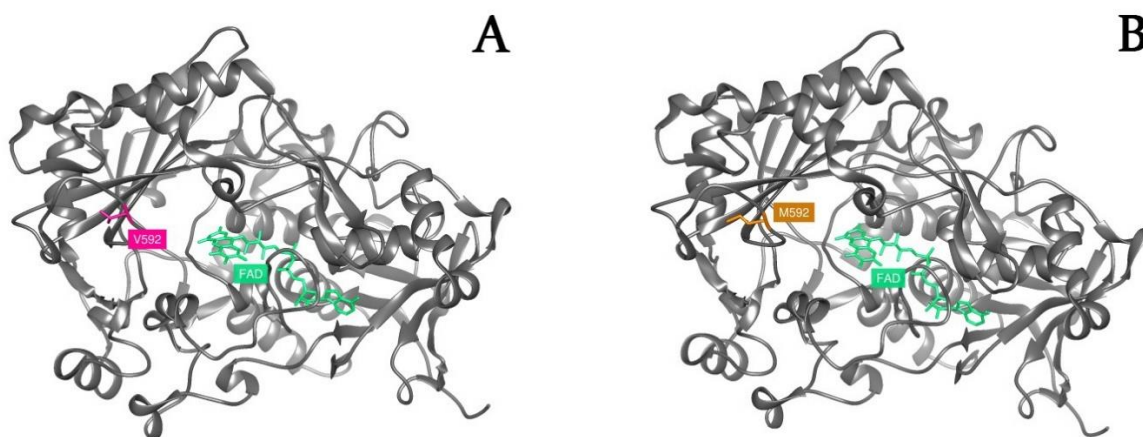
Nakon detektovane celobioza – dehidrogenazne aktivnosti na površini ćelija kvasca, kolonija koja je pokazivala aktivnost je selektovana i izolovan je plazmid koji je potom poslat na sekvenciranje. Rezultati sekvenciranja su pokazali da je došlo do mutacija na pozicijama D20N, A64T unutar citohrom domena (Slika 23) i na poziciji V592M unutar flavinskog domena (Slika 24).



Slika 22: Prikaz strukture citohrom domena trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze¹⁰ sa obeleženim amino kiselinama na pozicijama na kojima je došlo do uvođenja mutacija kao i plavo obeležen M65 i ljubičasto H163 koji učestvuju u koordinaciji Fe iz hema: (A) prirodan oblik enzima gde je, žuto je obeležen A64, a zeleno D20; (B) mutirana forma enzima gde je cigla narandžasto obeležena mutacija T64 i tamno zeleno obeležena mutacija N20.

¹⁰ Struktura citohrom domena je konstruisana upotrebom PDB fajla 1D7C. Za kreiranje strukture i obeležavanje amino kiselinskih ostataka i kofaktora korišćen je UCSF Chimera program.

Primećuje se da obe mutacije do kojih je došlo unutar citohrom domena se nalaze na površini domena, ali i da se nalaze u neposrednoj blizini hema. Metionin 65 očestvuje u koordinaciji gvožđa unutar hema, dok je *error – prone* bibliotekom dobijena mutacija na poziciji 64 gde je alanin prešao u treonin. S' obzirom da je do mutacije došlo u neposrednoj blizini metionina koji učestvuje u koordinaciji hema, ukazuje na veliku važnost tog regiona u aktivnosti samog enzima. Mutacija asparaginske kiseline na poziciji 20 unutar citohrom domen u asparagin koji se nalazi na površini domena, verovatno ima uticaj na naelektrisanje citohrom domena, a samim tim i na elektrostatičko privlačenje dva domena i blizinu katalitički aktivnog mesta hemu unutar citohrom domena.



Slika 24: Prikaz strukture flavinskog domena trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze¹¹ sa obeleženim amino kiselinama na pozicijama na kojima je došlo do uvođenja mutacija kao i tirkizno obeležen FAD: (A) prirodnog oblika enzima gde je, roze je obeležen V592; (B) mutirana forma enzima gde je svetlo braon obeležena mutacija M592.

Na slici 24, prikazana je treća mutacija unutar trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze koja je locirana u flavinskom domenu i nalazi se na spoljašnjosti domena, a opet u neposrednoj blizini katalitički aktivnog mesta.

¹¹ Struktura citohrom domena je konstruisana upotrebom PDB fajla 1KDG. Za kreiranje strukture i obeležavanje amino kiselinskih ostataka i kofaktora korišćen je UCSF Chimera program.

Dobijeni trostruki mutant je dalje korišćen u okviru naše istraživačke grupe od strane doktoranta Marije Blažić, kao templat u narednoj rundi *error – prone* PCR reakcija kako bi se dobili mutanti koji poseduju poboljšane osobine u odnosu na trostrukog mutanta i kako bi potencijalno našli primenu u dizajniranju biosenzora i biogorivnih ćelija.

5.2.3. Ekspresija trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze sa zelenim fluorescentnim enzimom na površini ćelija kvasca

Dobijeni trostruki mutant celobioza – dehidrogenaze je potom kloniran u pCTCON₂ konstrukt u koji je prethodno kloniran gen za zeleni fluorescentni protein. Ekspresijom himernih proteina na površini ćelije kvasca nije detektovana aktivnost celobioza – dehidrogenaze, ali smo uspeali da detektujemo fluorescenciju zelenog fluorescentnog proteina. Razlog zašto nije detektovana aktivnost celobioza – dehidrogenaze nije poznat iako je dokazano da ekspresijom proteina sa zelenim fluorescentnim proteinom ne dolazi do ometanja njihove aktivnosti, već da može doći samo do smanjenja enzimske aktivnosti²⁰² usled konformacionih ograničenja enzima i dostupnosti supstrata. Na primeru glukoza – oksidaze eksprimirane na površini kvasca kao himere sa zelenim fluorescentnim proteinom uočava se smanjenje enzimske aktivnosti u odnosu na glukoza – oksidazu eksprimiranu u odsustvu zelenog fluorescentnog proteina²⁰³. S' obzirom da prirodni oblik celobioza – dehidrogenaza ne pokazuje aktivnost na površini ćelija kvasca, dok trostruki mutant pokazuje aktivnost koja nakon 36 h ekspresije iznosi oko 0,006 IU/mL, što je veoma mala enzimska aktivnost, ne čudi da u prisustvu zelenog fluorescentnog proteina ne dolazi do detekcije aktivnost celobioza – dehidrogenaze.

5.3. Semi – racionalni dizajn celobioza – dehidrogenaze u cilju povećanja oksidativne stabilnosti

Veoma važnu ulogu prilikom odabira i selekcije proteina za upotrebu i dizajn biogorivnih ćelija ili biosenzora igra upravo njihova stabilnost u prisustvu reaktivnih kiseoničnih vrsta. Iako do destabilizacije proteina može doći u prisustvu različitih hemijskih agenasa, usled čega dolazi do denaturacije ali i do inaktivacije ili delimičnog smanjenja enzimske aktivnosti, reaktivne kiseonične vrste se smatraju agensima koji najviše doprinose destabilizaciji proteina. U prisustvu reaktivnih kiseoničnih vrsta, poput vodonik peroksida, dolazi do oksidacije amino kiselinskih ostataka poput metionina, cisteina, tirozina i triptofana¹⁹³.

Nasuprot ostalim amino kiselina koje podležu oksidaciji, metioninski ostaci su najosetljiviji čak i prisustvu veoma mali koncentracija oksidativnog agensa. Oksidacijom metionina dolazi do njegove konverzije u metionin sulfoksid. Stoga metioninski ostaci koji se nalaze u blizini aktivnog mesta kao i oni koji se nalaze na samoj površini enzima imaju najveći uticaj na oksidativnu stabilnost enzima u prisustvu nekog od oksidativnih agenasa, odnosno u prisustvu vodonik peroksida¹⁹⁴.

5.3.1. Odabir i selekcija metionininskih ostataka celobioza – dehidrogenaze

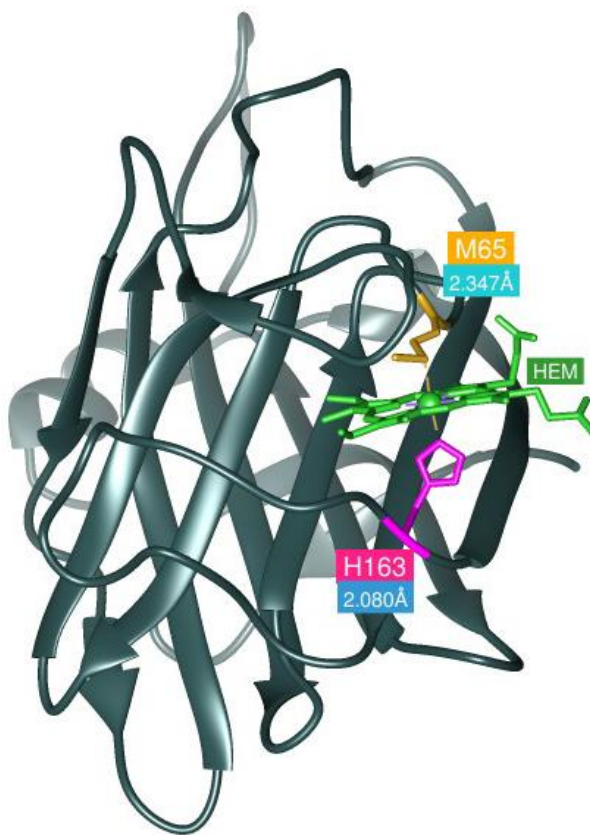
Celobioza - dehidrogenaza poseduje ukupno 7 metionina, od kojih je 6 metionina smešteno unutar flavinskog domena, dok se jedan metionin nalazi unutar citohrom domena i zajedno sa histidinom 163 učestvuje u koordinaciji gvožđa unutar hema⁸⁵. Zamenom metionina na poziciji 65, koji se nalazi unutar citohrom domena i učestvuje u koordinaciji gvožđa, nekom od 20 amino kiselina, može doći do narušavanja strukture hema odnosno do slabijeg vezivanja gvožđa ili do njegovog potpunog gubitka.

Istraživanja su pokazala da zamenom M65 sa alaninom dolazi do zadržavanja hema, a pretpostavlja se da je razlog upravo koordinacija hema sa histidinom na poziciji 163 što ujedno dovodi i do zadržavanja aktivnosti celobioza – dehidrogenaze⁸⁹. Mutacijom metionina na poziciji 65 u serin pokazano je da dolazi do povećanja aktivnosti ali i do povećane proizvodnje vodonik peroksida u odnosu na prirodni oblik enzima¹⁹⁵.

Unutar flavinskog domena se nalazi katalitički aktivno mesto i supstrat vezujuće mesto, a poznato je da flavinski domen ima sposobnost da katalizuje redukciju kako jednoelektronskih tako i dvoelektronski akceptora elektrona, zbog čega ima sposobnost da funkcioniše nezavisno od citohrom domena i da zadrži celokupnu enzimsku aktivnost.

Uočeno je da ekspresijom flavinskog domena u odsustvu hem domena, dolazi do povećane enzimске aktivnosti ukoliko se koristi DCIP kao akceptor elektrona⁸³. Flavinski domen može direktno da prebacuje elektrone na jednoelektronske ili dvoelektronske akceptore elektrona nakon oksidacije supstrata, a može i da elektrone prebacuje na citohrom domen odakle se transferuju na neki od jednoelektronskih akceptora elektrona. Smatra se da transfer elektrona sa flavinskog na citohrom domen može da bude limitirajući po pitanju brzine enzimске reakcije u zavisnosti od pH na kom se reakcija odvija i samim tim u zavisnosti međusobnog položaja domena.

S' obzirom na činjenicu da mutacije metionina na poziciji 65 unutar citohrom domena mogu da dovedu do destabilizacije strukture samog domena i do njegove inaktivacije, upotrebom saturacione mutageneze kreirana je biblioteka mutanata celobioza – dehidrogenaze na poziciji M65 (Slika 25).



Slika 235: Prikaz strukture citohrom domena celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium*¹² sa obeleženim metioninom na poziciji 65 (zlatno) i histidinom 163 (ljubičasto) koji učestvuju u koordinaciji gvožđa unutar hema (tamno zeleno); udaljenost M65 od gvožđa unutar hema iznosi 2,347 Å, a udaljenost H163 iznosi 2,080 Å.

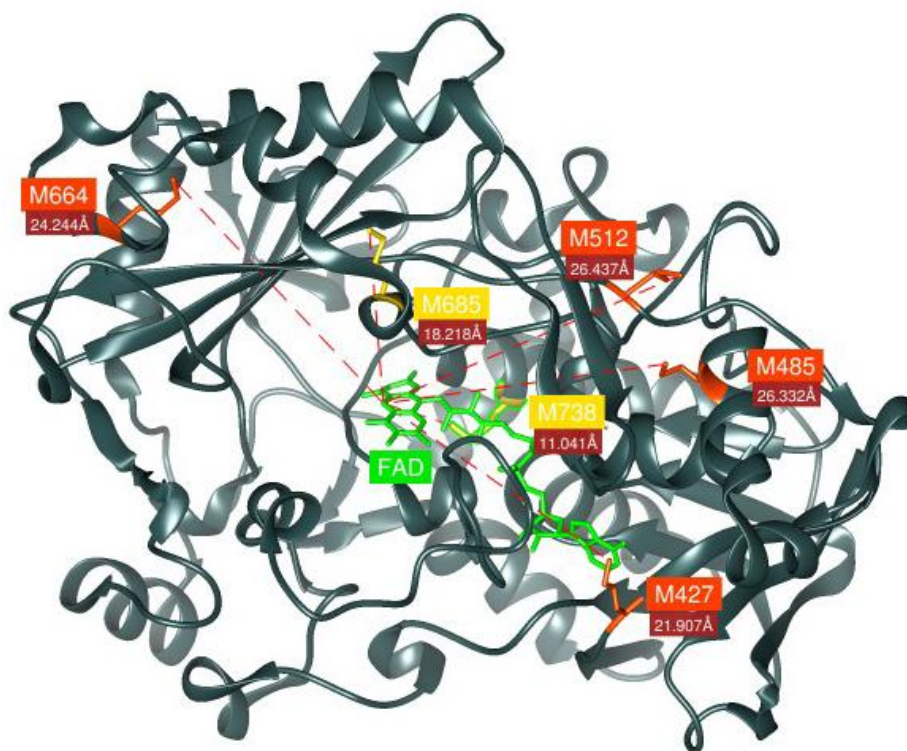
Flavinski domen poseduje 6 metionina na pozicijama 427, 485, 512, 664, 685, 738 od kojih M685 i M738 su pozicionirani tako da su najmanje udaljeni od N5 atoma flavinskog prstena (Tabela 33).

¹² Struktura citohrom domena je konstruisana upotrebom PDB fajla 1D7C. Za kreiranje strukture i obeležavanje amino kiselinskih ostataka i kofaktora korišćen je UCSF Chimera program.

Tabela 33: Udaljenost metioninskih ostataka (S atom) unutar flavinskog domena od N5 atoma FAD koji se nalazi unutar katalitički aktivnog mesta.

Metioninski ostatak	Udaljenost [Å]
M427	21,9
M485	26,3
M512	26,4
M664	24,2
M685	18,2
M738	11,0

Metionini na pozicijama 685 i 738 su upravo zbog svoje blizine u odnosu na FAD, a samim tim i u odnosu na katalitički aktivno mesto, predstavljaju potencijalna mesta oksidacije u prisustvu vodonik peroksida (Slika 26). Oksidacija ovih amino kiselina može imati veliki uticaj na aktivnost i stabilnost samog enzima, zbog čega su ova mesta iskorišćena za kreiranje saturacionih biblioteka.



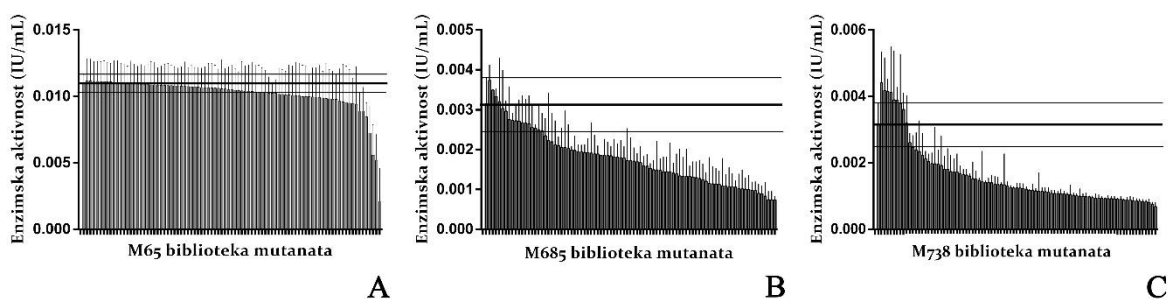
Slika 24: Prikaz strukture flavinskog domena celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium*¹³ sa obeleženim metioninima unutar domena; M427, M485, M512, M664 su obeleženi narandžasto, dok su M685 i M738 obeleženi žuto; FAD je obeležen svetlo zeleno; udaljenost svakog metioninskog ostatka je prikazana ispod svakog metionina.

5.3.2. Pretraživanje saturacionih biblioteka celobioza – dehidrogenaze

Nakon selekcije metioninskih ostataka i kreiranja saturacionih biblioteka, dobijenim plazmidima transformisane su kompetentne ćelije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* InvSci soja. Analiza saturacionih biblioteka je rađena u mikrotitar pločicama (96 bunara), inokulisanjem pojedinačnih kolonija i ekstracelularnom ekspresijom enzima.

¹³ Struktura citohrom domena je konstruisana upotrebom PDB fajla 1KDG. Za kreiranje strukture i obeležavanje amino kiselinskih ostataka i kofaktora korišćen je UCSF Chimera program.

Aktivnost eksprimiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze je detektovana upotrebom DCIP eseja i u poređenju sa prirodnim oblikom enzima, uočava se da unutar svake biblioteke postoji nekoliko varijanti enzima koje pokazuju povećanu aktivnost u odnosu na prirodni oblik enzima (Slika 27).

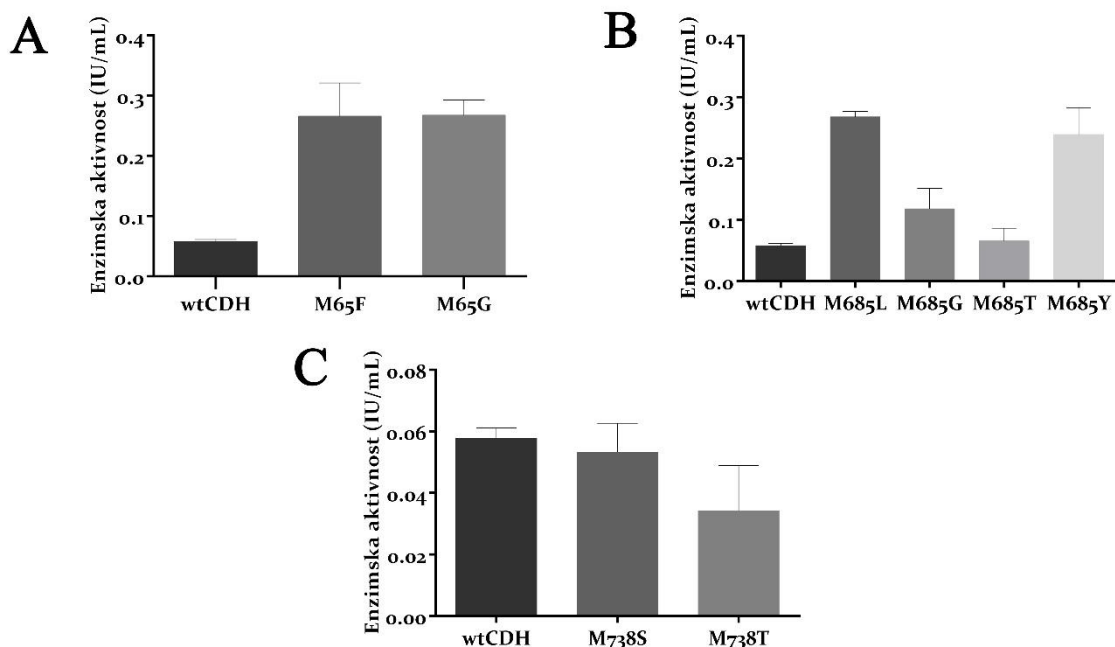


Slika 27: Analiza različitih varijanti enzima unutar saturacionih biblioteka na pozicijama metionina M65, M685, M738; mutanti su sortirani prema aktivnosti u odnosu na prirodni oblik enzima.

Nekoliko varijanti enzima, iz svake saturacione biblioteke, sa povećanom aktivnošću u odnosu na prirodni oblik enzima je selektovano i urađena je ekspresija proteina na većoj skali, kako bismo selektovane mutante koristili za detekciju oksidativne stabilnosti u prisustvu vodonik peroksida.

Nakon završene ekspresije selektovanih varijanti enzima, koncentrovanim uzorcima je izmerena aktivnost i upoređeni su sa prirodnim oblikom enzima kako bi se utvrdio tačan odnos aktivnosti i kako bi potvrdili da su mutacije uvedene u enzim dovele do promene enzimske aktivnosti merene upotrebom DCIP eseja (Slika 28).

Selektovani mutanti iz svake biblioteke, koje su obeležene u odnosu na poziciju metionina koji je mutiran, su sekvencirani kako bi se utvrdilo koje amino kiseline su dovele do dobijenih rezultata.



Slika 28: Aktivnost selektovanih varijanti enzima pojedinačnih saturacionih biblioteka: (A) mutanti iz M65 biblioteke; (B) mutanti iz M685 biblioteke; (C) mutanti iz M738 biblioteke.

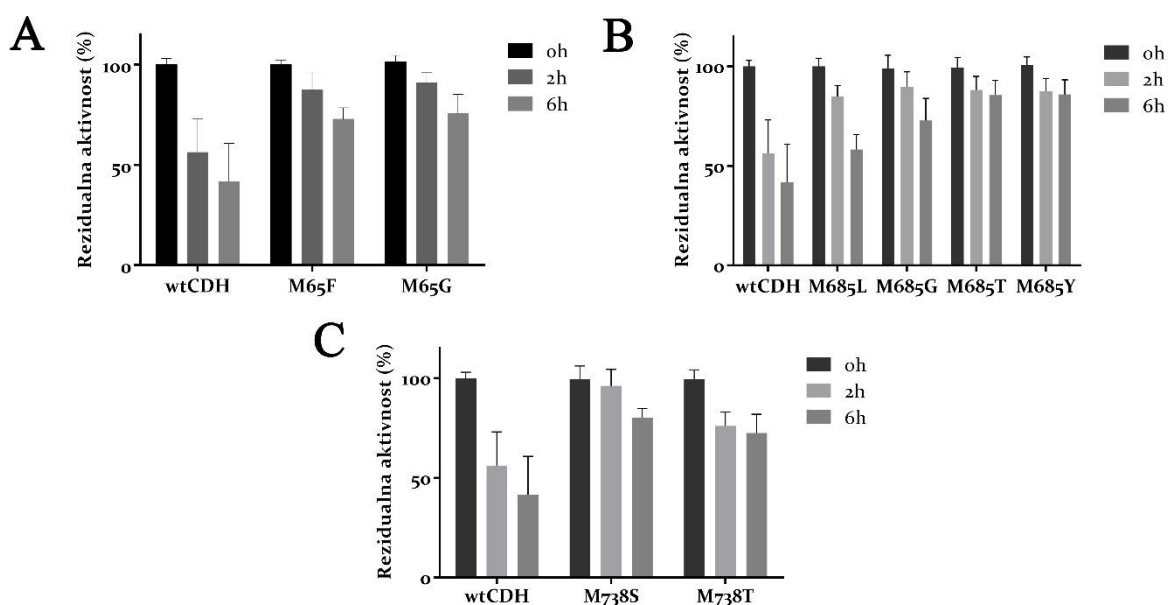
Mutanti iz biblioteke M65, pokazuju oko 5 puta veću aktivnost u odnosu na wtCDH, dok mutanti iz biblioteke M738 pokazuju veoma sličnu aktivnost kao i wtCDH. Mutanti M685L i M685Y iz biblioteke M685 pokazuju 3 do 4 puta veću aktivnost u odnosu na wtCDH, dok mutant M685T ima aktivnost vrlo sličnu wt enzimu, a mutant M685G pokazuje dva puta veću aktivnost u poređenju sa wtCDH.

5.3.3. Merenje oksidativne stabilnosti selektovanih mutanata i prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze

Selektovani mutanti su potom tretirani vodonik peroksidom kako bi utvrdili da li su uvedene mutacije dovele do povećane oksidativne stabilnosti u odnosu na prirodni oblik enzima. Merenje oksidativne stabilnosti je rađeno u mikrotitar pločicama upotrebom prethodno konstruisanog eseja.

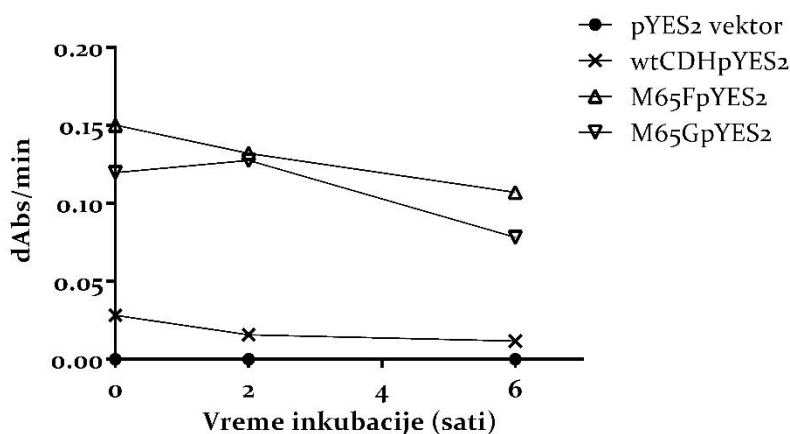
Kako bi se odredila oksidativna stabilnost mutanata i prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze u prisustvu 0,3 M vodonik peroksida, merena je rezidualna aktivnost enzima nakon 2 i 6 časova inkubacije u vodonik peroksidu upotrebom DCIP eseja (Slika 29). Uporedo sa merenjem oksidativne stabilnosti selektovanih varijanti enzima, merena je i oksidativna stabilnost prirodnog oblika enzima kako bi se ustanovilo da li uvedene mutacije dovode do povećane stabilnosti nakon inkubacije u vodonik peroksidu.

Pre merenja rezidualne aktivnosti, vodonik peroksid je uklonjen iz reakcione smeše inkubacijom sa katalazom imobilizovanom na makroporoznom GMA – EGDMA polimeru, kako bi se sprečila interakcija vodonik peroksida sa DCIP, što dovodi do ometanja merenja enzimske aktivnosti.



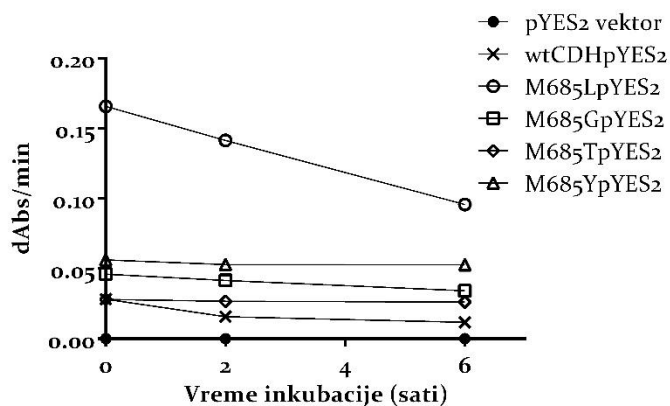
Slika 29: Merenje rezidualne aktivnosti mutanata saturacionih biblioteka nakon 2 sata i 6 sati inkubacije u 0,3 M vodonik peroksidu; prikazana je i aktivnost u 0 h odnosno početna aktivnost enzima. (A) mutanti iz M65 biblioteke; (B) mutanti iz M685 biblioteke; (C) mutanti iz M738 biblioteke.

Mutanti iz saturacione biblioteke M65, pored toga što pokazuju značajno veću aktivnost u poređenju sa prirodnim oblikom enzima, pokazuju i povećanu oksidativnu stabilnost. Nakon 6 sati inkubacije u 0,3 M vodonik peroksidu, wtCDH zadržava 40% svoje početne aktivnosti, dok mutant M65F pokazuje čak 70% svoje početne aktivnosti. Iz biblioteke M65, za dalje prečišćavanje i detaljnu kinetičku karakterizaciju, odabran je mutant M65 koji pored toga što pokazuje veliku oksidativnu stabilnost, ima i 9 puta veću aktivnost u odnosu na prirodni oblik enzima i 1,4 puta veću aktivnost u odnosu na M65G mutant nakon 6 sati inkubacije u vodonik peroksidu (Slika 30).



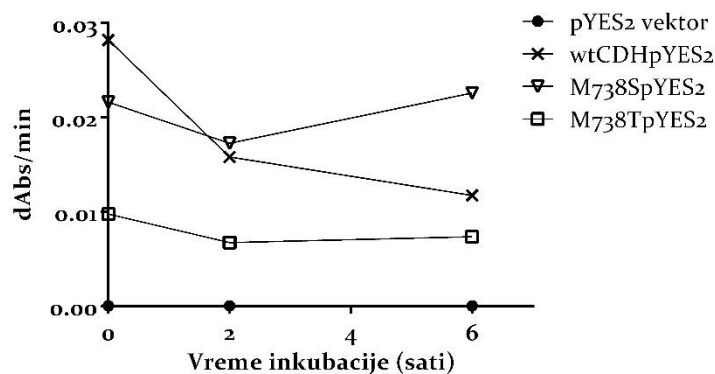
Slika 30: Promena absorbance na 540 nm u vremenu nakon 0, 2 i 6 h inkubacije u 0,3 M vodonik peroksidu za mutante iz M65 biblioteke.

Mutanti M685T i M685Y nakon 6 h inkubacije u vodonik peroksidu pokazuju 90% rezidualne aktivnosti, dok mutanti M685L i M685G pokazuju 60% rezidualne aktivnost i u poređenju sa prirodnim oblikom enzima, pokazano je da mutacije na M685 poziciji dovode do povećane oksidativne stabilnosti. Iako mutanti M685T i M685Y pokazuju čak 90% rezidualne aktivnosti nakon inkubacije u vodonik peroksidu, mutant M685Y ima 2 puta veću aktivnost u poređenju sa mutantom M685T (Slika 31) zbog čega je odlučeno da se u daljim eksperimentima koristi mutant M685Y.



Slika 31: Promena absorbance na 540 nm u vremenu nakon 0, 2 i 6 h inkubacije u 0,3 M vodonik peroksidu za mutante iz M685 biblioteke.

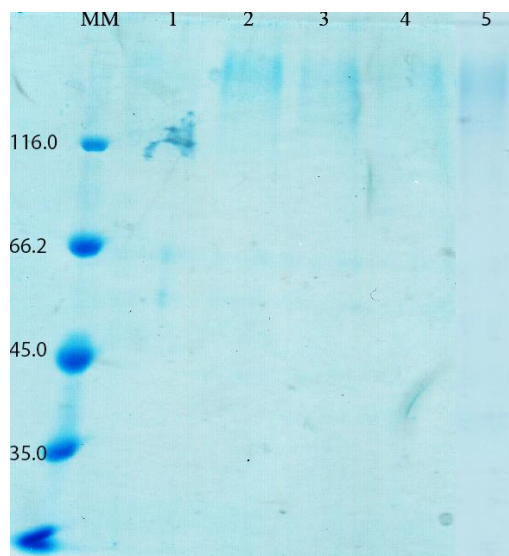
Iako mutanti iz biblioteke M738 imaju manju aktivnost u poređenju sa prirodnim oblikom enzima, pokazano je da nakon 6 h inkubaciju u 0,3 M vodonik peroksidu zadržavaju čak 80% svoje početne aktivnosti. Mutant M738S je odabran za dalje eksperimente jer ima veoma sličnu aktivnost kao i wtCDH (Slika 32).



Slika 32: Promena absorbance na 540 nm u vremenu nakon 0, 2 i 6 h inkubacije u 0,3 M vodonik peroksidu za mutante iz M738 biblioteke.

5.3.4. Prečišćavanje oksidativno stabilnih mutanta i prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze

Prvi korak u prečišćavanju oksidativno stabilnih mutanata, u poređenju sa prirodnim oblikom enzima, je bila ultrafiltracija gde su uklonjeni svi proteini čija je molekulska masa bila manja od 50 kDa. Nakon toga, mutanti i wtCDH su prečišćeni upotrebom jonoizmenjivačke hromatografije i analizirani SDS – PAGE elektroforezom (Slika 33), gde se jasno uočavaju trake prečišćenih varijanti enzima koje se nalaze iznad molekuskog markera od 116 kDa.



Slika 33: SDS – PAGE prečišćenih varijanti celobioza – dehidrogenaze: (1) wtCDH; (2) M65F; (3) M685Y; (4) M738S; (5) koncentrovani uzorak wtCDH; (MM) molekularni markeri.

Molekulska masa rekombinantno dobijenih varijanti enzima je znatno veća od teorijski pretpostavljene vrednosti. Upotrebom *Saccharomyces cerevisiae* kao ekspresionog sistema često dolazi do ekspresije proteina većih molekulskih masa ali i do formiranja širokih traka prilikom analize na SDS – PAGE, usled ne uniformne glikozilacije što je potvrđeno na primeru glukoza – oksidaze iz *Aspergillus niger*¹⁹⁶, lakaze iz *Myceliophthora thermophila*¹⁹⁷ i invertaze¹⁹⁸.

Do oksidacije metionina dolazi posredstvom malih molekula poput reaktivnih kiseoničnih vrsta, povećan stepen glikozilacije ne utiče na ovaj proces i ne može da spreči oksidaciju metioninski ostataka u prisustvu vodonik peroksida, što je potvrđeno na studijama o oksidativnoj stabilnosti glukoza – oksidaze eksprimirane u *Saccharomyces cerevisiae*¹⁹⁹.

5.3.5. Karakterizacija oksidativno stabilnih mutanata i prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze

5.3.5.1. Određivanje kinetičkih parametara

Oksidativno stabilni mutanti M65F, M685Y i M738S zajedno sa wtCDH su kinetički okarakterisani upotrebom laktoze i celobioze kao supstratima i dobijene vrednosti su upoređene sa rekombinantnim prirodnim oblikom enzima (Tabela 34).

Tabela 34: Kinetički parametri, wtCDH i oksidativno stabilnijih varijanti celobioza – dehidrogenaze, izmereni u prisustvu laktoze i celobioza kao supstrata.

	Oksidativna stabilnost u 0,3 M H ₂ O ₂	Laktoza			Celobioza		
	t _{1/2} [h]	K _m [mM]	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _m [mM ⁻¹ s ⁻¹]	K _m [μM]	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _m [mM ⁻¹ s ⁻¹]
wtCDH	4,7±1,3	0,77±0,09	1,55±0,05	2,00±0,24	38±10	0,81±0,08	21,5±6,1
M65F	13,1±1,9	1,43±0,10	4,64±0,09	3,24±0,24	103±44	3,27±0,74	31,8±15,4
M685Y	27,3±7,2	1,44±0,14	3,95±0,12	2,73±0,28	12,5±1,9	2,62±0,09	209±32,6
M738S	18,9±4,4	1,53±0,10	0,97±0,02	0,64±0,04	162±21	1,58±0,12	9,76±1,47

Oksidativna stabilnost pojedinačnih mutanata prikazana u tabeli 34 je izračunata na osnovu rezidualne aktivnosti mutanata nakon 6 h inkubacije u 0,3 M vodonik peroksidu (Slika 29).

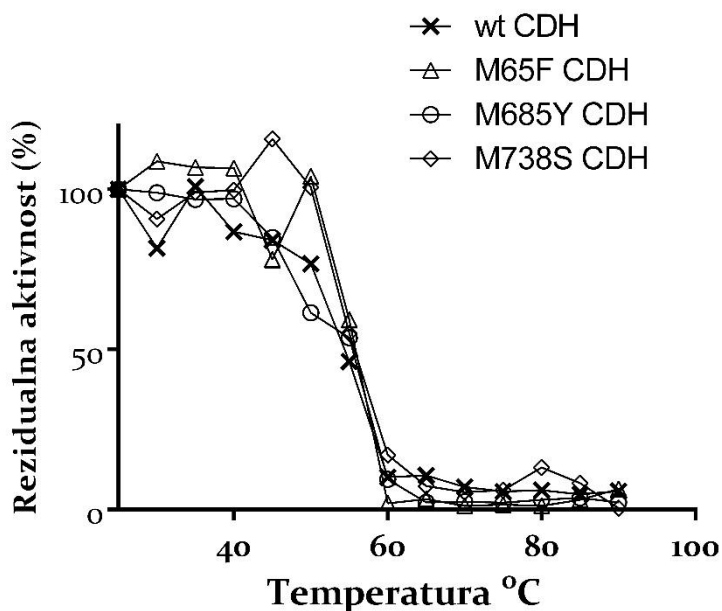
Rekombinantni wtCDH pokazuje veće K_m za laktozu i manje k_{cat} za celobiozu u poređenju sa wtCDH iz *Phanerochaete chrysosporium*⁵⁷. Manja aktivnost rekombinantnih enzima eksprimiranih u *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 soju je takođe pokazana i prilikom ekspresije glukoza – oksidaze²⁰⁰. Razlog za smanjenu aktivnost enzima eksprimiranih u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* može nastati kao posledica povećane glikozilacije koja je karakteristična za ovaj tip kvasca, čime se sprečava dostupnost supstrata enzimu. Uprkos činjenici da *Saccharomyces cerevisiae* katalizuje kačenje između 50 i 150 manoznih ostataka po mestu glikozilacije na enzimu^{189, 190}, veoma laka genetska manipulacija i dalje čini ovaj kvasac veoma poželjnim za proteinski inženjering eukariotskih enzima.

Mutanti M65F i M685Y pokazuju međusobno slične vrednosti za k_{cat} prilikom upotrebe laktoze kao supstrata, dok su te vrednosti oko 2 puta veće u odnosu na wtCDH. Takođe je uočeno, da su specifične konstante za mutante M65F i M685Y veće u odnosu na prirodni oblik enzima. Prilikom upotrebe celobioze kao supstrata, k_{cat} vrednosti svih oksidativno stabilnijih mutanata su 2 do 4 puta veće u odnosu na prirodni oblik enzima, dok pokazuju slične vrednosti sa rekombinantnim enzimom čija k_{cat} iznosi $4,1 \text{ s}^{-1}$. Mutant M685Y pokazuje značajno manje K_m u odnosu na ostale mutante kao i u odnosu na wtCDH, usled čega ima pokazuje značajno veću specifičnu konstantu za celobiozu.

Mutant M738S pokazuje manju aktivnost u poređenju sa wtCDH, međutim pokazano je da je uvođenje ove mutacije dovelo do značajnog povećanja stabilnosti u prisustvu vodonik peroksida u poređenju sa prirodnim oblikom enzima, pa tako polu život M738S mutanta je 4 puta povećan u odnosu na wtCDH. Polu život u $0,3 \text{ M}$ vodonik peroksidu je za M65F je 2,8 puta veći u odnosu na wtCDH, dok je za M685Y 5,8 puta veći.

5.3.5.2. Određivanje temperaturne stabilnosti

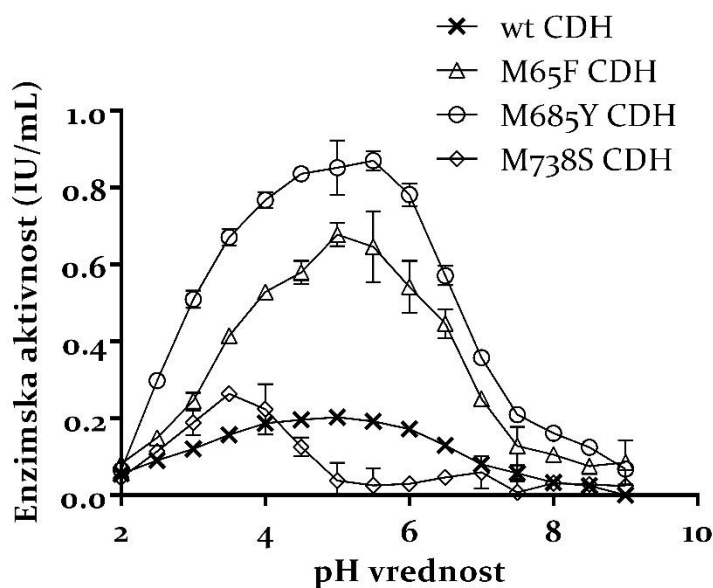
Temperaturna stabilnost je određena merenjem aktivnosti prirodnog oblika enzima i oksidativnih mutanata nakon inkubacije na određenoj temperaturi tokom 15 minuta i svi mutanti su pokazivali sličnu stabilnost kao i wtCDH odnosno dolazi do potpune inaktivacije enzima na temperaturama iznad 60°C (Slika 34).



Slika 254: Prikaz temperaturne stabilnosti wtCDH i oksidativnih mutanata na različitim temperaturama.

5.3.5.3. Određivanje pH optimuma

Oksidativno stabilnim mutantima kao i wtCDH enzimu, određen je pH optimum i uočeno je da mutant M738S pokazuje najveću enzimsku aktivnost na pH vrednostima od 3 do 4, dok wtCDH i mutanti M65F i M685Y pokazuju pH optimum u opsegu pH vrednosti od 4 do 6 (Slika 35).



Slika 35: Prikaz pH optimuma prirodnog oblika enzima i oksidativnih mutanata na različitim pH vrednostima od 2 do 9.

5.3.6. Proizvodnja kombinovanih mutanata

Mutacije, prethodno selektovanih i okarakterisani oksidativnih mutanata (M65F, M685Y, M738S) su potom iskorišćene za kreiranje kombinovanih mutanata koji sadrže dve odnosno tri mutacije (M65F – M685Y, M65F – M738S, M685Y – M738S, M65F – M685Y – M738S). Dobijeni kombinovani mutanti su eksprimirani u fermentacijama od 1 L, međutim nakon koncentrovanja uzoraka nije detektovana aktivnost celobioza – dehidrogenaze upotrebom DCIP eseja.

5.4. Kloniranje i ekspresija prirodnog oblika i mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze u *Pichia pastoris* KM71H soju

Ekspresioni sistemi poput *Saccharomyces cerevisiae* se koriste prilikom dirigovane evolucije i drugih tehnika proteinskog inženjeringa za kreiranje različitih varijanti enzima. Međutim, nakon dobijanja varijante enzima sa željenim osobina, neophodno je pristupiti proizvodnji enzima na većem ekspresionom nivou, za šta se uglavnom koristi metilotrofni kvasac *Pichia pastoris*²⁰⁵. Iako *Pichia pastoris* ima veoma malu efikasnost prilikom transformacije²⁰⁵, velika gustina ćelija prilikom rasta, sposobnost da sekretuje velike količine željenog proteina kao i post – translacione modifikacije čine je veoma korišćenim ekspresionim sistemom²⁰⁶.

5.4.1. Kloniranje mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze u pPICZ α A vektor

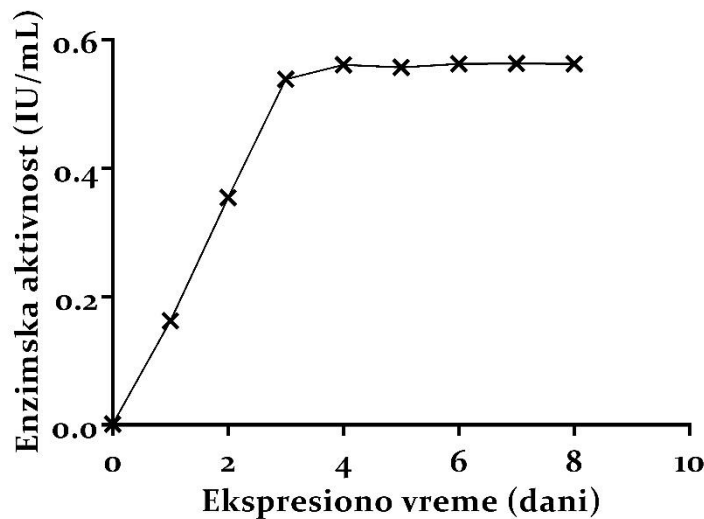
Prilikom dirigovane evolucije celobioza – dehidrogenaze eksprimirane na površini ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100, dobijen je trostruki mutant (D20N, A64T, V592M) koji je zajedno sa oksidativnim mutantima M65F, M685Y, M738S uspešno kloniran u pPICZ α A vektor. Nakon kloniranja, dobijeni konstrukti su sekvencirani i potvrđene su mutacije na željenim pozicijama.

5.4.2. Ekspresija i prečišćavanje prirodnog oblika i mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze

Nakon uspešnog kloniranja željenih varijanti celobioza – dehidrogenaze, pristupilo se transformaciji *Pichia pastoris*, a potom ekspresiji i prečišćavanju željenih varijanti enzima. Transformacijom *Pichia pastoris*, dobijeno je nekoliko kolonija na YPD agar pločama sa zeocinom koje su potom testirane na aktivnost celobioza – dehidrogenaze upotrebom DCIP eseja. Za svaku varijantu enzima,

transformant koji je pokazivao najbolju proizvodnju je selektovan i korišćen za proizvodnju enzima u 1 L fermentacije.

Optimalno vreme trajanja fermentacije, kako bi se postigla najveća proizvodnja celobioza – dehidrogenaze je determinisano merenjem enzimske aktivnosti upotrebom DCIP eseja u alikvotima fermentacione tečnosti uzetih na svaka 24 h tokom 8 dana metanolne indukcije (Slika 36).

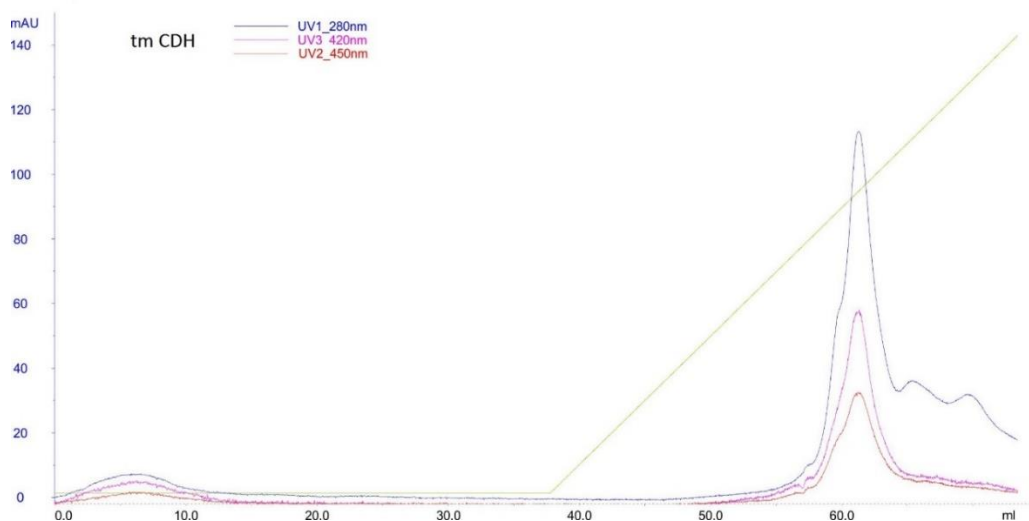


Slika 26: Optimalno vreme trajanja fermentacije prikazano za trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju, merenjem enzimske aktivnosti upotrebom DCIP eseja.

Primećeno je da se nakon četiri dana metanolne indukcije dostiže maksimalna proizvodnja enzima koja iznosi oko 950 IU/L fermentacione tečnosti i da ne dolazi do značajnih promena u narednim danima trajanja fermentacije. Ekspresijom celobioza – dehidrogenaze klonirane u pPIC9K vektoru u kvascu *Pichia pastoris* dobijeni su slični podaci za optimalno vreme ekspresije proteina¹⁹². Međutim u prethodnim istraživanjima, ekspresijom prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze u *Pichia pastoris* KM71H soju, dobijena je znatno niža ekspresiona stopa, 221 IU/L⁸³ u odnosu na podatke koje je naša istraživačka grupa dobila, što se

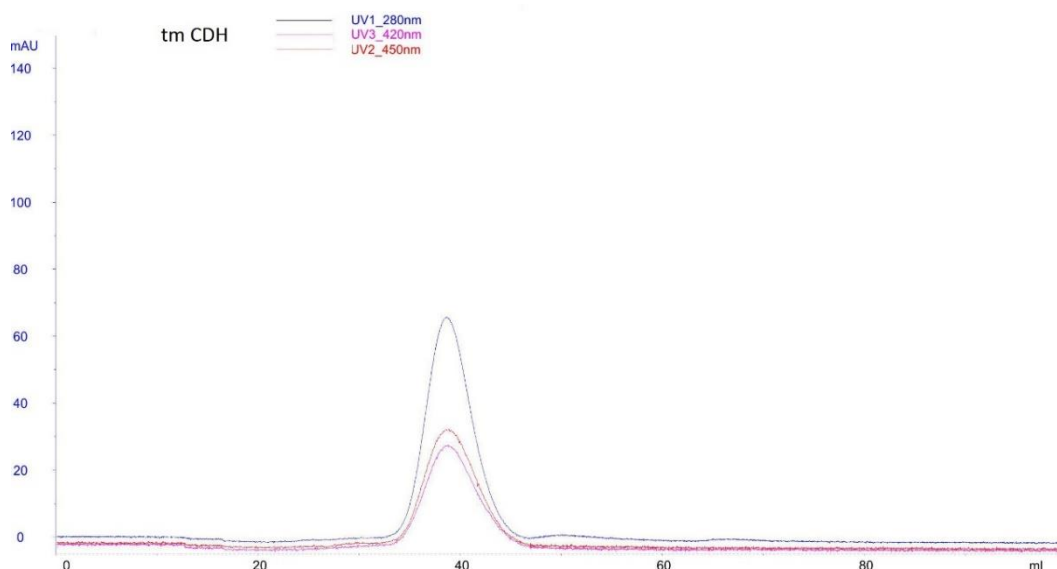
može objasniti potencijalnom upotrebom transformanta sa višestrukom integracijom plazmida unutar hromozomalne DNK kvasca.

Kako bi se postigla maksimalna stopa ekspresije proteina, za ekspresiju mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze, rađena je metanolna indukcija tokom 6 dana, nakon čega je centrifugiranjem odvojena fermentaciona tečnost sa eksprimiranim varijantama enzima od ćelija. Dobijena fermentaciona tečnost je koncentrovana upotrebom ultrafiltracione ćelije, što je ujedno i bio prvi korak pri prečišćavanju eksprimiranih mutanata celobioza – dehidrogenaze. Nakon ultrafiltracije, rađena je jonoizmenjivačka hromatografija (Slika 37) gde se uočava pik koji potiče od tmCDH ali uočavaju se i manji pikovi drugih proteina i gel filtraciona hromatografija (Slika 38) gde se jasno uočava jedan pik proteina koji potiče od CDH.



Slika 27: Prikaz hromatograma za trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze (tmCDH) eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju nakon jonoizmenjivačke hromatografije¹⁴.

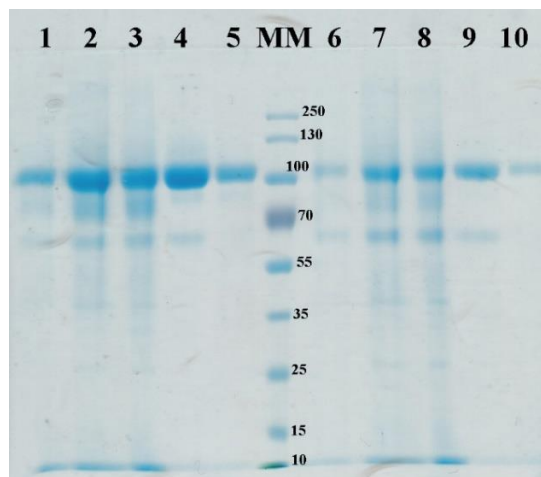
¹⁴ Zbog lakše preglednosti, prikazan je hromatogram samo za trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju. Hromatogrami ostalih mutanata, kao i prirodnog oblika enzima su pokazivali isti profil (Prilog 2).



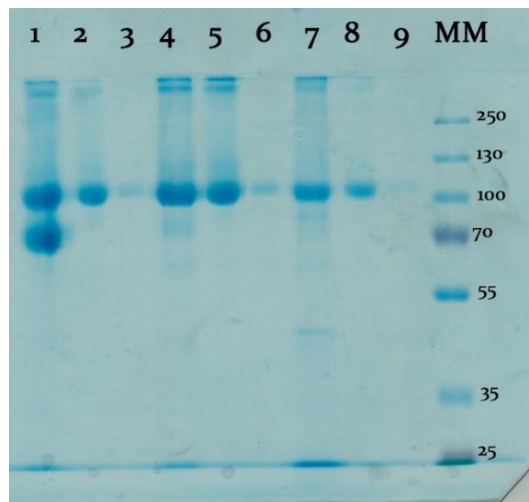
Slika 28: Prikaz hromatograma za trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze (tmCDH) eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju nakon gel filtracione hromatografije¹⁵.

Nakon završenih hromatografija, SDS – PAGE elektroforezom su analizirani svi koraci prečišćavanja za wtCDH i trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze (Slika 39), kao i za oksidativne mutante M65F, M685Y, M738S (Slika 40). Na slikama 39 i 40, moguće je jasno uočiti da je nakon gel filtracije dobijena jedna traka proteina koja potiče od celobioza – dehidrogenaze i da masa dobijenog enzima od 100 kDa odgovara masi prethodno izolovane rekombinantne celobioza – dehidrogenaze iz *Pichia pastoris*^{83, 192, 207}, ali i da je dobije masa enzima veoma slična masi nativnog enzima izolovanog iz *Phanerochaete chrysosporium*²⁰⁷. Neznatno veća masa rekombinantno eksprimiranih varijanti enzima u odnosu na nativnu formu enzima, nastaje kao posledica većeg stepena glikozilacije.

¹⁵ Zbog lakše preglednosti, prikazan je hromatogram samo za trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju. Hromatogrami ostalih mutanata, kao i prirodnog oblika enzima su pokazivali isti profil (Prilog 2).

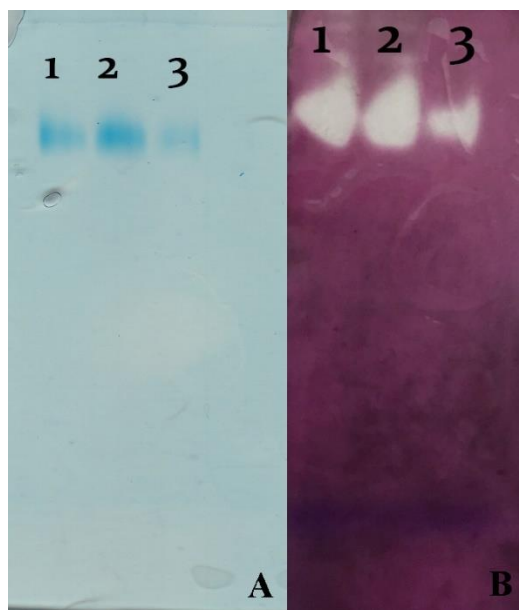


Slika 29: SDS – PAGE koraka prečišćavanja varijanti celobioza – dehidrogenaze: (1) wtCDH dijalizovan uzorak; (2) wtCDH dijalizovan uzorak; (3) wtCDH koncentrovan uzorak; (4) wtCDH nakon jonoizmenjivačke hromatografije; (5) wtCDH nakon gel filtracije; (MM) molekularni markeri; (6) tmCDH dijalizovan uzorak; (7) tmCDH dijalizovan uzorak; (8) tmCDH koncentrovan uzorak; (9) tmCDH nakon jonoizmenjivačke hromatografije; (10) tmCDH nakon gel filtracije.



Slika 30: SDS – PAGE koraka prečišćavanja oksidativno stabilnih varijanti celobioza – dehidrogenaze: (1) M65F koncentrovan uzorak; (2) M65F nakon jonoizmenjivačke hromatografije; (3) M65F nakon gel filtracije; (4) M685Y koncentrovan uzorak; (5) M685Y nakon jonoizmenjivačke hromatografije; (6) M685Y nakon gel filtracije; (7) M738S koncentrovan uzorak; (8) M738S nakon jonoizmenjivačke hromatografije; (9) M738S nakon gel filtracije; (MM) molekularni markeri.

Prečišćeni uzorci su analizirani i nativnom elektroforezom kako bi se detektovala enzimska aktivnost eksprimiranog proteina na gelu upotrebom DCIP eseja. Prikazan je zimogram za oksidativne mutante (Slika 41) dok su wtCDH i trostruki mutant pokazivali isti profil na nativnoj elektroforezi. Nativni gel bojen CBB – om jasno pokazuje samo jednu traku proteina, dok je zimogramom pokazano da traka odgovara celobioza – dehidrogenazi jer prilikom oksidacije laktoze, koja je korišćena kao supstrat, dolazi do simultane redukcije DCIP – a usled čega on menja boju i iz ljubičaste, kada je u oksidovanom obliku, postaje bezbojan, kada se nalazi u potpuno redukovanom stanju. Obezbojavanjem ljubičasto obojenog gela ukazuje na aktivnost celobioza – dehidrogenaze.



Slika 31: Nativna elektroforeza oksidativno stabilnih mutanata celobioza – dehidrogenaze: (A) bojena CBB – om; (B) detekcija aktivnosti u gelu (zimogram) upotrebom DCIP eseja; (1) M65F mutant; (2) M685Y mutant; (3) M738S mutant.

Tokom prečišćavanja proteina, određeni su prinos prečišćavanja i stepen prečišćenosti trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze kao i za prirodni oblik enzima (Tabela 35), ali i za oksidativne mutante (Tabela 36).

Tabela 35: Podaci o koracima tokom prečišćavanja wtCDH i trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze: (UF) ultrafiltracija; (DEAE) uzorak nakon jonoizmenjivačke hromatografije; (GF) uzorak nakon gel filtracione hromatografije; (V) zapremina uzorka; (Cp) koncentracija proteina; (Ac) koncentracija enzimske aktivnosti; (Sp) specifična aktivnost enzima po miligramu ukupnih proteina; (Y) prinos prečišćavanja; (Pf) stepen prečišćenosti uzorka.

	wtCDH			tmCDH		
	UF	DEAE	GF	UF	DEAE	GF
V [mL]	12	5	6	12	3	7
Cp [mg/mL]	0,72	0,59	0,22	0,42	0,48	0,08
Ac [IU/mL]	8,86	8,1	4,49	2,34	5,41	1,17
Sp [IU/mg]	12,3	13,7	20,4	5,55	11,2	14,1
Y [%]	100	38,09	25,34	100	57,80	29,17
Pf	1	1,11	1,66	1	2,02	2,6

Tabela 36: Podaci o koracima tokom prečišćavanja oksidativnih mutanta celobioza – dehidrogenaze: (UF) ultrafiltracija; (DEAE) uzorak nakon jonoizmenjivačke hromatografije; (GF) uzorak nakon gel filtracione hromatografije; (V) zapremina uzorka; (Cp) koncentracija proteina; (Ac) koncentracija enzimske aktivnosti; (Sp) specifična aktivnost enzima po miligramu ukupnih proteina; (Y) prinos prečišćavanja; (Pf) stepen prečišćenosti uzorka.

	M65F			M685Y			M738S		
	UF	DEAE	GF	UF	DEAE	GF	UF	DEAE	GF
V [mL]	15	10	10	15	10	10	15	10	10
Cp [mg/mL]	1,84	0,39	0,11	1,84	0,62	0,08	1,84	0,39	0,08
Ac [IU/mL]	13,96	4,71	1,27	14,66	7,31	1,12	2,01	1,72	0,34
Sp [IU/mg]	7,57	12,18	11,34	7,95	11,71	13,36	1,09	4,40	4,45
Y [%]	100	22,49	6,06	100	33,24	5,09	100	57,05	11,28
Pf	1	1,61	1,50	1	1,47	1,68	1	4,04	4,08

Stepen prečišćenosti enzima je definisan kao odnos specifične aktivnosti enzima po miligramu ukupnih proteina nakon i pre prečišćavanja i kretao se od 1 do

4 za različite mutante celobioza – dehidrogenaze, a stepen prečišćenosti za wtCDH iznosi 1,66, dok je prinos prečišćavanja koji je definisan kao procenat enzimske aktivnosti nakon prečišćavanja bio od 5% do 29% za različite mutante i prirodni oblik celobioza – dehidrogenaze. Specifična aktivnost prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze i trostrukog mutanta nakon prečišćavanja iznosi 20,4 IU/mg odnosno 14,1 IU/mg, dok oksidativni mutant M685Y nakon prečišćavanja pokazuje najveću specifičnu aktivnost (13,36 IU/mg) u poređenju sa ostalim oksidativnim mutantima.

5.4.3. Karakterizacija prirodnog oblika i mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze

5.4.3.1. Određivanje kinetičkih parametara

Mutirane varijante celobioza – dehidrogenaze zajedno sa prirodnim oblikom enzima su kinetički okarakterisane upotrebom laktoze i celobioze kao supstratima i dobijene vrednosti su upoređene sa rekombinantnim prirodnim oblikom enzima (Tabela 37).

Tabela 37: Kinetički parametri, prirodnog oblika i oksidativno stabilnijih varijanti celobioza – dehidrogenaze, izmereni u prisustvu laktoze i celobioza kao supstrata.

	Laktoza			Celobioza		
	K_m [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [mM ⁻¹ s ⁻¹]	K_m [μM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [mM ⁻¹ s ⁻¹]
wt CDH	3,49	35,7	10,2	168	29,8	177
tm CDH	1,00	19,9	19,8	79,6	28,4	358
M65F	1,248	16,59	13,29	979,1	45,07	46,03
M685Y	3,642	49,18	13,50	1377	125,2	90,92
M738S	1,751	12,75	7,28	155,3	13,62	87,70

Trostruki mutant celobioza – dehidrogenaze pokazuje najmanju K_m vrednost (1 mM) za laktozu i za celobiozu (79,6 mM) u odnosu na oksidativne mutante ali i u

odnosu na prirodni oblik enzima. Oksidativni mutant M685Y i wtCDH pokazuju gotovo identične K_m vrednosti za laktozu, dok za celobiozu oksidativni mutant M685Y pokazuje 8,2 puta veću K_m vrednost u odnosu na wtCDH. Mutant M65F ima K_m vrednost koja iznosi 1,248 mM za laktozu, što je veoma mala razlika u odnosu na trostrukog mutanta, dok M738S mutant pokazuje 2 puta manju K_m vrednost u odnosu na wtCDH. Oksidativni mutanti M65F i M685Y imaju znatno veće K_m vrednosti u odnosu na ostale mutante ali i u odnosu na wtCDH. Mutant M738S i wtCDH pokazuju veoma slične vrednosti K_m za celobiozu, dok tmCDH pokazuje nešto manju vrednost u odnosu na wtCDH.

Mutanti M65F, M738S i trostruki mutant celobioza – dehidrogenaze pokazuju slične vrednosti k_{cat} za laktozu gde je korišćen DCIP kao elektron akceptor, za razliku od wtCDH i M685Y mutanta koji pokazuju oko 2 odnosno 3 puta veće k_{cat} za laktozu u odnosu na ostale mutante. U poređenju sa publikovanim vrednostima k_{cat} za prirodni oblik celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* soj KCC60256, rekombinantno eksprimiranu u *Pichia pastoris* X – 33 soju, iznosi $8,2 \text{ s}^{-1}$ ²⁰⁷ dok za CDH iz *Phanerochaete chrysosporium* soj RP78 rekombinantno eksprimiranu u *Pichia pastoris* KM71H soju iznosi $4,7 \text{ s}^{-1}$ ⁸³ uočava se da svi eksprimirani mutanti kao i prirodni oblik enzima imaju veće k_{cat} vrednosti za laktozu kao supstrat. Ukoliko uporedimo dobijene k_{cat} vrednosti sa nativnom celobioza – dehidrogenazom izolovanom iz *Phanerochaete chrysosporium* K3 soj gde k_{cat} iznosi $13,4 \text{ s}^{-1}$ ²⁰⁸, uočava se da mutanti tmCDH, M65F i M738S imaju veoma slične k_{cat} vrednost kao nativni protein, dok wtCDH enzim i mutant M685Y imaju oko 3 do 4 puta veće k_{cat} vrednosti u odnosu na nativni protein.

Poređenjem dobijenih k_{cat} vrednosti za celobiozu za mutante i wtCDH sa prethodno publikovanim k_{cat} vrednostima za celobiozu koja za prirodni oblik celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* soj KCC60256, rekombinantno eksprimiranu u *Pichia pastoris* X – 33 soju, iznosi $6,27 \text{ s}^{-1}$ ²⁰⁷, $3,6 \text{ s}^{-1}$ je

k_{cat} vrednost za CDH iz *Phanerochaete chrysosporium* soj RP78 rekombinantno eksprimiranu u *Pichia pastoris* KM71 soju⁸³ dok za nativnu CDH iz *Phanerochaete chrysosporium* K3 soj k_{cat} iznosi $15,7 \text{ s}^{-1}$ ²⁰⁸, može se uočiti da oksidativni mutant M738S ima skoro identično k_{cat} kao i nativni protein celobioza – dehidrogenaze, dok rekombinantno eksprimiran prirodni oblik enzima i ostali mutanti pokazuju značajno veće k_{cat} vrednosti.

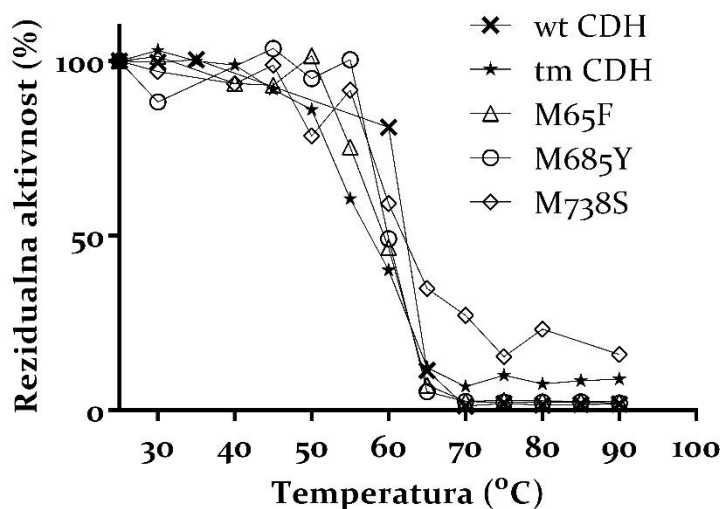
Na osnovu dobijenih podataka za k_{cat} , možemo zaključiti da eksprimirani i prečišćeni rekombinantni prirodni oblik i mutanti celobioza – dehidrogenaze pokazuju značajno veću enzimsku aktivnost kada se koriste laktoza ili celobioza kao supstrati u odnosu na prethodno publikovane vrednosti za celobioza – dehidrogenazu, što ukazuje na njihovu moguću primenu u biokatalizi za proizvodnju laktobionske ili celobionske kiseline³⁷.

Za upotrebu enzima u biosenzorima jedan od najbitnijih parametara je konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) enzima prema supstratu⁶⁴, stoga se iz priloženih rezultata uočava da trostruki mutant celobioza – dehidrogenaze pokazuje najveću konstantu specifičnosti za laktozu ($19,8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) ali i za celobiozu ($358 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) u odnosu na rekombinantni wtCDH za koji konstanta specifičnosti za laktozu iznosi $10,2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, a za celobiozu $177 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. U poređenju sa literaturnim podacima za prirodni oblik celobioza – dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* soj KCC60256, rekombinantno eksprimiranu u *Pichia pastoris* X – 33 soju, specifična konstanta za laktozu iznosi $24,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, a za celobiozu $29,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ²⁰⁷, a za CDH iz *Phanerochaete chrysosporium* soj RP78 rekombinantno eksprimiranu u *Pichia pastoris* KM71 soju specifična konstanta za laktozu je $4,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, a za celobiozu $60 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ⁸³, dok nativni enzim CDH izolovan iz *Phanerochaete chrysosporium* K3 soja ima specifičnu konstantu $12 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ za laktozu i $140 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ za celobiozu²⁰⁸ možemo uočiti da trostruki mutant pokazuje veće konstante specifičnosti prema laktozi i

celobiozi kao supstratima i da je potencijalni kandidat za proizvodnju biosenzora osetljivih na laktozu odnosno celobiozu.

5.4.3.2. Određivanje temperaturne stabilnosti

Temperaturna stabilnost je određena merenjem aktivnosti prirodnog oblika enzima i mutiranih varijanti enzima nakon inkubacije na određenoj temperaturi tokom 15 minuta i svi mutanti su pokazivali sličnu stabilnost kao i wtCDH osim M738S mutanta koji pokazuje stabilnost i pri temperaturama iznad 65°C (Slika 42).

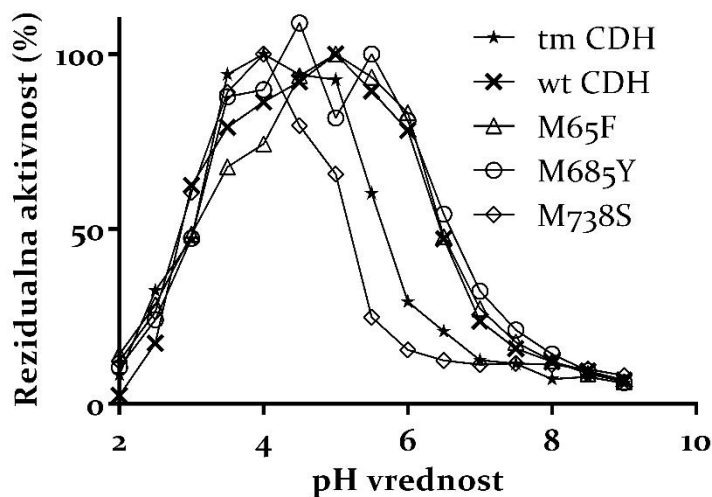


Slika 32: Prikaz temperaturne stabilnosti prirodnog oblika enzima i mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze na različitim temperaturama.

5.4.3.3. Određivanje pH optimuma

Oksidativno stabilnim mutantima kao i trostrukom mutantu i wtCDH enzimu, određen je pH optimum i uočeno je da mutant M738S pokazuje najveću enzimsku aktivnost na pH vrednostima od 3 do 5,5, kao i trostruki mutant celobioza – dehidrogenaze dok prirodni oblik enzima i mutanti M65F i M685Y pokazuju pH optimum u opsegu pH vrednosti od 4 do 6 (Slika 43). Dobijeni pH optimum za

wtCDH i mutirane varijante enzima je veoma sličan prethodno publikovanim podacima za nativnu i rekombinantnu celobioza – dehidrogenazu²⁰⁷.

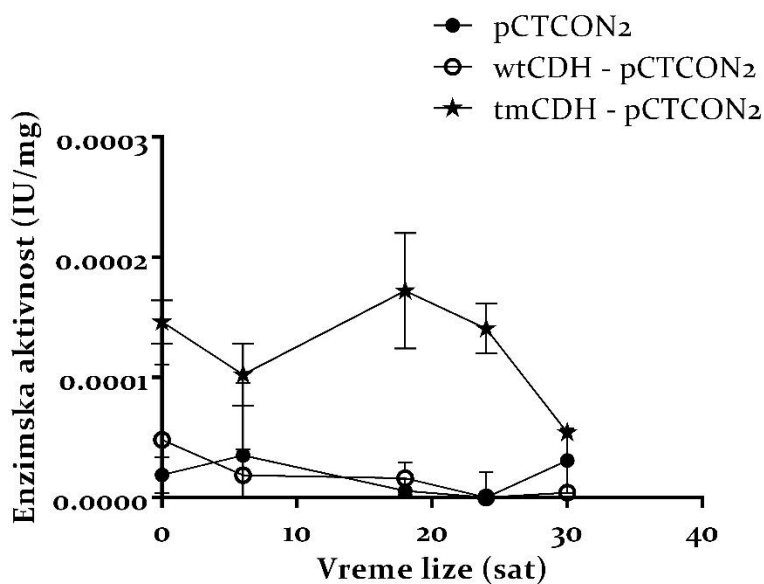


Slika 33: Prikaz pH optimuma prirodni oblik enzima i mutiranih varijanti celobioza – dehidrogenaze na različitim pH vrednostima.

5.5. Proizvodnja laktobionske kiseline

Imobilizacijom enzima na površini ćelija kvasca obezbeđuje se jednostavna i laka upotreba enzima, ali i uklanjanje enzima iz reakcione smeše kako bi se sakupio željeni proizvod. Ekspresijom celobioza – dehidrogenaze kao i lakaze na ćelijskim zidovima kvasca, a potom liziranjem ćelija kako bi se dobili ćelijski zidovi kao služe kao nosači enzima i njihovim mešanjem u odgovarajućoj srazmeri, moguće je katalizovati proizvodnju laktobionske kiseline. Ekspresija lakaze na površini ćelija kvasca, kao i proizvodnja liziranih ćelijskih zidova sa eksprimiranom lakazom je rađena u okviru doktorske disertacije doktoranta Nikoline Popović, dok je u ovoj doktorskoj disertaciji iskorišćena kao deo enzimske mašinerije za proizvodnju laktobionske kiseline. Na osnovu proizvodnje ćelijskih zidova sa eksprimiranom lakazom, kreirani su eksperimenti za proizvodnju ćelijskih zidova sa eksprimiranom celobioza – dehidrogenazom.

Nakon završene ekspresije, ćelije koje su na svojoj površini imale eksprimiran wtCDH, tmCDH kao i prazne ćelije su centrifugirane i isprane 3 puta sa 0,1 M natrijum – acetatnim puferom pH 4,5 kako bi se uklonio sav medijum, nakon čega je postavljena liza ćelija upotrebom 3% toluena. Ćelijska liza je praćena tokom 30 h i u određenim časovima lize, uzimani su alikvoti ćelijskih zidova koji su potom analizirani na aktivnost celobioza – dehidrogenaze. Uporedo sa merenjem aktivnosti celobioza – dehidrogenaze, pratili smo i oslobađanje proteina iz ćelije u supernatantu iznad liziranih ćelijskih zidova, merenjem absorbance na 280 nm. Alikvotima prikupljenim tokom lize ćelija, podešena je koncentracija ćelijskih zidova da bude 250 mg/mL i izmerena je enzimska aktivnost upotrebom DCIP eseja (Slika 44).

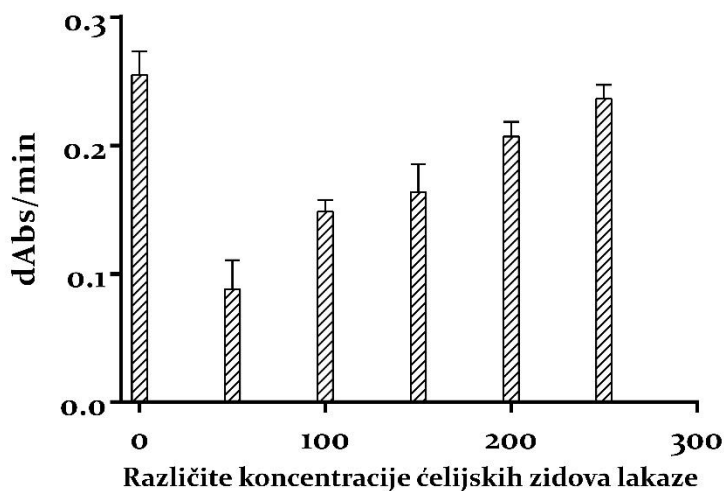


Slika 34: Merenje enzimske aktivnosti ćelijskih zidova sa imobilizovanim trostrukim mutantom i prirodnim oblikom celobioza – dehidrogenaze.

Primećuje se da čak i nakon liziranja ćelijskih zidova, ne detektuje se aktivnost prirodnog oblika enzima, dok trostruki mutant pokazuje aktivnost, zbog čega je on korišćen u daljim eksperimentima. Trostruki mutant celobioza – dehidrogenaze pokazuje najveću enzimsku aktivnost po miligramu ćelijskih zidova nakon 18 h lize, dok nakon 24 h lize pokazuje neznatno manju aktivnost, međutim u 24 h lize, koncentracija proteina u supernatantu iznad ćelijskih zidova je bila najveća, zbog čega su za proizvodnju laktobionske kiseline korišćene ćelije nakon 24 h lize.

Pored lize ćelijskih zidova sa eksprimiranim trostrukim mutantom celobioza – dehidrogenaze, urađena je i liza ćelijskih zidova sa eksprimiranom lakazom. Ćelijski zidovi (250 mg/mL) sa imobilizovanom CDH (100 µL) i različite zapremine ćelijskih zidova sa imobilizovanom lakazom (bez lakaze, 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL, 250 µL) su pomešane i merena je promena absorbance na 540 nm u prisustvu

DCIP – a kao redoks medijatora i u prisustvu 0,2 mM bakra koji je neophodan lakazi kako bi katalizovala oksidaciju redukovanog DCIP – a (Slika 45).



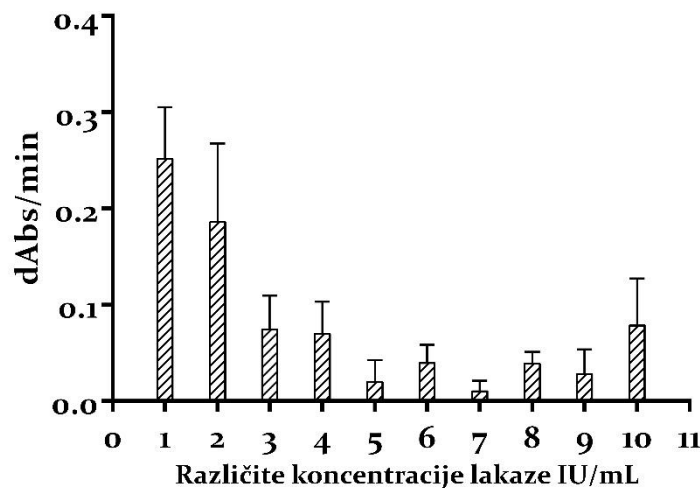
Slika 35: Promena absorbance na 540 nm u prisustvu DCIP – a kao redoks medijatora, tmCDH i različitih zapremina lakaze imobilizovane na ćelijskim zidovima.

Oksidacijom laktoze dejstvom celobioza – dehidrogenaze dolazi do redukcije DCIP – a usled čega dolazi do opadanja absorbance na 540 nm i do promene boje redoks medijatora iz ljubičaste kada je u oksidovanom stanju u bezbojnu kada je u potpuno redukovanom obliku. Poznato je da se aktivnost celobioza – dehidrogenaze ne može detektovati u prisustvu lakaze, upravo zbog njene sposobnosti da katalizuje oksidaciju redoks medijatora koji je prethodno redukovao od strane CDH, što dovodi do toga da se aktivnost CDH ne detektuje²⁰⁴.

Promena absorbance bez dodate lakaze je oko 0,25 što ukazuje na aktivnost trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze, međutim sa dodatkom većih zapremina lakaze trebalo bi da dođe do opadanja promene absorbance, što ovde nije slučaj. Uočava se da pri nižim koncentracijama dodati ćelijskih zidova sa imobilizovanom lakazom dolazi do smanjenje promene absorbance što može da ukaže na simultan transfer elektrona sa enzima na redoks medijator, a potom

posredstvom lakaze na kiseonik. Međutim, kako raste koncentracija ćelijskih zidova tako raste i promena absorbance što može da ukaže na prisustvo oksido – redukcioni enzima eksprimiranih na ćelijskim zidovima, usled čega pri većim koncentracijama ćelijskih zidova dolazi do obezbojavanja DCIP – a kao redoks medijatora za oksido – reduktazne enzime.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da lakaza imobilizovana na ćelijskim zidovima nije idealan kandidat za proizvodnju laktobionske kiseline u kombinaciji sa imobilizovanom celobioza – dehidrogenazom na zidovima kvasca. Upotreba komercijalno dostupne lakaze bi trebala da omogući prevazilaženje prethodno nastalih ometajućih faktora, usled čega su postavljene reakcije sa različitim koncentracijama lakaze iz *Trametes versicolor* kako bismo odredili koja koncentracija lakaze je neophodna za simultan transfer elektrona, a samim tim i proizvodnju laktobionske kiseline (Slika 46).



Slika 36: Promena absorbance na 540 nm u prisustvu DCIP – a kao redoks medijatora, tmCDH i različitih koncentracija lakaze izražene u IU/mL: (1) 0,094; (2) 0,0188; (3) 0,0282; (4) 0,0376; (5) 0,047; (6) 0,0564; (7) 0,0658; (8) 0,0752; (9) 0,084; (10) 0,094.

Upotrebom komercijalne lakaze, primećuje se trend opadanja promene absorbance sa povećanjem koncentracije lakaze, kao i da pri koncentraciji od 0,094 IU/mL lakaze dolazi do blagog porasta promene absorbance što može biti posledica nedostatka rastvorenog molekulskog kiseonika, odnosno da je pri tim uslovima, sav kiseonik dejstvom lakaze preveden u vodu, što omogućava celobioza – dehidrogenazi da u prisustvu supstrata dovede do redukcije redoks medijatora. Na osnovu rezultata prikazanih na slici 31, može se zaključiti da pri koncentracijama lakaze oko 0,07 IU/mL dolazi do nesmetane proizvodnje laktobionske kiseline u prisustvu tmCDH eksprimiranog na liziranim ćelijama, što je potom testirano i na većoj skali.

Proizvodnja laktobionske kiseline pri reakcionoj zapremini od 20 mL, upotrebom imobilizovanog trostrukog mutanta celobioza – dehidrogenaze (0,15 IU/mL) i komercijalne lakaze je praćena promenom pH vrednosti. Za proizvodnju laktobionske kiseline je korišćen 10 mM natrijum – acetatni pufer pH 4,5, 200 mM laktoza i 0,6 mM DCIP, međutim u reakcijama sa CDH imobilizovanom na ćelijskim zidovima (2 mL suspenzije ćelijskih zidova koncentracija 250 mg/mL), nakon 24 h promena pH je iznosila 0,2 pH jedinice. Kako bi se pH vrednost vratila na početnu pH vrednost, odnosno pH vrednost pufera, bilo je neophodno utrošiti 600 µL 0,1 M natrijum hidorkside, što ukazuje na podatak da je tokom 24 h produkovano 60 µmol laktobionske kiseline.

U cilju proizvodnje većih količina laktobionske kiseline, uočava se da ovaj sistem ne daje zadovoljavajuće velike količine laktobionske kiseline, zbog čega je produkovana laktobionska kiselina upotrebom prirodnog oblika celobioza – dehidrogenaze produkovane u *Pichia pastoris* i liofilizovane (3,1 IU/mL) i komercijalne lakaze. Reakciona smeša je sadržala 200 mM laktozu, 0,25 IU/mL wtCDH, 0,7 IU/mL lakaze i 0,6 mM DCIP u 10 mM natrijum – acetatnom puferu pH 4,5, a nakon 2 h detektovana je promena pH vrednosti od 1,2 pH jedinice, što

odgovara količini od 320 μmol laktobionske kiseline, što bi značilo da za 24 h može biti proizvedeno 3,84 mmol laktobionske kiseline.

6. Zaključci

Sposobnost celobioza – dehidrogenaze da katalizuje redukciju Fe^{3+} jona kao jednoelektronskog akceptora elektrona, oksidacijom različitih supstrata poput laktoze je iskorišćena prilikom razvoja fluorescentnog eseja tokom čega je zaključeno da u prisustvu 2 mM vodonik peroksida kao i 2 mM jona gvožđa moguće detektovati aktivnost celobioza – dehidrogenaze na osnovu fluorescencije i iskoristiti za pretragu biblioteka gena ovog enzima u proteinskom inženjeringu.

Uspešno su konstruisane *error – prone* biblioteke mutanata upotrebom celobioza – dehidrogenaze insertovane u pCTCON2 vektor, odakle je analizom i merenjem aktivnosti enzima detektovan trostruki mutant (D20N, A64T, V592M) koji je za razliku od prirodnog oblika enzima pokazivao aktivnost.

U ovoj doktorskoj disertaciji uspešno su kreirane saturacione biblioteke upotrebom semi – racionalnog dizajna i detektovani su mutanti oksidativno stabilniji u prisustvu 0,3 M vodonik peroksida u odnosu na prirodni oblik celobioza – dehidrogenaze. Analizom kreiranih biblioteka na pozicijama metionina 65, 685, 738 uočeno je da zamenom metionina na poziciji 65, koji učestvuje u koordinaciji gvožđa unutar hema, sa fenilalaninom nastaje varijanta enzima koja ima 9 puta veću aktivnost u odnosu na prirodni oblik enzima nakon 6 h inkubacije u vodonik peroksidu kao i da pokazuje preko 70% rezidualne aktivnosti. Mutant M685Y pokazuje preko 90% rezidualne aktivnosti, dok mutant M738S iako pokazuje 2 puta manju aktivnost u poređenju sa wtCDH, zadržava 80% rezidualne aktivnosti nakon 6 h inkubacije u vodonik peroksidu. Mutant M685Y ima 5,8 puta povećan polu život u 0,3 M vodonik peroksidu u odnosu na wtCDH. Iako su dobijeni pojedinačni mutanti koji pokazuju povećanu oksidativnu stabilnost, dobijanje mutanata kombinovanjem pojedinačnih mutacija nije bilo uspešno. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su uspešno kreirani mutanti sa povećanom oksidativnom stabilnošću u prisustvu vodonik peroksida, pri čemu M65F i M685Y pokazuju i povećanu aktivnost u poređenju sa wtCDH. Kreirani mutanti zbog

povećane oksidativne stabilnosti ali i povećane aktivnosti predstavljaju odlične kandidate za dizajn biosenzora, ali i za proizvodnju laktobionske kiseline.

Oksidativni mutanti prethodno produkovani u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* kao i trostruki mutant su uspešno klonirani u pPICZ α A vektor i eksprimirani u kvascu *Pichia pastoris* KM71H soju. Mutanti celobioza – dehidrogenaze su prečišćeni i okarakterisani i na osnovu dobijenih rezultata moguće je zaključiti da trostruki mutant celobioza – dehidrogenaze pokazuje najveću konstantu specifičnosti za laktozu ($19,8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) ali i za celobiozu ($358 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) u odnosu na rekombinantni wtCDH za koji konstanta specifičnosti za laktozu iznosi $10,2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, a za celobiozu $177 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Mutant M685Y pokazuje najveću K_m kao i k_{cat} vrednost za laktozu ali i celobiozu kao supstrate u odnosu na prirodni oblik enzima ali i ostale analizirane mutante.

Trostruki mutant (D2oN, A64T, V592M) dobijen uvođenjem mutacija pomoću *error – prone* PCR je iskorišćen za proizvodnju laktobionske kiseline. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da upotrebom celobioza – dehidrogenaze eksprimirane na površini ćelija kvasca i lakazom moguće uspešno produkovati laktobionsku kiselinu, pri čemu se nakon 24 h dobija 60 μmol dok upotrebom rekombinantne celobioza – dehidrogenaze produkovane u *Pichia pastoris*, nakon 24 h dobija se 3,84 mmol laktobionske kiseline. Dobijeni rezultati ukazuju da je upotrebom celobioza – dehidrogenaze eksprimirane na površini ćelija kvasca moguće produkovati laktobionsku kiselinu, ali usled veoma male aktivnosti enzima eksprimiranog na površini kvasca dobija se 64 puta manje laktobionske kiseline u odnosu na enzim dobijen iz *Pichia pastoris*.

7. Literatura

-
- [1] Bommarius, A. S., and Paye, M. F. (2013) Stabilizing biocatalysts, *Chemical Society reviews* 42, 6534-6565.
- [2] Choi, J. M., Han, S. S., and Kim, H. S. (2015) Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnology advances* 33, 1443-1454.
- [3] Prasad, S., and Roy, I. (2018) Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance, *Recent patents on biotechnology* 12, 33-56.
- [4] Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Sukumaran, R. K., and Pandey, A. (2017) Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications, *Bioresource technology* 245, 1304-1313.
- [5] Akoh, C. C., Chang, S. W., Lee, G. C., and Shaw, J. F. (2008) Biocatalysis for the production of industrial products and functional foods from rice and other agricultural produce, *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 10445-10451.
- [6] Fernandes, P. (2010) Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts, *Enzyme research* 2010, 862537.
- [7] Huisman, G. W., and Collier, S. J. (2013) On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis, *Current opinion in chemical biology* 17, 284-292.
- [8] Kapoor, S., Rafiq, A., and Sharma, S. (2017) Protein engineering and its applications in food industry, *Critical reviews in food science and nutrition* 57, 2321-2329.
- [9] Panesar, P. S., Kumari, S., and Panesar, R. (2013) Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications, *Critical reviews in biotechnology* 33, 345-364.
- [10] Patel, R. N. (2018) Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals, *Bioorganic & medicinal chemistry* 26, 1252-1274.
- [11] Sun, H., Zhang, H., Ang, E. L., and Zhao, H. (2018) Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates, *Bioorganic & medicinal chemistry* 26, 1275-1284.
- [12] Raveendran, S., and Parameswaran, B. (2018) Applications of Microbial Enzymes in Food Industry, 56, 16-30.
- [13] Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., and Mehta, P. K. (2016) Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, 3 *Biotech* 6, 174.
- [14] Gurung, N., Ray, S., Bose, S., and Rai, V. (2013) A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond, *BioMed Research International* 2013, 18.
- [15] Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., and Mohan, R. (2000) Advances in microbial amylases, *Biotechnology and applied biochemistry* 31 (Pt 2), 135-152.
- [16] Liu, L., Yang, H., Shin, H. D., Chen, R. R., Li, J., Du, G., and Chen, J. (2013) How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives, *Bioengineered* 4, 212-223.
- [17] Hammel, K. E., and Cullen, D. (2008) Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis, *Current opinion in plant biology* 11, 349-355.
- [18] Harreither, W., Sygmund, C., Dunhofen, E., Vicuna, R., Haltrich, D., and Ludwig, R. (2009) Cellobiose dehydrogenase from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*, *Appl Environ Microbiol* 75, 2750-2757.
- [19] Hatakka, A. (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation, *FEMS microbiology reviews* 13, 125-135.
- [20] Karapetyan, K. N., Fedorova, T. V., Vasil'chenko, L. G., Ludwig, R., Haltrich, D., and Rabinovich, M. L. (2006) Properties of neutral cellobiose dehydrogenase from the ascomycete *Chaetomium* sp. INBI 2-26(-) and comparison with basidiomycetous cellobiose dehydrogenases, *Journal of biotechnology* 121, 34-48.
- [21] ten Have, R., and Teunissen, P. J. (2001) Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi, *Chemical reviews* 101, 3397-3413.
- [22] Zamocky, M., Ludwig, R., Peterbauer, C., Hallberg, B. M., Divne, C., Nicholls, P., and Haltrich, D. (2006) Cellobiose dehydrogenase--a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi, *Current protein & peptide science* 7, 255-280.

- [23] Ander, P. (1994) The cellobiose-oxidizing enzymes CBQ and CbO as related to lignin and cellulose degradation — a review, *FEMS microbiology reviews* 13, 297-311.
- [24] Cameron, M. D., and Aust, S. D. (2001) Cellobiose dehydrogenase-an extracellular fungal flavocytochrome, *Enzyme and microbial technology* 28, 129-138.
- [25] Harreither, W., Sygmond, C., Augustin, M., Narciso, M., Rabinovich, M. L., Gorton, L., Haltrich, D., and Ludwig, R. (2011) Catalytic Properties and Classification of Cellobiose Dehydrogenases from Ascomycetes, *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1804-1815.
- [26] Henriksson, G., Johansson, G., and Pettersson, G. (2000) A critical review of cellobiose dehydrogenases, *Journal of biotechnology* 78, 93-113.
- [27] Henriksson, G., Zhang, L., Li, J., Ljungquist, P., Reitberger, T., Pettersson, G., and Johansson, G. (2000) Is cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* a lignin degrading enzyme?, *Biochimica et biophysica acta* 1480, 83-91.
- [28] Kremer, S. M., and Wood, P. M. (1992) Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *European journal of biochemistry* 208, 807-814.
- [29] Mason, M. G., Nicholls, P., and Wilson, M. T. (2003) Rotting by radicals--the role of cellobiose oxidoreductase?, *Biochemical Society transactions* 31, 1335-1336.
- [30] Baminger, U., Subramaniam, S. S., Renganathan, V., and Haltrich, D. (2001) Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase from the plant pathogen *Sclerotium (Athelia) rolfsii*, *Appl Environ Microbiol* 67, 1766-1774.
- [31] Alonso, S., Rendueles, M., and Díaz, M. (2013) Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects, *Biotechnology advances* 31, 1275-1291.
- [32] Baminger, U., Ludwig, R., Galhaup, C., Leitner, C., Kulbe, K. D., and Haltrich, D. (2001) Continuous enzymatic regeneration of redox mediators used in biotransformation reactions employing flavoproteins, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, 541-550.
- [33] Habermuller, K., Mosbach, M., and Schuhmann, W. (2000) Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors, *Fresenius' journal of analytical chemistry* 366, 560-568.
- [34] Schuhmann, W. (2002) Amperometric enzyme biosensors based on optimised electron-transfer pathways and non-manual immobilisation procedures, *Journal of biotechnology* 82, 425-441.
- [35] Barton, S. C., Gallaway, J., and Atanassov, P. (2004) Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices, *Chemical reviews* 104, 4867-4886.
- [36] Bullen, R. A., Arnot, T. C., Lakeman, J. B., and Walsh, F. C. (2006) Biofuel cells and their development, *Biosensors & bioelectronics* 21, 2015-2045.
- [37] Heller, A. (2004) Miniature biofuel cells, *Physical Chemistry Chemical Physics* 6, 209-216.
- [38] Willner, I. I., and Katz, E. (2000) Integration of Layered Redox Proteins and Conductive Supports for Bioelectronic Applications, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 39, 1180-1218.
- [39] Tasca, F., Gorton, L., Harreither, W., Haltrich, D., Ludwig, R., and Nöll, G. (2008) Direct Electron Transfer at Cellobiose Dehydrogenase Modified Anodes for Biofuel Cells, *The Journal of Physical Chemistry C* 112, 9956-9961.
- [40] Rayner, A. D. M., and Boddy, L. (1988) *Fungal decomposition of wood : its biology and ecology*, Wiley, Chichester; New York.
- [41] Willför, S., Sundberg, A., Pranovich, A., and Holmbom, B. (2005) *Polysaccharides in some industrially important hardwood species*, Vol. 39.
- [42] Blanchette, R. A., Nilsson, T., Daniel, G., and Abad, A. (1989) Biological Degradation of Wood, In *Archaeological Wood*, pp 141-174, American Chemical Society.
- [43] Breen, A., and Singleton, F. L. (1999) Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping, *Current opinion in biotechnology* 10, 252-258.
- [44] Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N. S., Hofrichter, M., and Rogalski, J. (1999) Biodegradation of lignin by white rot fungi, *Fungal genetics and biology : FG & B* 27, 175-185.

- [45] Beguin, P., and Aubert, J. P. (1994) The biological degradation of cellulose, *FEMS microbiology reviews* 13, 25-58.
- [46] Eastwood, D. C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., Asiegbu, F. O., Baker, S. E., Barry, K., Bendiksby, M., Blumentritt, M., Coutinho, P. M., Cullen, D., de Vries, R. P., Gathman, A., Goodell, B., Henrissat, B., Ihrmark, K., Kauserud, H., Kohler, A., LaButti, K., Lapidus, A., Lavin, J. L., Lee, Y. H., Lindquist, E., Lilly, W., Lucas, S., Morin, E., Murat, C., Oguiza, J. A., Park, J., Pisabarro, A. G., Riley, R., Rosling, A., Salamov, A., Schmidt, O., Schmutz, J., Skrede, I., Stenlid, J., Wiebenga, A., Xie, X., Kues, U., Hibbett, D. S., Hoffmeister, D., Hogberg, N., Martin, F., Grigoriev, I. V., and Watkinson, S. C. (2011) The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi, *Science (New York, N.Y.)* 333, 762-765.
- [47] Gilbertson, R. L. (1980) Wood-Rotting Fungi of North America, *Mycologia* 72, 1-49.
- [48] SAVORY, J. G. (1954) BREAKDOWN OF TIMBER BY ASCOMYCETES AND FUNGI IMPERFECTI, *Annals of Applied Biology* 41, 336-347.
- [49] Schubert, M., Engel, J., Thony-Meyer, L., Schwarze, F. W., and Ihssen, J. (2012) Protection of wood from microorganisms by laccase-catalyzed iodination, *Appl Environ Microbiol* 78, 7267-7275.
- [50] Daniel, G. (1994) *Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation FEMS*, Vol. 13.
- [51] Daniel, G. (2003) Microview of Wood under Degradation by Bacteria and Fungi, In *Wood Deterioration and Preservation*, pp 34-72, American Chemical Society.
- [52] Blanchette, R. A. (1991) Delignification by Wood-Decay Fungi, *Annual Review of Phytopathology* 29, 381-403.
- [53] Daniel, G., Volc, J., and Niku-Paavola, M.-L. (2004) Cryo-FE-SEM & TEM immuno-techniques reveal new details for understanding white-rot decay of lignocellulose, *Comptes Rendus Biologies* 327, 861-871.
- [54] Messner, K., and Srebotnik, E. (1994) Biopulping: An overview of developments in an environmentally safe paper-making technology, *FEMS microbiology reviews* 13, 351-364.
- [55] Wong, D. W. (2009) Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes, *Applied biochemistry and biotechnology* 157, 174-209.
- [56] Bao, W., Usha, S. N., and Renganathan, V. (1993) Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel extracellular hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Archives of biochemistry and biophysics* 300, 705-713.
- [57] Rotsaert, F. A. J., Renganathan, V., and Gold, M. H. (2003) Role of the flavin domain residues, His689 and Asn732, in the catalytic mechanism of cellobiose dehydrogenase from *phanerochaete chrysosporium*, *Biochemistry* 42, 4049-4056.
- [58] Hori, C., Gaskell, J., Igarashi, K., Kersten, P., Mozuch, M., Samejima, M., and Cullen, D. (2014) Temporal alterations in the secretome of the selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora* during growth on aspen wood reveal this organism's strategy for degrading lignocellulose, *Applied and environmental microbiology* 80, 2062-2070.
- [59] Beguin, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation, *Annual review of microbiology* 44, 219-248.
- [60] Coughlan, M. P. (1985) The Properties of Fungal and Bacterial Cellulases with Comment on their Production and Application, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 3, 39-110.
- [61] Coughlan, M. P. (1992) Enzymic hydrolysis of cellulose: An overview, *Bioresource technology* 39, 107-115.
- [62] Gilbert, H. J., and Hazlewood, G. P. (1993) Bacterial cellulases and xylanases, 139, 187-194.
- [63] Atalla, R. H., and Vanderhart, D. L. (1984) Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms, *Science (New York, N.Y.)* 223, 283-285.

- [64] Ludwig, R., Harreither, W., Tasca, F., and Gorton, L. (2010) Cellobiose Dehydrogenase: A Versatile Catalyst for Electrochemical Applications, *ii*, 2674-2697.
- [65] Daniel, K., and Roland, L. (2016) Cellobiose dehydrogenase: An essential enzyme for lignocellulose degradation in nature – A review / Cellobiosedehydrogenase: Ein essentielles Enzym für den Lignozelluloseabbau in der Natur – Eine Übersicht, *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment* 67, 145-163.
- [66] Ayers, A. R., Ayers, S. B., and Eriksson, K. E. (1978) Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*, *European journal of biochemistry* 90, 171-181.
- [67] Westermarck, U., and Eriksson, K. E. (1975) Purification and properties of cellobiose: quinone oxidoreductase from *Sporotrichum pulverulentum*, *Acta Chem Scand B* 29, 419-424.
- [68] Li, B., Nagalla, S. R., and Renganathan, V. (1996) Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and environmental microbiology* 62, 1329-1335.
- [69] Raices, M., Paifer, E., Cremata, J., Montesino, R., Stahlberg, J., Divne, C., Szabo, I. J., Henriksson, G., Johansson, G., and Pettersson, G. (1995) Cloning and characterization of a cDNA encoding a cellobiose dehydrogenase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS letters* 369, 233-238.
- [70] Henriksson, G., Pettersson, G., Johansson, G., Ruiz, A., and Uzcategui, E. (1991) Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains, *European journal of biochemistry* 196, 101-106.
- [71] Subramaniam, S. S., Nagalla, S. R., and Renganathan, V. (1999) Cloning and characterization of a thermostable cellobiose dehydrogenase from *Sporotrichum thermophile*, *Archives of biochemistry and biophysics* 365, 223-230.
- [72] Ander, P., Mishra, C., Farrell, R. L., and Eriksson, K.-E. L. (1990) Redox reactions in lignin degradation: interactions between laccase, different peroxidases and cellobiose: quinone oxidoreductase, *Journal of biotechnology* 13, 189-198.
- [73] Igarashi, K., Samejima, M., and Eriksson, K. E. (1998) Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition, *European journal of biochemistry* 253, 101-106.
- [74] Roy, B. P., Paice, M. G., Archibald, F. S., Misra, S. K., and Misiak, L. E. (1994) Creation of metal-complexing agents, reduction of manganese dioxide, and promotion of manganese peroxidase-mediated Mn(III) production by cellobiose:quinone oxidoreductase from *Trametes versicolor*, *The Journal of biological chemistry* 269, 19745-19750.
- [75] KREMER, S. M., and WOOD, P. M. (1992) Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe(III) reductase, *205*, 133-138.
- [76] Kremer, S. M., and Wood, P. M. (1992) Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* as a source of Fenton's reagent, *Biochemical Society transactions* 20, 110S.
- [77] Henriksson, G., Ander, P., Pettersson, B., and Pettersson, G. (1995) CELLOBIOSE DEHYDROGENASE (CELLOBIOSE OXIDASE) FROM PHANEROCHAETE-CHRYOSPORIUM AS A WOOD DEGRADING ENZYME - STUDIES ON CELLULOSE, XYLAN AND SYNTHETIC LIGNIN, *Applied microbiology and biotechnology* 42, 790-796.
- [78] Arantes, V., Jellison, J., and Goodell, B. (2012) Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass, *Applied microbiology and biotechnology* 94, 323-338.
- [79] Tan, T.-C., Kracher, D., Gandini, R., Sygmund, C., Kittl, R., Haltrich, D., Hällberg, B. M., Ludwig, R., and Divne, C. (2015) Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation, *Nature Communications* 6, 7542.

- [80] Langston, J. A., Shaghasi, T., Abbate, E., Xu, F., Vlasenko, E., and Sweeney, M. D. (2011) Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61, *Appl Environ Microbiol* 77, 7007-7015.
- [81] Phillips, C. M., Beeson, W. T., Cate, J. H., and Marletta, M. A. (2011) Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*, *ACS chemical biology* 6, 1399-1406.
- [82] Li, B., Nagalla, S. R., and Renganathan, V. (1997) Cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* is encoded by two allelic variants, *Appl Environ Microbiol* 63, 796-799.
- [83] Desriani, Ferri, S., and Sode, K. (2010) Functional expression of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase flavin domain in *Escherichia coli*, *Biotechnol Lett* 32, 855-859.
- [84] Lehner, D., Zipper, P., Henriksson, G., and Pettersson, G. (1996) Small-angle X-ray scattering studies on cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1293, 161-169.
- [85] Hallberg, B. M., Bergfors, T., Backbro, K., Pettersson, G., Henriksson, G., and Divne, C. (2000) A new scaffold for binding haem in the cytochrome domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase, *Structure (London, England : 1993)* 8, 79-88.
- [86] Hallberg, B. M., Henriksson, G., Pettersson, G., and Divne, C. (2002) Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase, *Journal of molecular biology* 315, 421-434.
- [87] Cox, M. C., Rogers, M. S., Cheesman, M., Jones, G. D., Thomson, A. J., Wilson, M. T., and Moore, G. R. (1992) Spectroscopic identification of the haem ligands of cellobiose oxidase, *FEBS letters* 307, 233-236.
- [88] Dumonceaux, T. J., Bartholomew, K. A., Charles, T. C., Moukha, S. M., and Archibald, F. S. (1998) Cloning and sequencing of a gene encoding cellobiose dehydrogenase from *Trametes versicolor*, *Gene* 210, 211-219.
- [89] Rotsaert, F. A., Li, B., Renganathan, V., and Gold, M. H. (2001) Site-directed mutagenesis of the heme axial ligands in the hemoflavoenzyme cellobiose dehydrogenase, *Archives of biochemistry and biophysics* 390, 206-214.
- [90] Kleingardner, J. G., and Bren, K. L. (2015) Biological significance and applications of heme c proteins and peptides, *Accounts of chemical research* 48, 1845-1852.
- [91] Cavener, D. R. (1992) GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities, *Journal of molecular biology* 223, 811-814.
- [92] Kiess, M., Hecht, H. J., and Kalisz, H. M. (1998) Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases, *European journal of biochemistry* 252, 90-99.
- [93] Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H. M., and Hecht, H. J. (1999) 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 55, 969-977.
- [94] Li, J., Vrieling, A., Brick, P., and Blow, D. M. (1993) Crystal structure of cholesterol oxidase complexed with a steroid substrate: implications for flavin adenine dinucleotide dependent alcohol oxidases, *Biochemistry* 32, 11507-11515.
- [95] Vrieling, A., Lloyd, L. F., and Blow, D. M. (1991) Crystal structure of cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum* refined at 1.8 Å resolution, *Journal of molecular biology* 219, 533-554.
- [96] Zamocky, M., Hallberg, M., Ludwig, R., Divne, C., and Haltrich, D. (2004) Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi, *Gene* 338, 1-14.

- [97] Igarashi, K., Momohara, I., Nishino, T., and Samejima, M. (2002) Kinetics of inter-domain electron transfer in flavocytochrome cellobiose dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochem J* 365, 521-526.
- [98] Hallberg, B. M., Henriksson, G., Pettersson, G., Vasella, A., and Divne, C. (2003) Mechanism of the Reductive Half-reaction in Cellobiose Dehydrogenase, *The Journal of biological chemistry* 278, 7166.
- [99] Henriksson, G., Johansson, G., and Pettersson, G. (1993) Is cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* a one-electron reductase?, *Biochimica et biophysica acta* 1144, 184-190.
- [100] Morpeth, F. F. (1985) Some properties of cellobiose oxidase from the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*, *Biochem J* 228, 557-564.
- [101] Cohen, J. D., Bao, W., Renganathan, V., Subramaniam, S. S., and Loehr, T. M. (1997) Resonance Raman spectroscopic studies of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Archives of biochemistry and biophysics* 341, 321-328.
- [102] Rogers, M. S., Jones, G. D., Antonini, G., Wilson, M. T., and Brunori, M. (1994) Electron transfer from *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose oxidase to equine cytochrome c and *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome c-551, *Biochem J* 298 (Pt 2), 329-334.
- [103] Samejima, M., and Eriksson, K. E. (1992) A comparison of the catalytic properties of cellobiose:quinone oxidoreductase and cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *European journal of biochemistry* 207, 103-107.
- [104] Ghisla, S., and Massey, V. (1989) Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions, *European journal of biochemistry* 181, 1-17.
- [105] Jones, G. D., and Wilson, M. T. (1988) Rapid kinetic studies of the reduction of cellobiose oxidase from the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* by cellobiose, *Biochem J* 256, 713-718.
- [106] Samejima, M., Phillips, R. S., and Eriksson, K. E. (1992) Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Stopped-flow spectrophotometric analysis of pH-dependent reduction, *FEBS letters* 306, 165-168.
- [107] Wilson, M., and L Liu, B. (1994) Electron transfer reactions of cellobiose oxidase, *Biochemical Society transactions* 22, 725-728.
- [108] Stoica, L., Ruzgas, T., Ludwig, R., Haltrich, D., and Gorton, L. (2006) Direct electron transfer--a favorite electron route for cellobiose dehydrogenase (CDH) from *Trametes villosa*. Comparison with CDH from *Phanerochaete chrysosporium*, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 22, 10801-10806.
- [109] Westermark, U., and Eriksson, K.-E. J. A. c. s. B. (1974) Carbohydrate-dependent enzymic quinone reduction during lignin degradation, 28, 204-208.
- [110] Mansfield, S. D., De Jong, E., and Saddler, J. N. (1997) Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization, *Applied and environmental microbiology* 63, 3804-3809.
- [111] Mason, M. G., Nicholls, P., Divne, C., Hallberg, B. M., Henriksson, G., and Wilson, M. T. (2003) The heme domain of cellobiose oxidoreductase: a one-electron reducing system, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1604, 47-54.
- [112] Mason, M. G., Wilson, M. T., Ball, A., and Nicholls, P. (2002) Oxygen reduction by cellobiose oxidoreductase: the role of the haem group, *FEBS letters* 518, 29-32.
- [113] Temp, U., and Eggert, C. (1999) Novel interaction between laccase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*, *Applied and environmental microbiology* 65, 389-395.
- [114] Wilson, M. T., Hogg, N., and Jones, G. D. (1990) Reactions of reduced cellobiose oxidase with oxygen. Is cellobiose oxidase primarily an oxidase?, *Biochem J* 270, 265-267.
- [115] Duarte, J. C., Costa-Ferreira, M., and Sena-Martins, G. (1999) Cellobiose dehydrogenase. Possible roles and importance for pulp and paper biotechnology, *Bioresource technology* 68, 43-48.

- [116] Calabrese Barton, S., Gallaway, J., and Atanassov, P. (2004) Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices, *Chemical reviews* 104, 4867-4886.
- [117] Dutton, P. L. (1978) Redox potentiometry: determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems, *Methods in enzymology* 54, 411-435.
- [118] Wilson, G. S. (1978) Determination of oxidation-reduction potentials, *Methods in enzymology* 54, 396-410.
- [119] Heller, A. (2006) Electron-conducting redox hydrogels: Design, characteristics and synthesis, *Current opinion in chemical biology* 10, 664-672.
- [120] Harreither, W., Coman, V., Ludwig, R., Haltrich, D., and Gorton, L. (2007) Investigation of Graphite Electrodes Modified with Cellobiose Dehydrogenase from the Ascomycete *Mycioccum thermophilum*, 19, 172-180.
- [121] Stoica, L., Dimcheva, N., Haltrich, D., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2005) Electrochemical investigation of cellobiose dehydrogenase from new fungal sources on Au electrodes, *Biosensors & bioelectronics* 20, 2010-2018.
- [122] Stoica, L., Ludwig, R., Haltrich, D., and Gorton, L. (2006) Third-generation biosensor for lactose based on newly discovered cellobiose dehydrogenase, *Analytical chemistry* 78, 393-398.
- [123] Heim, R., Prasher, D. C., and Tsien, R. Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12501-12504.
- [124] Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2010) Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues, *Physiological reviews* 90, 1103-1163.
- [125] Pakhomov, A. A., and Martynov, V. I. (2008) GFP family: structural insights into spectral tuning, *Chemistry & biology* 15, 755-764.
- [126] Remington, S. J. (2006) Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics, *Current opinion in structural biology* 16, 714-721.
- [127] Remington, S. J. (2002) Negotiating the speed bumps to fluorescence, *Nature biotechnology* 20, 28-29.
- [128] Shaner, N. C., Steinbach, P. A., and Tsien, R. Y. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins, *Nature methods* 2, 905-909.
- [129] Shu, X., Shaner, N. C., Yarbrough, C. A., Tsien, R. Y., and Remington, S. J. (2006) Novel chromophores and buried charges control color in mFruits, *Biochemistry* 45, 9639-9647.
- [130] Davidson, M., and E Campbell, R. (2009) Engineered fluorescent proteins: Innovations and applications, *Nature methods* 6, 713-717.
- [131] Day, R. N., and Davidson, M. W. (2009) The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging, *Chemical Society reviews* 38, 2887-2921.
- [132] Kremers, G. J., Gilbert, S. G., Cranfill, P. J., Davidson, M. W., and Piston, D. W. (2011) Fluorescent proteins at a glance, *Journal of cell science* 124, 157-160.
- [133] Shaner, N. C., Patterson, G. H., and Davidson, M. W. (2007) Advances in fluorescent protein technology, *Journal of cell science* 120, 4247-4260.
- [134] Barondeau, D. P., Kassmann, C. J., Tainer, J. A., and Getzoff, E. D. (2006) Understanding GFP posttranslational chemistry: structures of designed variants that achieve backbone fragmentation, hydrolysis, and decarboxylation, *Journal of the American Chemical Society* 128, 4685-4693.
- [135] Barondeau, D. P., Kassmann, C. J., Tainer, J. A., and Getzoff, E. D. (2007) The case of the missing ring: radical cleavage of a carbon-carbon bond and implications for GFP chromophore biosynthesis, *Journal of the American Chemical Society* 129, 3118-3126.
- [136] Tomosugi, W., Matsuda, T., Tani, T., Nemoto, T., Kotera, I., Saito, K., Horikawa, K., and Nagai, T. (2009) An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity, *Nature methods* 6, 351-353.

- [137] Baldini, G., Cannone, F., and Chirico, G. (2005) Pre-unfolding resonant oscillations of single green fluorescent protein molecules, *Science (New York, N.Y.)* 309, 1096-1100.
- [138] Huang, D., and Shusta, E. V. (2005) Secretion and surface display of green fluorescent protein using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology progress* 21, 349-357.
- [139] Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., and Tsien, R. Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins, *Trends in biochemical sciences* 20, 448-455.
- [140] March, J. C., Rao, G., and Bentley, W. E. (2003) Biotechnological applications of green fluorescent protein, *Applied microbiology and biotechnology* 62, 303-315.
- [141] Tsien, R. Y. (1998) THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN, 67, 509-544.
- [142] Zimmer, M. (2002) Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior, *Chemical reviews* 102, 759-781.
- [143] Li, J., Xu, H., Bentley, W. E., and Rao, G. (2002) Impediments to secretion of green fluorescent protein and its fusion from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology progress* 18, 831-838.
- [144] Ram, A. F., Van den Ende, H., and Klis, F. M. (1998) Green fluorescent protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS microbiology letters* 162, 249-255.
- [145] Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene* 173, 33-38.
- [146] Boder, E. T., and Wittrup, K. D. (2000) Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, *Methods in enzymology* 328, 430-444.
- [147] Cappellaro, C., Hauser, K., Mrša, V., Watzele, M., Watzele, G., Gruber, C., and Tanner, W. (1991) *Saccharomyces cerevisiae* α - and α -agglutinin: characterization of their molecular interaction, *EMBO J* 10, 4081-4088.
- [148] Dubey, K. K., Pramanik, A., Ankush, Khushboo, and Yadav, J. (2019) Chapter 12 - Enzyme Engineering, In *Advances in Enzyme Technology* (Singh, R. S., Singhania, R. R., Pandey, A., and Larroche, C., Eds.), pp 325-347, Elsevier.
- [149] Matsuura, T., Miyai, K., Trakulnaleamsai, S., Yomo, T., Shima, Y., Miki, S., Yamamoto, K., and Urabe, I. (1999) Evolutionary molecular engineering by random elongation mutagenesis, *Nature biotechnology* 17, 58-61.
- [150] Heifetz, A., Barker, O., Morris, G. B., Law, R. J., Slack, M., and Biggin, P. C. (2013) Toward an understanding of agonist binding to human Orexin-1 and Orexin-2 receptors with G-protein-coupled receptor modeling and site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 52, 8246-8260.
- [151] Mou, Y., Huang, P.-S., Thomas, L. M., and Mayo, S. L. (2015) Using Molecular Dynamics Simulations as an Aid in the Prediction of Domain Swapping of Computationally Designed Protein Variants, *Journal of molecular biology* 427, 2697-2706.
- [152] Richter, F., Leaver-Fay, A., Khare, S. D., Bjelic, S., and Baker, D. (2011) De novo enzyme design using Rosetta3, *PLoS one* 6, e19230.
- [153] Siegel, J. B., Zanghellini, A., Lovick, H. M., Kiss, G., Lambert, A. R., St Clair, J. L., Gallaher, J. L., Hilvert, D., Gelb, M. H., Stoddard, B. L., Houk, K. N., Michael, F. E., and Baker, D. (2010) Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction, *Science (New York, N.Y.)* 329, 309-313.
- [154] Singh, A., Poshtiban, S., and Evoy, S. (2013) Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection, *Sensors (Basel, Switzerland)* 13, 1763-1786.
- [155] Cobb, R. E., Chao, R., and Zhao, H. (2013) Directed Evolution: Past, Present and Future, *AIChE journal. American Institute of Chemical Engineers* 59, 1432-1440.
- [156] B Rubin-Pitel, S., Cho, H., Chen, W., and Zhao, H. (2007) Chapter 3. Directed Evolution Tools in Bioproduct and Bioprocess Development, *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*.

- [157] Betz, S. F., Liebman, P. A., and DeGrado, W. F. (1997) De novo design of native proteins: characterization of proteins intended to fold into antiparallel, rop-like, four-helix bundles, *Biochemistry* 36, 2450-2458.
- [158] Severin, K., Lee, D. H., Kennan, A. J., and Ghadiri, M. R. (1997) A synthetic peptide ligase, *Nature* 389, 706-709.
- [159] Cedrone, F., Menez, A., and Quemeneur, E. (2000) Tailoring new enzyme functions by rational redesign, *Current opinion in structural biology* 10, 405-410.
- [160] Antikainen, N. M., and Martin, S. F. (2005) Altering protein specificity: techniques and applications, *Bioorganic & medicinal chemistry* 13, 2701-2716.
- [161] Arnold, F. H. (1993) Engineering proteins for nonnatural environments, 7, 744-749.
- [162] Turanli, B., Alkim, C., and Cakar, Z. P. (2012) Protein Engineering Methods and Applications.
- [163] Sygmund, C., Santner, P., Krondorfer, I., Peterbauer, C. K., Alcalde, M., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M., and Ludwig, R. (2013) Semi-rational engineering of cellobiose dehydrogenase for improved hydrogen peroxide production, *Microbial cell factories* 12, 38.
- [164] Reena Gomes, A., Munivenkatappa Byregowda, S., Muniveerappa Veeregowda, B., and Vinayagamurthy, B. (2016) An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins, *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 4, 346-356.
- [165] Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Current opinion in biotechnology* 10, 411-421.
- [166] Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., and Higgins, D. R. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, *Molecular biotechnology* 16, 23-52.
- [167] Malys, N., Wishart, J. A., Oliver, S. G., and McCarthy, J. E. G. (2011) Chapter eleven - Protein Production in *Saccharomyces cerevisiae* for Systems Biology Studies, In *Methods in enzymology* (Jameson, D., Verma, M., and Westerhoff, H. V., Eds.), pp 197-212, Academic Press.
- [168] Visser, H., Joosten, V., Punt, P. J., Gusakov, A. V., Olson, P. T., Joosten, R., Bartels, J., Visser, J., Sinitsyn, A. P., Emalfarb, M. A., Verdoes, J. C., and Wery, J. (2011) RESEARCH: Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C₁, *Industrial Biotechnology* 7, 214-223.
- [169] Kost, T. A., and Condreay, J. P. (1999) Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells, *Current opinion in biotechnology* 10, 428-433.
- [170] Glick, B. R., Pasternak, J. J., and Patten, C. L. (2010) *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, Washington, DC: ASM Press.
- [171] Hitzeman, R. A., Hagie, F. E., Levine, H. L., Goeddel, D. V., Ammerer, G., and Hall, B. D. (1981) Expression of a human gene for interferon in yeast, *Nature* 293, 717-722.
- [172] Vinayagamurthy, B., Reddy, G. R., and Suryanarayana, V. V. S. (2007) *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins - Vaccines, *Indian Journal of Biotechnology* 6, 175-186.
- [173] Cherf, G. M., and Cochran, J. R. (2015) Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering, *Methods Mol Biol* 1319, 155-175.
- [174] McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., and Chiswell, D. J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains, *Nature* 348, 552-554.
- [175] Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science (New York, N.Y.)* 228, 1315-1317.
- [176] Francisco, J. A., Campbell, R., Iverson, B. L., and Georgiou, G. (1993) Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 10444-10448.

- [177] Beerli, R. R., Bauer, M., Buser, R. B., Gwerder, M., Muntwiler, S., Maurer, P., Saudan, P., and Bachmann, M. F. (2008) Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14336-14341.
- [178] Ho, M., Nagata, S., and Pastan, I. (2006) Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9637-9642.
- [179] Boder, E. T., and Wittrup, K. D. (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, *Nature biotechnology* 15, 553-557.
- [180] Chao, G., Lau, W. L., Hackel, B. J., Sazinsky, S. L., Lippow, S. M., and Wittrup, K. D. (2006) Isolation and engineering human antibodies using yeast surface display, *Nat Protoc* 1, 755-768.
- [181] Koide, S., Koide, A., and Lipovsek, D. (2012) Target-binding proteins based on the 10th human fibronectin type III domain ((1)(o)Fn3), *Methods in enzymology* 503, 135-156.
- [182] Scholler, N. (2012) Selection of antibody fragments by yeast display, *Methods Mol Biol* 907, 259-280.
- [183] Zhao, Q., Zhu, Z., and Dimitrov, D. S. (2012) Yeast display of engineered antibody domains, *Methods Mol Biol* 899, 73-84.
- [184] Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., Harpold, M. M., and Gingeras, T. R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*, *Molecular and cellular biology* 5, 1111-1121.
- [185] Koutz, P., Davis, G. R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J., and Thill, G. (1989) Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes, *Yeast (Chichester, England)* 5, 167-177.
- [186] Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A., and Gingeras, T. R. (1987) Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*, *Nucleic Acids Res* 15, 3859-3876.
- [187] Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., and Stillman, C. A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*, *Molecular and cellular biology* 9, 1316-1323.
- [188] Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J. J., and Romanes, M. A. (1993) The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Gene* 136, 111-119.
- [189] Grinna, L. S., and Tschopp, J. F. (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, *Yeast (Chichester, England)* 5, 107-115.
- [190] Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W., and Grinna, L. (1987) High-Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylotrophic Yeast, *Pichia Pastoris*, *Bio/Technology* 5, 1305-1308.
- [191] Pavor, T. V., Cho, Y. K., and Shusta, E. V. (2009) Development of GFP-based biosensors possessing the binding properties of antibodies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 11895-11900.
- [192] Yoshida, M., Ohira, T., Igarashi, K., Nagasawa, H., Aida, K., Hallberg, B. M., Divne, C., Nishino, T., and Samejima, M. (2001) Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 65, 2050-2057.
- [193] Kim, Y. H., Berry, A. H., Spencer, D. S., and Stites, W. E. (2001) Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins, *Protein Eng* 14, 343-347.

- [194] Vogt, W. (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal, *Free Radic Biol Med* 18, 93-105.
- [195] Blažić, M. (2019) Protein engineering of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* in yeast *Saccharomyces cerevisiae* InvSci for increased activity and stability, *Biochemical engineering journal* v. 146, pp. 179-185-2019 v.2146.
- [196] Blazic, M., Kovacevic, G., Prodanovic, O., Ostafe, R., Gavrovic-Jankulovic, M., Fischer, R., and Prodanovic, R. (2013) Yeast surface display for the expression, purification and characterization of wild-type and B11 mutant glucose oxidases, *Protein Expression and Purification* 89, 175-180.
- [197] Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., and Arnold, F. H. (2003) Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution, *Appl Environ Microbiol* 69, 987-995.
- [198] Chu, F. K., and Maley, F. (1980) The effect of glucose on the synthesis and glycosylation of the polypeptide moiety of yeast external invertase, *The Journal of biological chemistry* 255, 6392-6397.
- [199] Kovačević, G., Ostafe, R., Fischer, R., and Prodanović, R. (2019) Influence of methionine residue position on oxidative stability of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Biochemical Engineering Journal* 146, 143-149.
- [200] Kovacevic, G., Blazic, M., Draganic, B., Ostafe, R., Gavrovic-Jankulovic, M., Fischer, R., and Prodanovic, R. (2014) Cloning, heterologous expression, purification and characterization of M12 mutant of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* KM71H, *Molecular biotechnology* 56, 305-311.
- [201] Roodveldt, C., Aharoni, A., and Tawfik, D. S. (2005) Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability, *Current opinion in structural biology* 15, 50-56.
- [202] Wu, C. F., Cha, H. J., Rao, G., Valdes, J. J., and Bentley, W. E. (2000) A green fluorescent protein fusion strategy for monitoring the expression, cellular location, and separation of biologically active organophosphorus hydrolase, *Applied microbiology and biotechnology* 54, 78-83.
- [203] Kovačević, G., Ostafe, R., Balaž, A. M., Fischer, R., and Prodanović, R. (2019) Development of GFP-based high-throughput screening system for directed evolution of glucose oxidase, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 127, 30-37.
- [204] Baminger, U., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., and Haltrich, D. (1999) A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase, *Journal of microbiological methods* 35, 253-259.
- [205] Cereghino, G. P., Cereghino, J. L., Ilgen, C., and Cregg, J. M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*, *Current opinion in biotechnology* 13, 329-332.
- [206] Cereghino, J. L., and Cregg, J. M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS microbiology reviews* 24, 45-66.
- [207] Suk Choi, H., Sup Kim, D., Thapa, L., Lee, S.-J., Kim, S. B., Cho, J., Park, C., and Kim, S. (2016) Production and characterization of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* KCCM 60256 and its application for an enzymatic fuel cell, *Korean Journal of Chemical Engineering*.
- [208] Henriksson, G., Sild, V., Szabo, I. J., Pettersson, G., and Johansson, G. (1998) Substrate specificity of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochimica et biophysica acta* 1383, 48-54.

8. Prilog

8.1. Prilog 1

Prajmeri za kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pYES2 vektor

forward prajmer ATCGAATTCATGAGATTTCTTCAATTTT

reverse prajmer ATCTCTAGATCAAGGACCTCCCGCAAGCG

Prajmeri za kreiranje saturacionih biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pYES2 vektoru¹⁶

M65 *forward* prajmer CTCGGTGGCGCCNNNAACAACGACCTG

reverse prajmer CAGGTCGTTGTTNNNGGCGCCACCGAG

M685 *forward* prajmer GACCCCGCGACGNNNAACTCGAACCAC

reverse prajmer GTGGTTCGAGTTNNNCGTCGCGGGGTC

M738 *forward* prajmer CAGGGCACGCTCNNNTCTGCCGCCGAG

reverse prajmer CTCGGCGGCAGANNNGAGCGTGCCCTG

Prajmeri za kreiranje kombinovanih mutanata celobioza – dehidrogenaze u pYES2 vektoru

M65 *forward* prajmer CTCGGTGGCGCCTTCAACAACGACCTG

reverse prajmer CAGGTCGTTGTTGAAGGCGCCACCGAG

M685 *forward* prajmer GACCCCGCGACGTATAACTCGAACCAC

reverse prajmer GTGGTTCGAGTTATACGTCGCGGGGTC

¹⁶ NNN predstavlja svaki od 64 kodona.

M738	<i>forward</i> prajmer	CAGGGCACGCTC AGT TCTGCCGCCGAG
	<i>reverse</i> prajmer	CTCGGCCGGCAGAA ACT GAGCGTGCCCTG

Prajmeri za kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pCTCON₂ vektor

<i>forward</i> prajmer	ATGCTAGCCAGAGTGCCTCACAGTTTACC
<i>reverse</i> prajmer	ATGGATCCTCAAGGACCTCCCGCAAG

Prajmeri za kreiranje error – prone biblioteka celobioza – dehidrogenaze u pCTCON₂ vektor

<i>forward</i> prajmer	ATGCTAGCCAGAGTGCCTCACAGTTTACC
<i>reverse</i> prajmer	ATGGATCCTCAAGGACCTCCCGCAAG

Prajmeri za kloniranje gena za zeleni fluorescentni protein u pCTCON₂ vektor

<i>forward</i> prajmer	ATTGGATCCTCTGGTATGTCTAAAGGTGAAGAATT
<i>reverse</i> prajmer	AATCTCGAGTCATTTGTACAATTCATCCATAC

Prajmeri za kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u GFP – pCTCON₂ vektor

<i>forward</i> prajmer	ATGCTAGCCAGAGTGCCTCACAGTTTACC
<i>reverse</i> prajmer	ATGGATCCTCAAGGACCTCCCGCAAG

Prajmeri za kloniranje gena za celobioza – dehidrogenazu u pPICZ α A vektor

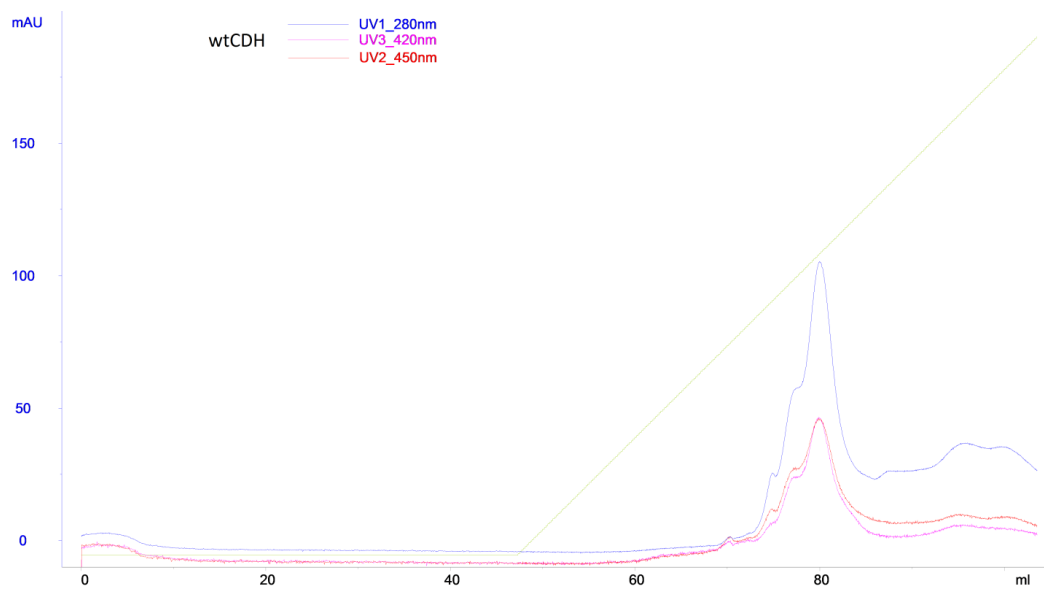
<i>forward</i> prajmer	ATGAATTCCAGAGTGCCTCACAGTTTACC
------------------------	-------------------------------

reverse prajmer ATTCTAGATCAAGGACCTCCCGCAAG

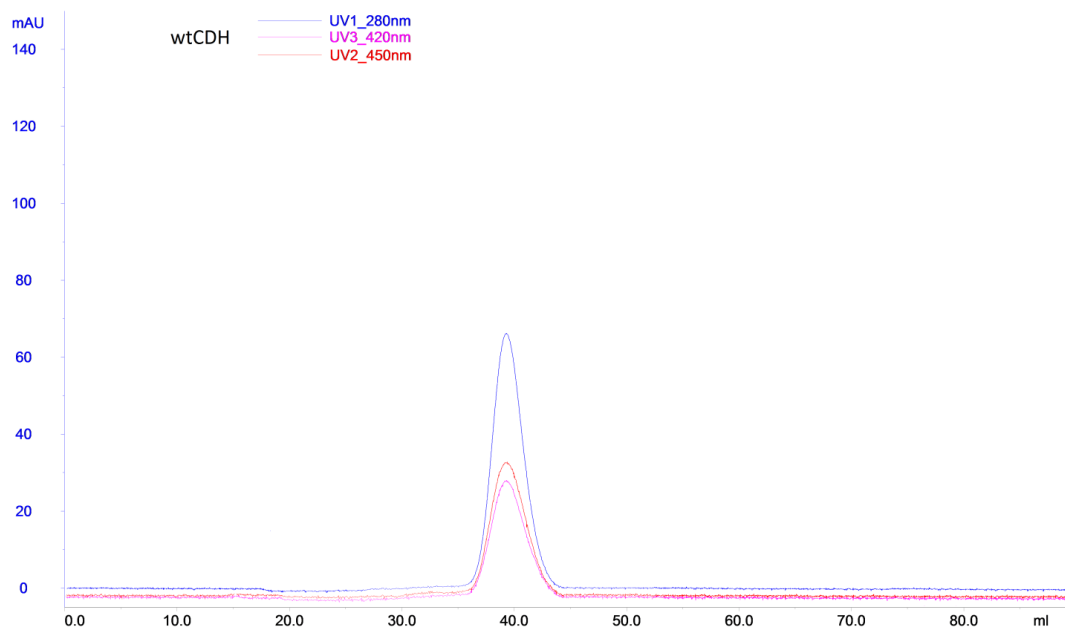
**Prajmeri za kloniranje mutiranih gena za celobioza –
dehidrogenazu u pPICZ α A vektor**

D20N	<i>forward</i> prajmer	GGTATCACCAACCCTGTTCATG
A64T	<i>forward</i> prajmer	CTCGGTGGCACCATGAACAAC
V592M	<i>forward</i> prajmer	CGCAGCCTCCATGAACTCC
M65F	<i>forward</i> prajmer	CTCGGTGGCGCCTTTAACAACGACCTG
M685Y	<i>forward</i> prajmer	GACCCCGCGACGTATAACTCGAACCAC
M738S	<i>forward</i> prajmer	GCACGCTCTCTTCTGCCGCCG

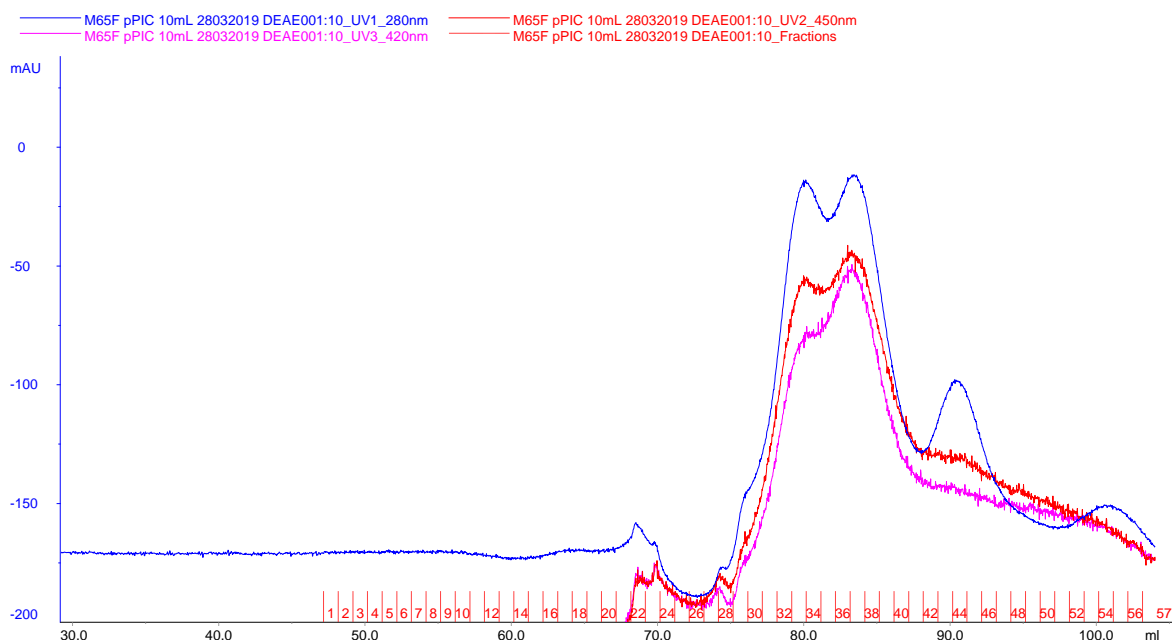
8.2. Prilog 2



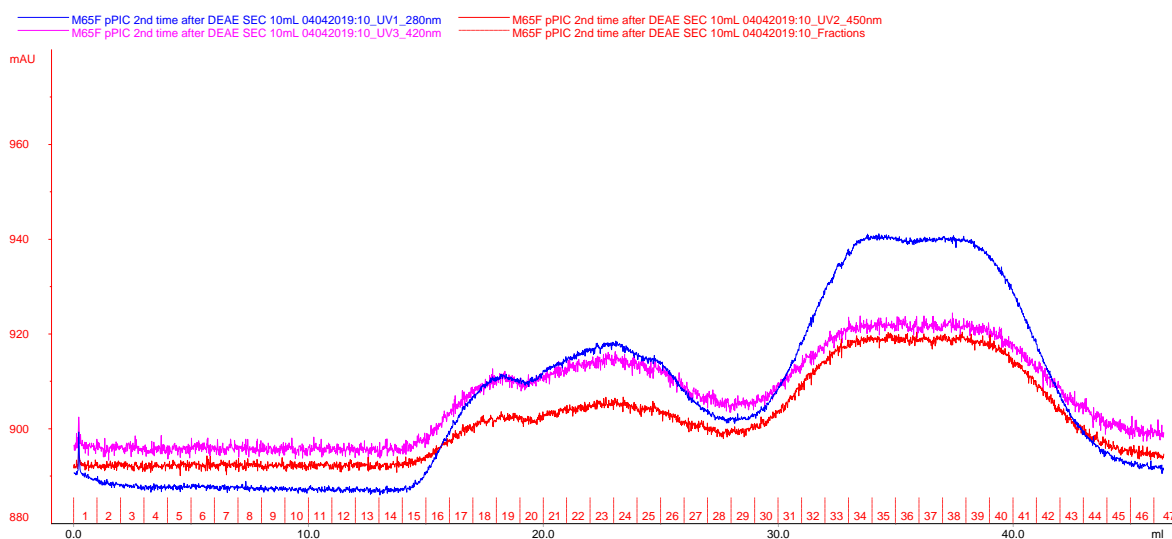
Slika 37: Prikaz hromatograma za prirodni oblik celobioza – dehidrogenaze (wtCDH) eksprimiran u *Pichia pastoris* KM71H soju nakon jonoizmenjivačke hromatografije.



Slika 38: Prikaz hromatograma za prirodni oblik celobioza – dehidrogenaze (wtCDH) eksprimiran u *Pichia pastoris* KM71H soju nakon gel filtracione hromatografije.



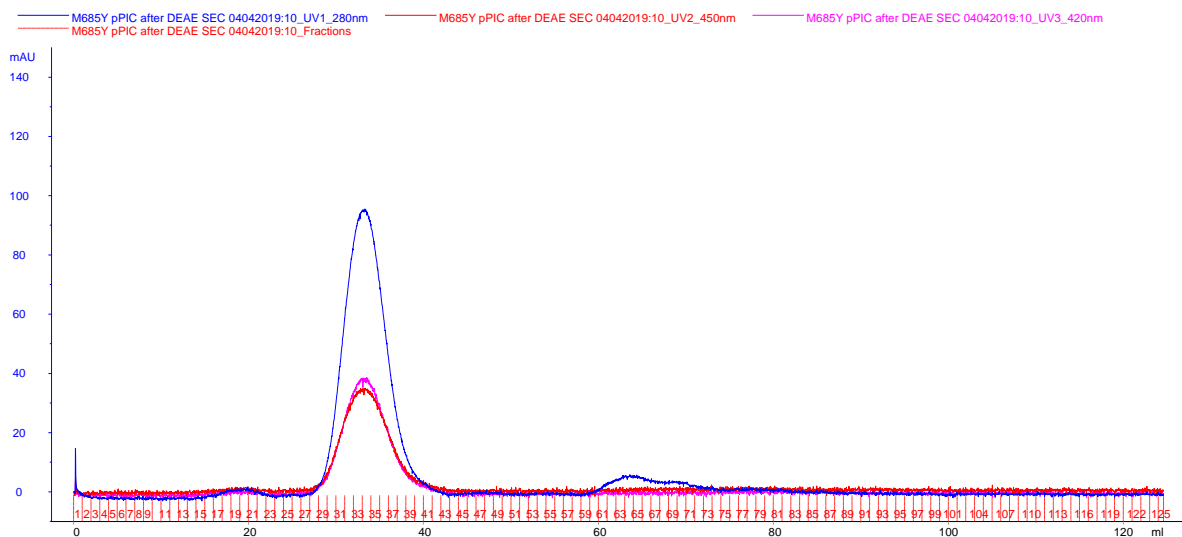
Slika 39: Prikaz hromatograma za mutanta celobioza – dehidrogenaze (M65F) eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju nakon jonoizmenjivačke hromatografije.



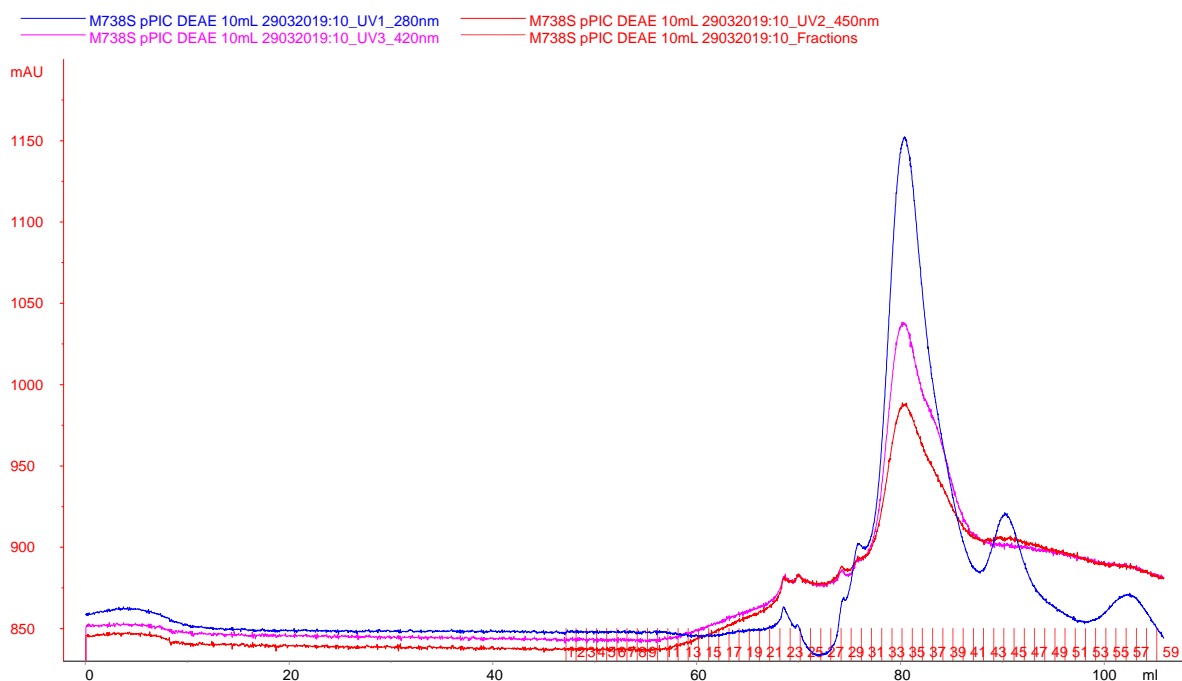
Slika 40: Prikaz hromatograma za mutanta celobioza – dehidrogenaze (M65F) eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju nakon gel filtracione hromatografije.



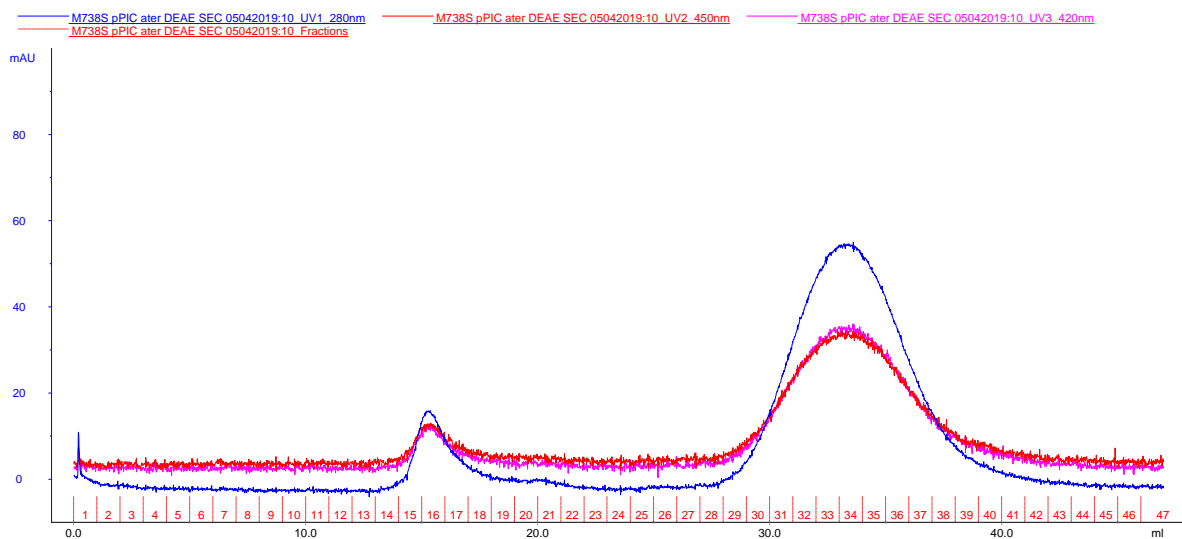
Slika 41: Prikaz hromatograma za mutanta celobioza – dehidrogenaze (M685Y) eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju nakon jonoizmenjivačke hromatografije.



Slika 42: Prikaz hromatograma za mutanta celobioza – dehidrogenaze (M685Y) eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju nakon gel filtracione hromatografije.



Slika 43: Prikaz hromatograma za mutanta celobioza – dehidrogenaze (M738S) eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju nakon jonoizmenjivačke hromatografije.



Slika 44: Prikaz hromatograma za mutanta celobioza – dehidrogenaze (M738S) eksprimiranog u *Pichia pastoris* KM71H soju nakon gel filtracione hromatografije.

Ana Marija Balaž, rođena je 14.07.1987. godine u Zrenjaninu, Srbija od oca Jovana i majke Nadice. Osnovnu školu „2.Oktobar“ kao i Gimnaziju, prirodno – matematički smer, završila je u Zrenjaninu. Osnovne studije Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar pohađa u periodu od 2006. do 2013. godine, kada je diplomirala sa prosečnom ocenom 7,74 i ocenom 10 na završnom radu. Master studije biohemije na Hemijskom fakultetu upisuje 2013. godine i sa prosečnom ocenom 9,00 i ocenom 10 na master radu, 2014. godine stiče zvanje master biohemičar. Doktorske studije, upisuje 2014. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer biohemija pod rukovodstvom vanrednog profesora dr Radivoja Prodanovića gde se bavi istraživanjima na temama iz proteinskog inženjeringa i metodama visokoefikasne pretrage biblioteka celobioza – dehidrogenaze.

Ana Marija Balaž je od 1.06.2015. godine zaposlena kao istraživač pripravnik Centra za Hemiju, Instituta za Hemiju, Tehnologiju i Metalurgiju, Univerziteta u Beogradu, a od 1.06.2018. prelazi u više zvanje, istraživač saradnik na istom institutu. Tokom doktorskih studija, angažovana je na projektu Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije III46010 pod nazivom „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju poboljšanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“ čiji je rukovodilac profesor dr Zorica Knežević – Jugović.

Tokom izrade doktorske disertacije, u okviru bilateralnog projekta „Razvoj visoko efikasnih skrining sistema zasnovanih na protocnoj citometriji i mikrofluidici za dirigovanu evoluciju glukoza oksidaze, celobioza dehidrogenaze i hemicelulaze“ između Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Instituta za molekularnu biotehnologiju RWTH Ahen Univerziteta, boravila je tri meseca u Ahenu, Nemačka. Tokom boravka bavila se dirigovanom evolucijom celobioza – dehidrogenaze i

razvojem fluorescentnog eseja za detekciju mutanata celobioza – dehidrogenaze upotrebom protočne citometrije.

Od kada se bavi naučno – istraživačkim radom, Ana Marija Balaž je objavila i učestvovala u izradi šest radova u međunarodnim časopisima, od kojih dva kao prvi autor i ima ukupno tri saopštenja iz oblasti doktorske disertacije od čega su dva sa skupova nacionalnog značaja (M64) i jedan sa skupova od međunarodnog značaja (M34).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ана Марија Балаж

Број индекса ДБ13/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Протеински инжењеринг целобиоза – дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* у циљу повећања оксидативне стабилности за примену у биокатализи

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Ана Марија Балаж

Број индекса : ДБ13/2014

Студијски програм: Биохемија

Наслов рада: **Протеински инжењеринг целобиоза – дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* у циљу повећања оксидативне стабилности за примену у биокатализи**

Ментор: ванредни професор др Радивоје Продановић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Протеински инжењеринг целобиоза – дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* у циљу повећања оксидативне стабилности за примену у биокатализи

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

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

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

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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