
UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Karla Ž. Ilić Đurđić

Proteinski inženjering ligninolitičkih peroksidaza u
cilju unapređenja degradacije tekstilnih boja

Doktorska disertacija

Beograd, 2020



UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Karla Ž. Ilić Đurđić

Improvement of ligninolytic peroxidases
catalyzed textile dyes degradation by protein
engineering

Doctoral dissertation

Belgrade, 2020



Mentor:

dr Radivoje Prodanović
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Tanja Ćirković Veličković
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu
Ghent University, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent, Belgija
Ghent University Global Campus, Incheon, Južna Koreja
Dopisni član SANU

Član komisije:

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

Član komisije:

dr Zoran Vujčić
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Nataša Božić
Naučni savetnik
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju –
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvaljujem se:

Mentoru ove doktorske disertacije, dr Radivoju Prodanović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na velikoj pomoći u izradi ove doktorske disertacije, korisnim savetima i konstruktivnim kritikama. Takođe, želim da mu se zahvalim na strpljenju, razumevanju, vremenu i ukazanom poverenju.

Redovnoj profesorki Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i dopisnom članu SANU, dr Tanji Ćirković Veličković pre svega na znanju pruženom u toku master studija koji mi je bilo izuzetno značajno u izradi ove doktorske disertacije ali i na posvećenom vremenu, ukazanoj podršci i pomoći. Takođe, želim da joj se zahvalim što je pristala da bude deo komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Redovnoj profesorki Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dr Mariji Gavrović-Jankulović na znanju pruženom u toku studija na Hemijskom fakultetu, ali i na pomoći, podršci i poverenju koje mi je ukazala u toku mog rada na Katedri za biohemiju, Hemijskog fakulteta. Takođe, želim da joj se zahvalim što je pristala da bude deo komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dr Zoranu Vujčiću na znanju pruženom u toku studija na Hemijskom fakultetu, velikom doprinosu mom logičkom zaključivanju i slobodi prilikom držanja vežbi iz Hemije prirodnih proizvoda. Takođe, želim da mu se zahvalim što je pristao da bude deo komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Dr Nataši Božić, naučnom savetniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu pre svega što je pristala da bude deo komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Svim profesorima i asistentima Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na znanju koje su mi pružili u toku studija, vremenu, podršci i odgovorima na moja mnogobrojna pitanja. Pre svega svim profesorima i kolegama sa Katedre za biohemiju, ali i sa celog

Hemijskog fakulteta na kolegijalnosti, pomoći, podršci i tome što su učinili rad na fakultetu mnogo lakšim i interesantnijim.

Profesoru Rainer Fischer sa RWTH Univerziteta u Ahenu i Profesoru Stefan Schillberg koji su omogućili moj boravak na Fraunhofer institutu za molekularnu biologiju i primenjenu ekologiju bez kog ova doktorska disertacija sigurno ne bi imali oblik kakav ima danas. Posebnu zahvalnost dugujem dr Raluca Ostafe na velikoj pomoći u radu na Fraunhofer institutu, dr Selin Ece na pomoći u radu na protočnom citometru i korisnim savetima, dr Helga Schinkel i tehničaru Simon Vögel čija mi je pomoć bila od velikog značaja. Takođe, želim da se zahvalim svim kolegama sa Fraunhofer instituta pre svega na tome što su učinili da se osećam kao kod kuće.

Kolegama iz laboratorije 434 na pomoći, podršci i svim lepim, nezaboravnim trenucima. Takođe, želim da se zahvalim i kolegama iz ostalih laboratorija. Bez svih vas rad na fakultetu ne bi bio isti. Svojoj kumi Aleksandri, prijateljici Maji i jednoj za mene izuzetno posebnoj osobi na neizmernoj podršci, ljubavi i prijateljstvu.

SAŽETAK

Tekstilna industrija iskoristi preko petsto hiljada tona boja godišnje. Neefikasnost procesa bojenja dovodi do otpuštanja izuzetno velikih količina tekstilnih boja u životnu sredinu. Kako je veliki broj studija pokazao da su sintetičke boje, a prevashodno azo boje izuzetno toksične i da predstavljaju pretnju za javno zdravlje njihovo uklanjanje iz životne sredine i otpadnih voda je od velikog značaja. Međutim, kako su sintetičke boje vrlo heterogeni molekuli koji u svojoj strukturi sadrže više funkcionalnih grupa veoma mali broj enzima ima mogućnost da katalizuje degradaciju širokog spektra ovih jedinjenja.

Ligninolitički enzimi među kojima su lignin i versatilna peroksidaza su ekstracelularne, hem peroksidaze koje imaju vrlo široku supstratnu specifičnost, a samim tim i široku primenu u procesima bioremedijacije. Međutim, primena enzima na velikim skalama često je limitirana niskom stabilnošću enzima u industrijskim reakcionim uslovima. Takođe, kako bi primena enzima bila ekonomski isplativa oni moraju imati veliku katalitičku efikasnost i mora biti razvijen proces koji će omogućiti višekratnu primenu i lako uklanjanje enzima iz reakcione smeše. Jedan od glavnih ograničenja primene peroksidaza u procesima bioremedijacije je inhibicija enzima u prisustvu visokih koncentracija H_2O_2 , supstrata esencijalnog za njihovu aktivnost.

Iako ove dve peroksidaze imaju sličan katalitički mehanizam i strukturu, njihova supstratna specifičnost se značajno razlikuje. Lignin peroksidaza preferira oksidaciju manjih fenolnih jedinjenja, dok versatilna peroksidaza efikasnije oksiduje velike, kompleksne, naelektrisane molekule poput tekstilnih boja. Smatra se da ove razlike u supstratnoj specifičnosti mogu biti posledica razlika u naelektrisanju i topografiji okruženja katalitičkog triptofana.

U cilju unapređenja oksidativne stabilnosti versatilne i lignin peroksidaze iste su eksprimirane na površini kvasca i razvijen je metod visokoefikasne pretrage biokatalizatora zasnovan na fluorescencijom aktiviranom ćelijskom sortiranju. Primena tiramid-fluoresceinskog eseja omogućila je sortiranje ćelija zasnovano na intenzitetu zelene

fluorescencije bez kompartmentalizacije. Efikasnost metoda potvrđena je sortiranjem referentnih biblioteka versatilne peroksidaze pri čemu je došlo do značajnog obogaćenja biblioteke ćelijama koje ekspimiraju enzim. Procenat aktivnih ćelija povećan je sa 5% pre sortiranja na 69% za referentnu biblioteku versatilne peroksidaze i na 71% za biblioteku lignin peroksidaze. Analiza ćelija divljeg tipa peroksidaza protočnom citometrijom pre i nakon preinkubacije ćelija 20 minuta u 30 mM H₂O₂ pokazala je da dolazi do smanjenja broja ćelija koje ekspimiraju aktivan enzim, pri čemu je zaključeno da navedeno vreme i koncentracija peroksida mogu da se primene za sortiranje nasumičnih biblioteka gena u cilju povećanja oksidativne stabilnosti ligninolitičkih peroksidaza. Pre sortiranja procenat analiziranih ćelija iz biblioteka gena koje ekspimiraju varijante enzima oksidativno stabilnije od divljih tipova obe peroksidaze bio je oko 1%, dok je isti nakon dve runde sortiranja povećan na 52% za lignin peroksidazu i 56% za versatilnu peroksidazu. Analiza FACS histograma takođe je pokazala povećanje broja ćelija koje ekspimiraju aktivan enzim nakon preinkubacije ćelija u viokoj koncentraciji vodonik-peroksida nakon prvog i drugog ciklusa sortiranja ćelija.

Unapređenje oksidativne stabilnosti izabranih najstabilnijih mutanata nakon analize sortiranih ćelija u mikrotitar pločama potvrđena je preinkubacijom ćelijskih zidova kvasca obloženih lignin i versatilnom peroksidazom i njihovim mutantima u istoj koncentraciji vodonik-peroksida. Dok se aktivnost versatilne peroksidaze više nije mogla detektovati nakon 50 minuta inkubacije rezidualna aktivnost mutanata bila je između 50 i 80%. Slično je zabeleženo za lignin peroksidazu. Nakon sat vremena preinkubacije u visokoj koncentraciji vodonik-peroksida divlji tip lignin peroksidaze zadržao je svega 10% aktivnosti, dok je rezidualna aktivnost tri izabrana mutanta bila između 50 i 80%. Povećanje oksidativne stabilnosti mutiranih enzima potvrđeno je u višestrukim ciklusima degradacije tekstilnih boja. Dok su divlji tipovi enzima do desetog ciklusa izgubili i do 30% svoje aktivnosti neki od mutanata skoro potpuno su zadržali svoju inicijalnu aktivnost.

Uspešnost pripreme saturacionih biblioteka gena lignin peroksidaze (D165N, D264N) i versatilne peroksidaze (V160N, A260N) potvrđena je sekvenciranjem. Po ekspresiji biblioteka gena iste su pretražene u mikrotitar pločama u cilju pronalaska mutiranih enzima

sa povećanom aktivnošću za degradaciju tri tekstilne azo boje – Evans blue, Amido black 10B i Guinea green. Analiza dobivenih rezultata pokazala je da mutacije na odabranim pozicijama imaju značajan efekat na supstratnu specifičnost enzima. Mutirani enzimi koji su pokazali najveću aktivnost u degradaciji jedne ili više testiranih boja su sekvencirani, ekstrahovani sa površine kvasca i okarakterisani. Sekvenciranje mutiranih gena versatilne peroksidaze potvrdili su prisustvo mutacija gena na ciljanim pozicijama. Svih pet sekvenciranih i okarakterisanih mutanata pokazali su značajno različite kinetičke parametre od divljeg tipa versatilne peroksidaze. Primenom saturacione mutageneze u regionu katalitičkog triptofana katalitička efikasnost enzima poboljšana je i do 16 puta u odnosu na divlji tip enzima. Saturaciona mutageneza triptofanskog regiona lignin peroksidaze takođe je dovela do identifikacije mutiranih enzima sa unapređenom katalitičkom efikasnošću za degradaciju sve tri primenjene boje (mutanata sa do 13 puta većom katalitičkom efikasnošću od divljeg soja enzima).

Ćelijski zidovi obloženi ligninolitičkim peroksidazama i njihovim mutantima primenjeni su u višestrukim ciklusima degradacije boja. Dobiveni rezultati pokazali su da su mutirani enzimi bili sposobni da uklone značajno veći procenat sve tri boje iz reakcione smeše od divljih tipova enzima. Lignin peroksidaza, kao i njeni mutanti zadržali su skoro celokupnu aktivnost nakon 10 ciklusa degradacije boja. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je primena ćelijskih zidova kvasca obloženih lignin i versatilnom peroksidazom vrlo efikasan način *in situ* imobilizacije enzima koji omogućava višestruku primenu enzima u uklanjanju tekstilnih boja.

Ključne reči:

Versatilna peroksidaza, lignin peroksidaza, FACS, oksidativna stabilnost, saturaciona mutageneza, katalitički triptofan, degradacija boja.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

ABSTRACT

Textile industry spends over five hundred tons of dyes each year. Inefficiency of dying process releases high amounts of textile dyes to environment. As many synthetic dyes, especially azo dyes are proven to be toxic and represent a risk for public health, their removal from ecosystems and wastewaters is of great importance. However, synthetic dyes are very heterogeneous group of molecules with many different functional groups. Therefore, very few enzymes are able to catalyze their degradation.

Ligninolytic peroxidases, including lignin and versatile peroxidases are extracellular, heme-containing enzymes of wide substrate specificity, and therefore, many applications in bioremediation processes. However, large-scale enzymes applications are often limited due to their low stability in industrial reaction conditions. Additionally, in order to make enzymes applications economically acceptable their applications in multiple cycles and easy removal from reaction mixtures must be ensured. One of the main limitations for application of ligninolytic peroxidases in bioremediation processes is their suicidal inactivation in presence of high concentrations of hydrogen-peroxide, essential substrate for their activity.

Lignin and versatile peroxidase have very similar structure and catalytic mechanism, but different substrate specificity. Lignin peroxidase prefers oxidation of small phenolic molecules, while versatile peroxidase more efficiently degrades bulky, complex and charged compounds like textile dyes.

In order to improve oxidative stability of lignin and versatile peroxidase we expressed them on yeast cell surface and developed FACS-based high-throughput screening system. Application of tyramid-fluorescein assay allowed cell sorting based on green fluorescence intensity without cell compartmentalization. Efficiency of applied method was confirmed by reference libraries sorting. Percentage of cells expressing active peroxidase increased from 5% before sorting to 69% after sorting for versatile peroxidase and to 71% for lignin peroxidase.

Flow cytometry analysis of the cells expressing peroxidases before and after 20-minute preincubation in 30 mM H₂O₂ showed decrease in number of cells with high green fluorescence after H₂O₂ treatment. Therefore, it is concluded that applied peroxide concentration and time of incubation can be used for sorting of random mutagenesis gene libraries of both lignin and versatile peroxidase for oxidative stability. Amount of the cells expressing versatile or lignin peroxidase variants with higher than wild-type oxidative stability was 1% before sorting and increased to 52% for versatile peroxidase and 56% for lignin peroxidase after two sorting rounds. Analysis of FACS histograms also showed increase in number of the cells expressing active enzyme after preincubation in high concentrations of hydrogen-peroxide after both first and second sorting round.

Improvement in oxidative stability of selected variants of lignin and versatile peroxidase was confirmed in microtiter plates after sorting and by preincubation of cell walls coated with lignin or versatile peroxidase and their selected variants in the same concentration of H₂O₂. While activity of wild-type versatile peroxidase could not be detected after 50-minute preincubation selected mutants retained between 50 and 80% of initial activity. Very similar results were obtained for lignin peroxidase variants. After 1-h preincubation activity of wild-type lignin peroxidase decreased to 10% of its initial activity, while three selected variant retained between 50 and 80% of their initial activity.

Saturation libraries of lignin peroxidase (D165N and D264N) and versatile peroxidase (A160N and A260N) were prepared. Mutations introduction was confirmed by sequencing randomly selected mutants. After expression of prepared variants gene libraries were screened for increased degradation activity of the three selected azo dyes – Evans blue, Amido black 10B and Guinea green. Analysis of obtained results showed that introduced mutations had significant impact on peroxidases substrate specificities. Mutated enzymes with the highest dye degradation activity were selected, sequenced, extracted and purified from the yeast cell surface and characterized. Sequencing revealed presence of mutations on altered positions. All five characterized mutants of versatile peroxidase showed different kinetic parameters than wild-type enzyme. Saturation mutagenesis of Trp environment in lignin peroxidase also led to identification of mutated genes coding for the

variants with improved catalytic efficiency for degradation of all three dyes. Selected lignin peroxidase variants showed up to 13 times higher catalytic efficiency than wild-type enzyme.

Yeast cell walls coated with lignin and versatile peroxidases and their variants were applied for multiple cycles of dyes degradation. Obtained results showed that selected variants were able to remove significantly higher amounts of all three dyes than wild-type enzymes. Lignin peroxidase and its mutants retained almost full activity after 10 8-h cycles. All the results confirmed that *in situ* immobilization process is very efficient system for application in multiple cycles of dyes degradation.

Key words:

Versatile peroxidase, lignin peroxidase, FACS, oxidative stability, saturation mutagenesis, catalytic triptophan, dyes degradation.

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry



Lista skraćenica

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

APS – amonijum-persulfat

CAA – eng. *casamino acids*

CBB – eng. *Comasie Brilliant Blue*

Chl - hloramfenikol

DMSO – dimetilsulfoksid

EDTA – etilendiamin-tetrasirćetna kiselina

FACS – protočni citometar (eng. *fluorescent activated cell sorter*)

Gal – galaktoza

Glc – glukoza

LB – Luria-Bertani

LiP – lignin peroksidaza

LRET – eng. *long range electron transfer*

MnP – mangan peroksidaza

MTP – mikrotitar ploča sa 96 bunara

PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza

PBS – puferisani fiziološki rastvor (eng. *phosphate buffered saline*)

PCR – eng. *polymerase chain reaction*

PEG – polietilen glikol

SDS – natrijum-dodecil-sulfat

TBE – tris-borat-edta

TEMED – 1,2-Bis(dimetilamino)etan

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometan

TyrF – Tiramid-fluorescein

VP – versatilna peroksidaza

WT – prirodni tip (eng. *wild type*)

YNB – eng. *yeast nitrogen base*

YPD – eng. *yeast peptone dextrose*

2,4-DCP – 2,4-dihlorfenol

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski deo.....	4
2.1. Tekstilne boje	4
2.1.2 Toksičnost tekstilnih boja i metode njihovog ukljanjanja iz životne sredine	6
2.2. Mikrobiološka razgradanja lignina.....	7
2.2.1 Struktura lignina	7
2.2.2 Razgradnja lignina.....	7
2.2.3 Gljive bele truleži	9
2.3. Ligninolitičke peroksidaze	10
2.3.1 Struktura lignin peroksidaze.....	10
2.3.2 Struktura versatilne peroksidaze	12
2.3.3 Katalitički ciklus lignin peroksidaze	14
2.3.4 Katalitički ciklus versatilne peroksidaze	16
2.3.5 Razlike u oksidaciji supstrata između lignin i versatilne peroksidaze	18
2.3.6 Mogućnosti primene ligninolitičkih peroksidaza	20
2.3.7 Ograničavajuće osobine ligninolitičkih peroksidaza.....	24
2.4. Proteinski inženjering.....	25
2.5. Dirigovana evolucija enzima.....	29
2.5.1 Metode za kreiranje biblioteka gena	30
2.6. Ekspresija proteina na površini ćelija kvasca.....	40
3. Materijal i metode	43
3.1. Ciljevi istraživanja.....	43
3.2. Materijal	44
3.2.1 Hemikalije	44
3.2.2 Izvor gena za lignin i versatilnu peroksidazu	44
3.2.3. Vektori i sojevi.....	44
3.3. Mikrobiološke metode.....	44
3.3.1 Medijumi za rast bakterija.....	45
3.3.2 Medijumi za rast kvasaca	46
3.3.3 Kompetentne ćelije.....	47
3.4. Molekularno-biološke metode.....	49

3.4.1 Kloniranje gena za versatilnu peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor	49
3.4.2 Kloniranje gena za lignin peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor	53
3.4.3 Prečišćavanje PCR proizvoda	56
3.4.4 Izolovanje plazmida iz <i>E. coli</i> XL10Gold.....	57
3.4.5 Agarozna DNA elektroforeza.....	57
3.4.6 Provera uspešnosti kloniranja gena za versatilnu peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor.....	58
3.4.7 Provera uspešnosti kloniranja gena za lignin peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor	60
3.4.8 Priprema nasumično mutiranih biblioteka gena za versatilnu peroksidazu	62
3.4.9 Priprema nasumično mutiranih biblioteka gena za lignin peroksidazu.....	64
3.4.10 Priprema saturacionih biblioteka gena za versatilnu peroksidazu.....	67
3.4.11 Priprema saturacionih biblioteka gena za lignin peroksidazu	68
3.5. Ekspresija lignin i versatilne peroksidaze na površini kvasca <i>S. cerevisiae</i> EBY100.....	69
3.5.1 Optimizacija uslova ekspresije peroksidaza.....	69
3.5.2 Ekspresija peroksidaza u mikrotitar pločama.....	70
3.6. Određivanje aktivnosti versatilne i lignin peroksidaze	70
3.6.1 Određivanje aktivnosti versatilne peroksidaze ABTS esejem.....	70
3.6.2 Određivanje aktivnosti lignin peroksidaze 2,4-DCP esejem	71
3.7. Pretraga nasumičnih bibiloteka gena versatilne i lignin peroksidaze.....	71
3.7.1 Sinteza tiramid-fluoresceina.....	71
3.7.2 Esej sa tiramid-fluoresceinom	71
3.7.3 Sortiranje referentnih biblioteka.....	72
3.7.4 Sortiranje nasumičnih biblioteka gena u cilju povećanja oksidativne stabilnosti	72
3.7.5 Protočna citometrija	72
3.7.6 Provera uspešnosti sortiranja i selekcija najstabilnijih mutanata	73
3.8. Pretraga saturacionih biblioteka gena.....	73
3.9. Karakterizacija izabranih mutanata	74
3.9.1 Izolovanje plazmida iz kvasaca i sekvencioniranje	74
3.9.2 Priprema ćelijskih zidova obloženih peroksidazama	74
3.9.3 Određivanje oksidativne stabilnosti mutanata.....	75
3.9.4 Degradacija boja.....	75
3.9.5 Izolovanje i prečišćavanje peroksidaza u himernom obliku sa Aga2 proteinom	76
3.9.6 Proteinska elektroforeza i zimogram.....	76

3.9.7	Određivanje kinetičkih parametara	78
4.	Rezultati i diskusija	79
4.1.	Ekspresija lignin i versatilne peroksidaze na površini ćelija <i>S. cerevisiae</i> EBY100.....	79
4.1.2	Kloniranje lignin i versatilne peroksidaze u pCTCON2 ekspresioni vektor	79
4.1.3	Ekspresija lignin i versatilne peroksidaze na površini ćelija kvasca <i>S. cerevisiae</i> EBY100	83
4.2.	Fluorescencijom aktivirano ćelijsko sortiranje mutanata lignin i versatilne peroksidaze u cilju unapređenja oksidativne stabilnosti enzima	89
5.2.1.	Priprema nasumično mutiranih biblioteka gena lignin i versatilne peroksidaze	91
4.2.2	Tiramid-fluorescein esej za FACS	94
4.2.3	Sortiranje referentnih biblioteka versatilne peroksidaze	97
4.2.4	Sortiranje referentnih biblioteka lignin peroksidaze	100
4.2.5	Sortiranje i analiza nasumično mutiranih biblioteka gena versatilne peroksidaze	102
4.2.6	Sortiranje i analiza nasumično mutiranih biblioteka gena lignin peroksidaze	107
4.2.7	Selekcija oksidativno najstabilnijih varijanti versatilne peroksidaze	111
4.2.8	Selekcija oksidativno najstabilnijih varijanti lignin peroksidaze	117
4.2.9	Ekstrakcija i prečišćavanje himernih proteina Aga2-VP i njihova karakterizacija	122
4.2.10	Ekstrakcija i prečišćavanje himernih proteina Aga2-LiP i njihova karakterizacija	124
4.3.	Unapređenje degradacije sintetičkih boja katalizovane versatilnom i lignin peroksidazom primenom saturacione mutageneze	126
4.3.1	Priprema saturacionih biblioteka gena	130
4.3.2	Pretraga saturacione biblioteke gena versatilne peroksidaze	131
4.3.3	Karakterizacija izabranih mutanata versatilne peroksidaze.....	133
4.3.4	Višestruki ciklusi degradacije boja mutantima versatilne peroksidaze	137
4.3.5	Pretraga saturacione biblioteke gena lignin peroksidaze.....	139
4.3.6	Karakterizacija izabranih mutanata lignin peroksidaze.....	140
4.3.7	Višestruki ciklusi degradacije boja mutantima lignin peroksidaze	145
6.	Zaključci.....	147
7.	Literatura	151

1. Uvod

U dvadesetom veku najveći broj prirodnih boja primenjivanih za promenu boje tkanine zamenjene su sintetičkim bojama koje imaju dužu postojanost i nižu cenu. Samo tekstilna industrija iskoristi preko petsto hiljada tona boja godišnje (Ventura-Camargo, Marin-Morales, 2013). Međutim, neefikasnost procesa bojenja dovodi do otpuštanja izuzetno velikih količina tekstilnih boja u životnu sredinu. Kako je veliki broj studija pokazao da su sintetičke boje, a prevashodno azo boje izuzetno toksične i da predstavljaju pretnju za javno zdravlje njihovo uklanjanje iz životne sredine i otpadnih voda je od velikog značaja (Stolz, 2001).

Najčešći problem hemijskih metoda eliminacije sintetičkih boja je nastanak sekundarnog zagađenja i još toksičnijih proizvoda degradacije. Shodno tome, velika pažnja je posvećena bioremedijaciji i enzimskoj degradaciji ovih molekula. Međutim, kako su sintetičke boje heterogeni molekuli, koji u svojoj strukturi sadrže više funkcionalnih grupa veoma mali broj enzima ima mogućnost da katalizuje razgradnju širokog spektra ovih molekula (Pulgare et al., 2010; Chang, Lin, 2001).

Ligninolitički enzimi među kojima su lignin i versatilna peroksidaza su ekstracelularne, hem peroksidaze koje prevashodno sekretuju gljive bele truleži u cilju razgradnje ligninocelulozne biomase (Fagerstedt et al., 2010). Ove peroksidaze imaju vrlo široku supstratnu specifičnost, a samim tim i široku primenu u procesima bioremedijacije (Falade et al., 2016). Međutim, primena enzima na velikoj skali često je ograničena niskom stabilnošću enzima u industrijskim reakcionim uslovima (Bommarius, Paye, 2013). Takođe, kako bi primena enzima bila ekonomski isplativa oni moraju imati veliku katalitičku efikasnost i mora biti razvijen proces koji će omogućiti višekratnu primenu i lako uklanjanje enzima iz reakcione smeše (Datta et al., 2013).

Katalitički ciklus lignin i versatilne peroksidaze podrazumeva oksidaciju dva molekula supstrata po katalitičkom ciklusu uz utrošak jednog molekula H_2O_2 i formiranje dva

intermedijera pre povratka enzima u osnovno stanje. Glavni katalitički mehanizam ovih enzima koji omogućava oksidaciju supstrata visokog redoks potencijala naziva se „long-range“ elektronski transfer i prevashodno podrazumeva formiranje katjon radikala na površinski lociranom katalitičkom triptofanu i elektronski transfer do molekula hema koji se nalazi u centralnoj šupljini enzima (Ruiz-Dueñas et al., 1999). Međutim, u prisustvu visokih koncentracija H₂O₂ dolazi do suicidalne inhibicije enzima i formiranja katalitički neaktivne komponente III (Hiner et al., 2002).

Iako ove dve peroksidaze imaju sličan katalitički mehanizam i strukturu njihova supstratna specifičnost se značajno razlikuje. Lignin peroksidaza preferira oksidaciju manjih fenolnih jedinjenja, dok versatilna peroksidaza efikasnije oksiduje velike, kompleksne, naelektrisane molekule poput tekstilnih boja. Smatra se da ove razlike u supstratnoj specifičnosti mogu biti posledica razlika u naelektrisanju i topografiji okruženja katalitičkog triptofana (Pérez-Boada et al., 2005; Ruiz-Dueñas et al., 2009).

Jedan od najviše primenjivanih načina za unapređenje karakteristika enzima je proteinski inženjering, odnosno uvođenje mutacija u gene koji kodiraju odgovarajuće proteine koje će rezultovati određenom fenotipskom promenom (Chen, Arnold, 1991). Struktura proteina može se izmeniti primenom racionalnog ili polu-racionalnog dizajna ukoliko su poznate aminokiseline koje mogu imati uticaja na aktivnost ili stabilnost enzima. Dirigovana evolucija kao metoda u proteinskom inženjeringu podrazumeva pripremu biblioteka nasumično mutiranih gena, proizvodnju mutiranih proteina u odgovarajućem ekspresionom sistemu i pretragu istih u cilju pronalaženja mutiranog enzima sa željenim karakteristikama (Hida et al., 2007; Tracewell, Arnold, 2009).

Kako bi se osigurala identifikacija najstabilnijih ili najaktivnijih enzimskih varijanti u samoj genskoj biblioteci neophodno je pretražiti izuzetno velike biblioteke (10⁶-10¹⁰ kopija gena). Ovaj proces je omogućen primenom visokoefikasnih metoda za pretraživanje biblioteka gena kao što su fluorescencijom aktivirano ćelijsko sortiranje (FACS) i mikrofluidika sa ćelijskim sortiranjem. U toku procesa pretrage biblioteka od ključnog

značaja je očuvanje veze između gena koji kodira enzim i samog mutiranog enzima koji poseduje odgovarajuće karakteristike (Rieseberg et al., 2001, Wahler, Reymond, 2001).

Navedena veza između genotipa i fenotipa može se očuvati ekspresijom enzima na površini ćelija kvasca *S. cerevisiae*. U ovom slučaju željeni enzim se eksprimira na površini ćelije u vidu himernog proteina koji se prilikom sekrecije iz ćelije kovalnetno vezuje za površinu ćelijskog zida kvasca (Boder, Wittrup, 2000). Dodatna prednost ovog tipa ekspresije je *in situ* imobilizacija enzima na površini kvasca koja olakšava primenu enzima kao biokatalizatora, omogućava njihovu višestruku primenu i može dovesti do povećanja stabilnosti enzima (Kuroda, Ueda, 2013).

2. Teorijski deo

2.1. Tekstilne boje

Sintetičke boje upotrebljene od strane tekstilne industrije u cilju promene boje tkanine se nazivaju tekstilnim bojama (Ventura-Camargo, Marin-Morales, 2013). Procenjeno je da se na globalnom nivou godišnje primeni sedamsto hiljada tona sintetičkih boja, od čega dve trećine upotrebi tekstilna industrija (Nam, Renganathan, 2000; Jarosz-Wilkolazka et al., 2002; Yanto et al., 2014). Do sredine devetnaestog veka u industrijske svrhe koristili su se pigmenti izolovani iz povrća ili dobijeni od životinja. Međutim, sa industrijskom revolucijom u dvadesetom veku gotovo sve prirodno dobivene boje i pigmenti zamenjeni su sintetičkim. Svake godine se proizvedu stotine novih sintetičkih boja koje se odmah primenjuju u najrazličitije svrhe (Majcen-Le Marechal et al., 1997, Silveira et al. 2009).

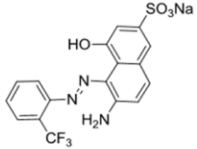
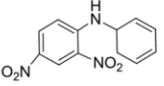
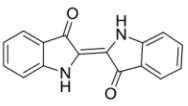
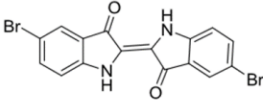
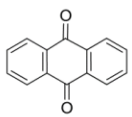
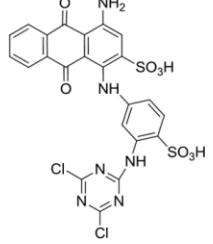
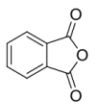
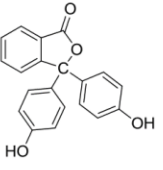
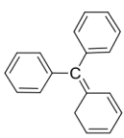
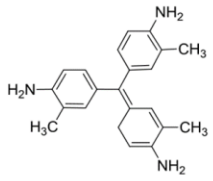
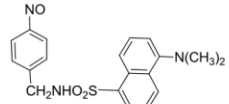
Loša efikasnost procesa bojenja dovodi do veoma ozbiljnog zagađenja životne sredine. Procena je da između 10 i 50% primenjenih boja završi u rekama i morima. Najveće zagađenje životne sredine bojama primećeno je u blizini samih fabrika tekstilne industrije i rezultat je neefikasnog tretmana otpadnih voda ili direktnog otpuštanja istih u površinske vode (Stolz, 2001; Robinson et al., 2001).

2.1.1 Klasifikacija i struktura tekstilnih boja

Hemijska struktura sintetičkih boja je veoma raznolika, shodno tome postoji veći broj klasifikacija ovi molekula (Benkhaya et. al., 2017). Prema Kirk-Othmer-u sintetičke boje se mogu podeliti na kisele, bazne, direktne, reaktivne, sumporne, vat boje, fluorescentne boje i prekursor boja. Određeni autori u klasifikaciju uključuju i disperzione boje (Guaratini et al., 2000). Međutim, ova podela boja nije zadovoljavajuća jer ne uzima u obzir hemijsku strukturu boja. Danas se više primenjuje podela boja prema hromofori (Slika 1) (Benkhaya et. al., 2017).

Azo boje predstavljaju najveću klasu sintetičkih boja. Procenjuje se da oko 50% boje koje se sintetišu i upotrebljavaju u industriji čine azo boje usled jednostavnosti njihovog

kuplovanja, velikih mogućnosti podešavanja nijansi i veoma visokog molarnog ekstencionog koeficijenta (Sabnis et al., 2001). Njihova glavna hemijska karakteristika je prisustvo jedne ili većeg broja azo grupa (-N=N-). Najčešće četiri azo grupe povezane fenil- i naftil-grupama substituisanim različitim funkcionalnim grupama (hidroksi-, metil-, nitro- i drugim) (Ventura-Camargo, Marin-Morales, 2013).

	Hromofora	Primer boje	
Azo boje	$-\text{N}=\text{N}-$		Kiselo crvena 337
Nitro boje	$-\text{N}(\text{O})_2$		Disperzno žuta 14
Indigoidne boje			Vat plava 35
Antrahinonske boje			Reaktivno plava 4
Ftaleinske boje			Fenolftalein
Trifenil-metanske boje			Bazno ljubičasto 2
Nitrozo boje	$-\text{N}=\text{O}$		DNSBA-NO

Slika 1. Hromofore i primeri tekstilnih boja različite hemijske strukture.

2.1.2 Toksičnost tekstilnih boja i metode njihovog uklanjanja iz životne sredine

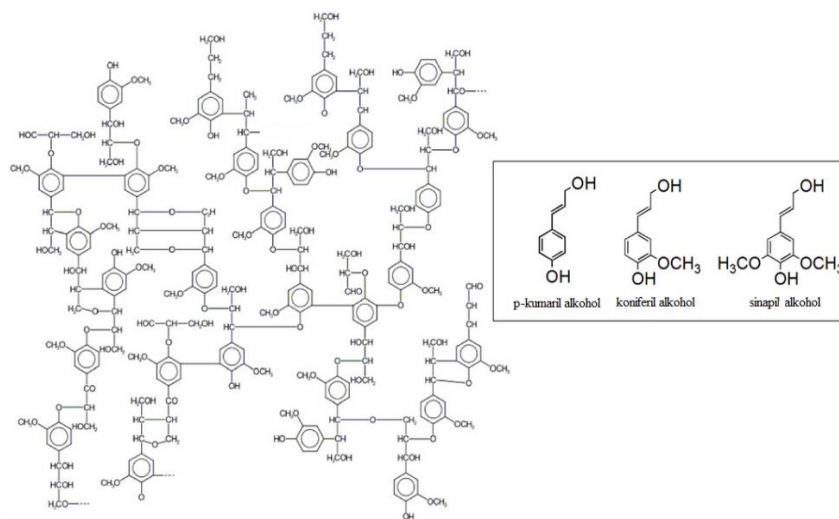
S obzirom na količine tekstilnih boja koje se svakodnevno upotrebljavaju, kao i neefikasnost procesa bojenja, procena toksičnosti ovih molekula je od velikog značaja kako za životnu sredinu tako i za zdravlje ljudi. Shodno tome, veliki broj boja i jedinjenja koja nastaju njihovom razgradnjom je testiran na laboratorijskim životinjama (Amin et al., 2010; Ventura-Camargo, Marin-Morales, 2013). Pokazano je da je veliki broj boja, različite hemijske strukture, primenjenih u tekstilnoj industriji toksičan i/ili kancerogen (Michaels i Lewis, 1985; Novotný et al., 2006; Xu et al., 2007). S obzirom na toksičnost tekstilnih boja i proizvoda njihove degradacije i neefikasnosti hemijskih i fizičkih procesa degradacije boja otpuštenih u životnu sredinu, smatra se da mikrobiloško i enzimsko uklanjanje boja može biti najbolje rešenje (Pulgare et al., 2010; Chang, Lin, 2001).

2.2. Mikrobiološka razgradanja lignina

2.2.1 Struktura lignina

Lignin (*lat. lignum*-drvo) je biopolimer koji čini oko 25% biljne biomase (Higuchi, 1990), što ga čini jednim od najzastupljenijih biomolimera u prirodi (Kenrick i Crane, 1997). Predstavlja važnu komponentu ćelijskog zida biljaka gde sa celulozom i hemicelulozom gradi veoma kompleksnu uređenu strukturu koja se naziva lignocelulozna biomasa.

Lignin je hidrofobni heteropolimer amorfne strukture koji nastaje radikalskim umrežavanjem aromatičnih alkohola (monolignola): p-kumaril, koniferil i sinapil alkohola aktivnošću različitih polimeraza i oksidaza. Monolignoli se inkorporiraju u lignin gradeći fenilpropanoide: p-hidroksifenil, gvajacil i siringil (Vanholme *et al.*, 2010). Na slici 2 prikazana je struktura lignina i njegovih gradivnih komponenti (Christopher *et al.*, 2014).



Slika 2: Struktura lignina i njegovih gradivnih komponenti

2.2.2 Razgradnja lignina

Veoma mali broj mikroorganizama je sposoban da razgrađuje lignoceluloznu biomasu. Među njima su određene bakterije i filamentozne gljive, pri čemu je bakterijska razgradnja ćelijskog zida koji sadrži lignin ograničena i mnogo sporija od degradacije gljivama. Određene vrste rodova *Cellulomonas*, *Bacillus* i *Pseudomonas* i neke Aktinomicete mogu,

do određenog stepena, da degraduju ligninoceluloznu biomasu drveta (Ericsson *et al.*, 1990). Gljive koje mogu da degraduju ligninoceluloznu biomasu su gljive drvene truleži, a pripadaju tipu Basidiomycota i Ascomycota i prema vrsti drveta i proizvodima koji nastaju nakon degradacije dele se na gljive meke truleži, gljive braon truleži i gljive bele truleži (Abdel-Hamid *et al.*, 2013).

Iako su monomerne jedinice lignina relativno jednostavni molekuli, trodimenzionalna struktura nastalog polimernog molekula je veoma kompleksna i neponavljajuća što znatno otežava biodegradaciju. Samo ekstracelularni enzimi mogu da pristupe površini polimera, a veliki broj različitih veza u polimernom ligninu otežava specifičnu enzimsku degradaciju. Biološka degradacija lignina se, pre svega odvija manje specifičnim oksidativnim mehanizmima (Hammel, Cullen, 2008). Lignini obmotavaju celulozu i hemicelulozu, pa njegova degradacija omogućava degradaciju istih. Pored toga, mali molekuli, redoks medijatori, moraju prvi biti oksidovani kako bi se postigao visok oksido-redukcioni odnos i kako bi se oksidovale aromatične komponente lignina (Kundell *et al.*, 2010).

Gljive meke truleži predstavljaju veliku grupu u koje se ubrajaju: *Chaetomium globosum*, *Ustulina deusta*, *Alternaria alternata* i *Thielavia terrestris* (Haider, Trojanowski, 1980; Daniel, 1994; Martínez *et al.*, 2005). Ove gljive probijaju S2 sloj sekundarnog zida i ulaze u lumen ćelije pri čemu se orijentišu po celuloznim mikrofibrilima, nakon čega mogu rasti u jednom ili dva smera (Busswel, 1991). Sposobne su da degraduju biljne polisaharide, ali slabo deluju na lignin. Njihovo ograničeno delovanje rezultuje mekom koezistencijom drveta u vlažnim sredinama, dok drvo u suvim sredinama postaje braon i veoma krto (Ericson *et al.*, 1990).

Gljive braon truleži čine oko 10% gljiva koje degraduju ligninoceluloznu biomasu i obuhvataju: *Fomitopsis palustris*, *Gloeophyllum trabeum*, *Lenzites trabea*, *Poria cocos*, *Postia placenta*, *Serpula lacrymans* i druge (Martínez *et al.*, 2005; Sanchez 2009). Ove gljive selektivno izvlače celulozu i hemicelulozu iz drveta pri čemu drvo veoma brzo gubi čvrstinu. Drvo se tada pre svega sastoji od malo modifikovanog lignina koji je delimično dealkilovan, demetoksilovan i demetilovan, ali su aromatični prstenovi očuvani.

2.2.3 Gljive bele truleži

Gljive bele truleži su najveća grupa gljiva koje razgrađuju ligninoceluloznu biomasu i u stanju su da razlože najveći deo komponenata drveta: celulozu, hemicelulozu i lignin (Christman, Oglesby, 1971). Zajednička karakteristika ovih gljiva je ta da nakon njihovog delovanja trulo drvo dobija belu boju, a samo drvo je vlažno, meko i sunderasto.

U ovu grupu spada veliki broj gljiva, prevashodno tipa Basidiomycota, redova Polyporales i Agaricales poput *Coriolus versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Lentinus edodes*, *Phlebia radiata*, *Panus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus* i *Pycnoporus cinnabarinus*, i nekoliko Ascomycota poput *Xylariae*. Modeli mehanizama i obrazaca degradacije drveta od strane ovih gljiva su intenzivno proučavani još od 1970-tih godina (Higuchi, 1983; Kawai et al., 1988; Kirk, Farrel, 1987; Kirk et al., 1975; Glenn et al., 1983).

Gljive bele truleži vrlo brzo kolonizuju drvo i napadaju sve ksilemske ćelije. Razlikuju se dva glavna obrasca degradacije biomase od strane ovih gljiva:

- Simultana degradacija celuloze, hemiceluloze i lignina. Ćelijski zidovi se progresivno napadaju iz lumena prema srednjoj lameli i postepeno se istanjuju. Formiranje rupa i erozija tkiva drveta dešavaju se u blizini hifa gljiva. Određeni pripadnici tipa Basidiomycota: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Irpes lacteus* i *Heterobasidion annosum* i roda Ascomycota: *Xylaria hipoxylon* degraduju dvrnu biomasu na opisan način (Martínez et al., 2005). Istanjevanje ćelijskog zida pomoću *Phanerochaete chrysosporium* može da bude rezultat različitih aktivnosti, što zavisi od soja gljive (Ruel et al., 1994).
- Selektivna degradacija lignina i hemiceluloze. Celuloza se ne degraduje (Eriksson et al., 1990). Na ovaj način svoju aktivnost ispoljavaju određene gljive tipa Basidiomycota: *Dichomitus squalens*, *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa* i druge (Buswell, 1991; Martínez et al., 2005).

Dekompoziciju lignina omogućava set ekstracelularnih enzima, metalo-oksidaza koje su pre svega hem peroksidaze (mangan peroksidaza, lignin peroksidaza i versatilna

peroksidaza) i lakaze. Pored ovih enzima degradacione reakcije uključuju i sekretorne medijatore poput fenolnih i drugih aromatičnih jedinjenja, malih peptida, metalnih jona, organskih kiselina i reaktivnih kiseoničnih vrsta (Kundell et al, 2010).

2.3. Ligninolitičke peroksidaze

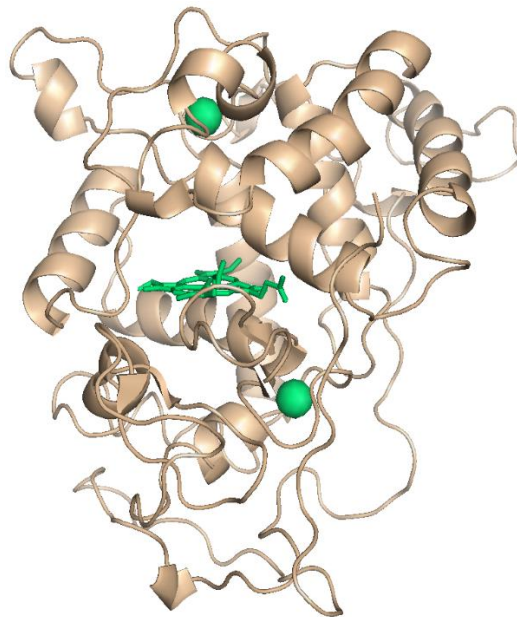
Ligninolitičke peroksidaze su enzimi koji sadrže hem i koriste vodonik-peroksid kako bi oksidovale širok spektar supstrata. Njihova biološka funkcija je degradacija lignina. Prvi put su identifikovane u *Phanerochaete chrysosporium* (Kuwahara et al., 1984), a nakon toga i u drugim vrstama kao na primer: *Pleurotus eryngii*, *Trametes versicolor* i *Phlebia radiata* (Cullen i Kersten, 2004).

2.3.1 Struktura lignin peroksidaze

Lignin peroksidaze (EC 1.11.1.14) su prvi put pronađene u ekstracelularnoj tečnosti gljive *Phanerochaete chrysosporium* 1983. godine (Glenn et al., 1983; Tien i Kirk, 1983). U toku narednih nekoliko godina identifikovano je više izoformi ove peroksidaze, između ostalih H1, H2, H6, H7, H8 i H10 izoenzimi, sekretovani u ekstracelularni prostor od strane *P. chrysosporium* (Farrell et al., 1989). Prisustvo lignin peroksidaze detektovano je i u ekstracelularnim prostorima *Trametes versicolor* (Johansson et al., 1993), *Phlebia radiata* (Moilanen et al., 1996), and *Phanerochaete sordida* (Sugiura et al., 2009). Različite izoforme enzima se razlikuju po stepenu glikozilacije, izoelektričnim tačkama, supstratnoj specifičnosti i stabilnosti. Razlike u N-terminalnoj sekvenciji upućivale su na to da se izoforme prepisuju sa različitih gena, što je kasnije potvrđeno sekvencioniranjem genoma *P. chrysosporium* (Martínez et al., 2004).

Lignin peroksidaza (slika 3) je globularni protein oko 50 x 40 x 50 Å (Piontek et al., 1993). U centralnoj šupljini lokalizovan je jedan molekul hema, dok je jon gvožđa koordinovan pomoću četiri atoma azota iz tetrapirolnog prstena i jednim atomom azota iz histidina. Samim tim, hem je fiksiran u strukturi lignin peroksidaze i učinjen dostupnim kroz dva kanala. Enzim se sastoji od dva domena, proksimalnog i distalnog i sadrži osam većih i osam manjih α -helixa i tri manje antiparalelne β -pločice (Choinowski et al., 1999).

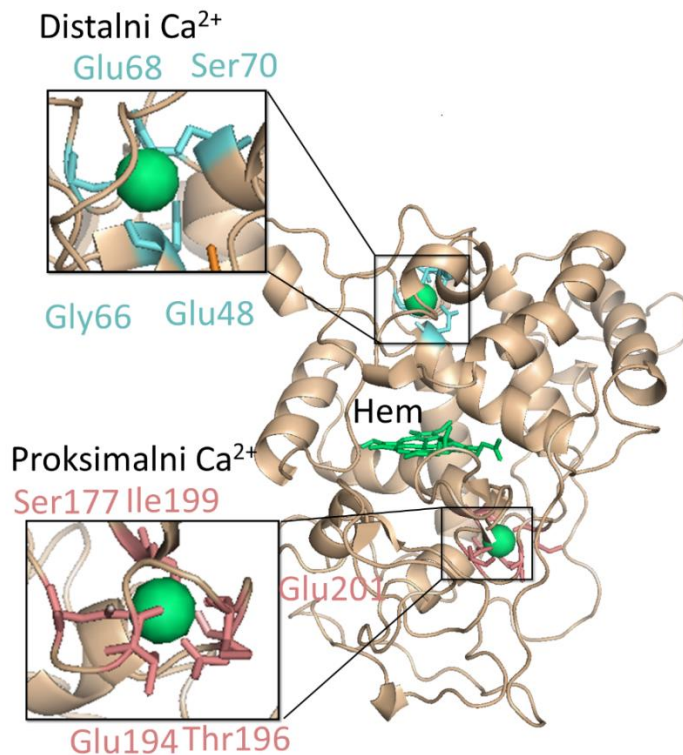
Pored hema, lignin peroksidaza sadrži i dva jona kalcijuma, a struktura je stabilizovana prisustvom četiri disulfidne veze.



Slika 3. Struktura lignin peroksidaze iz *P. chrysosporium* H8. Atomske koordinate preuzete su iz PDB fajla 1B82 (Blodig et al., 2001).

Prisustvo dva jona kalcijuma je esencijalno za aktivnost lignin peroksidaze. Jedan jon je lokalizovan u distalnom domenu i koordinovan sa tri glutamata i jednim serinom, dok se drugi nalazi u proksimalnom domenu i koordinovan je pomoću dva glutamata i po jednim serinom, treoninom i izoleucionom, dok je koordinacija jona upotpunjena prisustvom molekula vode (slika 4) (Martínez, 2002). Pored toga, za razliku od većine ostalih hem peroksidaza ne sadrži tirozin u svojoj strukturi, kao ni slobodne cisteine (Edwards et al. 1993). Nedostatak aminokiseline tirozina može se objasniti kroz izbegavanje oksidativnih oštećenja prilikom degradacije lignina (Pérez-Boada et al., 2005).

Posttranslacione modifikacije pored glikozilovanja podrazumevaju hidroksilaciju triptofana na položaju 171. Hidroksilacija Trp171 je konzervirana kod svih izoformi i čini se esencijalnim za aktivnost enzima (Falade et al., 2017).

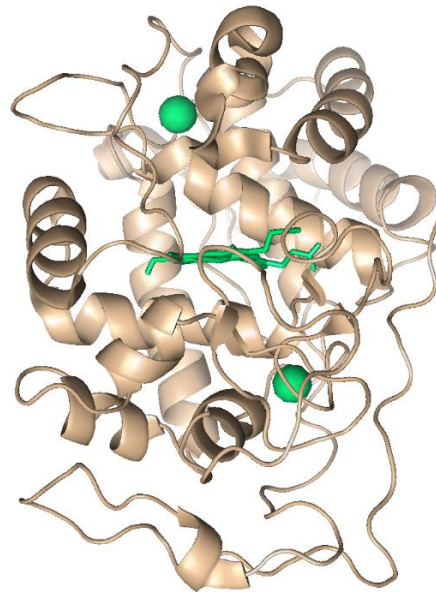


Slika 4. Koordinacija kalcijumovih jona u strukturi lignin peroksidaze. Atomske koordinate preuzete su iz PDB fajla 1B82 (Blodig et al., 2001).

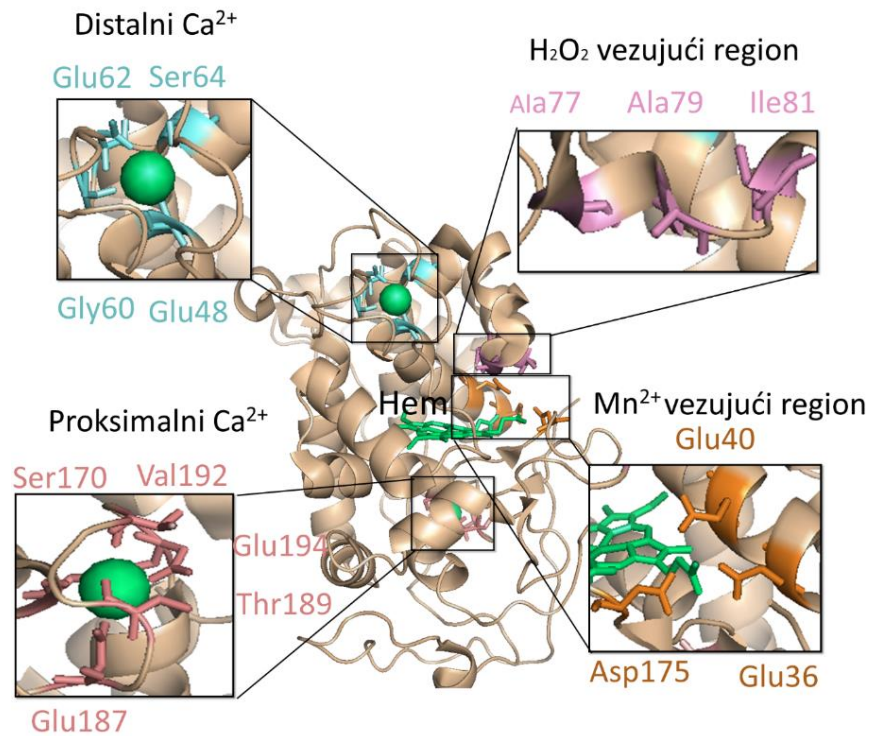
2.3.2 Struktura versatilne peroksidaze

Versatilna peroksidaza (EC 1.11.1.16) je hibridni enzim koji pokazuje aktivnost lignin i mangan peroksidaze. Zbog svoje sposobnosti da oksiduje jone Mn²⁺ do Mn³⁺ prva versatilna peroksidaza izolovana iz ekstracelularne tečnosti gljive *Pleurotus* 1996. godine okarakterisana je kao izoenzim mangan peroksidaze (Martínez et al., 1996; Giardina et al., 2000).

Versatilna peroksidaze iz *P. eryngii* (slika 5) je monomerni globularni protein koji sadrži molekul hema u centralnoj šupljini. Kao i u strukturi lignin peroksidaze jon gvožđa je koordinovan pomoću četiri atoma azota iz tetrapirolnog prstena i jednim atomom azota iz histidina. Strukturu ovog enzima čini 40% α -heliksa (18 heliksa u čijoj izgradnji učestvuju 133 aminokiseline) i 6% β -pločiča (16 nizova u čijoj izgradnji učestvuju 22 aminokiseline).



Slika 5. Struktura versatilne peroksidaze iz *P. eryngii*. Atomske koordinate preuzete su iz PDB fajla 2BOQ (Pérez-Boada et al., 2005).



Slika 6. Strukturni regioni versatilne peroksidaze esencijalni za njenu stabilnost i aktivnost.

U strukturi versatilne peroksidaze prisutna su i dva jona kalcijuma. Distalni jon Ca^{2+} koordinovan je pomoću 4 aminokiseline, dva glutamata, serinom i glicinom, dok je proksimalni jon Ca^{2+} koordinovan pomoću 5 aminokiselina, serinom, valinom, dva glutamata i treoninom (slika 6) (Pérez-Boada et al., 2005).

U strukturi versatilne peroksidaze iznad internog propionata hema nalazi se Mn^{2+} vezujući region koji čine 3 aminokiseline, Glu36, Glu40 i Asp175. Karboksilatne grupe ove tri aminokiseline zajedno sa karboksilatnom grupom hemovog propionata učestvuju u koordinaciji jona mangana (Camarero et al., 2000). Odmah iznad mangan vezujućeg mesta nalazi se H_2O_2 vezujući region kog čine Ala77, Ala79 i Ile81 (Gold et al., 2000; Sundaramoorthy et al., 2005).

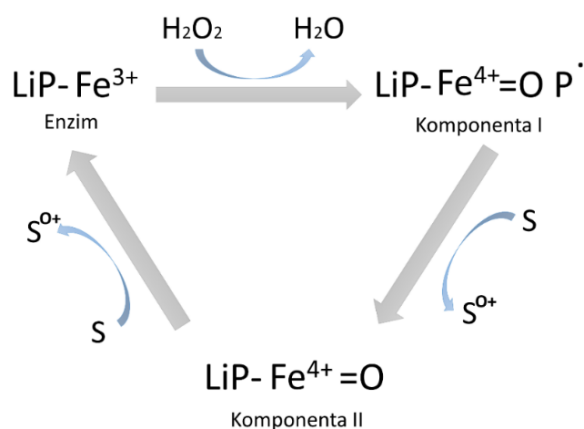
2.3.3 Katalitički ciklus lignin peroksidaze

Lignin peroksidaza (EC 1.11.1.14) ima biološku funkciju u degradaciji lignina kao deo ekstracelularnog enzimskog konzorcijuma. Pokazano je da ima sposobnost da oksiduje veći broj nefenolnih lignin-model jedinjenja. Oksidacija katalizovana lignin peroksidazom podrazumeva monoelektronske oksidacije i formiranja katjon radikala pri čemu dolazi do cepanja bočnog lanca, demetilovanja, pregrupisanja u molekulu i intramolekulske adicije (Kirk et al., 1986; Wong, 2009).

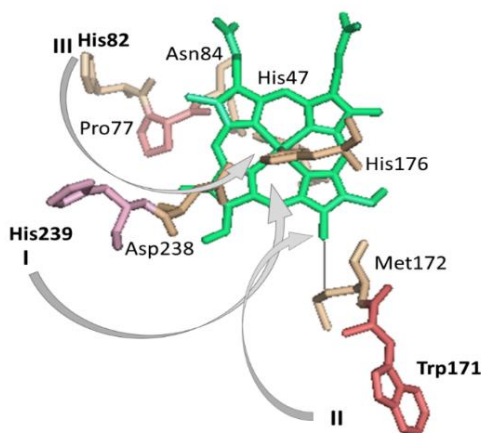
Lignin peroksidaza ima veoma široku supstratnu specifičnost. Oksidacioni procesi katalizovani ovim enzimom su oksidacija benzil alkohola, aldehida, ketona i fenolnih molekula (Furukawa et al., 2014; Paliwal et al., 2012). Što se tiče fenolnih molekula pokazano je da može da oksiduje gvajakol, katehol, 2,4-dihlor fenol i mnoge druge (Harvey, Palmer, 1990; Wong, 2009). Veratril alkohol je jedan od glavnih nefenolnih supstrata lignin peroksidaze koji se smatra i redoks medijatorom u procesima oksidacije lignina, ali i drugih molekula pomoću ovog enzima (Khindaria et al., 1996; Christian et al., 2005).

Oksidacija najvećeg broja supstrata od strane lignin peroksidaze omogućena je prisustvom površinski lociranog „katalitičkog“ triptofana (Trp171). U toku katalitičkog ciklusa dolazi do formiranja radikala na Trp171 kroz transfer elektrona (LRET) do hema u centralnoj

šupljini enzima (Ivancich et al., 2001). Katalitički ciklus se sastoji iz tri koraka (slika 7). Na početku dolazi do oksidacije Fe (III) iz molekula hema molekulom H₂O₂, pri čemu dolazi do otpuštanja molekula H₂O i formiranja okso-feril intermedijera (Komponente 1). Oksoferil intermedijer ima deficit od 2 elektrona u odnosu na enzim u osnovnom stanju i do njegove redukcije dolazi u dva uzastopna koraka - dolazi do monoelektronske oksidacije prvog molekula supstrata i formiranja drugog intermedijera koji ima deficit od jednog elektrona (Komponente 2), a zatim i do monoelektronske oksidacije drugog molekula supstrata i vraćanja enzima u osnovno stanje i završetka katalitičkog ciklusa (Abdel-Hamid et al., 2013).



Slika 7. Katalitički ciklus lignin peroksidaze



Slika 8. Mogući putevi transfera elektrona sa supstrata do molekula hema kod lignin peroksidaze

Pored glavnog elektronskog puta koji se odvija preko Trp171 moguća su još dva puta elektrona sa supstrata do molekula hema. Ova dva puta kod lignin peroksidaze podrazumevaju formiranje imidazolnih radikala na His82 ili H239 (slika 8). U slučaju formiranja radikala na His82 prenos elektrona se odvija preko Pro77 i Asn84, a u slučaju formiranja radikala na His239 prenos elektrona do hema odvija se preko Asp238 (Pérez-Boada et al, 2005, Ruiz-Dueñas, Martínez, 2009).

2.3.4 Katalitički ciklus versatilne peroksidaze

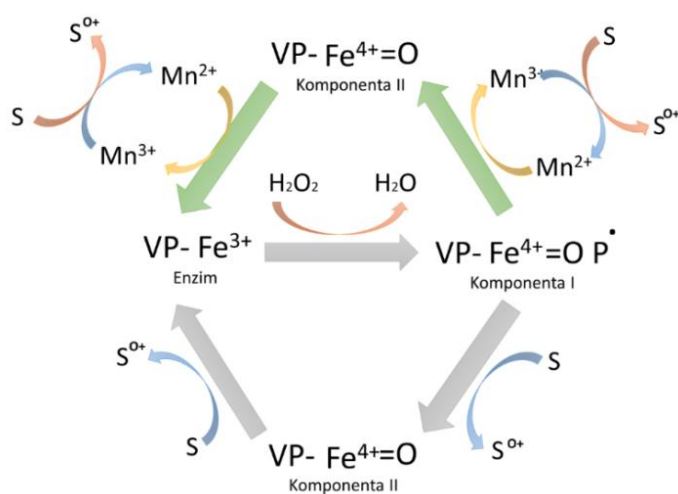
Biološka finkcija versatilne peroksidaze ista je kao funkcija lignin peroksidaze i podrazumeva oksidativnu depolimerizaciju lignina. Kompleksnost ovog procesa zahteva sinergističko delovanje većeg broja enzima i prisustvo redoks medijatora. Zbog svojih hibridnih osobina versatilna peroksidaza predstavlja jedan od najefikasnijih enzima sekretovanih od strane gljiva bele truleži (Caramero et al., 1998).

Kao što je već navedeno versatilna peroksidaza kombinuje katalitičke osobine mangan i lignin peroksidaze, odnosno, sposobna je da oksiduje Mn^{2+} jone do Mn^{3+} jona, kao i da oksiduje različite atomatične supstrate „long range“ elektronskim transferom (LRET). Kombinacija ova dva katalitička mehanizma omogućava versatilnoj peroksidazi da oksiduje veoma širok spektar supstrata različitog redoks potencijala (Ruiz-Dueñas et al., 1999; Pérez-Boada et al., 2005).

Oksidacija najvećeg broja supstrata visokog redoks potencijala od strane versatilne peroksidaze omogućena je prisustvom površinski lociranog „katalitičkog“ triptofana (Trp164). Triptofan na poziciji 164 versatilne peroksidaze analogan je triptofanu 171 u strukturi lignin peroksidaze. U toku katalitičkog ciklusa dolazi do formiranja radikala na Trp164 kroz „long-range“ elektronski transfer (LRET) do hema u centralnoj šupljini enzima (Ivancich et al., 2001, Ayala-Aceves et al., 2001). Katalitički ciklus se, kao kod lignin peroksidaze, sastoji iz tri koraka (slika 9). Prvo dolazi do oksidacije Fe (III) iz molekula hema molekulom H_2O_2 i otpuštanja molekula H_2O i formiranja okso-feril intermedijera (Komponente 1). Okso-feril intermedijer ima deficit od 2 elektrona u odnosu na enzim u osnovnom stanju i do njegove redukcije dolazi u dva uzastopna koraka - dolazi

do monoelektronske oksidacije prvog molekula supstrata i formiranja drugog intermedijera koji ima deficit od jednog elektrona (Komponente 2), a zatim i do monoelektronske oksidacije drugog molekula supstrata i vraćanja enzima u osnovno stanje i završetka katalitičkog ciklusa (Abdel-Hamid et al., 2013).

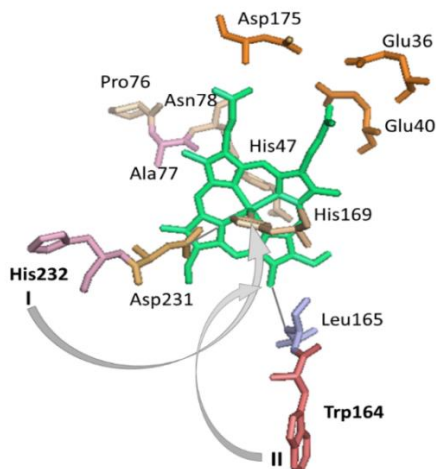
Katalitički ciklus versatilne peroksidaze (Ruiz-Dueñas et al., 1999.; Pérez-Boada et al., 2005) (slika 9) podrazumeva dve elektronske oksidacije osnovnog stanja VP (VP-Fe³⁺) sa H₂O₂ pri čemu se gradi komponenta I koja sadrži Fe⁴⁺-okso kompleks i porfirin katjon radikal, a zatim komponenta II koja podrazumeva Fe⁴⁺-osko kompleks posle porfirinske redukcije. U ovom slučaju ne dolazi do prenosa radikala na površinski lociran Trp. Iz komponente II još jednim ciklusom oksidacije Mn²⁺ ili nekog aromatičnog jedinjenja nastaje osnovno stanje enzima VP-Fe³⁺. Ovim putem se prevashodno oksiduju aromatična jedinjenja nižeg redoks potencijala.



Slika 9. Katalitički ciklus versatilne peroksidaze

Za razliku od lignin peroksidaze kod versatilne peroksidaze pored LRET puta elektrona sa Trp164 elektronski prenos je moguć samo još jednim putem. U ovom slučaju dolazi do formiranja imidazolskog radikala na His232 (analog His239 kod lignin peroksidaze) i elektroni sa supstrata se prenose preko Asp231 (analog Asp238) (slika 10). Naravno, u strukturi versatilne peroksidaze prisutno je i vezivno mesto za jone Mn²⁺ koji se nalazi u

blizini molekula hema (Slika 10) (Pérez-Boada et al., 2005, Ruiz-Dueñas, Martínez, 2009).



Slika 10. Mogući putevi prenosa elektrona sa supstrata na molekul hema u toku katalitičkog ciklusa versatile peroksidaze

2.3.5 Razlike u oksidaciji supstrata između lignin i versatile peroksidaze

Veliki broj studija potvrdio je značaj površinski lociranih molekula Trp za aktivnost lignin i versatile peroksidaze (Wang et al., 2003; Pérez-Boada et al., 2005; Tinoco et al., 2007; Smith et al., 2009; Fernández-Fueyo et al., 2014). Mutacija Trp164 u Ser kod versatile peroksidaze dovodi do potpunog izostanka aktivnosti ovog enzima sa različitim supstratima (ABTS, veratril alkohol, Reaktivno crno 5) u odsustvu jona mangana (Pérez-Boada et al., 2005), dok je inženjering Trp i njegovog kiselog okruženja u strukturi *Coprinus cinereus* peroksidaze (CiP) doveo do pojave sličnog elektronskog puta koji je inače prisutan kod ove dve ligninolitičke peroksidaze (Smith et al., 2009). Takođe, supstitucija Ser168 molekulom Trp u strukturi mangan peroksidaze omogućila je ovom enzimu da oksiduje veratril-alkohol (Fernández-Fueyo et al., 2014).

Pored veoma slične strukture i katalitičkog LRET mehanizma prisutnog kod obe peroksidaze (lignin i versatile peroksidaze) ova dva enzima imaju značajno različite supstratne specifičnosti. Glavni supstrat lignin peroksidaze je veratril alkohol, mali fenolni molekul (Romero et al. 2019). Versatilna peroksidaza takođe ima sposobnost da oksiduje

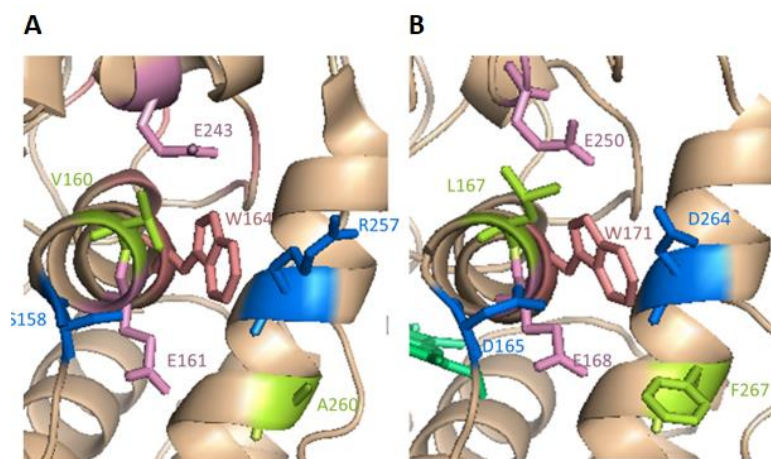
ovaj supstrat, ali sa daleko nižom efikasnošću od lignin peroksidaze. U suštini, lignin peroksidaza preferira oksidaciju malih fenolnih molekula u odsustvu redoks medijatora (Harvey et al., 1986, Tinoco et al., 2007). Versatilna peroksidaza ima visoku specifičnost za oksidaciju supstrata veće molekulske mase i kompleksnije strukture kao što su molekuli tekstilnih boja, pa se njenim supstratom izbora smatra azo boja reaktivno crno 5. Oksidacija ovog i mnogih drugih supstrata od strane lignin peroksidaze moguća je samo u prisustvu redoks medijatora koji će omogućiti povratak enzima u osnovno stanje, odnosno ponovno formiranje komponente 1. Jedan od najviše primenjivanih i najbolje opisanih redoks medijatora lignin peroksidaze je upravo veratril alkohol (Pérez-Boada et al. 2005; Ruíz Dueñas, Martínez, 2009).

Triptofan 171 u strukturi lignin peroksidaze okružen je sa četiri kisele aminokiseline (Glu168, Glu250, Asp165 i Asp264) dok je Trp164 u strukturi versatilne peroksidaze okružen sa dve kisele (Glu161 and Glu243), jednom baznom (Arg257) i jednom neutralnom aminokiselinom (Ser158) (slika 11). Pretpostavlja se da je upravo ova razlika u strukturi i naelektrisanju okruženja katalitičkog molekula Trp kod lignin i versatilne peroksidaze ključna za razlike u supstratnoj specifičnosti enzima (Pérez-Boada et al., 2005).

Po dve kisele aminokiseline (VP: Glu161 i Glu243, LiP: Glu168 i Glu250) konzervirane su u strukturi ligninolitičkih peroksidaza i smatra se da mogu imati značajnu ulogu u stabilizaciji katjon radikala koji se formira na molekulu triptofana u toku katalitičkog ciklusa, dok ostale aminokiseline mogu uticati na specifičnost enzima (Pérez-Boada et al., 2005; Tinoco et al, 2007; Ruiz-Dueñas et al, 2008). Tvrdnje o mogućnosti uticaja okruženja triptofana na aktivnost i specifičnost enzima potvrđene su mesto-dirigovanom mutagenезom (Pérez-Boada et al., 2005; Romero et al., 2019). Na primer, supstitucija Asp165 u strukturi lignin peroksidaze molekulom Asn dovela je do smanjenja konstante specifičnosti enzima za veratril alkohol sa $268 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ na $155 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, dok je ista mutacija na poziciji 264 dovela do smanjenja konstante specifičnosti na $222 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (Romero et al., 2019). Takođe, zamena R257 u strukturi versatilne peroksidaze dovodi do potpunog

gubitka aktivnosti ovog enzima sa bojama visokog redoks potencijala (Ruiz-Dueñas et al., 2008).

Druga velika razlika u strukturi okruženja površinskog triptofana je prisustvo dve aminokiseline sa velikim bočnim ostacima u strukturi lignin peroksidaze (L167 i F267) na pozicijama koje odgovaraju značajno manjim aminokiselinama u strukturi versatilne peroksidaze (V160 i A260) (slika 11). Zamena alanina na poziciji 260 fenilalaninom u strukturi versatilne peroksidaze rezultovala je promenom obe kinetičke konstante, k_{cat} i K_M ali je katalitička efikasnost enzima sa reaktivno crnim 5 ostala vrlo slična (Ruiz-Dueñas et al., 2008). Sve mutacije uvedene u ovom regionu imale su uticaj na vrednosti kinetičkih parametara versatilne peroksidaze (Pérez-Boada et al., 2005; Ruiz-Dueñas et al., 2008). Nema istraživanja koja bi pokazala efekat promena ovim aminokiselinama na aktivnost lignin peroksidaze.



Slika 11. Razlike u okruženju katalitičkog triptofana kod versatilne i lignin peroksidaze. **A.** Fragment versatilne peroksidaze. **B.** Fragment lignin peroksidaze.

2.3.6 Mogućnosti primene ligninolitičkih peroksidaza

Ligninolitičke peroksidaze imaju mogućnost da oksiduju izuzetno veliki broj različitih supstrata, pa su shodno tome našle vrlo široku primenu (Falade et al., 2016):

- Delignifikacija sirovina za proizvodnju etanola – kako je etanol dobra alternativa fosilnim gorivima primena jeftinih sirovina, poput ligninocelulozne

biomase mogla bi da bude od velikog značaja. Pored cene sirovine biološki metodi delignifikacije zahtevaju manje uložene energije i daju veći prinos (Sánchez et al., 2011). Međutim, ovaj metod proizvodnje podrazumeva duži period inkubacije od hemijskih metoda i primenu hemijskih metoda za izolovanje proizvoda (Khuong et al., 2014). Prilikom primene mikroorganizama za delignifikaciju pokazalo se da njihova upotreba ugljenih hidrata kao izvora energije značajno utiče na smanjenje prinosa (Sun et al., 2011). Ovaj problem može biti prevaziđen primenom konzorcijuma ligninolitičkih enzima (Asgher et al., 2013; Wang et al., 2013; Fernandez-Fueyo et al., 2014).

- Tretman otpadnih voda tekstilne industrije i degradacija boja – usled neefikasnosti procesa bojenja u tekstilnoj industriji dolazi do otpuštanja velikih količina sintetičkih boja u životnu sredinu (Yanto et al., 2014). S obzirom na to da je najveći broj otpuštenih boja toksičan razvijeno je mnogo metoda kako za sprečavanje njihovog dospeća u rečne tokove tako i za remedijaciju kontaminiranih ekosistema (Xu et al., 2007; Singh et al., 2015). Međutim, veliki broj hemijskih i fizičkih metoda rezultuje toksičnim proizvodima degradacije ili formiranjem velike količine mulja i samim tim dovodi do sekundarnog zagađenja (Parshetti et al., 2012). Primena mikroorganizama u cilju apsorpcije i degradacije sintetičkih boja počela je još 1993. godine i do sada se pokazala kao odlična alternativa prethodno primenjivanim metodama (Ollikka et al., 1993; Kumar, Sumangala, 2011). Pored celih mikroorganizama za degradaciju sintetičkih boja primenjeni su i prečišćeni ligninocelulozni enzimi (Ferreira-Leitao et al., 2007; Alam et al., 2009; Rajasundari, Murugesan, 2011). Primenom ligninolitičkih peroksidaza uspešno su uklonjene hemijski veoma raznolike sintetičke boje – azo, triarilmetanske, antrahidonske, indigo, heterociklične i polimerne boje (Abadulla et al., 2000; Parshetti et al. 2012).
- Depolimerizacija uglja i uklanjanje ostalih ksenobiotika – veliki broj istraživanja potvrdio je efikasnost ligninolitičkih peroksidaza u degradaciji različitih ksenobiotika – organofosfornih jedinjenja, fenola, hlorofenola, policikličnih aromatičnih ugljovodonika i drugih (Duran et al., 2002; Zheng,

Obbard, 2002; Wesenberg et al., 2003; Pizzul et al., 2009; Tisma et al., 2010; Zhang, Geißen, 2010; Marco-Urrea et al., 2012). Veliki broj ovih jedinjenja su pesticidi i herbicidi koji pronalaze primenu u industriji, a samim tim se mogu naći u životnoj sredini. S obzirom na njihovu toksičnost i rizik po javno zdravlje njihovo uklanjanje iz ekosistema je od velikog značaja (Wesenberg et al., 2003; Kabe et al., 2005). Pored navedenih ksenobiotika ligninolitičke peroksidaze su uspešno primenjene za depolimerizaciju uglja koji, ukoliko nije potpuno sagoreo ima negativan uticaj na kvalitet vode i dovodi do otpuštanja različitih toksičnih jedinjenja u životnu sredinu (Ahrens, Morrisey, 2005).

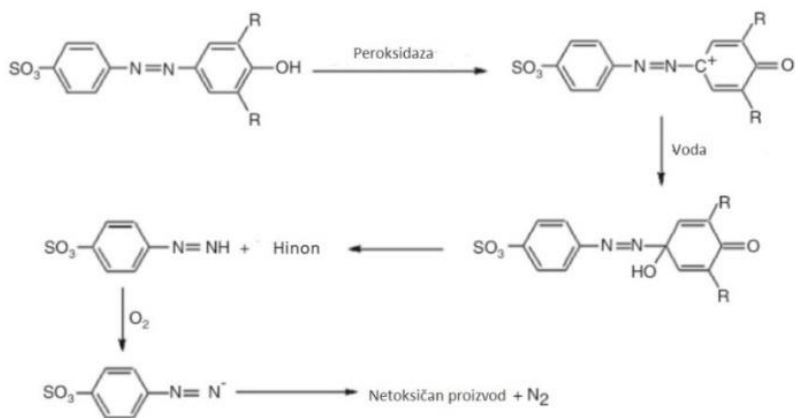
- Oksidacija melanina – primena ligninolitičkih peroksidaza u kozmetičkoj industriji za izbeljivanje kože. Melanin je taman pigment odgovoran za boju kože i kose, čije nagomilavanje u površinskim slojevima epidermisa dovodi do hiperpigmentacije, veoma čestog dermatološkog stanja (Mauricio et al., 2011; Kindred et al., 2013). Ovaj heterogeni polimer je sastavljen pre svega od katehola i hinola, a njegove strukturne karakteristike se mogu porediti sa strukturom lignina i uglja (Woo et al., 2004). Jedan od glavnih načina za uklanjanje hiperpigmentacije kože je inhibicija tirozinaze (enzima koji učestvuje u sintezi melanina) pre svega primenom hidrohina (Kim, Uyama, 2005, Kindred et al., 2013). Međutim, ovaj metod zahteva jako mnogo vremena (Woo et al., 2004). Shodno tome, enzimi koji mogu da degraduju melanin, poput ligninolitičkih peroksidaza imaju veliki potencijal za primenu u ove svrhe (Woo et al., 2004; Mauricio et al. 2011). Takođe, pokazano je da je primena lignin peroksidaze u kremama za lice bezbedna zbog inaktivacije enzima promenom pH prilikom aplikacije na kožu, nakon čega biva degradovan od strane proteaza i glikozidaza (Draelos, 2015).
- Razvoj novih lekova – zbog svoje široke supstratne specifičnosti ligninolitičke peroksidaze se mogu primeniti i u svrhe razvoja novih lekova. Na primer, pokazano je da melanin dovodi do povećanja rezistencije bakterija na antibiotike – aktivnost ampicilina, kanamicina, tetraciklina i polimiksina B na *E. coli* je znatno smanjena u prisstvu melanina (Lin et al., 2005). Shodno tome, primena

enzima koji depolimerizuju melanin mogla bi da poveća potentnost antibiotika (Draelos, 2015).

- Sinteza novih molekula trodimenzionalnim umrežavanjem (Salvachúa et al., 2013).

2.3.6.1 Predložen mehanizam oksidacije azo boja ligninolitčkim peroksidazama

Prilikom transformacije azo boja primenom lignin peroksidaze primećeno je cepanje azo veze i prisustvo dva proizvoda, hinona i sulfofenil-hidroperoksida. Korišćenjem ovih podataka predložen je mehanizam razgradnje fenolnih azo boja ligninolitčkim peroksidazama (Torres-Duarte, Vazquer-Duhalt, 2010).



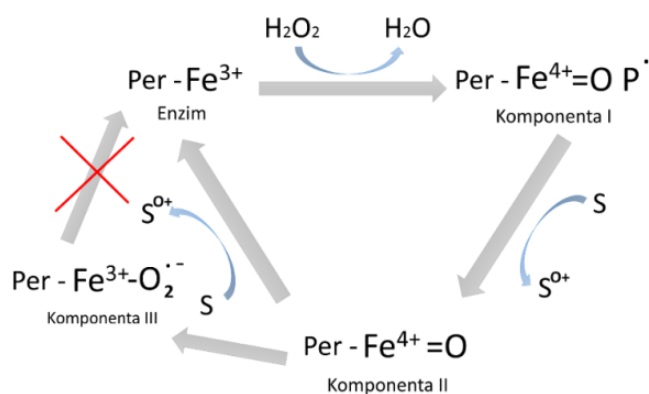
Slika 12. Razgradanja azo boja

Nakon dve monoelektronske oksidacije fenolnog dela molekula boje dolazi do formiranja karbonijum jona (slika 12). Kada molekul vode reaguje sa fenolim ugljenikom koji sadrži azo vezu dolazi do formiranja nestabilnog hidroksil intermedijera koji se razlaže do hinona i amidofenildiazina. Amidofenildiazin se oksiduje kiseonikom iz vazduha dajući fenildiazin radikal koji nakon eliminacije azota daje fenil radikal koji se dalje oksiduje kiseonikom iz vazduha. S obzirom na to da ne dolazi do formiranja aromatičnih amina može se zaključiti da ovaj proces vodi detoksifikaciji azo boja (Torres-Duarte, Vazquer-Duhalt, 2010).

2.3.7 Ograničavajuće osobine ligninolitičkih peroksidaza

Široka supstratna specifičnost ligninolitičkih peroksidaza čini ih veoma pogodnim za primenu u različitim industrijskim granama (Falade et al., 2016). Međutim, opšti problem primene enzima u ove svrhe jeste njihova niska stabilnost u industrijskim uslovima (Bommarius, Paye, 2013). Najznačajniji problem primene u industrijske svrhe karakterističan za ligninolitičke peroksidaze jeste njihova inaktivacija u visokim koncentracijama H_2O_2 (Wariishi, Gold, 1990; Valderrama et al., 2002).

Iako je H_2O_2 neophodan supstrat za ligninolitičke peroksidaze njegovo prisustvo dovodi do inaktivacije enzima (slika 13). Kao što je prethodno navedeno, u toku katalitičkog ciklusa ligninolitičkih peroksidaza dolazi do dve monoelektronske oksidacije dva molekula supstrata. Prvom monoelektronskom oksidacijom dolazi do formiranja komponente II, dok se enzim u sledećem koraku vraća u osnovno stanje. Međutim, u prisustvu visokih koncentracija H_2O_2 umesto povratka u osnovno stanje enzima dolazi do formiranja komponente III. Ovaj intermedijer podrazumeva formiranje superoksid anjon radikala. Tako nastala komponenta III je katalitički neaktivna. Pored toga može doći do oksidacije aminokiselina, prevashodno metionina i grupa na molekulu hema što sve zajedno vodi do ireverzibilne inaktivacije enzima (Wariishi, Gold, 1990; Hiner et al., 2002; Valderrama et al., 2002).



Slika 13. Mehanizam inhibicije peroksidaza u visokim koncentracijama H_2O_2

2.4. Proteinski inženjering

Veliki broj faktora poput visoke specifičnosti, katalitičke efikasnosti, blagih reakcionih uslova, velikog broja katalitičkih reakcija, ali i tehnološki razvoj doveli su do toga da su enzimi poslednjih decenija prepoznati kao veoma značajni industrijski biokatalizatori (Liu, et al., 2019). Našli su širok spektar primena pre svega u industriji hrane, farmaceutskoj i hemijskoj industriji (Bornscheuer et al., 2012). Takođe, enzimi se mogu smatrati katalizatorima koji ne zagađuju životnu sredinu i shodno tome predstavljaju odličnu alternativu tradicionalnim hemijskim katalizatorima (Liu, et al., 2019).

Međutim, glavna prepreka izuzetno širokoj primeni enzima kao biokatalizatora jeste njihova niska stabilnost u industrijskim reakcionim uslovima – pri visokim temperaturama, u prisustvu organskih rastvarača i proteinskih denaturanata (Bommarius, Paye, 2013). Poslednjih godina pronađene su sekvencije enzima iz ekstremofilnih mikroorganizama koji odlično ispunjavaju uslove neophodne za industrijsku primenu, poput povećane temperature stabilnosti, otpornosti na proteolizu i denaturaciju u prisustvu organskih rastvarača (Pucci, Rooman, 2017). Međutim, ekstremofilnih mikroorganizama je mnogo manje nego poznatih mezofilnih organizama, pa je shodno tome i broj detektovanih enzima ovih organizama vrlo mali, a broj reakcija koje mogu da katalizuju ograničen (Ferrer et al., 2016; Lorenz, Eck, 2005). Zbog izuzetno velikog potencijala za primenu najrazličitijih enzimskih reakcija u industrijskim postrojenjima unapređenje karakteristika enzima (stabilnosti i katalitičke efikasnosti) mezofilnih mikroorganizama je od velikog značaja (Cicerone et al., 2015).

Jedan od možda najviše obećavajućih metoda za unapređenje stabilnosti, ali i povećanje katalitičke efikasnosti enzimskih biokatalizatora je proteinski inženjering. Inženjering proteina podrazumeva promene na nivou genske sekvencije koje rezultuju u promenama u aminokiselinskoj sekvenciji proteina i mogu dovesti do povećanja aktivnosti i stabilnosti proteina, ali i promenama funkcije ili supstratne specifičnosti enzima (Reetz, 2013; Tokuriki, Tawfik, 2009). Do sada je u proteinskom inženjeringu primenjeno nekoliko različitih pristupa:

-
- Racionalni dizajn – predstavlja zamenu određene aminokiseline u sekvenciji proteina drugom, poznatom aminokiselinom. Ovo je prvi primenjen pristup koji zahteva poznavanje sekvencije gena, trodimenzionalne strukture i katalitičkog mehanizma enzima (Smith, 1994; Wohlgemuth, 2012). Sve veći broj poznatih sekvencija i struktura proteina u bazama podataka, kao i razvoj kompjuterskih metoda značajno su unapredili rezultate koji se dobivaju primenom racionalnog dizajna. U ovom slučaju koriste se različiti algoritmi koji povezuju podatke o strukturi, termodinamici i funkciji proteina i određuju pozicije za mutagenezu („hotspots“). Izabrane pozicije u sledećem koraku podležu mesto-određenoj mutagenezi i dobivene varijante bivaju testirane u laboratorijskim uslovima.

U suštini, povećanje stabilnosti enzima može biti rezultat povećanja slobodne energije uvijanja proteina i podrazumevati formiranje sonih mostova, vodoničnih i disulfidnih veza ili pojačavanje elektrostatičkih i hidrofobnih interakcija u strukturi proteina, dok promene u katalitičkoj efikasnosti i aktivnosti enzima podrazumevaju mutagenezu u okolini ili u samom katalitičkom centru enzima (Bommarius, Paye, 2013; Daniel et al., 2008; Pace et al., 2014). U današnje vreme, najveći broj metoda za unapređenje stabilnosti enzima zasniva se na homolognom modelovanju (Eijsink et al., 2004) i uvođenju sonih mostova i disulfidnih veza (Chen et al., 2012; Lee et al., 2014).

- Dirigovana evolucija – oponaša prirodne evolucionjske procese u *in vitro* uslovima uz primenu kontrolisanog i usmerenog selektivnog pritiska (Chen, Arnold, 1991; Tracewell, Arnold, 2009). Glavni princip u dirigovanoj evoluciji podrazumeva generisanje nasumično mutiranih biblioteka gena i pretragu tih biblioteka u cilju selekcije mutanta sa poboljšanim karakteristikama. Ovaj pristup može da se primeni i u situacijama kada informacije o trodimenzionalnoj strukturi proteina nisu dostupne. Dosadašnja istraživanja su pokazala da primena dirigovane evolucije može da izbegne pravila povećanja stabilnosti na račun smanjenja aktivnosti koja su izuzetno česta u prirodnoj evoluciji (Siddiqui, 2017).

Takođe, dirigovana evolucija se može primeniti za unapređenje većeg broja karakteristika enzima ili dodatno unapređenje pojedine karakteristike kroz primenu

većeg broja rundi evolucije. U ovom slučaju najbolji kandidati se podvrgavaju ponovnoj mutagenezi i selekciji. Proces same selekcije je glavni ograničavajući faktor i podrazumeva primenu visokoefikasnih metoda poput fluorescencijom aktiviranog ćelijskog sortiranja protočnom citometrijom ili kapljičnog sortiranja mikrofluidnim uređajima (Baret et al., 2009; Yang, et al., 2015).

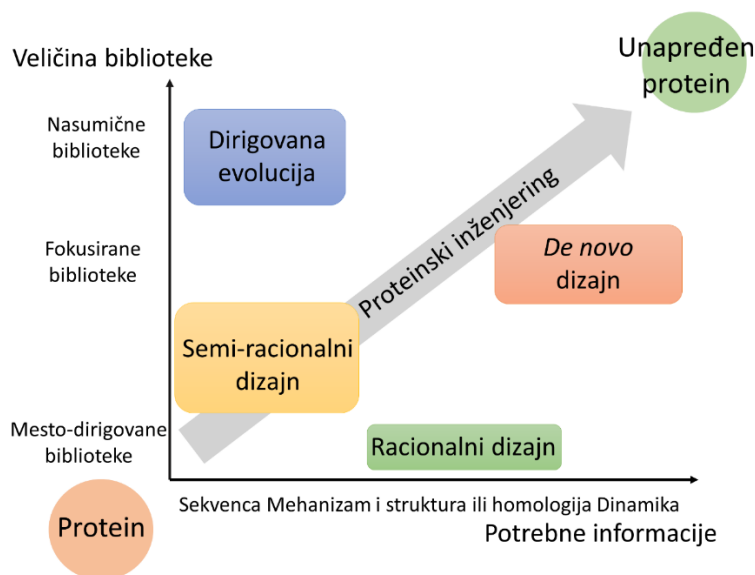
- Semi-racionalni inženjering – predstavlja kombinaciju prva dva pristupa i podrazumeva primenu bioinformatičkih softvera u cilju sužavanja broja pozicija za mutagenezu. Proteini se modifikuju komparativnom analizom većeg broja proteinskih sekvencija, podataka o sekundarnim i tercijarnim strukturama, homolognim modelovanjem i kompijuterskim algoritmima predviđanja u cilju određivanja najpogodnijih pozicija za mutagenezu. Po određivanju pogodnih pozicija generišu se biblioteke gena najčešće primenom mesto-određene mutageneze i kombinacijom tehnika zasićujuće mutageneze gena. Ovaj pristup dovodi do kreiranja manjih biblioteka gena, povećanja efikasnosti evolucionog procesa i često ne zahteva primenu visokoefikasnih metoda za pretragu biokatalizatora (Reetz, 2013).

U samom semi-racionalnom dizajnu postoji nekoliko pristupa stabilizaciji proteina. Na primer, smanjenje prisustva fleksibilnih regiona u proteinu može da dovede do smanjenja izloženosti hidrofobnog jezgra rastvaraču, stabilizaciji proteina i samim tim povećanju termalne stabilnosti (Bommarius, Paye, 2013; Pezzullo et al., 2013). Međutim, pored stabilizacije fleksibilnih regiona generalna stabilizacija aktivnog centra enzima može da dovede i do povećanja stabilnosti i povećanja aktivnosti enzima (Zhang et al., 2016).

- *De novo* dizajn – podrazumeva modelovanje aktivnog centra enzima primenom kvantno-mehaničkih simulacija (Huang et al., 2016). Ovaj metod proteinskog inženjeringa se naglo razvija unapređenjem kompijuterskih metoda poput Rosetta i EvoDesign softvera (Borgo, Havranek, 2012; Brender et al., 2017). Sprovedeno je nekoliko studija zasnovanih na identifikaciji aminokiselina potrebnih za smanjanje energije aktivacije i stabilizaciju prelaznog stanja u reakciji koja je katalizovana. Ove studije su takođe uzele u obzir i samu stabilnost proteina. Na primer, *de novo* je

napravljen termostabilan enzim koji katalizuje veliki broj reakcija oksidacije (Watkins et al., 2017).

Svi do sada primenjeni pristupi u proteinskom inženjeru razlikuju se po veličini generisanih biblioteka gena i po znanju i razumevanju strukture i funkcije enzima ili kompjuterskim metodama koje se primenjuju (slika 14) (Liu, et al., 2019). Ukratko, dirigovana evolucija zahteva najmanje informacija o sekvenciji i strukturi proteina, ali podrazumeva kreiranje izuzetno velikih biblioteka gena i primenu visokoefikasnih metoda za pretragu biblioteka. Racionalni dizajn podrazumeva pripremu malog broja varijanti enzima, ali zahteva znanje o strukturi i funkciji enzima. Semi-racionalni dizajn se nalazi između dva prethodno opisana metoda. Zahteva određena znanja o strukturi i funkciji proteina i podrazumeva pripremu biblioteka gena značajno manje veličine u odnosu na biblioteke koje se pripremaju u dirigovanoj evoluciji i ne podrazumeva primenu visokoefikasnih metoda za pretragu. *De novo* dizajn proteina je najnoviji metod u proteinskom inženjeru i unapređuje se razvojem najsavremenijih kompjuterskih metoda.



Slika 14. Poređenje različitih pristupa u proteinskom inženjeru.

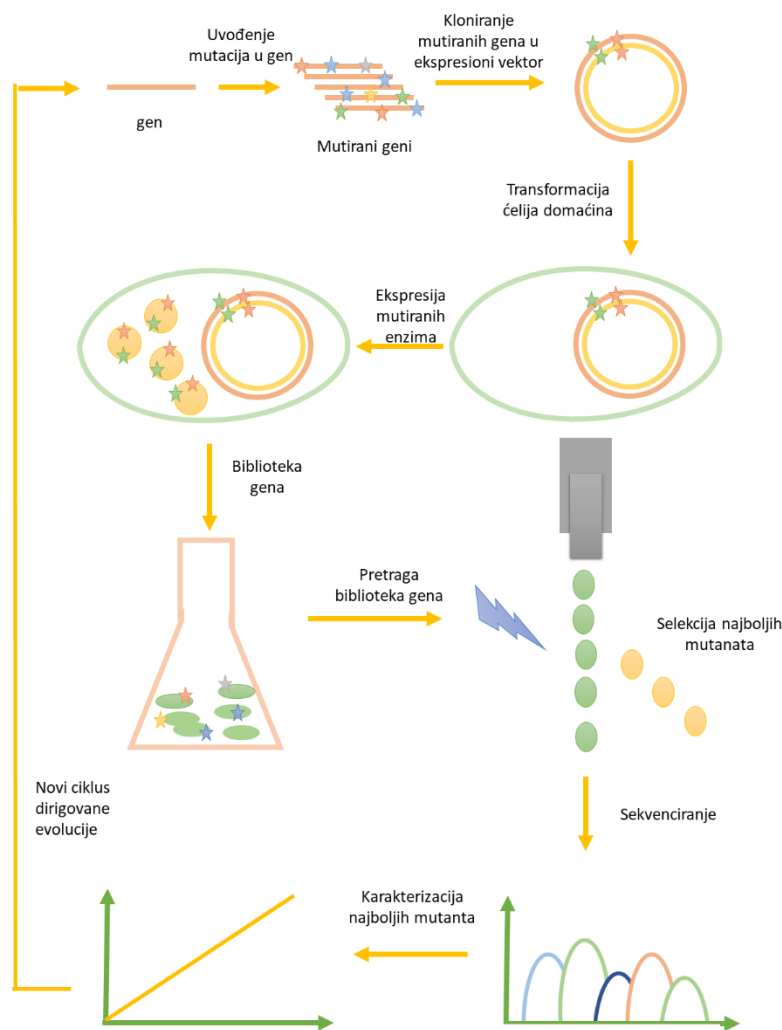
2.5. Dirigovana evolucija enzima

Dirigovana evolucija je jedan od najčešće primenjivanih metoda proteinskog inženjeringa u cilju unapređenja određenih karakteristika enzima. Prvi put je primenjen 1991. godine u cilju unapređenja stabilnosti i aktivnosti suptilizina E (Chen, Arnold, 1991) i podrazumeva pripremu nasumično mutiranih biblioteka gena i njihovu pretragu uz primenu određenog selekcionog pritiska (Hida et al., 2007; Tracewell, Arnold, 2009).

Eksperimentalni ciklus dirigovane evolucije podrazumeva:

- Uvođenje mutacija u gen koji kodira za enzim čije karakteristike je potrebno unaprediti. Ovaj korak podrazumeva pravljenje diverziteta.
- Nakon uvođenja mutacija u gen isti je nophodno klonirati u vektor koji će omogućiti umnožavanje i ekspresiju enzima u željenom domaćinu.
- Kada se dobije pul plazmida sa kloniranim mutiranim genima njima je potrebno transformisati ćelije mikroorganizama u kojima će enzim biti eksprimiran, a zatim i eksprimirati enzim.
- Sledeći korak podrazumeva pretraživanje pripremljene biblioteke, odnosno selekciju varijanti enzima sa najviše unapređenim željenim karakteristikama uz primenu odgovarajućeg selekcionog pritiska i najčešće primenu viskoefikasnih metoda za pretragu biblioteka gena (Hertzberg, Pope, 2000).
- Nakon selekcije, odnosno izbora najboljih mutanata iste je potrebno prečistiti i okarakterisati.
- Ukoliko je potrebno dalje unaprediti istu ili neku drugu karakteristiku enzima ciklus se može ponoviti sa mutiranim genom koji je izabran kao početnom osnovom za kreiranje diverziteta.

Prethodno opisan eksperimentalni ciklus u dirigovanoj evoluciji enzima prikazan je na slici 15 (Labrou, 2010).



Slika 15. Eksperimentalni ciklus dirigovane evolucije.

2.5.1 Metode za kreiranje biblioteka gena

Biblioteke gena mogu da se pripreme na više različitih načina pri čemu su najviše korišćene metode rekombinacije gena i nasumična mutagenaza (Arnold, 2001; Plückthun et al., 2001; Kotzia i Labrou, 2009).

Rekombinacija gena ukratko podrazumeva mešanje isečenih segmenata gena, odnosno „DNA blokova“ između dve ili više DNA sekvencija. Ovaj *in vitro* metod prvi je primenio Stemer 1994. godine i nazvao ga je *DNA shuffling* (Stemmer, 1994). Od tada razvijeno je i

primenjeno više različitih metoda koje za posledicu imaju rekombinaciju gena (Sen et al., 2007; Haseltine, Arnold, 2007; Hilda et al, 2007; Bershtein, Tawfik, 2008).

Nasumična mutageneza gena podrazumeva promene na nivou sekvencije jednog gena koje se mogu svrstati u 5 kategorija (Labrou, 2010):

- Tranzicije – zamena purinskog nukleotida drugim purinskim nukleotidim ili pirimidinskog nukleotida drugim pirimidinskim nukleotidim
- Transverzije – zamene purinskog nukleotida pirimidinskim i obrnuto.
- Delecije – brisanje jednog ili više nukleotida iz genske sekvencije.
- Insercije – dodatak jednog ili više nukleotida u gensku sekvenciju.
- Inverzije – rotacija dvolančanog segmenta DNA od 2 ili više nukleotida za 180 °.

Za pripremu nasumično mutiranih biblioteka gena može se priminiti veći broj metoda. Diverzitet se može kreirati primenom mutatorskih sojeva bakterija (Cox, 1996; Henke, Bornscheuer, 1999), primenom različitih hemijskih mutagena (Mohan, Banerjee, 2008) „Error-Prone“ PCR-om (Leung et al, 1989; Cadwell, Joyce, 1992; Vartanian et al., 1996; Fujii et al., 2004) ili saturacionom mutagenezom (Kotzia, Labrou, 2009). Trenutno ne postoji dogovor oko toga koja od ovih metoda je najefikasnija.

2.5.1.1 Kreiranje biblioteka gena „Error-Prone“ PCR-om

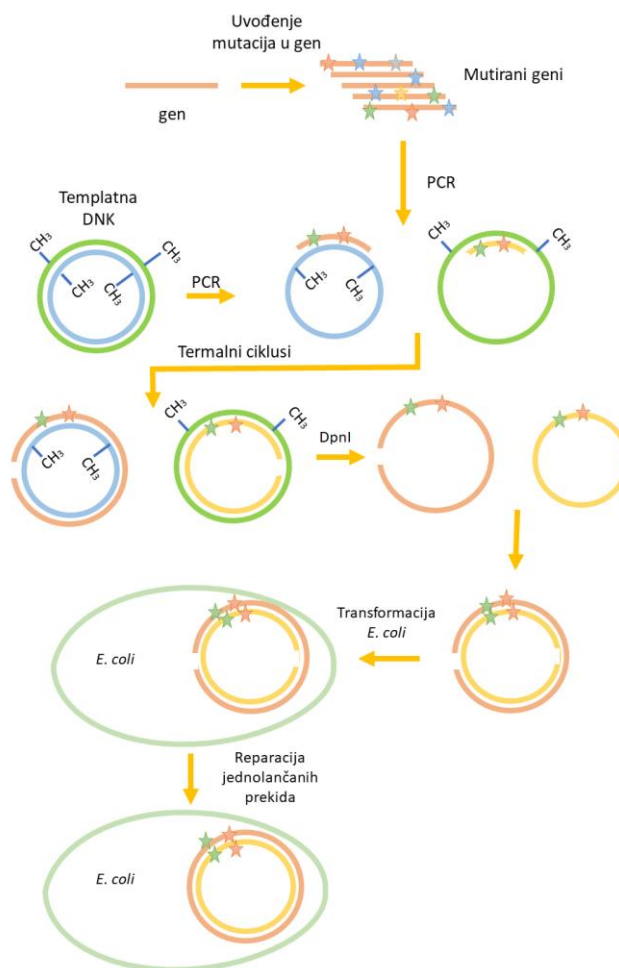
Od početka razvoja „error-prone“ PCR metoda za uvođenje mutacija u željeni gen isti se zasnivao na povećanju frekvencije greške Taq DNA polimeraze. Ova, dobro poznata, DNA polimeraza nema 3' – 5' egzonukleaznu aktivnost i kao takva ima veliku frekvenciju greške pri umnožavanju molekula DNA ($0,8-1,1 \times 10^{-4}$ supstitucija baza po broju baznih parova produkta) (Tindall, Kunkel, 1998; Cline et al., 1996). Promena određenih uslova, odnosno sastava PCR reakcione smeše može da dovede do povećanja mutacione stope:

- Dodatak jona Mn^{2+} smanjuje specifičnost uparivanja baznih parova (Beckman et al., 1985).
- Dodatak dezoksi nukleotida u različitim koncentracijama može da favorizuje pogrešno inkorporiranje nukleotida (Chaput et al., 2008).

-
- Povećanje koncentracije Mg^{2+} jona stabilizuje komplekse nekomplementarnih baznih parova (Eckert, Kunkel, 1991).
 - Povećanje koncentracije same DNA polimeraze povećava verovatnoću elongacije mutiranog segmenta (Labrou, 2010).

Nakon samog PCR-a, odnosno uvođenja mutacija u gen za određeni enzim isti mora da bude uveden u vektor. Ovo je jedan od najviše limitirajućih koraka u pripremi biblioteka gena, jer podrazumeva korak ligacije koji određuje veličinu biblioteke. Iako su supstitucije najčešće mutacije koje se dobijaju ovim metodom, moguće su i delecije koje pomeraju okvir čitanja (Labrou, 2010).

Kako bi se prevazišli nedostaci Taq polimeraze razvijene su nove „low fidelity“ DNA polimeraze koje imaju visoke stope mutacija i favorizuju određen tip konverzija (Tindall, Kunkel, 1988; Cline, 1996). Jedan od novih enzima na tržištu je „Mutazym“ DNA polimeraza koja pokazuje značajno uniformniji mutacioni spektar od ostalih DNA polimeraza primenjenih u iste svrhe (Vanhercke et al., 2005). Problem uticaja ligacije na veličinu biblioteke generisane „Error-Prone“ PCR-om može biti prevaziđen amplifikacijom celog plazmida (Miyazaki et al., 2002). U ovom slučaju mutirani geni se koriste kao megaprajmeri, a vektor sa prethodno kloniranim nemutiranim genom se primenjuje kao templatna DNA, pri čemu se umnožava celokupna DNA vektora oko mutiranog gena. Po završetku PCR reakcije višak templatne DNA koja sadrži nemutirani gen se uklanja tretmanom DpnI enzimom koji digestuje metilovanu DNA. Tako dobiveni molekuli DNA sa jednolančanim prekidima koriste se za transformaciju *E. coli* koja popravlja prekide i umnožava plazmid (slika 16).



Slika 16. Priprema nasumično mutiranih biblioteka gena „error-prone“ PCR-om uz umnožavanje celog plazmida.

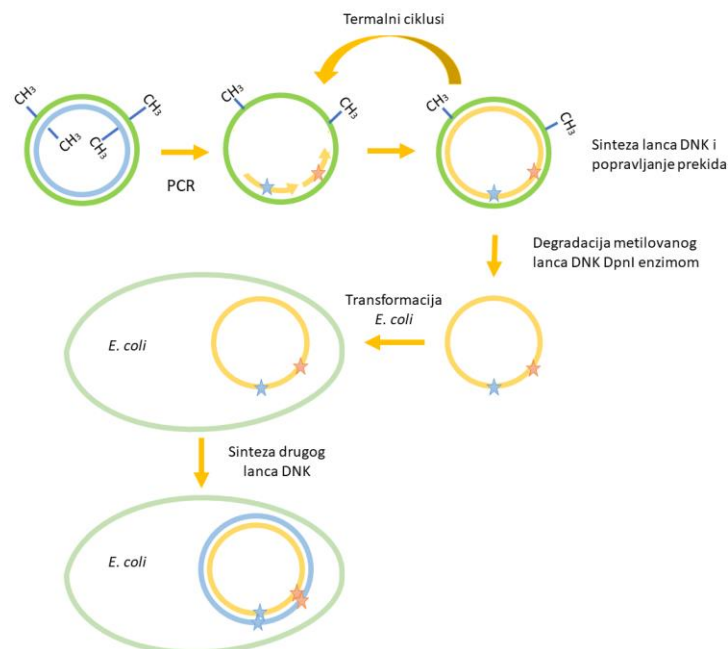
2.5.1.2 Kreiranje biblioteka gena saturacionom mutagenезom

Saturaciona mutageneza predstavlja zamenu jedne ili više aminokiselina u sekvenciji proteina sa svih 20 proteinskih aminokiselina. Primenjuje se nakon identifikacije i utvrđivanja značaja određene pozicije za aktivnost ili stabilnost proteina u cilju određivanja najpovoljnije aminokiseline za datu poziciju (Andreadeli et al., 2008; Reetz, Wu, 2008).

Prva primenjena metoda saturacione mutageneze nazvana je „umnožavanje celog plazmida u jednoj rundi PCR-a“ (Reidhaar-Olson, Sauer, 1988; Maynard et al., 2002) i podrazumeva dizajn prajmera tako da imaju oko 10 komplementarnih nukleotida, mutacioni kodon i jos

10 komplementarnih nukleotida nizvodno od mutacionog kodona. Ovakvi prajmeri se koriste za umnožavanje celog plazmida koji sadrži kloniran nemutirani gen. Primenom *forward* i *reverse* prajmera dobivaju se cirkularni molekuli DNA sa jednolančanim prekidima koji se tretiraju DpnI enzimom u cilju uklanjanja templatne DNA i kao takvi se koriste za transformaciju *E. coli* koja popravlja jednolančane prekide. U ovom slučaju mutageni prajmeri sadrže mutacioni kodon – kodon sa 64 različite kombinacije nukleotida – *NNN*. Takođe, ovaj kodon može da bude i set najčešćih kodona koji kodiraju 20 proteinskih aminokiselina.

U novije vreme ova metoda je unapređena i podrazumeva primenu jednog ili više *forward* prajmera za umnožavanje celog plazmida i ligaciju jednolančanog prekida u istom koraku (*QuickChange Lightning Multi Site Directed Mutagenesis Kit, Agilent technologies*). Nakon pripreme jednolančanih cirkularnih molekula DNA templatna DNA degraduje primenom DpnI enzima i koristi za transformaciju *E. coli* koja sintetiše drugi lanac DNA molekula (slika 17).



Slika 17. Saturaciona mutageneza gena PCR-om u jednom koraku, primenom samo *forward* prajmera za umnožavanje celog plazmida

Pored navedene metode za pripremu saturacionih biblioteka gena razvijene su i brojne druge metode kao na primer: kombinatorna kasetna mutageneza (Reidhaar-Olson, Sauer; 1988), skenirajuća saturaciona mutageneza (Maynard et al., 2002), kodon kasetna mutageneza (Kegler-Ebo, 1994) i iterativna saturaciona mutageneza (Reetz, Carballeira, 2007; Reetz et al., 2009). Ove metode imaju određene prednosti i mane, ali su ređe upotrebljavane.

2.5.2 Metode za visokoefikasnu pretragu biokatalizatora

Jedan od limitirajućih koraka u dirigovanoj evoluciji enzima jeste proces selekcije varijanti enzima sa poboljšanim karakteristikama, odnosno pretraga biblioteka gena. Kako bi se pronašao enzim sa potrebnim karakteristikama neophodno je pretražiti izuzetno veliki broj varijanti enzima i pri tome sačuvati vezu između samog izabranog mutiranog enzima i gena koji ga kodira – vezu između genotipa i fenotipa. Shodno tome, razvijen je veći broj pristupa ovom eksperimentalnom procesu (Rieseberg et al., 2001, Wahler, Reymond, 2001) (slika 18):

- Selekcija – metod koji se zasniva na direktnoj vezi između rasta ćelije koja eksprimira enzim i aktivnosti ili stabilnosti enzima (Stemmer, 1994; Boersma et al., 2009). Ovaj pristup omogućava brzu i efikasnu pretragu velikih genskih biblioteka (10^9 varijanti) i ima visoku efikasnost (na ovaj način se dobijaju samo varijante enzima sa unapređenim karakteristikama) (Rieseberg et al., 2001). Međutim, navedeni metod je primenljiv u izuzetno malom broju slučajeva – samo kada aktivnost enzima daje prednost za rast ćelija. Shodno tome, metod je limitiran za unapređenje karakteristika enzima koji sintetišu ili oslobađaju nutrijente neophodne za rast (Reetz et al., 2008) ili enzime koji razlažu supstance toksične za rast ćelija (Stemmer, 1994) (slika 18A).
- „Agar plate“ pretraga – najjednostavniji metod koji se zasniva na inkubaciji kolonija ćelija koje eksprimiraju enzim sa supstratom, dok pri formiranju proizvoda dolazi do pojave boje ili fluorescencije (Parikh, Matsumura, 2005; Ben-David et al, 2008). Glavni nedostaci ovog metoda su ograničen broj varijanti koje

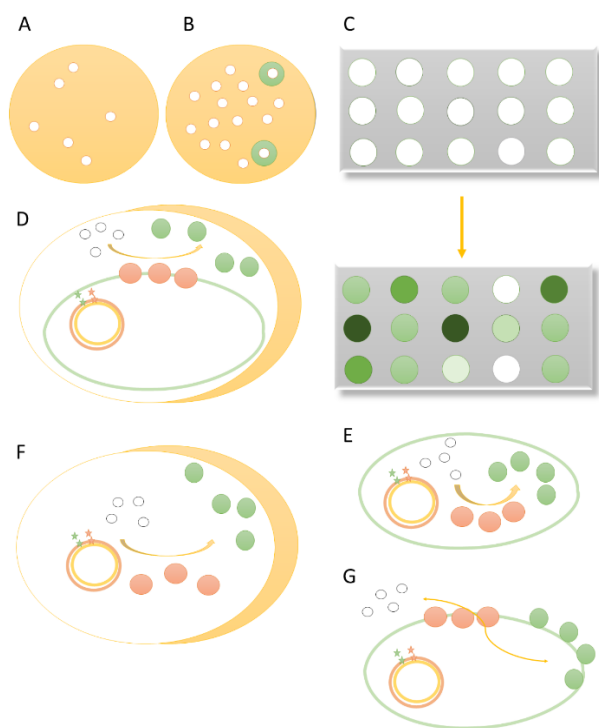
se mogu skenirati (10^5) i činjenica da se intenzitet signala ne može precizno izmeriti (Rieseberg et al., 2001) (slika 18B).

- Pretraga u mikrotitar pločama – najčešće primenjivan metod koji se zasniva na merenju aktivnosti varijanti enzima u pojedinačnim bunarima mikrotitar ploče, pri čemu se obezbeđuje i precizno merenje kinetike enzima i jednostavno očuvanje veze između genotipa i fenotipa. Primena ovog metoda je izuzetno široka i što se tiče ekspresionih sistema i vrste enzima, detekcija može biti i kolorimetrijska i fluorimetrijska, ali se primenom standardnih mikrotitar pločama sa 96 bunara efikasno može skenirati samo oko 10^4 varijanti dnevno (Bloom, 2006; Williams et al., 2007; Kelly et al., 2008) (slika 18C).
- „Ćelije u kapljicama“ – metod koji se zasniva na formiranju mikro-reaktora inkapsuliranjem pojedinačnih ćelija u kapljice. Kapljice su najčešće dvostruke emulzije vode u ulju u vodi. Očuvanje veze između genotipa i fenotipa omogućava se tako što se u svakoj kapljici nalazi pojedinačna ćelija sa supstratom/supstratima i proizvodima reakcije. Primenom FACS-a ovaj pristup omogućava pretrage biblioteka sa i do 10^9 varijanti. Glavni problem prilikom primene ove metode je sam enzimski esej. Ukoliko se za pretragu biblioteka primenjuje FACS enzimski esej mora rezultirati fluorescentnim proizvodom, pri čemu ni supstrat ni proizvod ne mogu da napuste kapljicu u kojoj se nalazi ćelija (Taly et al., 2007; Huebner et al., 2008; Ostafe et al., 2014) (slika 18D).
- „Ćelije kao mikro-reaktori“ – metod koji podrazumeva da supstrat ulazi u ćeliju koja eksprimira enzim, a konverzija u proizvod dovodi do nastajanja fluorescentnog molekula koji ne može da napusti ćeliju. U tom slučaju se sama ćelija ponaša kao mikro-reaktor i nema potrebe za njenom inkapsulacijom. Ćelije koje na ovaj način postaju fluorescentne mogu se analizirati i sortirati primenom FACS-a. Prednosti i mane su iste kao kod prethodno opisanog metoda, sa tim da se ovde eliminiše postojanje praznih kapljica i kapljica koje sadrže više od jedne ćelije. Mogu se skenirati biblioteke sa do i 10^9 varijanti, ali je broj primenljivih supstrata ograničen. Takođe, većina fluorescentnih supstrata su veštački supstrati,

pa se metod jako retko može koristiti za unapređenje aktivnosti enzima (Aharoni et al., 2006; Ostafe et al., 2013) (slika 18E).

- *In vitro* selekcija – metod koji se zasniva na *in vitro* ekspresiji proteina u kapljicama. Kapljice se formiraju na isti način kao za ćelije, ali se enkapsuliraju mutirani geni zajedno sa svim komponentama za transkripciju i translaciju i supstratima. Ovo je metod kojim se mogu skenirati najveće biblioteke (10^{10}), jer se izbegava limitirajući korak transformacije ćelija bibliotekama gena (Tawfik, Griffiths, 1998; Mastrobattista et al., 2005). Kapljice zadržavaju vezu između genotipa i fenotipa (Leemhuis et al., 2005) i mogu se sortirati primenom FACS-a, kao i kod prethodno opisanih metoda (Taly et al., 2007) (slika 18F).
- „Ćelijski displej“ – metod koji podrazumeva ekspresiju enzima tako da on bude vezan za ćelijski zid (očuvanje veze genotipa i fenotipa), ali i da konverzija supstrata u proizvod dovodi do pojave fluorescencije, ali i vezivanja molekula za ćelijski zid. Ćelije koje na ovaj način postaju fluorescentne mogu se analizirati i sortirati primenom FACS-a. U ovom slučaju mogu se sortirati biblioteke veličine do 10^9 varijanti, postavka sistema je jednostavnija nego kod primene ćelija u kapljicama, ali proizvod mora biti fluorescentan (Lipovesk et al., 2007; Becker et al., 2008; Varadarajan et al., 2008) (slika 18G).

Sve navedene metode se efikasno primenjuju u pretrazi biblioteka gena. Napretkom tehnologije i razvojem protočnih citometara sve češće se primenjuju metode zasnovane na FACS-u, dok se metode poput „agar plate“ eseja i skrininga u mikrotitar pločama koriste za analizu sortiranih ćelija, kada broj ćelija koje je potrebno analizirati padne na 10^4 ili manje (Ostafe et al., 2013).



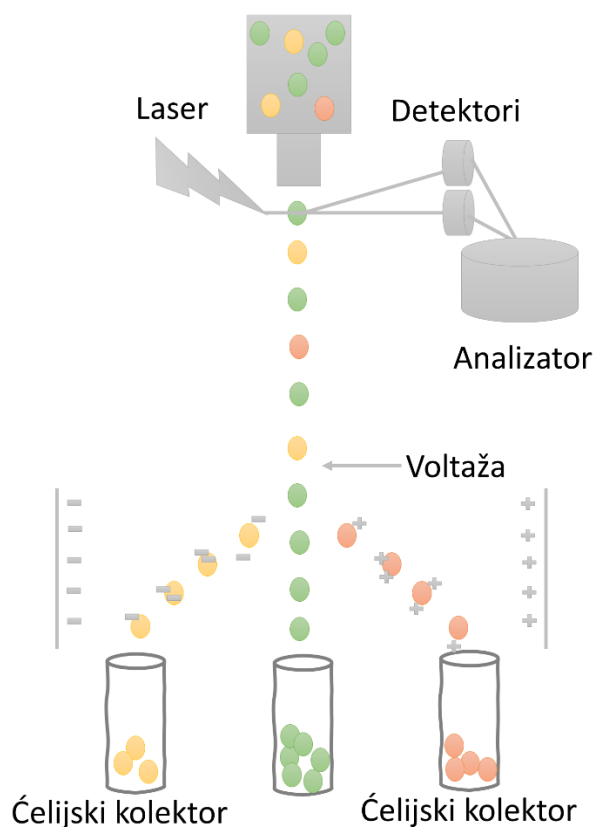
Slika 17. Eksperimentalni pristupi u pretrazi biblioteka gena. **A.** Selekcija. **B.** „Agar plate“ pretraga. **C.** Pretraga biblioteka u mikrotitar pločama. **D.** Čelije u kapljicama. **E.** Čelije kao mikro-reaktori. **F.** *In vitro* ekspresija i selekcija enzima. **G.** Ekspresija na površini ćelija.

2.5.2.1 Fluorescencijom aktivirano ćelijsko sortiranje

Fluorescencijom aktivirano ćelijsko sortiranje (FACS) predstavlja metod za visokoefikasnu pretragu biblioteka gena, zasnovan na primeni protočne citometrije. Kao što je već navedeno, dirigovana evolucija enzima podrazumeva kreiranje izuzetno velikih biblioteka mutiranih gena (i do 10^{10}) mutanata. Pretraga biblioteka ove veličine u cilju pronalaženja mutanata enzima sa željenim karakteristikama nije moguća primenom konvencijalnih metoda poput merenja aktivnosti enzima u mikrotitar pločama, već podrazumeva korišćenje visoko efikasnih metoda (Hertzberg, Pope, 2000; Taly et al., 2007). Pretraživanje ovakvih biblioteka najčešće je omogućeno primenom FACS-a. Različiti pristupi u pripremi uzorka („ćelije u kapljicama“; „ćelije kao mikro-reaktori“; *in vitro* selekcija; ekspresija proteina na površini ćelija...) rezultuju povećanjem fluorescencije koja je rezultat aktivnosti varijanti enzima u pojedinačnim kompartmentima. U ovom slučaju podrazumeva se da jedna ćelija kao mikro-reaktor sadrži veći broj kopija istog mutiranog gena u vektoru, a samim tim i

veliki broj kopija jednog mutanta enzima. Najaktivnije ili najstabilnije varijante enzima će prevesti najveći broj supstrata u fluorescentni proizvod i samim tim imati najveću fluorescenciju (Rieseberg et al., 2001; Aharoni et al., 2006).

Analiza ovih kapljica ili ćelija FACS-om podrazumeva formiranje mlaza u kom prolaze po jedna ćelija ili kapljica. Laser ekscituje fluoroforu u toku prolaska kapljice/ćelije, a detektori mere intenzitet fluorescencije. Nakon analize signala kapljice/ćelije sa najvećom fluorescencijom bivaju naelektrisane. Primenom električnog polja samo naelektrisane kapljice/ćelije bivaju skrenute sa puta mlaza i sortirane u posebne kolektore iz koji se mogu regenerisati i dalje analizirati (slika 19). Na ovaj način se biblioteka može znatno obogatiti aktivnijim ili stabilnijim varijantama i njena veličina se često smanjuje na 10^4 varijanti koje se mogu lako dalje analizirati u mikrotitar pločama (Aharoni et al., 2006; Taly et al., 2007; Xiao et al., 2015).



Slika 19. Shematski prikaz fluorescencijom aktiviranog ćelijskog sortiranja.

Visokoeffikasna pretraga biblioteka gena primenom FACS-a zahteva fluorescentnu detekciju signala, što podrazumeva razvoj enzimskih eseja koji rezultuju oslobađanjem fluorescentnih proizvoda. Pored fluorescencije postoji nekoliko karakteristika supstrata i proizvoda koje moraju biti ispunjene kako bi esej bio pogodan za primenu u FACS-u. Prilikom primene ćelija inkapsuliranih u kapljice nastali proizvod ne sme da napusti kapljicu; ukoliko se ćelije koriste kao mikro-reaktori supstrat mora da uđe u ćeliju, ali ne sme da izađe iz iste, a ukoliko je enzim eksprimiran na površini ćelije nastali proizvod mora ostati vezan za ćelijski zid (Rieseberg et al., 2001; Goddard, Reymond, 2004; Aharoni et al., 2006).

2.6. Ekspresija proteina na površini ćelija kvasca

Očuvanje veze između genotipa i fenotipa je od esencijalnog značaja za efikasnost primene bilo kog metoda za pretraživanje biblioteka gena. Selekcija se vrši merenjem aktivnosti enzima, ali kako bi se identifikovale mutacije koje su dovele do promene u određenim karakteristikama i kako bi se dati enzim dalje okarakterisao i primenio neophodno je znati sekvenciju gena koji kodira datu varijantu enzima. Jedan od metoda za očuvanje ove veze je ekspresija proteina na površini ćelija, pri čemu ćelija sadrži vektor sa kloniranim genom koji kodira za enzim, a po ekspresiji enzima on ostaje kovalentno vezan za površinu ćelijskog zida iste ćelije (Rieseberg et al., 2001; Kondo, Ueda, 2004).

Često primenjivan metod ekspresije enzima za primenu u dirigovanoj evoluciji i visokoeffikasnim metodama pretrage biblioteka je ekspresija proteina na površini ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Boder, Wittrup, 1997, 2000; Lipovesk et al., 2007).

Gen koji kodira željeni enzim klonira se u okviru klonirajućeg regiona pCTCON2 ekspresionog vektora (slika 19). Klonirajući region se nalazi nizvodno od GAL1 promotora koji omogućava ekspresiju proteina sa ovog vektora u prisustvu galaktoze kao inducera. Nakon promotora nalazi se gen koji kodira za α -aglutinin 2 subjedinicu (Aga2) proteina, a iza njega sekvencija za „Human influenza hemagglutinin“ (HA) tag. Gen od interesa se klonira u istom okviru čitanja tako da dođe do N-terminalne fuzije sa Aga 2 proteinom.

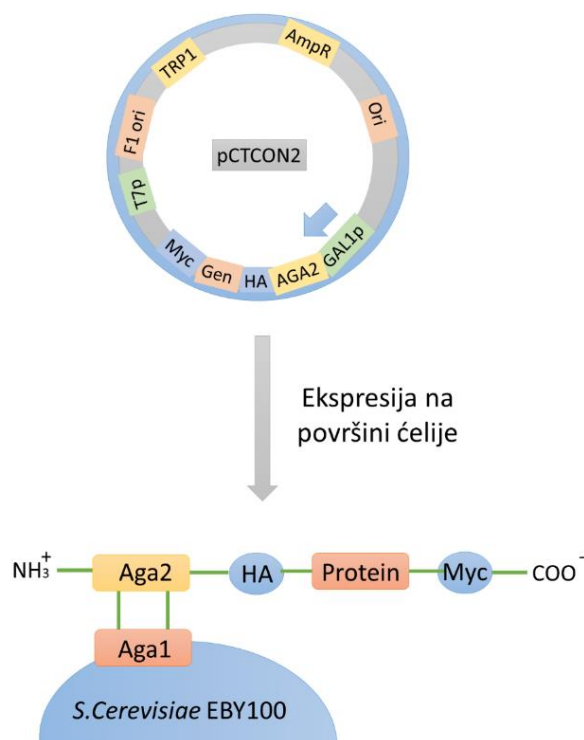
Nakon gena za željeni protein locirana je sekvencija za još jedan tag – c-myc epitop, a zatim i STOP kodon (Boder, Wittrup, 1997, 2000).

Translacijom se sa ovih regiona dobija himerni protein Aga2-HA-enzim-C-myc. Značaj epitopa koji se nalaze između dva proteina i na C-terminusu je u mogućnosti obeležavanja proteina antitelima, a Aga2 proteina u vezivanju za ćelijski zid kvasca. Po ekspresiji himernih proteina Aga2 protein se disulfidnim vezama vezuje sa Aga1 proteinom koji se transferuje van ćelije i biva ukotvljen u ćelijski zid. Ekspresija Aga1 proteina omogućena je primenom posebnog soja *S. cerevisiae* EBY100 (Genotip: MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura352 trp1 leu2delta200 his3delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL) ćelija koje imaju insertovan gen koji kodira za Aga1 protein u hromozomalnu DNA (Gai, Wittrup, 2007).

Pored regiona za kloniranje pCTCON2 vektor sadrži dva oridžina replikacije koji omogućavaju umnožavanje vektora u ćelijama kvasaca i u ćelijama bakterija (radi čuvanja i održavanja vektora). Takođe, sadrži dva selekciona markera TRP1 za selekciju u EBY100 ćelijama zahvaljujući Trp auktrotrofiji kod ovog soja kvasca i gen koji omogućava ampicilinsku rezistenciju za selekciju u *E. coli* (Boder, Wittrup, 1997, 2000; Gai i Wittrup, 2007) (slika 20).

Takođe, efikasna primena enzima u industrijske svrhe podrazumeva mogućnost njihove višestruke primene i uklanjanja iz reakcionih smeša (Datta et al., 2013). Ovo se generalno postiže imobilizacijom enzima na čvrstim podlogama kao što su polisaharidi (Prodanović, et al., 2015), trodimenzionalno povezani agregati (Salvachúa et al., 2013) ili na primer, porozne staklene kuglice (Dwevedi et al., 2012). Međutim, klasični postupci imobilizacije dovode do parcijalne inaktivacije enzima i limitacije njihove aktivnosti usled restrikcije difuzije molekula (Datta et al., 2013). Ovi problemi se mogu prevazići *in situ* imobilizacijom enzima njihovom ekspresijom na površini ćelija (Kuroda, Ueda, 2013; Cherf, Cochran, 2015). Na primer, ćelije kvasca sa eksprimiranim enzimima na površini mogu se koristiti kao biokatalizatori za višestruku upotrebu (Gai, Wittrup, 2007). Ovaj pristup je uspešno primenjen za veći broj enzima uključujući i lakazu, jedan od enzima iz

ligninolitičkog konzorcijuma. Takođe, imobilizacija lakaze na površini kvasca dovela je do značajnog unapređenja njene stabilnosti (Chen et al., 2016).



Slika 20. Ekspresija na površini ćelija *S. cerevisiae* EBY100 pomoću vektora pCTCON2

3. Materijal i metode

3.1. Ciljevi istraživanja

Predmet ove doktorske disertacije je povećanje efikasnosti degradacije tekstilnih boja katalizovane ligninolitičkim peroksidazama primenom proteinskog inženjeringa. Primenjena su dva pristupa:

1. Priprema i pretraživanje nasumičnih biblioteka gena lignin i versatilne peroksidaze protočnom citometrijom u cilju povećanja oksidativne stabilnosti enzima.
2. Priprema i pretraživanje saturacionih biblioteka gena lignin i versatilne peroksidaze u cilju promene supstratne specifičnosti enzima.

Shodno tome postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Kloniranje sintetičkih gena za peroksidaze u pCTCON2 vektor, ekspresija i optimizacija ekspresije peroksidaza na površini ćelija kvasca *S. cerevisiae*.
2. Priprema nasumičnih biblioteka gena peroksidaza.
3. Optimizacija tiramid-fluorescein eseja za primenu u sortiranju ćelija protočnom citometrijom za povećanje oksidativne stabilnosti ligninolitičkih peroksidaza.
4. Selekcija i karakterizacija dobivenih mutanata sa povećanom oksidativnom stabilnošću.
5. Priprema saturacionih biblioteka gena peroksidaza.
6. Pretraga saturacionih biblioteka gena peroksidaza.
7. Selekcija i karakterizacija mutanata sa povećanom aktivnošću.
8. Primena izabranih mutanata u višestrukim ciklusima degradacije boja u obliku enzima imobilizovanih na površini kvasca.

3.2. Materijal

3.2.1 Hemikalije

Sve hemikalije korišćene za izradu ove disertacije poručene su od kompanija Karl Roth (Nemačka) i Sigma Aldrich (Nemačka). Restrikcioni enzimi, polimeraze, DpnI i DNA ligaze poručene su od kompanije New England BioLabs (SAD). Kompetentne ćelije *E. coli* XL10Gold i kitovi za mutagenezu gena poručeni su od kompanije Agilent technologies (SAD). Kitovi za prečišćavanje PCR proizvoda i izolovanje plazmida poručeni su od kompanije Macherey-Nagel (Nemačka).

3.2.2 Izvor gena za lignin i versatilnu peroksidazu

Sintetički geni za lignin peroksidazu H8 iz *Phanerochaete chrysosporium* i versatilnu peroksidazu iz *Pleurotus eryngii* poručeni su od kompanije GenScript (SAD). Sekvencije naručenih gena prikazane su u daljem tekstu.

3.2.3. Vektori i sojevi

Za kloniranje, umnožavanje i održavanje plazmida korišćen je soj *E. coli* XL10Gold.

Za ekspresiju enzima na površini ćelija kvasca korišćen je soj *S. cerevisiae* EBY100 i vektor pCTCON2, dobijeni ljubaznošću profesora Dajn-a Vitrap-a, MIT, SAD.

3.3. Mikrobiološke metode

Prilikom rada poštovana su pravila rada u mikrobiološkoj laboratoriji.

Mikrobiološki medijumi pripremljeni su rastvaranjem ili suspendovanjem njihovih komponenti u dejonizovanoj vodi i sterilisani autoklaviranjem na 121 °C u toku 20 minuta. Do upotrebe medijum je čuvan na 4°C.

3.3.1 Medijumi za rast bakterija

3.3.1.1 Superoptimalni tečni medijum (SOC)

SOC medijum korišćen je za regeneraciju ćelija *E. coli* XL10Gold nakon transformacije. Komponente medijuma su odmerene (5 g ekstrakta kvasca, 0,5 g NaCl-a i 20 g peptona) i suspendovane u dejonizovanoj vodi tako da je finalna zapremina iznosila 960 mL. Medijum je sterilisan autoklaviranjem na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon hlađenja na 50 °C dodato je 10 mL 1 M MgCl₂, 10 mL 1 M MgSO₄ i 20 mL 20% (w/v) glukoze.

3.3.1.2 Lauria-Bertani medijum (LB medijum)

LB medijum bez selektivnih markera korišćen je za pripremu kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold. Komponente medijuma su odmerene (5 g ekstrakta kvasca, 10 g NaCl-a i 10 g peptona) i suspendovane u dejonizovanoj vodi tako da je finalna zapremina iznosila 1 L. Medijum je sterilisan autoklaviranjem na 121 °C u toku 20 minuta. Prilikom pripreme selekcionog medijuma sa ampicilinom po hlađenju sterilisanog medijuma na 50 °C istom je dodat 1 mL rastvora ampicilina koncentracije 100 mg/mL.

3.3.1.3 Lauria-Bertani čvrst medijum (LB-agar medijum)

Čvrst LB medijem bez selektivnih markera korišćen je za pripremu kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold, dok je medijum sa ampicilinom korišćen za selekciju i umnožavanje transformisanih kolonija *E. coli*. Čvrst LB medijum pripremljen je na isti način kao i tečan medijum (sekcija 3.3.1.2) uz dodatak 20 g agra pre sterilizacije.

3.3.1.4 NZY Broth medijum

NZY Broth medijum korišćen je pri transformaciji komercijalnih ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold. Komponente medijuma su odmerene (5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl-a i 10 g NZ amina) i suspendovane u dejonizovanoj vodi tako da je finalna zapremina iznosila 955 mL. Medijum je sterilisan autoklaviranjem na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon hlađenja na 50 °C dodato je 12,5 mL 1 M MgCl₂, 12,5 mL 1 M MgSO₄ i 20 mL 20% (w/v) glukoze.

3.3.2 Medijumi za rast kvasaca

3.3.2.1 2xYPAD medijum

2xYPAD medijum za rast kvasaca je korišćen za pripremu kompetentnih ćelija *S. cerevisiae* EBY100. Komponente medijuma su odmerene (20 g ekstrakta kvasca i 40 g triptona) i suspendovane u dejonizovanoj vodi tako da je finalna zapremina iznosila 800 mL. Medijum je sterilisan autoklaviranjem na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon hlađenja na 50 °C dodato je 200 mL 20% (w/v) glukoze.

3.3.2.2 YPD čvrst medijum (YPD-agar)

YPD medijum za rast kvasaca je korišćen za pripremu kompetentnih ćelija *S. cerevisiae* EBY100. Komponente medijuma su odmerene (10 g ekstrakta kvasca, 20 g triptona i 20 g agra) i suspendovane u dejonizovanoj vodi tako da je finalna zapremina iznosila 900 mL. Medijum je sterilisan autoklaviranjem na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon hlađenja na 50 °C dodato je 100 mL 20% (w/v) glukoze

3.3.2.3 Selektivni medijum za rast kvasca *S. cerevisiae* EBY100 (YNB-CAA medijum sa glukozom)

YNB-CAA medijum sa glukozom korišćen je za rast *S. cerevisiae* EBY100 ćelija transformisanih pCTCON2 plazmidom ili konstruktom istog plazmida i korišćenih gena. Komponente medijuma su odmerene (6,7 g azotnih baza kvasca sa NH₄SO₄ i 5 g kazamino kiselina) i suspendovane u dejonizovanoj vodi tako da je finalna zapremina iznosila 900 mL. Medijum je sterilisan autoklaviranjem na 121 °C u toku 20 minuta. Nakon hlađenja na 50 °C dodato je i 100 mL 20% (w/v) glukoze. Čvrst medijum je pripremljen na isti način samo što je pre sterilizacije u dodato i 20 g agra.

3.3.2.4 Selektivni medijum za indukciju ekspresije proteina na površini kvasca *S. cerevisiae* EBY100 (YNB-CAA medijum sa galaktozom)

YNB-CAA medijum sa galaktozom korišćen je za ekspresiju proteina na površini kvasca *S. cerevisiae* EBY100 ćelija transformisanih pCTCON2 plazmidom ili konstruktom istog plazmida i korišćenih gena. Medijum je pripremljen na isti način kao i tečni YNB-CAA

medijum sa glukozom (sekcija 3.3.2.3), samo što je nakon sterilizacije dodato 100 mL 20 (w/v) rastvora galaktoze umesto rastvora glukoze.

3.3.3 Kompetentne ćelije

Za pripremu biblioteka gena korišćene su komercijalne ultra-kompetentne ćelije *E. coli* XL10Gold. Za sve ostale eksperimente korišćene su pripremljene hemijski kompetentne ćelije *E. coli* XL10Gold i *S. cerevisiae* EBY100.

3.3.3.1 Priprema hemijski kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold

Ćelije soja *E. coli* XL10Gold su zasejane metodom iscrpljenja na LB-agar medijum i inkubirane 16 h na 37 °C, nakon čega je pojedinačna kolonija inokulisana u 2 mL tečnog LB medijuma i gajena na 37 °C i 200 obrtaja/min u toku 16h. Nakon umnožavanja ćelija 1 mL kulture inokulisan je u 100 mL LB medijuma prethodno zagrejanog na 37 °C. Ćelije su gajene na 37 °C i 200 obrtaja/min dok optička gustina na 600 nm (OD₆₀₀) nije dostigla vrednost 0.4 (približno 2 h).

Ćelijska kultura je prebačena u 2 plastične epruvete sa konusnim dnom i zapušaćem zapremine 50 mL koje su prethodno ohlađene na ledu i inkubirane 10 minuta na ledu, nakon čega je centrifugirano 10 minuta na 4°C i 3000 obrtaja/min. Supernatant je odbačen, a ćelije iz svake epruvete su resuspendovane u 10 mL 85 mM CaCl₂ rastvora sa 15% glicerolom (v/v). Centifugirano je 10 minuta na 4°C i 3000 obrtaja/min, supernatant je odbačen, a ćelije su resuspendovane u 10 mL istog rastvora i inkubirane na ledu 30 minuta. Ćelije su prikupljene centrifugiranjem u toku 10 minuta na 4°C i 3000 obrtaja/min i finalno resuspendovane u 1 mL istog rastvora. Ćelijske suspenzije su podeljene u alikvote od to 50 µL i zamrznute u tečnom azotu. Na ovaj način pripremljene hemijski kompetentne ćelije su do upotrebe skladištene na -80 °C, ne duže od 6 meseci.

3.3.3.2 Priprema hemijski kompetentnih ćelija *S. cerevisiae* EBY100

Ćelije soja *S. cerevisiae* EBY100 su zasejane metodom iscrpljenja na YPD-agar medijum i inkubirane 36 h na 30 °C, nakon čega je pojedinačna kolonija inokulisana u 2.5 mL tečnog 2xYPAD medijuma i gajena na 30 °C i 200 obrtaja/min u toku 16h. Nakon umnožavanja

ćelija celokupna zapremina kulture inokulisana je u 50 mL 2xYPAD medijuma prethodno zagrejanog na 30 °C. Ćelije su gajene na 30 °C i 200 obrtaja/min dok optička gustina na 600 nm (OD₆₀₀) nije dostigla vrednost 1 (približno 4 h).

Ćelije su centrifugirane 5 minuta na 300 obrtaja/minutu. Supernatant je odbačen, a ćelije su resuspendovane u 25 mL sterilne demineralizovane vode i ponovo centrifugirane 5 minuta na 300 obrtaja/minutu. Supernatant je odbačen, a ćelije su resuspendovane u 500 µL sterilne demineralizovane vode, prebačene u mikrotube zapremine 1 mL i centrifugirane 5 minuta na 6000 obrtaja/min. Supernatant je ponovo odbačen, a ćelije su resuspendovane u 500 µL prethodno sterilisanog FCC rastvora (5% glicerol (v/v) i 10% DMSO (v/v)). Ćelijska suspenzija je podeljena u alikvote od po 50 µL u mikrotubama zapremine 1.5 mL koji su do upotrebe skladišteni na -80 °C.

3.3.3.3 Transformacija komercijalnih ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold

BD Falcon polipropilenske epruvete zapremine 14 mL su ohlađene na ledu, a NZY Broth medijum je zagrejan na 42 °C. Ultra-kompetentne ćelije su otopljene na ledu, a zatim je po 100 µL ćelijske suspenzije prebačeno u svaku epruvetu. U svaku epruvetu sa ćelijskom suspenzijom dodato je po 4 µL β-merkaptoetanol za transformaciju ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold i lagano je promešano. Inkubirano je 10 minuta na ledu uz lagano mešanje na svakih 2 minuta. U svaki alikvot dodato je po 5 µL PCR smeše, lagano je promešano i inkubirano 30 minuta na ledu. Ćelije su izložene toplotnom šoku na 42 °C tačno 30 sekundi, a zatim su inkubirane na ledu 2 minuta. U svaki alikvot dodato je po 900 µL NZY Broth medijuma zagrejanog na 42 °C i inkubirano je 1 h na 37 °C i 250 obrtaja/min. Po 30 µL ćelijske suspenzije zasejano je na po jednu LB-agar ampicilinsku ploču i inkubirano je 16 h na 37 °C.

3.3.3.4 Transformacija kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold

Alikvot od 50 µL kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold je otopljen na ledu i dodato mu je 1-5 µL restvora plazmida, ligacione ili PCR smeše (u zavisnosti od eksperimenta). Nakon laganog mešanja ćelijske suspenzije su inkubirane 30 minuta na ledu, a zatim podvrgnute toplotnom šoku na 42 °C tačno 45 sekundi. Nakon 2 minuta na ledu u svaki alikvot dodato

je po 950 μ L SOC medijuma i inkubirano je 1 h na 37 °C i 250 rpm. Na pojedinačne LB-ampicilinske ploče zasejano je između 100 i 300 μ L suspenzije (u zavisnosti od eksperimenta) i inkubirano je 16 h na 37 °C.

3.3.3.5 Transformacija kompetentnih ćelija *S. cerevisiae* EBY100

U alikvot kompetentnih ćelija *S. cerevisiae* EBY100 zapremine 50 μ L dodato je 260 μ L 50% (v/v) rastvora PEG₃₃₅₀, 36 μ L 1 M rastvora litijum-acetata i 50 μ L jednolančane DNA (2 mg/mL), prethodno inkubirane na 98 °C u toku 10 min i čuvanoj na ledu do primene i 14 μ L rastvora plazmida. Smeša je promešana na vortex-u i inkubirana na 42 °C u toku 1h, uz mešanje svakih 10 minuta. Po završetku inkubacije dodato je po 950 μ L YNB-CAA medijuma sa glukozom i 200 μ L suspenzije je zasejano na YNB-CAA-agar ploče sa glukozom. Ploče sa zasejanim ćelijama su inkubirane na 30 °C 36 h (Gietz, Schiestl, 2007).

3.4. Molekularno-biološke metode

3.4.1 Kloniranje gena za versatilnu peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor

3.4.1.1 Umnožavanje gena za versatilnu peroksidazu

Gen za versatilnu peroksidazu umnožen je PCR-om. Sastav PCR smeše prikazan je u tabeli 1, a korišćen PCR program u tabeli 2.

Sekvencije prajmera korišćenih za kloniranje gena za versatilnu peroksidazu u pCTCON2 vektor (5' \rightarrow 3'):

Forward primer – ATCGATGCTAGCATGGCTACTTGTGATGACGGTAGAACAACCTGCAAATGCCGC

Reverse primer – TACTAGTGGATCCCTCGAGACTACCTGGAACCTGGTGAAGAGATGTTACAGGACC

Sekvencija sintatskog gena za versatilnu peroksidazu (5' \rightarrow 3'):

ATGGCTACTTGTGATGACGGTAGAACAACCTGCAAATGCCGCATGTTGCATCCTATTCCCAATCTTGACGAT
ATTCAGGAGAACTTGTGATGGTGTCTCAATGCGGTGAAGAGGTTTCATGAATCCTTGCCTTTGACCTTTTCAT
GATGCCATAGGATTTCTCCAACCTTTAGGTGGTGGTGGAGCTGATGGTAGTATCATTGCTTTTCGACACCATT
GAAACCAATTTCCAGCAAATGCCGGTATTGATGAGATAGTTTCAGCTCAGAAACCATTGCTTGTAAACAC

AACATTTCTGCTGGTGATTTTATCCAATTTGCTGGTGCTGTCGGAGTCTCAAATTTGCTCTGGAGGAGTCAGA
 ATACCTTTCTTCTTGGGTAGACCAGATGCAGTTGCCGCTAGTCCAGATCATCTTGTTCAGAACCTTTTGACT
 CAGTTGACTCTATTCTTGCCAGAATGGGTGATGCTGGTTTTAGTCCTGTAGAAGTTGTATGGTTACTTGCATC
 CCATTCTATTGCTGCAGCAGATAAAGTCGATCCTTCTATACCTGGTACTCCATTTCGATTCAACACCTGGTGTA
 TTCGACTCCCAGTTCTTCATTGAAACTCAGTTAAAGGGTCGTTTTGTTTCCAGGTACAGCTGATAATAAGGGT
 GAAGCTCAATCTCCTTTGCAAGGAGAAATTAGGTTGCAATCTGATCACTTGTTAGCTAGAGATCCTCAAACG
 GCTTGTGAATGGCAATCTATGGTGAACAATCAACCTAAGATCCAAAACAGATTTCGCTGCAACTATGTGCGAA
 AATGGCCTTGTGGGTCAAGACAAGACGAAACTAATCGATTGTTCCGATGTGATACCAACTCCTCCAGCCTT
 AGTCGGTGCAGCTCATTTGCCAGCAGGATTTTCGCTATCAGACGTGGAACAAGCTTGTGCTGCTACCCCCATT
 TCCAGCCTTAACAGCTGATCCTGGTCCTGTAACATCTGTTCCACCAGTTCAGGTAGTCTCGAGTAA

Tabela 1. Sastav PCR smeše za umnožavanje gena za versatilnu peroksidazu

Komponenta	Zapremina (μL)
5xpufer za Q5 DNA polimerazu	5
<i>Forward</i> prajmer (25 μM)	0,5
<i>Reverse</i> prajmer (25 μM)	0,5
Templatna DNA	0,5
Smeša dezoksiribonukleotida (10 mM)	0,5
Q5 DNA polimeraza	0,25
MiliQ voda	17,75
Ukupna zapremina	25

Tabela 2. PCR program za umnožavanje gena za versatilnu peroksidazu

Korak	Temperatura (°C)	Vreme
Inicijalna denaturacija	98	2 min
Denaturacija	98	10 sec
<i>Annealing</i>	69	30 sec
Elongacija	72	30 sec
Finalna elongacija	72	2 min

30 ciklusa

Po završetku reakcije PCR proizvod je prečišćen korišćenjem kita za prečišćavanje PCR proizvoda po protokolu opisanom u sekciji 4.4.6.

3.4.1.2 Dvostruka digestija gena za versatilnu peroksidazu i pCTCON2 vektora

U cilju insercije gena za versatilnu peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor i prečišćeni PCR proizvod i vektor pCTCON2 podvrgnuti su restrikcionalnoj digestiji sa 2 restrikcionalna enzima, NheI i SalI. Sastav reakcione smeše za digestiju gena prikazan je u tabeli 3, a za digestiju vektora u tabeli 4.

Tabela 3. Sastav smeše za dvostruku digestiju gena za versatilnu peroksidazu

Komponenta	Zapremina (µL)
Gen za versatilnu peroksidazu	12
NheI HF	1
SalI HF	1
10xCutSmart pufer	2
MiliQ voda	4
Ukupna zapremina	20

Tabela 4. Sastav smeše za dvostruku digestiju pCTCON2 vektora

Komponenta	Zapremina (µL)
pCTCON2 vektor	2
NheI HF	1
SalI HF	1
10xCutSmart pufer	2
MiliQ voda	14
Ukupna zapremina	20

Dvostruka restrikcionalna digestija gena i vektora trajala je 4 h na 37 °C. Enzimi su inaktivirani inkubacijom na 80 °C u toku 10 minuta. Dvostruko digestovani proizvodi su prečišćeni korišćenjem kita za prečišćavanje PCR proizvoda po protokolu opisanom u sekciji 4.4.6.

3.4.1.3 Defosforilacija dvostruko digestovanog pCTCON2 vektora

Radi unapređenja efikasnosti ligacije DNA molekula dvostruko digestovani pCTCON2 vektor je defosforilisan. Pripremljena reakciona smeša je prikazana u tabeli 5.

Tabela 5. Reakciona smeša za defosforilaciju dvostruko digestovanog pCTCON2 vektora

Komponenta	Zapremina (µL)
Dvostruko digestovani pCTCON2 vektor	10
Alkalna fosfataza (CIP)	1
10xCutSmart pufer	2
MiliQ voda	7
Ukupna zapremina	20

Defosforilacija je trajala 30 minuta na 37 °C. Enzim je inaktiviran inkubacijom na 80 °C u toku 10 minuta. Defosforilisan, dvostruko digestovan vektor je prečišćen korišćenjem kita za prečišćavanje PCR proizvoda po protokolu opisanom u sekciji 4.4.3.

3.4.1.4 Ligacija dvostruko digestovanih proizvoda

Dvostruko digestovani proizvodi gena za versatilnu peroksidazu i pCTCON2 vektora su ligirani primenom T4 DNA ligaze. Sastav reakcione smeše prikazan je u tabeli 6.

Tabela 6. Sastav ligacione smeše

Komponenta	Zapremina (µL)
Dvostruko digestovan pCTCON2 vektor	1
Dvostruko digestovan gen	2,5
10xpufer za T4 DNA ligazu	2
T4 DNA ligaza	1
MiliQ voda	13,5
Ukupna zapremina	20

Ligacija je trajala 45 minuta na 25 °C. Odmah po završetku reakcije 5 µL ligacione smeše je iskorišćeno za transformaciju *E. coli* XL10Gold kompetentnih ćelija.

3.4.2 Kloniranje gena za lignin peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor

3.4.2.1 Umnožavanje gena za lignin peroksidazu

Gen za lignin peroksidazu umnožen je PCR-om. PCR smeše prikazan je u tabeli 7, a korišćen PCR program u tabeli 8.

Sekvencije prajmera korišćenih za kloniranje gena za lignin peroksidazu u pCTCON2 vektor (5' → 3'):

Forward primer – AATGCTAGCGCAACCTGTGCTAATGGTAAG

Reverse primer – AATGTCGACTTAAGCCTTGTGTGGAGGTATTC

Tabela 7. Sastav PCR smeše za umnožavanje gena za lignin peroksidazu

Komponenta	Zapremina (μL)
5xpufer za Q5 DNA polimerazu	5
<i>Forward</i> prajmer (25 μM)	0,5
<i>Reverse</i> prajmer (25 μM)	0,5
Templatna DNA	0,5
Smeša dezoksiribonukleotida (10 mM)	0,5
Q5 DNA polimeraza	0,25
MiliQ voda	17,75
Ukupna zapremina	25

Tabela 8. PCR program za umnožavanje gena za lignin peroksidazu

Korak	Temperatura (°C)	Vreme
Inicijalna denaturacija	98	2 min
Denaturacija	98	10 sec
<i>Annealing</i>	64	30 sec
Elongacija	72	30 sec
Finalna elongacija	72	2 min

30 ciklusa

Po završetku reakcije PCR proizvod je prečišćen korišćenjem kita za prečišćavanje PCR proizvoda po protokolu opisanom u sekciji 4.4.3.

Sekvencija sintetičkog gena za lignin peroksidazu H8 (5' → 3'):

GCAACCTGTGCTAATGGTAAGACAGTAGGTGATGCTTCTTGTGCGCCTGGTTCGATGTCTTAGATGACATT
 CAAGCAAATATGTTTCACGGTGGTCAGTGTGGTGCCGAAGCTCACGAATCTATTAGATTGGTCTTTCACGAT
 TCTATAGCAATATCTCCTGCTATGGAGGCTAAAGGAAAGTTTGGTGGAGGTGGAGCCGATGGTTCAATCAT
 GATATTCGATACCATAGAAAACCGCTTTCACCCAAACATAGGATTGGATGAAGTAGTTGCTATGCAAAAAC
 CATTTGTCCAAAAACACGGAGTAACACCAGGTGACTTTATCGCTTTCGCCGGTGCCGTCGCCTTATCTAATT
 GCCCTGGTGCTCCTCAGATGAACTTCTTTACCGGAAGGAAGCCAGCTACACAACCAGCACCTGACGGTTTAG
 TACCAGAACCTTTTCATACTGTAGACCAAATTATAGCTAGAGTCAACGACGCTGGAGAATTTGATGAATTAG
 AATTGGTATGGATGTTGTCTGCTCACTCTGTTGCAGCAGTCAATGACGTTGATCCAACCGTCCAAGGATTAC
 CTTTTGATTCAACTCCAGGAATTTTCGATTCTCAGTTTTTCGTTGAAACTCAATTCAGAGGAACTTTGTTC
 AGGTTTCAGGAGGAAATCAAGGTGAAGTTGAGTCAGGTATGGCTGGTGAATCAGGATCCAGACAGATCATA
 CATTGGCTAGAGATTCTAGGACTGCCTGTGAATGGCAATCTTTCGTCGGTAATCAATCAAAGTTGGTAGATG
 ATTTTCAATTCATTTTTTTGGCTTTAACCCAGTTGGGTCAAGATCCAAATGCAATGACAGATTGTTCTGATG
 AATCCCATTATCAAAACCTATACCAGGTAATGGTCCATTTTCATTCCTCCCTCCTGGTAAATCACATTCTGAT
 ATTGAACAGGCTTGTGCTGAGACTCCTTTCCATCTTTAGTTACTTTGCCAGGTCCAGCCACTTCAGTCGCAA
 GAATACCTCCACACAAGGCTTAAGTCGA

3.4.2.2 Dvostruka digestija gena za lignin peroksidazu i pCTCON2 vektora

U cilju insercije gena za lignin peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor i prečišćeni PCR proizvod i vektor pCTCON2 podvrgnuti su restrikcionalnoj digestiji sa 2 restrikcionalna enzima, NheI i SalI. Sastav reakcione smeše za digestiju gena prikazan je u tabeli 9, a za digestiju vektora u tabeli 10.

Tabela 9. Sastav smeše za dvostruku digestiju gena za lignin peroksidazu

Komponenta	Zapremina (µL)
Gen za lignin peroksidazu	12
NheI HF	1
SalI HF	1
10xCutSmart pufer	2
MiliQ voda	4
Ukupna zapremina	20

Tabela 10. Sastav smeše za dvostruku digestiju pCTCON2 vektora

Komponenta	Zapremina (µL)
pCTCON2 vektor	2
NheI HF	1
SalI HF	1
10xCutSmart pufer	2
MiliQ voda	14
Ukupna zapremina	20

Dvostruka digestija gena i vektora trajala je 4 h na 37 °C. Enzimi su inaktivirani inkubacijom na 80 °C u toku 10 minuta. Dvostruko digestovani proizvodi su prečišćeni korišćenjem kita za prečišćavanje PCR proizvoda po protokolu opisanom u sekciji 4.4.3.

3.4.2.3 Defosforilacija dvostruko digestovanog pCTCON2 vektora

Radi unapređenja efikasnosti ligacije DNA molekula dvostruko digestovani pCTCON2 vektor je defosforilisan. Pripremljena reakciona smeša je prikazana u tabeli 11.

Tabela 11. Reakciona smeša za defosforilaciju dvostruko digestovanog pCTCON2 vektora

Komponenta	Zapremina (µL)
Dvostruko digestovani pCTCON2 vektor	10
Alkalna fosfataza (CIP)	1
10xCutSmart pufer	2
MiliQ voda	7
Ukupna zapremina	20

Defosforilacija je trajala 30 minuta na 37 °C. Enzim je inaktiviran inkubacijom na 80 °C u toku 10 minuta. Defosforilisan, dvostruko digestovan vektor je prečišćen korišćenjem kita za prečišćavanje PCR proizvoda po protokolu opisanom u sekciji 4.4.3.

3.4.2.4 Ligacija dvostruko digestovanih proizvoda

Dvostruko digestovani proizvodi gena za lignin peroksidazu i pCTCON2 vektora su ligirani primenom T4 DNA ligaze. Sastav reakcione smeše prikazan je u tabeli 12.

Tabela 12. Sastav ligacione smeše

Komponenta	Zapremina (μL)
Dvostruko digestovan pCTCON2 vektor	1
Dvostruko digestovan gen	2
10xpufer za T4 DNA ligazu	2
T4 DNA ligaza	1
MiliQ voda	14
Ukupna zapremina	20

Ligacija je trajala 45 minuta na 25 °C. Odmah po završetku reakcije 5 μL ligacione smeše je iskorišćeno za transformaciju *E. coli* XL10Gold kompetentnih ćelija.

3.4.3 Prečišćavanje PCR proizvoda

PCR proizvodi, kao i dvostruko digestovani vektori prečišćeni su korišćenjem kita za prečišćavanje PCR proizvoda (Marchery-Nagel), po uputstvu proizvođača. MiliQ voda je dodata u PCR proizvod do finalne zapremine od 100 μL i smeša je pomešana sa 200 μL pufera za vezivanje NT1. Smeša je nanešena na mini-spin kolonu i centrifugirano je 30 sekundi na 11000 g. Silika gel mini-spin kolona je isprana dodatkom 700 μL pufera za ispiranje NT3 i centrifugiranjem 30 sekundi na 11000 g. Ovaj korak je ponovljen 2 puta, a zatim je kolona osušena centrifugiranjem 3 minuta na 11000 g. Direktno na membranu nanešeno je 20 μL elucionog pufera NE i inkubirano je 1 minut na sobnoj temperaturi. DNA je eluirana u mikrotubu zapremine 1,5 mL centrifugiranjem u trajanju od 1 minuta na 11000 g.

3.4.4 Izolovanje plazmida iz *E. coli* XL10Gold

Plazmidi su izolovani iz prekonoćnih kultura *E. coli* XL10Gold ćelija dobijenih inokulacijom pojedinačnih kolonija u 2 mL LB-ampicilin medijuma i gajenjem u toku 16 h na 37 °C i 200 obrtaja/min korišćenjem kita za izolovanje plazmida. Ćelije iz prekonoćne kulture su prebačene u mikrotube zapremine 2 mL i prikupljene centrifugiranjem 30 sekundi na 12000 g. Plazmidi su izolovani iz prekonoćne kulture korišćenjem Marchery-Nagel kita za izolovanje plazmida, prema uputstvu proizvođača.

Ćelije su resuspendovane u 150 µL pufera A1 sa dodatkom RNAze H. U suspenziju dodato je 250 µL pufera A2 i lagano promešano. Nakon 2 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u smešu dodato je 350 µL pufera A3. Mešano je izvrtnjem tube do gubitka plave boje, a zatim centrifugirano 4 minuta na 12000 g. Supernatant je prenešen na mini-spin kolonu i nanešen na istu centrifugiranjem 30 sekundi na 2000 g. Membrana je isprana i osušena dodatkom 450 µL pufera A4 i centrifugiranjem 3 minuta na 12000 g. DNA je eluirana sa kolone dodatkom 50 µL elucionog pufera direktno na membranu. Inkubirano je 1 minut na sobnoj temperaturi, a zatim eluirano centrifugiranjem 1 minut na 12000 g u mikrotubu zapremine 1,5 mL.

3.4.5 Agarozna DNA elektroforeza

Za analizu PCR proizvoda i restrikovanih plazmida korišćena je agarozna DNA elektroforeza. Koncentracija agaroze bila je 0,6% ili 0,8% u zavisnosti od ekperimenta u TBE puferu (89 mM TRIS, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8,0) sa inkorporiranim etidijum-bromidom. Uzorci su pre nanošenja pomešani sa „6x purpule loading dye“ bojom za DNA elektroforezu. Elektroforeza je rađena pod naponom od 80 V, a DNA je vizuelizovana pod UV-lampom. Masa analiziranih DNA uzoraka poređena je sa DNA molekulskim markerima.

3.4.6 Provera uspešnosti kloniranja gena za versatilnu peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor

3.4.6.1 Provera uspešnosti kloniranja restrikcijom digestijom

Plazmidi izolovani iz pojedinačnih kolonija koje su porasle nakon transformacije *E. coli* XL10Gold ligacionom smešom VP-pCTCON2 linearizovani su SalI restrikcijom enzimom. Sastav restrikcione smeše dat je u tabeli 13.

Tabela 13. Sastav restrikcione smeše

Komponenta	Zapremina (μL)
Izolovani plazmidi	5
SalI HF	1
10xCutSmart pufer	2
MiliQ voda	12
Ukupna zapremina	20

Restrikcijom digestija plazmida trajala je 1 h na 37 °C, a aktivnost enzima je stopirana inkubacijom smeše 10 minuta na 80 °C. Restrikovani plazmidi su analizirani agaroznom DNA elektroforezom. pCTCON2 vektor restrikovan na isti način je korišćen kao negativna kontrola.

3.4.6.2 Provera uspešnosti kloniranja PCR-om

Plazmidi izolovani iz 5 pojedinačnih kolonija koje su porasle nakon transformacije *E. coli* XL10Gold ligacionom smešom VP-pCTCON2 upotrebljeni su kao templat za PCR uz korišćenje prajmera za kloniranje gena za versatilnu peroksidazu. Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 14, a korišćen PCR program u tabeli 15.

Tabela 14. Sastav PCR smeše za umnožavanje gena za versatilnu peroksidazu

Komponenta	Zapremina (μL)
Taq 2xMaster mix	10
<i>Forward</i> prajmer (25 μM)	0,4
<i>Reverse</i> prajmer (25 μM)	0,4
Templatna DNA	0,2
MiliQ voda	9
Ukupna zapremina	20

Tabela 15. PCR program za umnožavanje gena za versatilnu peroksidazu

Korak	Temperatura (°C)	Vreme
Inicijalna denaturacija	95	30 sec
Denaturacija	95	20 sec
<i>Annealing</i>	65	30 sec
Elongacija	68	1 min
Finalna elongacija	68	2 min

Nakon završetka reakcije PCR proizvodi su analizirani agaroznom DNA elektroforezom.

3.4.6.3 Provera uspešnosti kloniranja dvostrukom restrikcijom

Plazmidi izolovani iz 5 pojedinačnih kolonija koje su porasle nakon transformacije *E. coli* XL10Gold ligacionom smešom VP-pCTCON2 dvostruko su digestovani istim restrikcionim enzimima koji su upotrebljeni za kloniranje gena, NheI HF i Sali HF. Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 16.

Restrikcijna digestija je trajala 1 h na 37 °C, a restrikcioni enzimi su inaktivirani inkubacijom u trajanju od 10 minuta na 80 °C. Dobijeni proizvodi su analizirani agaroznom DNA elektroforezom.

Tabela 16. Sastav smeše za dvostruku restrikcionu digestiju plazmida

Komponenta	Zapremina (µL)
Izolovani plazmidi	5
NheI HF	1
SalI HF	1
10xCutSmart pufer	2
MiliQ voda	11
Ukupna zapremina	20

3.4.7 Provera uspešnosti kloniranja gena za lignin peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor

3.4.7.1 Provera uspešnosti kloniranja restrikcionom digestijom

Plazmidi izolovani iz pojedinačnih kolonija koje su porasle nakon transformacije *E. coli* XL10Gold ligacionom smešom LiP-pCTCON2 restrikovani su SalI restrikcionim enzimom. Sastav restrikcione smeše dat je u tabeli 17.

Tabela 17. Sastav restrikcione smeše

Komponenta	Zapremina (µL)
Izolovani plazmidi	5
SalI HF	1
10xCutSmart pufer	2
MiliQ voda	12
Ukupna zapremina	20

Restrikciona digestija plazmida trajala je 1 h na 37 °C, a aktivnost enzima je stopirana inkubacijom smeše 10 minuta na 80 °C. Restrikovani plazmidi su analizirani agaroznom DNA elektroforezom. pCTCON2 vektor restrikovan na isti način je korišćen kao negativna kontrola.

3.4.7.2 Provera uspešnosti kloniranja PCR-om

Plazmidi izolovani iz 5 pojedinačnih kolonija koje su porasle nakon transformacije *E. coli* XL10Gold ligacionom smešom LiP-pCTCON2 upotrebljeni su kao templatni za PCR uz korišćenje prajmera za kloniranje gena za lignin peroksidazu. Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 18, a korišćen PCR program u tabeli 19.

Tabela 18. Sastav PCR smeše za umnožavanje gena za lignin peroksidazu

Komponenta	Zapremina (μL)
Taq 2xMaster mix	10
<i>Forward</i> prajmer (25 μM)	0,4
<i>Reverse</i> prajmer (25 μM)	0,4
Templatna DNA	0,2
MiliQ voda	9
Ukupna zapremina	20

Tabela 19. PCR program za umnožavanje gena za lignin peroksidazu

Korak	Temperatura (°C)	Vreme
Inicijalna denaturacija	95	30 sec
Denaturacija	95	20 sec
<i>Annealing</i>	60	30 sec
Elongacija	68	1 min
Finalna elongacija	68	2 min

Nakon završetka reakcije PCR proizvodi su analizirani agaroznom DNA elektroforezom.

3.4.7.3 Provera uspešnosti kloniranja dvostrukom digestijom

Plazmidi izolovani iz 5 pojedinačnih kolonija koje su porasle nakon transformacije *E. coli* XL10Gold ligacionom smešom LiP-pCTCON2 dvostruko su restrikcijom digestovani istim restrikcionim enzimima koji su upotrebljeni za kloniranje gena, NheI HF i SalI HF. Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 20.

Tabela 20. Sastav smeše za dvostruku digestiju plazmida

Komponenta	Zapremina (µL)
Izolovani plazmidi	5
NheI HF	1
SalI HF	1
10xCutSmart pufer	2
MiliQ voda	11
Ukupna zapremina	20

Restrikciona digestija je trajala 1 h na 37 °C, a restrikcioni enzimi suinaktivirani inkubacijom u trajanju od 10 minuta na 80 °C. Dobijeni proizvodi su analizirani agaroznom DNA elektroforezom.

3.4.8 Priprema nasumično mutiranih biblioteka gena za versatilnu peroksidazu

3.4.8.1 Uvođenje mutacija u gen za versatilnu peroksidazu

Mutacije su uvedene u strukturu gena za versatilnu peroksidazu primenom GeneMorph II muthagenesis kita. Na ovaj način umnoženi i mutirani genu su korišćeni kao megaprajmeri za amplifikaciju celog pCTCON2 vektora. Pripremljene su dve biblioteke gena sa različitim stopom mutacija primenom različitih koncentracija templata. Koncentracije templata (VP-pCTCON2) u reakcionim smešama date su u tabeli 21.

Sekvencije prajmera korišćenih pripremu nasumičnih biblioteka gena za versatilnu peroksidazu (5' → 3'):

Tabela 21. Mase VP-pCTCON2 konstrukta u reakcionim smešama

Biblioteka	Koncentracija templata (pg/µL)
Niža stopa mutacija	300
Viša stopa mutacija	50

Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 22, dok je PCR program korišćena za umnožavanje gena dat u tabeli 23.

Forward primer – CGATGCTAGCATGGCTACTTGTGATGACGGTAGA ACAACTGCAAATGCCGC

Reverse primer – CTAGTGGATCCCTCGAGACTACCTGGAAGAGATGTTACAGGACC

Tabela 22. Sastav PCR smeše za uvođenje mutacija u gen za versatilnu peroksidazu

Komponenta	Zapremina (µL)
10x Mutazyme II reakcioni pufer	2,5
dNTP mix (40 mM svaki)	0,5
<i>Forward</i> prajmer (50 µM)	0,5
<i>Reverse</i> prajmer (50 µM)	0,5
Templatna DNA	0,5
Mutazyme II DNA polimeraza (2.5 U/µL)	0,5
MiliQ voda	20
Ukupna zapremina	25

Tabela 23. PCR program za uvođenje mutacija u gen za versatilnu peroksidazu

Korak	Temperatura (°C)	Vreme
Inicijalna denaturacija	95	2 min
Denaturacija	95	30 s
<i>Annealing</i>	65	30 s
Elongacija	72	1 min
Finalna elongacija	72	10 min

30 ciklusa

Po završetku reakcije PCR proizvod je prečišćen korišćenjem kita za prečišćavanje PCR proizvoda po protokolu opisanom u sekciji 4.4.3., izmerena im je koncentracija NanoDrop-om i analizirani su agaroznom DNA elektroforezom.

3.4.8.2 Umnožavanje celog plazmida VP-pCTCON2 primenom mutiranih megaprajmera

Za amplifikaciju celog plazmida VP-pCTCON2 kao megaprajmeri primenjeni su mutirani geni za VP dobiveni GeneMorph II random mutagenesis kitom. Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 24, dok je PCR program korišćena za umnožavanje gena dat u tabeli 25.

Po završetku PCR reakcije templatna DNA je uklonjena dodatkom 1 μL Dpn I enzima i inkubacijom na 37 °C u trajanju od 1 h.

Tabela 24. Sastav PCR smeše za umnožavanje celog plazmida

Komponenta	Zapremina (μL)
Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix	25
Megarajmeri (50 ng/ μL)	5
Templatna DNA (50 ng/ μL)	6
DMSO	1,5
MiliQ voda	12,5
Ukupna zapremina	50

Tabela 25. PCR program za umnožavanje celog plazmida

Korak	Temperatura (°C)	Vreme
Inicijalna denaturacija	95	30 s
Denaturacija	95	10 s
<i>Annealing</i>	61	30 s
Elongacija	72	5 min
Finalna elongacija	72	10 min

35 ciklusa

PCR proizvodi su analizirani agaroznom DNA elektroforezom i korišćeni za transformaciju ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold.

3.4.9 Priprema nasumično mutiranih biblioteka gena za lignin peroksidazu

3.4.9.1 Uvođenje mutacija u gen za lignin peroksidazu

Mutacije su uvedene u strukturu gena za lignin peroksidazu primenom GeneMorph II Mutagenesis kita. Sekvencije primenjenih prajmera date su u prilogu 2. Na ovaj način umnoženi i mutirani genu su korišćeni kao megaprajmeri za amplifikaciju celog pCTCON2 vektora.

Sekvencije prajmera korišćenih za pripremu nasumičnih biblioteka gena za lignin peroksidazu (5' → 3')

Forward primer – GCTAGCGCAACCTGTGCTAATGGTAAG

Reverse primer – GTCGACTTAAGCCTTGTGTGGAGGTATTC

Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 26, dok je PCR program korišćen za umnožavanje gena dat u tabeli 27.

Tabela 26. Sastav PCR smeše za uvođenje mutacija u gen za lignin peroksidazu

Komponenta	Zapremina (μL)
10x Mutazyme II reakcioni pufer	2,5
dNTP mix (40 mM svaki)	0,5
<i>Forward</i> prajmer (50 μM)	0,5
<i>Reverse</i> prajmer (50 μM)	0,5
Templatna DNA (0.25 ng/μL)	0,25
Mutazyme II DNA polimeraza (2.5 U/μL)	0,5
MiliQ voda	20,25
Ukupna zapremina	25

Tabela 27. PCR program za uvođenje mutacija u gen za lignin peroksidazu

Korak	Temperatura (°C)	Vreme
Inicijalna denaturacija	95	2 min
Denaturacija	95	30 s
<i>Annealing</i>	60	30 s
Elongacija	72	1 min
Finalna elongacija	72	10 min

30 ciklusa

Po završetku reakcije PCR proizvod je prečišćen korišćenjem kita za prečišćavanje PCR proizvoda po protokolu opisanom u sekciji 4.4.3., izmerena im je koncentracija NanoDrop-om i analizirani su agaroznom DNA elektroforezom.

4.3.9.2 Umnožavanje celog plazmida LiP-pCTCON2 primenom mutiranih megaprajmera

Za amplifikaciju celog plazmida LiP-pCTCON2 kao megaprajmeri primenjeni su mutirani geni za LiP dobiveni GeneMorph II Random Mutagenesis kitom. Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 28, dok je PCR program korišćena za umnožavanje gena dat u tabeli 29.

Po završetku PCR reakcije templatna DNA je uklonjena dodatkom 1 μ L Dpn I enzima i inkubacijom na 37 °C u trajanju od 1 h.

Tabela 28. Sastav PCR smeše za umnožavanje celog plazmida

Komponenta	Zapremina (μ L)
Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix	25
Megarajmeri (50 ng/ μ L)	5
Templatna DNA (50 ng/ μ L)	6
DMSO	1,5
MiliQ voda	12,5
Ukupna zapremina	50

Tabela 29. PCR program za umnožavanje celog plazmida

Korak	Temperatura (°C)	Vreme
Inicijalna denaturacija	95	30 s
Denaturacija	95	10 s
<i>Annealing</i>	61	30 s
Elongacija	72	5 min
Finalna elongacija	72	10 min

35 ciklusa

Po završetku PCR reakcije templatna DNA je uklonjena dodatkom 1 μ L Dpn I enzima i inkubacijom na 37 °C u trajanju od 1 h.

PCR proizvodi su analizirani agaroznom DNA elektroforezom i korišćeni za transformaciju ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold.

3.4.10 Priprema saturacionih biblioteka gena za versatilnu peroksidazu

Mutacije su uvedene u strukturu gena za versatilnu peroksidazu primenom QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kita. Kao templatna DNA korišćen je prethodno dobiven konstrukt VP-pCTCON2. Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 30, a PCR program u tabeli 31.

Sekvencija prajmera korišćenog za pripremu saturacione biblioteke gena za versatilnu peroksidazu na poziciji A160N (5' → 3')

Forward primer - CTGGTTTTAGTCCTMNMGAAGTTGTATGG

Sekvencija prajmera korišćenog za pripremu saturacione biblioteke gena za versatilnu peroksidazu na poziciji V260N (5' → 3')

Forward primer - CAAAACAGATTCMNMGCAACTATGTCG

Tabela 30. Sastav PCR smeše za uvođenje mutacija u gen za versatilnu peroksidazu

Komponenta	Zapremina (μL)
10x reakcioni pufer	2,5
dNTP mix	0,5
<i>Forward</i> prajmer 1 (50 μM)	0,5
<i>Forward</i> prajmer 2 (50 μM)	0,5
Templatna DNA	0,5
QuikSolution reagens	0,75
MiliQ voda	19,75
Ukupna zapremina	25

Tabela 31. PCR program za uvođenje mutacija u gen za versatilnu peroksidazu

Korak	Temperatura (°C)	Vreme
Inicijalna denaturacija	95	2 min
Denaturacija	95	20 s
<i>Annealing</i>	55	30 s
Elongacija	65	5 min
Finalna elongacija	65	10 min

30 ciklusa

Po završetku PCR reakcije templatna DNA je uklonjena dodatkom 1 μ L Dpn I enzima i inkubacijom na 37 °C u trajanju od 10 minuta. Digestovani PCR proizvodi su korišćeni za transformaciju ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold.

3.4.11 Priprema saturacionih biblioteka gena za lignin peroksidazu

Mutacije su uvedene u strukturu gena za lignin peroksidazu primenom QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kita. Kao templatna DNA korišćen je prethodno dobiven konstrukt LiP-pCTCON2. Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 32, a PCR program u tabeli 33.

Sekvencija prajmera korišćenog za pripremu saturacione biblioteke gena za lignin peroksidazu na poziciji D165 (5' \rightarrow 3')

Forward primer - GCTGGAGAATTTNNGAATTAGAATTGG

Sekvencija prajmera korišćenog za pripremu saturacione biblioteke gena za lignin peroksidazu na poziciji D264 (5' \rightarrow 3')

Forward primer - CAAAGTTGGTAGATNNMTTCAATTCATTTTT

Po završetku PCR reakcije templatna DNA je uklonjena dodatkom 1 μ L Dpn I enzima i inkubacijom na 37 °C u trajanju od 10 minuta. Digestovani PCR proizvodi su korišćeni za transformaciju ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold.

Tabela 32. Sastav PCR smeše za uvođenje mutacija u gen za lignin peroksidazu

Komponenta	Zapremina (μL)
10x reakcioni pufer	2,5
dNTP mix	0,5
<i>Forward</i> prajmer 1 (50 μ M)	0,5
<i>Forward</i> prajmer 2 (50 μ M)	0,5
Templatna DNA	0,5
QuikSolution reagens	0,75
MiliQ voda	19,75
Ukupna zapremina	25

Tabela 33. PCR program za uvođenje mutacija u gen za lignin peroksidazu

Korak	Temperatura (°C)	Vreme	
Inicijalna denaturacija	95	2 min	
Denaturacija	95	20 s	30 ciklusa
<i>Annealing</i>	55	30 s	
Elongacija	65	5 min	
Finalna elongacija	65	10 min	

3.5. Ekspresija lignin i versatilne peroksidaze na površini kvasca *S. cerevisiae* EBY100

3.5.1 Optimizacija uslova ekspresije peroksidaza

Prethodno pripremljene hemijski kompetentne ćelije *S. cerevisiae* EBY100 su transformisane pCTCON2 vektorom i VP-pCTCON2 i LiP-pCTCON2 konstruktima. Nakon 48-časovne inkubacije na YNB-CAA pločama sa 2% (w/v) glukozom pojedinačne ćelije su inokulisane u 20 mL tečnog YNB-CAA medijuma sa 2% (w/v) glukozom i gajene na 28 °C i 160 rpm. Rast ćelija je prekinut kada je optička gustina na 600 nm (OD_{600}) dostigla 3, 4, 5, 8 i 10. Alikvoti ćelija su zatim razblaženi do $OD_{600}=0.8$ YNB-CAA medijumom sa 2% (w/v) galaktozom u finalnoj zapremini od 20 mL. Indukcionom medijumu dodato je 20 μ L 0.5 M rastvora 5-aminolevuleinske kiseline. Ekspresija je trajala 16 h na 28 °C i 160 rpm. Ćelije su prikupljene centrifugiranjem na 11000 g u toku 30 s i 3 puta isprane reakcionim puferima (100 mM Na-tartaratnim puferom pH 3,5 za VP i 100 mM Na-acetatnim puferom pH 4,5 za LiP). Aktivnost VP određena je ABTS esejem, a LiP 2,4-DCP esejem (sekcije 4,5.1 i 4,5.2.).

Za optimizaciju vremena ekspresije ćelije koje su dostigle $OD_{600}=3,5$ razblažene su indukcionim medijumom do $OD_{600}=0,8$, dodata je 5-aminolevulinska kiselina i ćelije su gajene kao što je prethodno opisano. Alikvoti zapremine 1 mL su uzeti u momentu indukcije, na svaka 4 h u toku 48 h fermentacije. Za ispitivanje uticaja dodatka 5-aminolevuleinske kiseline na ekspresiju peroksidaza urađena je i fermentacija u istim

uslovima bez dodatka iste u indukcionu medijumu. Ćelije transformisane pCTCON2 vektorom i tretirane na isti naĉin korišćene su kao negativna kontrola.

U svim daljim eksperimentima primenjen je sledeći postupak za ekspresiju enzima: Pojedinaĉne kolonije *S. cerevisiae* EBY100 prethodno transformisane odgovarajućim konstruktom inokulisane su u 20 mL YNB-CAA medijuma sa 2% (w/v) glukozom i gajene su oko 16 h dok OD₆₀₀ nije dostigla 3-3,5 na 28 °C, 160 rpm. Alikvoti ćelija su prebaĉeni u indukcionu medijumu (YNB-CAA medijumu sa 2% (w/v) galaktozom) tako da je finalni OD₆₀₀=0.8. U indukcionu medijumu dodato je 20 µL 0,5 M rastvora 5-aminolevuleinske kiseline i ćelije su gajene 16 h na 28 °C i 160 rpm.

3.5.2 Ekspresija peroksidaza u mikrotitar ploĉama

Ekspresija peroksidaza u mikrotitar ploĉama raĉena je u cilju pretrage biblioteka gena. Pojedinaĉne kolonije sa YNB-CAA ploĉa sa 2% (w/v) glukozom inokulisane su u 100 µL istog medijuma u pojedinaĉnim bunarima mikrotitar ploĉe sa 96 bunara i gajene 16 h na 25 °C, 500 rpm i 80% vlaŹnosti. Po 5 µL ćelija prebaĉeno i u novu mikrotitar ploĉu sa po 30 µL istog medijuma i gajene još 8 h u istim uslovima. Ekspresija peroksidaza indukovana je dodatkom 100 µL YNB-CAA medijuma sa 2% (w/v) galaktozom i 50 µg/mL hloramfenikola, dok je 5-aminolevulinska kiselina dodata u finalnoj koncentraciji o 0,5 mM. Ekspresija je trajala 16 h pri istim uslovima.

Svaka mikrotitar ploĉa je sadržala 90 bunara sa mutantima peroksidaza, 3 bunara sa divljim tipom peroksidaze i 3 bunara sa ćelijama transformisanim praznim pCTCON2 vektorom.

3.6. Odreĉivanje aktivnosti versatilne i lignin peroksidaze

3.6.1 Odreĉivanje aktivnosti versatilne peroksidaze ABTS esejem

Aktivnost versatilne peroksidaze odreĉivana je ABTS esejem u mikrotitar ploĉama. Pre odreĉivanja aktivnosti sve ćelije su isprane 3 puta 100 mM Na-tartaratnim puferom pH 3,5. U 150 µL 100 mM Na-tartaratnog pufera pH 3,5 dodato je 20 µL uzorka i 20 µL 20 mM rastvora ABTS-a. Reakcija je indukovana dodatkom 10 µL 100 mM rastvora H₂O₂.

Promena apsorbance je praćena na 405 nm ($\epsilon_{405} = 36,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Za svako merenje aktivnost je standardizovana za $\text{OD}_{600}=1$.

3.6.2 Određivanje aktivnosti lignin peroksidaze 2,4-DCP esejem

Aktivnost lignin peroksidaze određivana je 2,4-DCP esejem u mikrotitar ploćama. Pre određivanja aktivnosti sve ćelije su isprane 3 puta 100 mM Na-actatnim puferom pH 4,5. U 110 μL 100 mM Na-acetatnog pufera pH 4,5 dodato je 20 μL uzorka, 20 μL 2 mM rastvora i 40 μL 400 mM rastvora 4-aminoantipirena. Reakcija je indukovana dodatkom 10 μL 100 mM rastvora H_2O_2 . Promena apsorbance je praćena na 540 nm ($\epsilon_{540} = 13 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Za svako merenje aktivnost je standardizovana za $\text{OD}_{600}=1$.

3.7. Pretraga nasumićnih bibiloteka gena versatilne i lignin peroksidaze

3.7.1 Sinteza tiramid-fluoresceina

Fluorescentni supstrat za FACS sintetisan je kao što je prethodno opisano (Hopman et al., 1998), sa manjim promenama. Pomešani su 20 mM rastvor tiramin-HCl-a, 25 mM rastvor trietilenamina i 20 nM rastvor N-hidroksisukcinimid-fluoresceina. Sve hemikalije su rastvorene u dimetil-formamid-u. Smeša je inkubirana 3 h na 4 °C. Sintetisani fluorescein-tiramid (TyrF) je razblažen etanolom do finalne koncentracije od 2 mM i skladišten na 4 °C do upotrebe.

3.7.2 Esej sa tiramid-fluoresceinom

Nakon 16 h ekspresije peroksidaza na površini kvasca ćelije su isprane 100 mM Na-acetatnim puferom pH 4,5 i razblažene do finalne koncentracije of 10^8 ćelija/mL (pri ćemu se $\text{OD}_{600} = 1$ odnosi na 2×10^7 ćelija/mL). Ćelije su isprane istim puferom sa 0,1% (w/v) BSA i ruspendovane u istom puferu sa 0,1 %BSA. Reakcije su raćene u zapremini od 200 μL sa 2×10^6 ćelija, 20 μM tiramid-fluoresceinom i 1 mM H_2O_2 . Nakon 1 minuta reakcije su stopirane dodatkom 1 mL 0,5% (w/v) BSA i 10 mM askorbinske kiseline u 10 x

koncentrovanom PBS-u, a zatim i 3 puta PBS-om sa 0,1% (w/v) BSA i finalno resuspendovane u ovom puferu (Lipovesk et al., 2007).

3.7.3 Sortiranje referentnih biblioteka

Provera efikasnosti sortiranja ćelija nakon reakcije sa tiramid-fluoresceinom urađena je sortiranjem referentnih biblioteka. Referentne biblioteke versatilne peroksidaze pripremljene su mešanjem 1%, 5% i 30% ćelija koje eksprimiraju versatilnu peroksidazu sa 99%, 95% i 70% ćelija koje su transformisane praznim pCTCON2 vektorom i tretirane na isti način kao i ćelje koje eksprimiraju enzim, tim redom. Referentne biblioteke lignin peroksidaze pripremljene su mešanjem 0.5%, 1% i 5% ćelija koje eksprimiraju lignin peroksidazu sa 99,5%, 99% i 95% ćelija koje su transformisane praznim pCTCON2 vektorom i tretirane na isti način kao i ćelije koje eksprimiraju enzim, tim redom. Kao negativna kontrola korišćene su ćelije transformisane praznim pCTCON2 vektorom. Nakon mešanja ćelija urađena je reakcija sa tiramid-fluoresceinom kao što je prethodno opisano.

3.7.4 Sortiranje nasumičnih biblioteka gena u cilju povećanja oksidativne stabilnosti

U cilju unapređenja oksidativne stabilnosti 2×10^6 ćelija sa eksprimiranim mutantima lignin ili versatilne peroksidaze inkubirano je 20 minuta u 30 mM rastvoru H_2O_2 u 100 mM Na-acetatnom puferu pH 4,5. Po završetku inkubacije ćelije su isprane 3 puta 100 mM Na-acetatnim puferom pH 4,5 sa 0,1% (w/v) BSA i finalno resuspendovane u 200 μ L istog pufera. Na ovaj način pripremljene ćelije korišćene su za reakciju sa tiramid-fluoresceinom kao što je prethodno opisano.

3.7.5 Protočna citometrija

Ćelije kvasaca su analizirane BD FACS Influx protočnim citometrom (BD Biosciences, San Jose, CA). Brzina analize bila je 1000 – 5000 događaja u sekundi, a sortiranja 10 – 200 događaja u sekundi. Za detekciju zelene fluorescencije korišćen je laser sa eksitacijom na 488 nm. Emisija je detektovana korišćenjem filtera od 530 nm. Širina blende podešena je na 530/540. Ćelije su prikazane na fluorescencija/forward scatter graficima. Za

referentne biblioteke sortirano je po 400 ćelija u pojedinačnom modu na YNB-CAA ploče sa 2% glukozom i 50 µg/mL hloramfenikola. Kod nasumičnih biblioteka gena sortirano je 10^4 ćelija na iste ploče i u 20 mL istog tečnog medijuma. Ćelije sortirane u tečni medijum korišćene su za drugu rundu sortiranja.

3.7.6 Provera uspešnosti sortiranja i selekcija najstabilnijih mutanata

Pojedinačne kolonije ćelija sortiranih na YNB-CAA ploče zasejane su u pojedinačne bunare mikrotitar ploče i gajene kao što je prethodno opisano. Za proveru uspešnosti sortiranja referentnih biblioteka aktivnost je određena ABTS esejem za versatilnu peroksidazu i 2,4-DCP esejem za lignin peroksidazu. Za proveru uspešnosti sortiranja nasumičnih biblioteka gena u cilju povećanja oksidativne stabilnosti mutanata aktivnost je određena na isti način i nakon 20 minuta inkubacije u 30 mM H₂O₂. Radi standardizacije u svaku mikrotitar ploču uključena su 3 bunarića sa ćelija transformisanim pCTCON2 vektorom i ćelija koje eksprimiraju divlje tipove enzima. Ćelije koje su imale 10 ili više od 10 puta manju aktivnost od divljeg tipa označene su kao neaktivne. Izračunata je rezidualna aktivnost ćelija nakon inkubacije u H₂O₂ i standardizovana na OD₆₀₀=1. Ćelije čija je rezidualna aktivnost minus dve standardne devijacije bila veća od rezidualne aktivnosti divljeg tipa plus dve standardne devijacije označene su kao ćelije sa većom oksidativnom stabilnošću. Ćelije čija je rezidualna aktivnost plus dve standardne devijacije bila manja od rezidualne aktivnosti divljeg tipa minus dve standardne devijacije označene su kao ćelije sa manjom oksidativnom stabilnošću. Sve ostale ćelije označene su kao ćelije sa istom oksidativnom stabilnošću kao divlji tip.

3.8. Pretraga saturacionih biblioteka gena

Nakon ekspresije enzima na površini kvasca u pojedinačnim bunarima mikrotitar ploče alikvoti od 20 µL ćelija prebačeni su u novu mikrotitar ploču sa 96 bunara koja je sadržala 130 µL 100 mM Na-acetatnog pufera pH 3,5 po bunaru i izmerena je optička gustina na 600 nm. Nakon merenja optičke gustine u svaki bunar dodato je po 10 µL 10 mM H₂O₂ i 40 µL 0,1 mM rastvora sintetičkih boja – Evans blue, Amido black 10B i Guinea green.

Procenat degradacije boje određen ne merenjem aporrbance pre i posle inkubacije na 620 nm i standardizovan po optičkoj gustini ćelija.

3.9. Karakterizacija izabranih mutanata

3.9.1 Izolovanje plazmida iz kvasaca i sekvencioniranje

Nakon selekcije mutanata enzima kolonije kvasca koje ih ekspimiraju zasejane su u po 2 mL YNB-CAA medijuma sa 2% (w/v) glukozom i 50 µg/mL hloramfenikola i gajene 24 h na 28 °C i 200 rpm. Po završetku umnožavanja ćelija iste su prikupljene centrifugiranjem (2000 g, 5 min) i resuspendovane u 500 µL pufera za lizu (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA i 0.5% (v/v) 2-merkaptotanol) i dodato je 50 U litikaze iz *Arthrobacter luteus* (Singh, Weil, 2002). Suspenzija je inkubirana 2 h na 30 °C. Nakon tretmana litikazom plazmidi su izolovani primenom kita za izolovanje plazmida (Marcherey-Nagel) kao što je prethodno navedeno za izolovanje plazmida iz bakterija.

Izolovani plazmidi su korišćeni za transformaciju *E. coli* XL10Gold bakterija. Pojedinačne kolonije *E. coli* XL10Gold su zasejane u po 2 mL LB-amp medijuma i gajene 16h na 37 °C i 200 rpm. Ćelije su prikupljene centrifugiranjem (1 min, 11000 g) i iz njih su izolovani plazmidi primenom Marcherey-Nagel kita za izolovanje plazmida, kao što je prethodno opisano. Na ovaj način dobiveni plazmidi sa mutiranim genima su korišćeni za sekvencioniranje i retransformaciju *S. cerevisiae* EBY100 ćelija.

3.9.2 Priprema ćelijskih zidova obloženih peroksidazama

Nakon ekspresije enzima na površini kvasca kao što je prethodno opisano ćelije su prikupljene centrifugiranjem (5 min, 2000 g) i tri puta isprane destilovanom vodom. Nakon ispitivanja ćelije su resuspendovane u 3 mL 3% (v/v) smeše toluola i destilovane vode i suspenzija je inkubirana na 25 °C i 200 rpm. Liza ćelija kvasca je praćena u toku 8 h. Pre početka lize i nakon svakih sat vremena uzeti su alikvoti zapremine 1 mL i centrifugirani 1 min na 11000g. Aktivnost u supernatantu i talogu je određena primenom 2,4-DCP eseja u mikrotitar pločama (Rye et al., 2008) za ćelije koje ekspimiraju lignin peroksidazu i primenom ABTS eseja u mikrotitar pločama za ćelije koje ekspimiraju versatilnu

peroksidazu, kao što je prethodno opisano. Koncentracija enzima u supernatantu je praćena primenom Bradfordovog reagensa. Za sve dalje eksperimente liza ćelija kvasca je stopirana nakon 5 h i dobiveni talozi ćelijskih zidova su ispirani do potpunog uklanjanja toluola (10 do 20 puta).

3.9.3 Određivanje oksidativne stabilnosti mutanata

Prethodno pripremljeni ćelijski zidovi obloženi lignin ili versatilnom peroksidazom ili njenim selektovanim mutantima inkubirani su u 30 mM rastvoru H₂O₂ u toku 1h. Alikvoti su uzeti nakon 5, 10, 15, 30, 45 i 60 minuta inkubacije i razblaženi tako da je OD₆₀₀ = 1. Aktivnost lignin peroksidaze određena je primenom 2,4-DCP esejem, a aktivnost versatilne peroksidaze ABTS esejem, kao što je prethodno opisanom.

3.9.4 Degradacija boja

Suspenzija ćelijskih zidova obloženih lignin ili versatilnom peroksidazom (200 µL) u 100 mM Na-tartaratnom puferu pH 3,5 pomešane su sa 100 µL 5 mM H₂O₂ i 100 µL 0,5 ili 1 mM rastvora različitih boja (u zavisnosti od eksperimenta). Kod lignin peroksidaze dodato je 100 µL 10 mM rastvora veratril alkohola (VA) i 500 µL 100 mM Na-tartaratnog pufera pH 3,5, dok je kod versatilne peroksidaze dodato samo 600 µL 100 mM Na-tartaratnog pufera pH 3,5. Degradacija boja praćena je merenjem apsorbance na 620 nm pre degradacije i nakon 8 ili 12 h, u zavisnosti od eksperimenta. Ćelijski zidovi pripremljeni na isti način od ćelija transformisanih praznim pCTCON2 vektorom korišćeni su kao negativna kontrola.

Kod višestrukih ciklusa degradacije boja nakon svakog ciklusa od 8 h ili 12 h ćelijski zidovi su ispirani 3 puta sa po 2 mL 100 mM Na-tartaratnog pufera pH 3,5 i ponovo resuspendovani u svežoj reakcionoj smeši. Ukupno je rađeno 10 ciklusa.

3.9.5 Izolovanje i prečišćavanje peroksidaza u himernom obliku sa Aga2 proteinom

Himerni proteini Aga2-VP i Aga2-LiP („wild-type“ enzimi i selektovani mutanti) ekstrahovani su sa površine ćelija kvasca i prečišćeni. Ćelije koje eksprimiraju enzime iz po 500 mL kulture su prikupljene centrifugiranjem (5 min, 2000 g), isprane 100 mM natrijum-acetatnim puferom pH 5,5 i resuspendovane u 50 mL istog pufera sa dodatkom 2-merkaptetoetanolu u finalnoj koncentraciji od 1 mM i inkubirane na 4 °C 4 h (Blažić et al., 2013). Supernatant nakon centrifugiranja (5 min, 2000 g) je skoncentrovan primenom Vivaspin ultrafiltracionih kaseti (Sartorius-Stedim, Göttingen, Germany) sa molekulskim „cutoff“-om od 10 kDa i dijalizovan naspram 20 mM Na-fosfatnog pufera pH 7,4.

Himerni proteini su prečišćeni primenom Vivapure Q Mini H mini spin kolona (Sartorius-Stedim, Göttingen, Germany) prema uputstvu proizvođača. Proteini su eluirani step elucijom 100, 200, 300 i 400 mM rastvorom NaCl u istom puferu. U svim frakcijama određena je aktivnost lignin ili versatilne peroksidaze primenom 2,4-DCP ili ABTS eseja u mikrotitar pločama (kao što je prethodno opisano).

Frakcije koje su pokazivale aktivnost (eluirane 300 mM rastvorom NaCl-a u 20 mM Na-fosfatnom puferu pH 7,4) su spojene. Dobiveni himerni proteini su analizirani SDS-PAGE i zimografijom i korišćeni za dalju karakterizaciju.

3.9.6 Proteinska elektroforeza i zimogram

Sastav gelova za SDS-PAGE dat je u tabeli 34. Gelovi za nativnu elektroforezu pripremljeni su na isti način, samo je umesto SDS-a dodata ista zapremina dejonizovane vode.

Tabela 34. Sastav gelova za elektroforezu.

Kopponenta	12% gel	4% gel
Smeša akrilamida i bisakrilamida	4 mL	0,5 mL
1,5 M TRIS pufer pH 8,8	2,5 mL	/
0,5 M TRIS pufer pH 6,8	/	0,94 mL
Destilovana voda	3,33 mL	2,25 mL
10% (w/v) SDS	100 μ L	38 μ L
TEMED	4 μ L	2 μ L
10 % (w/v) APS	75 μ L	25 μ L

Uzorci za SDS-PAGE pripremljeni su mešanjem 10 μ L 5x pufera za uzorke (60 mM TRIS pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 14,4 mM 2-merkaptotanol, 0,02% bromfenol plavo) sa 40 μ L uzorka, nakon čega su inkubirani 10 minuta na 98°C. Elektroforeza je rađena pod naponom od 80 V dok uzorci iz koncentrujućeg gela nisu prešli u razdvajajući gel nakon čega je elektroforeza rađena pod naponom od 150 V. Korišćen je pufer za elektroforezu (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3). Po završetku elektroforeze, gel je fiksiran i obojen rastvorom boje CBB G – 250 (0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina), a obezbojen 7% rastvorom sirćetne kiseline do pojave proteinskih traka na gelu. Masa proteina poređena je sa masom proteinskih standarda (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Uzorci za nativnu elektroforezu pripremljeni su mešanjem 10 μ L 5x pufera za uzorke uzorka (60 mM TRIS pH 6,8, 10% glicerol, 0,02% bromfenol plavo) sa 40 μ L uzorka, bez zagrevanja. Nativna elektroforeza je rađena pri istim uslovima kao i SDS PAGE samo što pufer za elektroforezu nije sadržao SDS. Po završetku elektroforeze, polovina gela je fiksirana i obojena rastvorom boje CBB G – 250 (0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina), a obezbojena 7% rastvorom sirćetne kiseline do pojave proteinskih traka na gelu.

Druga polovina gela je inkubirana u 100 mM Na-tartaratnom puferu pH 3.5 sa gvajakolom i H₂O₂ u finalnim koncentracijama od 9 mM i 0,5 mM do pojave traka.

3.9.7 Određivanje kinetičkih parametara

Kinetičke konstante za H₂O₂ su procenjene merenjem enzimske aktivnosti u različitim koncentracijama H₂O₂ (10-800 μM) u 100 mM Na-tartaratnom puferu pH 3,5 za versatilnu peroksidazu i 100 mM Na-acetatnom puferu pH 4,5 za lignin peroksidazu u prisustvu ABTS-a kao drugog supstrata za versatilnu peroksidazu ili 2,4-DCP i 4-AAP za lignin peroksidazu. Kinetičke konstante enzima za različite tekstilne boje određene su merenjem aktivnosti peroksidaza u različitim koncentracijama rastvora boja (10-100 μM) u 100 mM Na-tartaratnom puferu sa 0,5 mM H₂O₂.

U toku proračuna kinetičkih podataka uzeta je u obzir stehiometrija reakcije (npr 1 molekul H₂O₂ oksiduje 2 molekula ABTS-a) (Garcia-Ruíz et al. 2008). Koncentracija himernih proteina određena je merenjem apsorbance na 280 nm. Ekstincioni koeficijenti su izračunati primenom ProtParam softvera i iznosili su 17585 M⁻¹cm⁻¹ za versatilnu peroksidazu i 24825 M⁻¹cm⁻¹ za lignin peroksidazu.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Ekspresija lignin i versatilne peroksidaze na površini ćelija *S. cerevisiae* EBY100

Primena metoda za visokoefikasnu pretragu biokatalizatora podrazumeva i razvoj odgovarajućeg ekspresionog sistema koji će pre svega omogućiti očuvanje veze između genotipa i fenotipa. Na ovaj način unapređena karakteristika enzima može se pratiti unazad do sekvencije koja je dovela do željenog poboljšanja (Rieseberg et al., 2001, Kondo i Ueda, 2004).

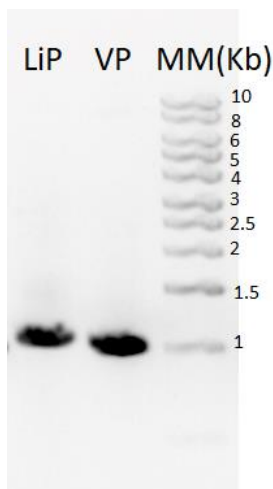
Jedan od ekspresionih sistema koji omogućava očuvanje veze između genotipa i fenotipa prilikom pretrage biblioteka gena jeste ekspresija proteina na površini kvasca *S. cerevisiae*. Zadržavanje proteina od interesa vezanog za površinu ćelije omogućeno je insercijom ciljanog gena iza gena za Aga2 protein u pCTCON2 ekspresionom vektoru. Po ekspresiji himernog proteina dolazi do vezivanja Aga2 proteina disulfidnim mostovima za Aga1 protein koji se nalazi ukotvljen u ćelijski zid kvasca (Boder, Wittrup, 1997, 2000).

Pored pomenute prednosti ovog tipa ekspresije rekombinantnih proteina ova ekspresiona platforma omogućava i *in situ* imobilizaciju enzima koja može značajno unaprediti stabilnost enzima i omogućiti njegovu višekratnu primenu (Boder, Wittrup, 2000; Dwevedi et al., 2012; Datta et al., 2013).

4.1.2 Kloniranje lignin i versatilne peroksidaze u pCTCON2 ekspresioni vektor

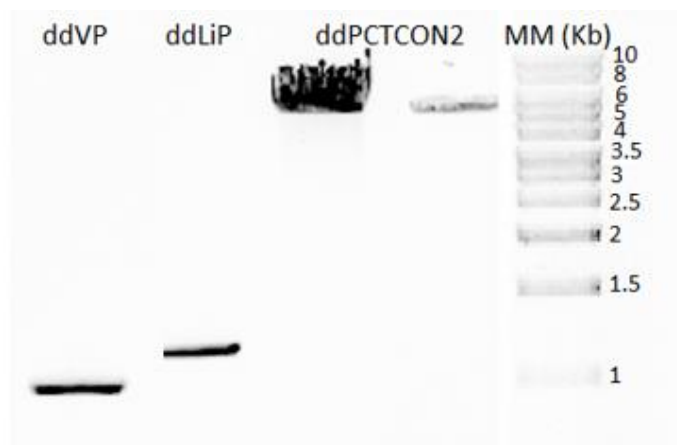
Kako bi se omogućila ekspresija lignin i versatilne peroksidaze na površini kvasca sintetički geni za lignin peroksidazu H8 iz *Phanerocheate chrysosporium* i za versatilnu peroksidazu iz *Pleurotus eryngii* (Prilog 1) umoženi su PCR-om primenom odgovarajućih gen-specifičnih prajmera (Prilog 2). Po završetku umnožavanja gena isti su prečišćeni i analizirani agaroznom DNA elektroforezom (slika 21).

Kao što je prikazano na slici 21 umnožavanjem gena dobivene su pojedinačne trake na agaroznoj DNA elektroforezi. Prva traka dobivena umnožavanjem gena za lignin peroksidazu po molekularnoj masi odgovara masi sintetičkog gena (1.1 Kb). Isto to važi i za gen za versatilnu preoksidazu gde je traka locirana na masi od približno 1 Kb.



Slika 21. Agarozna DNA elektroforeza PCR-om umnoženih gena za lignin i versatilnu peroksidazu.

Na osnovu agaroznog gela zaključeno je da su oba gena uspešno umnožena i pristupljeno je dvostrukoj digestiji gena i vektora primenom NheI i Sall restrikcionih enzima. Po završetku dvosturke digestije vektor je defosforilisan primenom alkalne fosfataze. Dvostruko digestovani geni i defosforilisan vektor (pCTCON2) su prečišćeni i analizirani agaroznom DNA elektroforezom (slika 21).

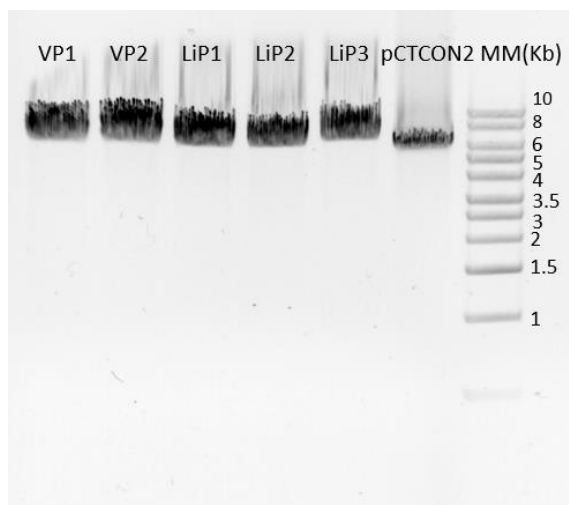


Slika 22. Agarozna DNA elektroforeza dvosturko digestovanih gena za versatilnu i lignin peroskidazu i digestovanog i defosforilisanog vektora pCTCON2.

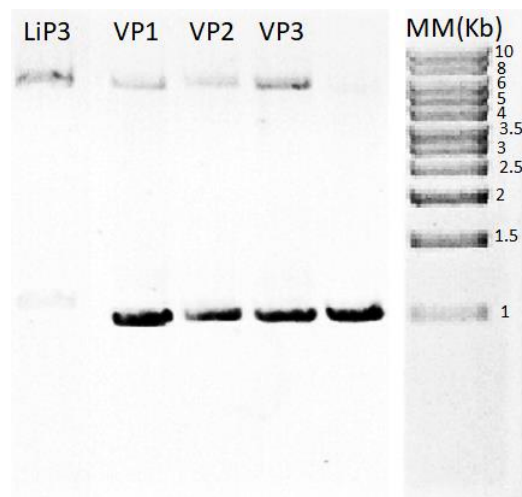
Kako se na elektroforegramu mogu uočiti pojedinačne trake na masama odgovarajućim za dvostruko digestovane gene i vektor (6.4 Kb) pristupljeno je ligaciji dobivenih proizvoda i transformaciji *E. coli* XL10Gold kompetentnih ćelija.

Kako bi se proverila uspešnost kloniranja po 5 kolonija *E. coli* XL10Gold zasejano je u tečni medijum za izolovanje plazmida. Izolovani plazmidi su restrikovani primenom SalI restrikcionog enzima. Po završetku restrikcije urađena je agarozna DNA elektroforeza, pri čemu je u poslednji bunar nanet uzorak praznog, na isti način restrikovanog pCTCON2 vektora (slika 23).

Sa slike 23 može se uočiti da je masa plazmida izolovanih iz kolonija VP1 i 2 i LiP3 nešto veća od mase praznog pCTCON2 vektora. Međutim, razlika u masi je mala i ne može se sa sigurnošću tvrditi da ove tri kolonije sadrže insertovane gene plazmidi su podvrgnuti restrikciji sa 2 restrikciona enzima prethodno korišćena i za kloniranje gena, NheI i SalI (slika 24).



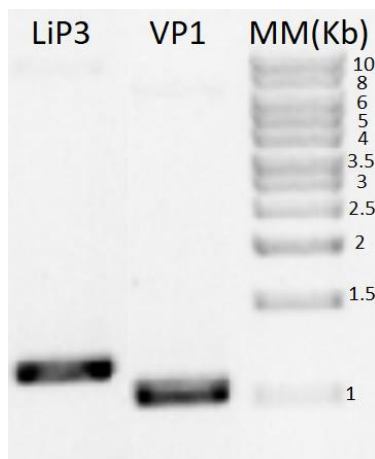
Slika 23. Agarozna DNA elektroforeza linearizovanih plazmida izolovanih iz ćelija *E. coli* XL10Gold prethodno transformisanih VP-pCTCON2 ili LiP-pCTCON2 ligacionim smešama.



Slika 24. Provera kloniranja lignin i versatilne peroksidaze u pCTCON2 ekspresioni vektor nakon dvostruke digestije plazmida

Na elektroforegramu u uzorku LiP3, plazmidima izolovanih iz treće kolonije *E. coli* XL10Gold transformisanih LiP-pCTCON2 ligacionom smešom jasno se mogu uočiti dve trake različite molekulske mase. Prva traka na većoj molekulskoj masi nalazi se malo iznad molekuskog markera od 6 Kb što odgovara masi praznog, linearizovanog pCTCON2 vektora. Druga traka nalazi se nešto iznad molekuskog markera mase 1 Kb i odgovara po masi genu za lignin peroksidazu. Isti je slučaj sa kolonijama VP 1-3 plazmidima, plazmidima izolovanih iz *E. coli* XL10Gold transformisanih VP-pCTCON2 ligacionom smešom. U ovom slučaju druga traka je nešto niže a elektroforegramu i nalazi se u visini molekuskog markera od 1Kb, što odgovara masi gena za versatilnu peroksidazu. U poslednji bunar na elektroforegramu pre molekulskih markera nanešen je PCR-om umnožen gen za versatilnu peroksidazu prethodno korišćen za kloniranje u pCTCON2 vektor. Jasno se vidi da su mase traka iz dvostruko digestovanih plazmida vrlo bliske masi PCR-om dobivenog gena. Kako se na elektroforegramu (slika 24) jasno može uočiti prisustvo 2 trake u svakom uzorku koji odgovaraju po masi praznom pCTCON2 vektoru i genima za lignin i versatilnu peroksidazu može se zaključiti da je kloniranje ovih gena u pCTCON2 vektor bilo uspešno.

Kao finalna provera kloniranja urađen je PCR sa plazmidima izolovanih iz kolonija LiP3 i VP1 kao templatima i primenom gen specifičnih prajmera. Po završetku umnožavanja gena urađena je agarozna DNA elektroforeza (slika 25).



Slika 25. DNA elektroforeza za PCR proveru kloniranja lignin i versatilne peroksidaze u pCTCON2 vektor

Na elektroforegramu prikazanom na slici 25 jasno se mogu uočiti pojedinačne trake koje odgovaraju po masi genima za lignin peroksidazu (LiP3-bunar 1) i versatilnu peroksidazu (VP1-bunar 2). Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je kloniranje gena za lignin i versatilnu peroksidazu bilo uspešno.

Izolovani i prečišćeni plazmidi poslani su na sekvencioniranje koje je potvrdilo uspešnost uvođenja celih, nemutiranih sekvencija gena za lignin i versatilnu peroksidazu u pCTCON2 ekspresioni vektor (prilog 1). Isti plazmidi su korišćeni u daljim eksperimentima za retransformaciju *E. coli* XL10Gold, radi umnožavanja i skladištenja plazmida i transformaciju *S. cerevisiae* EBY100 ćelija radi ekspresije enzima na njihovoj površini.

4.1.3 Ekspresija lignin i versatilne peroksidaze na površini ćelija kvasca *S. cerevisiae* EBY100

Ekspresija ligninolitičkih peroksidaze predstavlja jedan od većih izazova u radu. Prisustvo hema kao prostetične grupe i sama struktura ovih enzima dovode do formiranja inkluzionih

tela u *E. coli* i nemogućnosti dobijanja isplative količine solubilnog proteina. Trenutno se najveća količina ligninolitičkih peroksidaza za istraživačke svrhe proizvodi upravo u *E. coli* pri čemu se pristupa renaturaciji enzima iz inkluzionih tela u prisustvu hema i glutaciona (Ruiz-Dueñas et al., 1999).

Međutim, za potrebe pretrage izuzetno velikih biblioteka gena primenom visokoefikasnih metoda pretrage i selekciju najboljih mutanata enzima, ekspresija enzima koja podrazumeva renaturaciju istih i onemogućava očuvanje veze između genotipa i fenotipa nije pogodna.

Lignin peroksidaze H2 iz *P. chrysosporium* uspešno je eksprimirana na površini ćelija kvasca i primenjena za pretragu manjih biblioteka mutanata u mikrotitar pločama sa 96 bunarića (Rye et al., 2008). Međutim, izoforma H8 i ni jedna izoforma versatilne peroksidaze nisu eksprimirane na ovaj način.

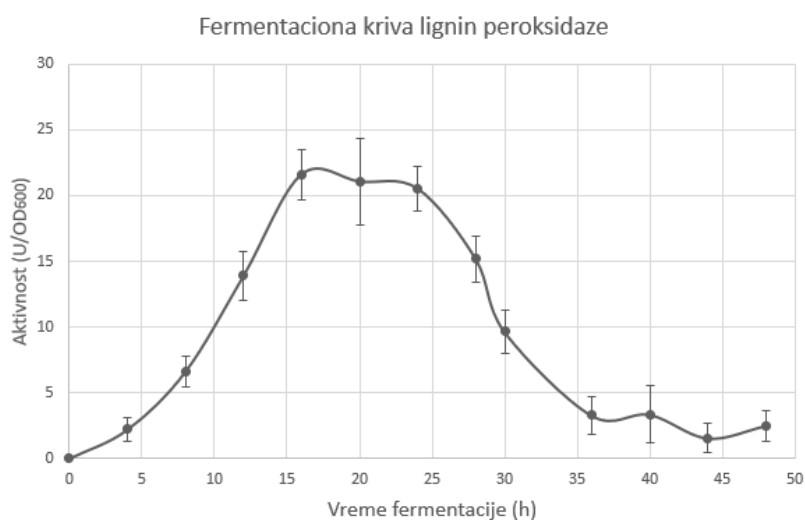
Kako bi se omogućila ekspresija ligninolitičkih peroksidaza na površini kvasca *S. cerevisiae* EBY100 prethodno pripremljene kompetentne ćelije transformisane su sekvencioniranim VP-pCTCON2 i LiP-pCTCON2 konstruktima. Nakon transformacije pojedinačne kolonije inokulisane su u po 20 mL tečnog YNB-CAA medijuma sa dodatkom glukoze za rast ćelija i hloramfenikola za srečavanje kontaminacije. Ćelije su gajene na 28 °C i 200 rpm.

Za optimizaciju vremena fermentacije rast ćelija je zaustavljen kada je OD₆₀₀ vrednost iznosila oko 3.5 i ćelije su dodatkom indukcionog medijuma – YNB-CAA medijuma sa galaktozom za indukciju ekspresije i 5-aminolevuleinskom kiselinom kao prekursorom za sintezu molekula hema razblažene tako da je vrednost OD₆₀₀ iznosila 0,8 i gajene na 28 °C u toku 48 h. Na početku fermentacije i na svaka 4 h uzeti su alikvoti ćelija koji bi trebale da ekspimiraju lignin ili versatilnu peroksidazu, isprane od medijuma primenom reakcionog pufera i određena je aktivnost enzima.

Aktivnost lignin peroksidaze određena je primenom 2,4-DCP eseja, a aktivnost versatilne peroksidaze primenom ABTS eseja u mikrotitar pločama. Ćelije kvasca prethodno

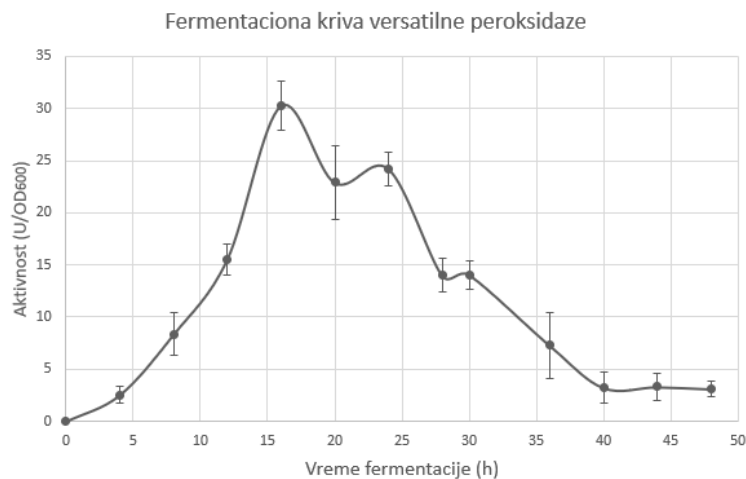
transformisane praznim pCTCON2 eksresionim vektorom i tretirane na isti način korišćene su kao negativna kontrola.

Na slici 26 prikazana je fermentaciona kriva lignin peroksidaze, odnosno promena aktivnosti enzima standardizovane po $OD_{600}=1$ u toku 48 h od momenta indukcije enzima. Vidi se da je aktivnost lignin peroksidaze detektovana već nakon 4 h i da raste u vremenu do 16 h. Aktivnost izmerena nakon 20 i 24 h fermentacije vrlo je slična vrednosti nakon 16 h, ali daljim tokom vremena aktivnost lignin peroksidaze značajno opada da bi nakon 36 h imala istu vrednost kao aktivnost nakon 4 h fermentacije.



Slika 26. Fermentaciona kriva za ekspresiju lignin peroksidaze na površini kvasca.

Fermentaciona kriva versatilne peroksidaze (slika 27) nešto se razlikuje od krive za lignin peroksidazu. Aktivnost se i u ovom slučaju može detektovati od 4 h fermentacije i dostiže maksimum nakon 16 h fermentacije. Za razliku od lignin peroksidaze aktivnost već nakon 20 h kreće da opada. Razlika u izmerenoj aktivnosti enzima nakon 20 i 24 h fermentacije nije statistički značajna, ali dalje u vremenu opada isto kao kod lignin peroksidaze.



Slika 27. Fermentaciona kriva za ekspresiju versatilne peroksidaze na površini kvasca.

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da se aktivnost oba enzima značajno povećava do 16 h fermentacije i da nakon 24 h kreće drastično da opada, verovatno usled utroška hranljivih komponenti medijuma. Za sve dalje eksperimente fermentacija je prekidana nakon 16 h od dodatka indukcionog medijuma za oba enzima.

Kako bi se optimizovali uslovi fermentacije rađena je i indukcija ekspresije u različitim vremenskim trenucima, odnosno ćelije su gajene u medijumu sa glukozom do različitih optičkih gusitna (tabela 35). Kao što se može jasno uočiti iz tabele 36 optička gustina ćelija u momentu indukcije imala je veoma veliki uticaj na ekspresiju enzima. Indukcija ekspresije pri nižim vrednostima OD₆₀₀ (3-4) rezultovala je u i do 10 puta većoj aktivnosti od ekspresije pri vrednosti 5. Pokazano je da je ekspresija versatilne peroksidaze više zavisna od fiziološkog stanja ćelija koje reflektuje upravo optička gustina nego lignin peroksidaza.

Kod versatilne peroksidaze do drastičnog pada aktivnosti dolazi već pri vrednosti 5 za optičku gustinu ćelija merenu na 600 nm. Najveća aktivnost detektovana je pri indukciji na najnižoj vrednosti za OD₆₀₀ (25,64 U/OD₆₀₀), dok je aktivnost opala na svega 5,31 U/OD₆₀₀, odnosno na 20,7% od najviše detektovane aktivnosti. Pri OD₆₀₀ vrednostima od 8 i 10 aktivnost versatilne peroksidaze nije bila detektovana. U slučaju lignin peroksidaze

najveća detektovana aktivnost od 24,13 U/OD₆₀₀ zabeležena kada je OD₆₀₀ vrednost iznosila 4. Iako je aktivnost kada je OD₆₀₀ vrednost iznosila 4 bila 16,7% niža zbog nešto viših standardnih devijacija ova razlika se ne može smatrati statistički značajnom. Za razliku od versatilne peroksidaze kod lignin peroksidaze aktivnost pri indukciji na OD₆₀₀ vrednosti 5 pala je za samo 36,5%, ali ni aktivnost lignin peroksidaze nije detektovana pri indukcijij na većim vrednostima optičke gustine (8 i 10).

Važno je napomenuti da je u ovom slučaju aktivnost merena nakon 16 h od indukcije. Moguće je da bi se ćelije indukovane na višim vrednostima optičke gustine regenerisale nakon dužeg vremenskog perioda u svežem medijumu i da bi došlo do ekspresije enzima na njihovoj površini. Kako je najveća aktivnost za oba enzima nakon 16 h ekspresije detektovana prilikom indukcije pri vrednostima OD₆₀₀ između 3 i 4 ove vrednosti su korišćene za dalje eksperimente.

Tabela 35. Zavisnost aktivnosti versatilne i lignin peroksidaze od vrednosti optičke gustine ćelija u trenutku ekspresije enzima

OD₆₀₀ vrednost pre indukcije ekspresije	Aktivnost versatilne peroksidaze (U/OD₆₀₀)	Aktivnost lignin peroksidaze (U/OD₆₀₀)
3	25,64±5	20,11±5
4	21,52±3	24,13±4
5	5,31±1	15,32±3
8	/	/
10	/	/

Kao još jedan veoma značajan parametar prilikom ekspresije ligninolitičkih peroksidaza na površini kvasca pokazala se vrednost OD₆₀₀ do koje će ćelije biti razblažene pri dodatku indukcionog medijuma, odnosno pronalaženje optimalnog odnosa inducera i biomase. Ćelije su gajene u YNB-CAA medijumu sa glukozom dok OD₆₀₀ nije dostigla 3-4, kada su razblažene indukcionim medijumom sa galaktozom i 5-aminolevuleinskom kiselinom do različitih vrednosti OD₆₀₀ u finalnoj zapremini od 20 mL. Fermentacija je trajala 16 h na 28 °C i 200 rpm.

Aktivnost oba enzima opadala je porastom OD₆₀₀. Male razlike u aktivnosti detektovane su između OD₆₀₀ 0,5 i 1, ali se značajno smanjivala povećanjem OD₆₀₀ na 1,5 i 2, pri čemu aktivnost versatilne peroksidaze nije mogla da bude detektovana pri OD₆₀₀ vrednosti 2.

Tabela 36. Zavisnost aktivnosti versatilne i lignin peroksidaze od vrednosti optičke gustine ćelija nakon indukcije ekspresije enzima

OD₆₀₀ vrednost nakon indukcije	Aktivnost versatilne peroksidaze (U/OD₆₀₀)	Aktivnost lignin peroksidaze (U/OD₆₀₀)
0,5	29,64±5	26,14±5
0,8	24,82±4	28,13±4
1	19,31±4	25,51±6
1,5	4,61±2	10,1±2
2	/	4,31±3

Poslednji parametar čiji uticaj na ekspresiju ligninolitičkih peroksidaza praćen je značaj dodatka 5-aminolevuleinske kiseline u indukcioni medijum. Kao što je prikazano u tabeli 37 aktivnost ni jedne peroksidaze nije bila detektovana nakon 16 h fermentacije u odsustvu prekursora za sintezu hema. Na osnovu dobivenih rezultata zaključno je da je dodatak 5-aminolevuleinske kiseline esencijalan za ekspresiju peroksidaza i ovaj prekursor je u svim daljim eksperimentima dodavan u indukcioni medijum.

Tabela 37. Zavisnost aktivnosti versatilne i lignin peroksidaze od prisustva 5-aminolevuleinske kiseline u indukcijom medijumu.

Koncentracija 5-ALA u medijumu (mM)	Aktivnost versatilne peroksidaze (U/OD₆₀₀)	Aktivnost lignin peroksidaze (U/OD₆₀₀)
/	/	/
0,5	24,82±4	28,13±4

Na osnovu prikazanih rezultata pronađeni su najpogodniji uslovi za ekspresiju ligninolitičkih peroksidaza koji su primenjivani u daljem eksperimentima. Pojedinačne ćelije su inokulisane u po 20 mL YNB-CAA medijuma sa glukozom i hloramfenikolom. Gajene su na 28 °C i 200 rpm dok OD₆₀₀ nije dostigla vrednost 3-4. Tada su ćelije

razblažene indukcionim medijumom (YNB-CAA medijumom sa galaktozom i 5-aminolevuleinskom kiselinom) do OD₆₀₀ vrednosti 0,8 i gajene 16 h pri istim uslovima.

4.2. Fluorescencijom aktivirano ćelijsko sortiranje mutanata lignin i versatilne peroksidaze u cilju unapređenja oksidativne stabilnosti enzima

Ligninolitičke peroksidaze su enzimi veoma široke supstratne specifičnosti. Sposobni su da oskiduju molekule različite strukture i redoks potencijala zahvaljujući posebnom mehanizmu oksidacije – „long-range“ elektronskom transferu. Aktivnost ovih hem peroksidaza je zavisna od H₂O₂. Nakon vezivanja ovog molekula dolazi do monoelektronske oksidacije dva molekula supstrata i otpuštanja molekula voda (Ruiz-Dueñas et al., 1999).

Međutim, u prisustvu visokih koncentracija H₂O₂ dolazi do suicidalne inaktivacije enzima, odnosno formiranja katalitički neaktivnog intermedijera i onemogućavanja povratka enzima u osnovno stanje. Neaktivni intermedijer koji sadrži superoksida anjon radikal može dovesti do oksidacije aminokiselina enzima i njegove ireverzibilne inaktivacije (Hiner et al., 2002).

Upravo zbog široke supstratne specifičnosti i velikih mogućnosti za primenu ovih enzima u industrijskim procesima prethodno je rađeno na unapređenju pH, oksidativne i termalne stabilnosti ovih enzima (Garcia-Ruiz et al., 2012; Bao, Haung, 2014.; Semba et al., 2015). U ovu svrhu primenjene su metode racionalnog dizajna (Bao, Haung, 2014; Sáez-Jiménez et al, 2015), koncenzusne mutagenezi (Semba et al., 2015) i dirigovane evolucije (Garcia-Ruiz et al., 2012; Rye et al, 2008). Međutim, prilikom primene dirigovane evolucije pretraživanje nasumičnih biblioteka gena rađeno je samo u mikrotitar pločama. Na ovaj način broj mutanta u biblioteci koji je mogao da bude pretražen limitiran je na maksimalno 10⁴ kopija gena (Garcia-Ruiz et al., 2012; Rye et al., 2008). Do sada nisu primenjene visokoefikasne metode pretrage biblioteka u cilju pronalaska najaktivnijih ili najstabilnijih mutanata ligninolitičkih peroksidaza.

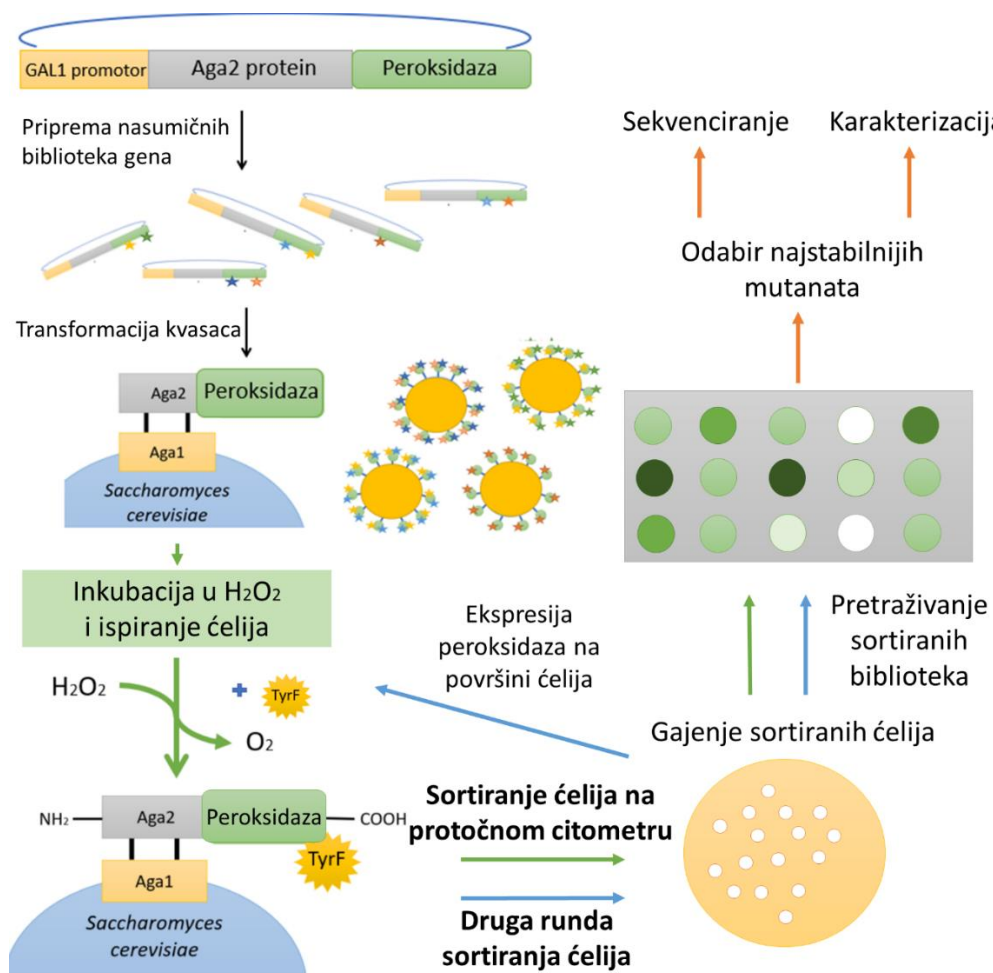
U cilju unapređenja oksidativne stabilnosti versatilne i lignin peroksidaze sintetički geni za ova dva enzima klonirani su u pCTCON2 vektor za ekspresiju proteina na površini kvasca. Pripremljene su nasumično mutirane biblioteke ovih gena i divlji tipovi enzima (wt) i pripremljene biblioteke gena eksprimirane su na površini kvasca *S. cerevisiae* EBY100 u himernoj formi sa Aga2 proteinom koji se po ekspresiji kovalentno vezuje za površinu ćelijskog zida. Na ovaj način očuvana je veza između genotipa i fenotipa. Radi unapređenja oksidativne stabilnosti peroksidaza primenjen je tiramid-fluoresceinski esej (Lipovesk et al., 2007). Po oksidaciji ovog supstrata od strane peroksidaza dolazi do kovalentnog vezivanja proizvoda oksidacije za proteine na površini ćelije. Ovo je omogućilo razvoj FACS sistema bez kompermentalizacije čija efikasnost je potvrđena sortiranjem referentnih biblioteka. Nakon višetrukih koraka ispiranja nekovalentno vezanog supstrata zelena fluorescencija ćelija bila je posledica aktivnosti enzima.

Radi unapređenja oksidativne stabilnosti po ekspresiji biblioteke gena na površini ćelija iste su inkubirane u visokoj koncentraciji H₂O₂, isprane od viška ovog supstrata i urađen je tiramid-fluoresceinski esej. Ćelije sa najvećom zelenom fluorescencijom koja odgovara enzimskoj aktivnosti sortirane su primenom protočne citometrije, odnosno fluorescecijom aktiviranog ćelijskog sortiranja i oporavljene na YNB-CAA pločama sa glukozom i hloramfenikolom. Nakon regeneracije ćelija i njihove ponovne inkubacije u visokoj koncentraciji H₂O₂ pristupljeno je drugoj rundi sortiranja.

Sortirane ćelije zasejane su u pojedinačne bunare mikrotitar ploča i zasebno su eksprimirani mutirani enzimi. Aktivnost nakon inkubacije ćelija u visokim koncentracijama H₂O₂ određena je ABTS esejem za versatilnu peroksidazu i 2,4-DCP esejem za lignin peroksidazu.

Oksidativno najstabilniji mutanti enzima su sekvencionirani i okarakterisani. Himerni proteini Aga2-Per ekstrahovani su sa površine kvasca i prečišćeni. Ovako pripremljeni himerni proteini korišćeni su za određivanje kinetičkih parametara za H₂O₂ i ABTS ili 2,4-DCP. Mutanti peroksidaza eksprimirani na površini kvasca su nakon lize ćelija i pripreme ćelijskih zidova obloženih ovim mutantima iskorišćeni su za određivanje stabilnosti u

visokim koncentracijama H_2O_2 u vremenu i višestruke cikluse degradacije tekstilnih boja. Shematski prikaz urađenih eksperimenata nalazi se na slici 27.



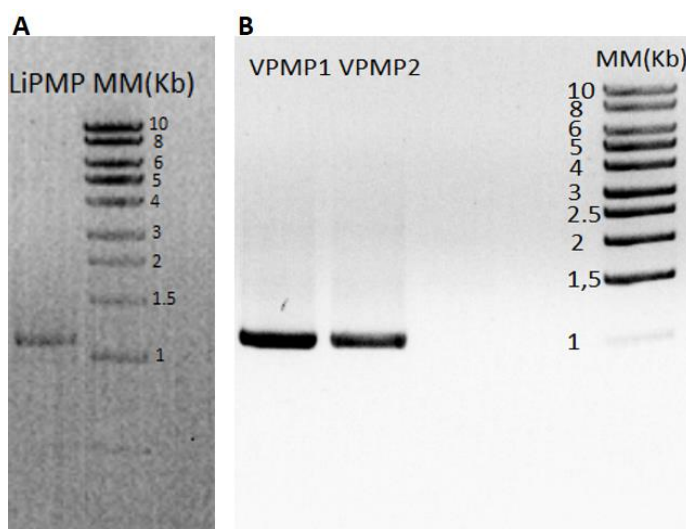
Slika 27. Shematski prikaz urađenih eksperimenata

5.2.1. Priprema nasumično mutiranih biblioteka gena lignin i versatilne peroksidaze

Nasumične biblioteke gena za lignin i versatilnu peroksidazu pripremljene su primenom „Mutazyme“ DNA polimeraze. Nakon kloniranja gena za ova dva enzima u pCTCON2

vektor dobiveni konstrukti primenjeni su kao templatni za umnožavanje gena i uvođenje mutacija (slika 29).

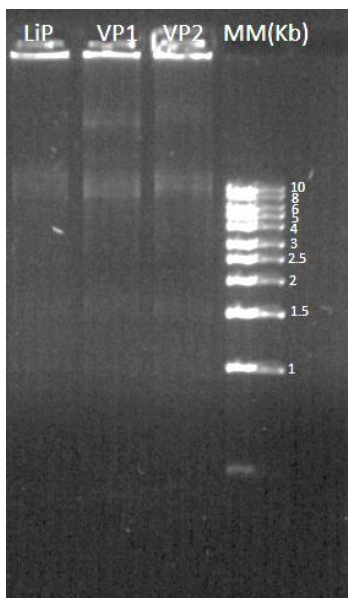
Za lignin peroksidazu pripremljena je jedna biblioteka sa srednjom stopom mutacija, dok su za versatilnu peroksidazu pripremljene dve biblioteke različitih stopa mutacija radi postizanja što veće raznovrsnosti u sekvencijama mutiranih gena. Na slici 29A jasno se vidi jedna traka na masi nešto većoj od 1 Kb koja odgovara masi gena za lignin peroksidazu, dok se na slici 29B isto može uočiti samo po jedna traka u oba uzorka na masi koja odgovara masi gena za versatilnu peroksidazu. Na osnovu prikazanih elektroforegrama može se zaključiti da su geni za obe peroksidaze uspešno umnoženi „Mutazyme“ polimerazom.



Slika 29. A. Agarozna DNA elektroforeza gena za lignin peroksidazu **B.** Agarozna DNA elektroforeza gena za versatilnu peroksidazu

Na ovaj način umnoženi geni tretirani su DpnI enzimom kako bi se uklonila celokupna količina templatne DNA i nakon prečišćavanja umnoženi geni iskorišćeni su kao megaprajmeri za umnožavanje celog plazmida dok su kao templatne DNA korišćeni konstrukti wtVP-pCTCON2 i wtLiP-pCTCON2. Na ovaj način izbegnut je korak ligacije koji limitira veličinu biblioteke i prisustvo praznog vektora u biblioteci gena. Nakon

uklanjanja templatne DNA koja je sadržala wt gene za peroksidaze urađena je DNA elektroforeza (slika 30).



Slika 30. Agarozna DNA elektroforeza nakon amplifikacije celih plazmida

Na slici 30 vidi se veći broj traka vrlo različite molekulske mase, ali se takođe su sva tri uzorka može videti prisustvo široke trake između molekulskih markera od 10 i 8 Kb koja po masi odgovara plazmidima VP-pCTCON2 i LiP-pCTCON2. Kako će se samo ispravno umnoženi plazmidi umnožiti u *E. coli* može se zaključiti da je amplifikacija celih plazmida oko potencijalno mutiranih gena bila uspešna.

Umnoženi plazmidi iskorišćeni su za transformaciju ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold prema uputstvu proizvođača i ćelije su raspoređene na između 150 i 200 LB-amp ploča po biblioteci. Primenjene su komercijalne ultra-kompetentne ćelije usled visoke transformacione efikasnosti koja omogućava generisanje biblioteka gena sa većim diverzitetom. Nakon 16 h inkubacije ploča na 37 °C po 10 pojedinačnih kolonija za svaku pripremljenu biblioteku zasejano je u po 2 mL LB-amp medijuma. Nakon umnožavanja bakterijskih ćelija iz istih su izolovani plazmidi. Izolovani plazmidi su posleti na sekvenciranje radi provere uspešnosti uvođenja mutacija u gene. Na osnovu broja kolonija koje su porasle na LB-amp pločama procenjena je veličina biblioteka. Sve kolonije sa ploča

su pokupljene, inokulisane u LB-amp medijum i iz njih je izolovan pul plazmida pripremljenih genskih biblioteka (tabela 38).

Tabela 38. Karakteristike pripremljenih nasumičnih biblioteka gena.

Biblioteka	Broj mutacija po genu	Srednja vrednost broja mutacija	Procenjena veličina biblioteke
LiP	1-6	3	1,0 x 10 ⁶
VP1	0-5	2	1,2 x 10 ⁶
VP2	1-9	4	1,8 x 10 ⁶

Sekvenciranje gena iz nasumično odabranih kolonija *E. coli* XL10Gold pokazalo je da su mutacije uspešno uvedene u sekvencije gena njihovim umnožavanjem „Mutazyme“ DNA polimerazom. Kao što je prikazano u tabeli 38 detektovano je između 0 i 9 mutacija u pojedinačnim genima i pripremljene su biblioteke sa različitim stopama mutacije. Prosečan broj mutacija po genu za dve biblioteke versatilne peroksidaze bio je 2 i 4, a broj mutacija za biblioteku lignin peroksidaze 3. Ove razlike posledica su, naravno, različitih sekvencija gena za lignin i versatilnu peroksidazu, ali prevashodno varijacija u koncentraciji templatne DNA u reakcionoj smeši pri uvođenju mutacija u gene. Pored toga, sekvenciranje je pokazalo da nije bilo preferencija u tipu nukleotidnih konverzija.

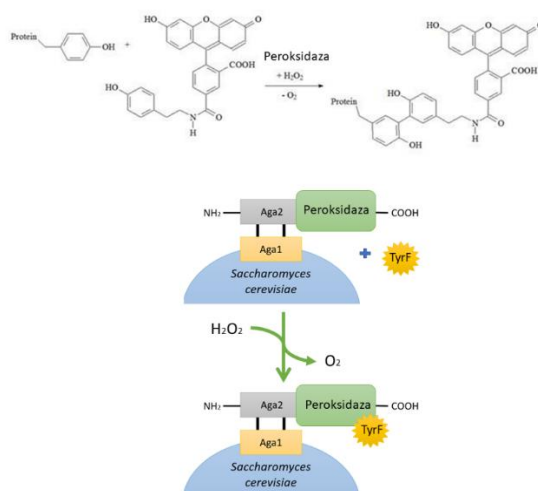
Veličine biblioteka gena procenjene na osnovu broja pojedinačnih kolonija *E. coli* XL10Gold bile su između 1 i 1,8 x 10⁶ mutanta što je približno veličinama drugih biblioteka korišćenih za sortiranje ćelija primenom protočne citometrije, ali i značajno veće od prethodno pripremljenih biblioteka gena ligninolitičkih peroksidaza (Rye et al, 2008; Garcia-Ruiz et al., 2012; Prodanović et al., 2012.)

4.2.2 Tiramid-fluorescein esej za FACS

Tiramid-fluoresceinski esej za određivanje aktivnosti peroksidaza razvijen je i primenjen za promenu enantioselektivnosti peroksidaze iz rena primenom protočne citometrije (FACS) (Lipovesk et al., 2007). Tiramid-fluorescein kao supstrat već poseduje zelenu fluorescenciju poreklom od molekula fluoresceina. Po dodatku H₂O₂ u smešu peroksidaze i fluorescentnog

supstrata dolazi do peroksidazom katalizovane oksidacije tiramida, a zatim i njegovog kovalentnog vezivanja za tirozinski bočni ostatak u proteinu (slika 31).

Ukoliko se peroksidaza nalazi eksprimirana na površini ćelije kvasca po završetku reakcije fluorescentni proizvod ostaje vezan na površini ćelije. Kako je veza između proizvoda i proteina na površini ćelije kovalentna višak fluorescentnog supstrata se može ukloniti ispiranjem ćelija. Na taj način zelena fluorescencija pojedinačne ćelije oslikava aktivnost peroksidaze koja je na njoj površini eksprimirana (Lipovesk et al., 2007; Ostafe et al., 2014).

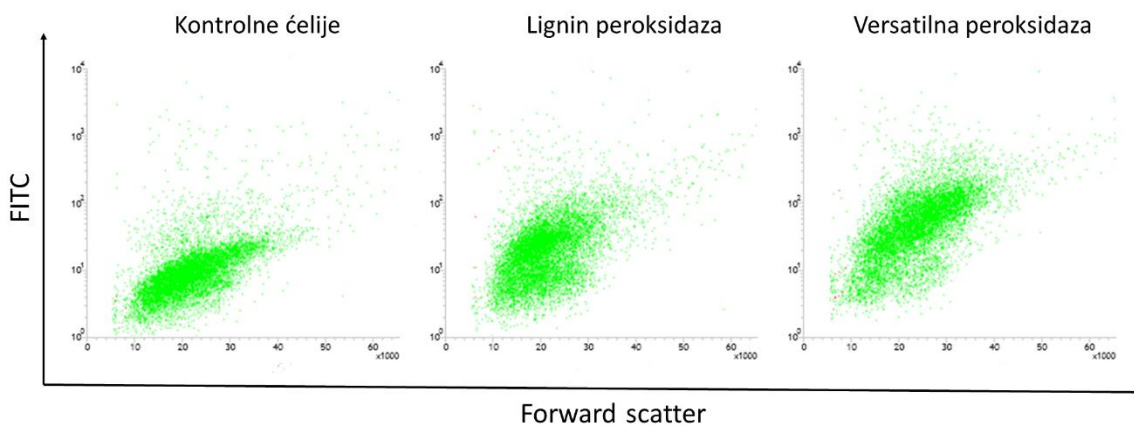


Slika 31. Tiramid-fluoresceinski esej za FACS.

Kako aktivnost ligninolitičkih peroksidaza sa tiramid-fluoresceinom kao supstratom nije do sada potvrđena pristupljeno je njenoj detekciji. Ćelije *S. cerevisiae* EBY100 koje eksprimiraju lignin ili versatilnu peroksidazu na svojoj površini isprane su od inducionog medijuma i razblažene tako da je jedna reakciona smeša sadržala samo 2×10^7 ćelija kako bi se maksimalno smanjila mogućnost „cross-talk“-a između ćelija (vezivanje fluorescentnog proizvoda enzima sa površine jedne ćelije za površinski protein druge ćelije) i dodat je rastvor fluorescentnog supstrata. Reakcija je inicirana dodatkom H_2O_2 i stopirana dodatkom 10 x PBS-a sa 0,5% BSA i 10 mM askorbinskom kiselinom nakon

samo 1 min. Trajanje reakcije je takođe smanjeno zbog velike osetljivosti fluorescentne detekcije i smanjenja mogućnosti „cross-talk“-a.

Nakon više koraka ispiranja u kojima je uklonjen višak fluorescentnog supstrata ćelije su finalno resuspendovane u PBS-u i analizirane protočnom citometrijom. Ćelije kvasca transformisane praznim pCTCON2 ekspresionim vektorom i tretirane na isti način korišćene su kao negativna kontrola. U toku analize protočnom citometrijom fluorescencija je ekscitovana primenom plavog lasera. Ćelije su prikazane na histogramima zavisnosti zelene fluorescencije (mere aktivnosti enzima) od vrednosti „Forward scatter“-a (mere veličine ćelije). Na svakom histogramu prikazano je 10^4 ćelija (slika 32).



Slika 32. Provera aktivnosti lignin i versatilne peroksidaze sa tiramidvari-fluoresceinom kao supstratom.

Sa slike 32 može se videti da je kod kontrolnih ćelija prisutna jedna vrlo kompaktna populacija ćelija niske zelene fluorescencije (do 10^2 jedinica), dok se kod ćelija koje ekspimiraju lignin ili versatilnu peroksidazu glavna populacija značajno podigla ka višim vrednostima zelene fluorescencije (do 10^3 jedinica). Pored glavne populacije u ova dva slučaja može se uočiti i mala populacija sa nižom zelenom fluorescencijom. Ova populacija odgovara ćelijama koje se nalaze u stacionarnoj fazi rasta i ne ekspimiraju peroksidaze na svojoj površini.

Na osnovu prikazanih rezultata, odnosno značajnog povećanja zelene fluorescencije ćelija koje eksprimiraju lignin ili versatilnu peroksidazu nakon reakcije ćelija sa fluorescentnim supstratom može se zaključiti da ove dve peroksidaze pokazuju aktivnost sa tiramid-fluoresceinom, pa je pristupljeno sortiranju referentnih biblioteka enzima u cilju optimizacije i procene efikasnosti izabranog metoda.

4.2.3 Sortiranje referentnih biblioteka versatilne peroksidaze

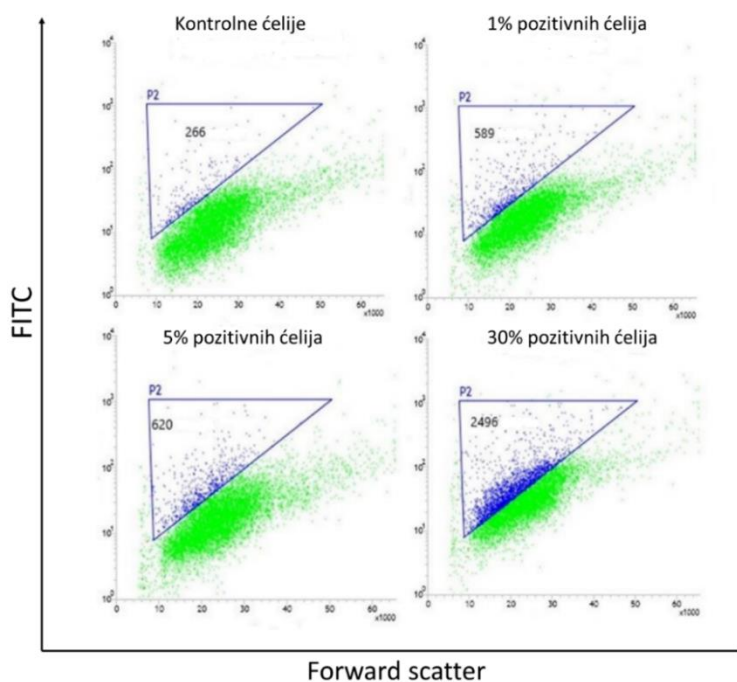
Referentne biblioteke gena za za versatilnu peroksidazu pripremljene su mešanjem ćelija kvasca koje eksprimiraju ovaj enzim na svojoj površini, prethodno transformisanih wtVP-pCTCON2 konstruktom i ćelija kvasca prethodno transformisanih praznim pCTCON2 vektorom u različitim odnosima. Na ovaj način pripremljene su 1%, 5% i 30% referentna biblioteka versatilne peroksidaze, gde se procenat u nazivu odnosi na procenat ćelija koje eksprimiraju enzim na svojoj površini.

Po završetku tiramid-fluorescenskog eseja ćelije su analizirane protočnom citometrijom. Ćelije kvasca transformisane praznim pCTCON2 ekspresionim vektorom i tretirane na isti način korišćene su kao negativna kontrola. U toku analize protočnom citometrijom fluorescencija je ekscitovana primenom plavog lasera. Ćelije su prikazane na histogramima zavisnosti zelene fluorescencije (mere aktivnosti enzima) od vrednosti „Forward scatter“-a (mere veličine ćelije). Na svakom histogramu prikazano je 10^4 ćelija. P2 kapija postavljena je iznad glavne populacije ćelija korišćenih kao negativna kontrola (slika 33).

Na slici 33 može se uočiti jasna korelacija između broja ćelija u P2 kapiji i procenta ćelija koje eksprimiraju enzim u reakcionoj smeši. Broj ćelija u ovoj kapiji porastao je sa 589 za referentnu biblioteku sa 1% ćelija koje eksprimiraju enzim na 2496 za referentnu biblioteku u kojoj 30% ćelija eksprimiraju versatilnu peroksidazu.

Ćelije koje se nalaze u obeleženim kapijama P2 sortirane su u pojedinačnom modu-u na YNB-CAA ploče sa glukozom i hloramfenikolom i regenerisane inkubacijom ploča na 28 °C u toku 48 h. Od ukupno 400 sortiranih ćelija na pločama nakon 48 h inkubacije poraslo je oko 300 kolonija. Kako je i kod kontrolnih ćelija uočena mala populacija (266 ćelija od

10⁴ analiziranih ćelija) sa nešto većom zelenom fluorescencijom može se pretpostaviti da su u ove ćelije i sortirane ćelije koje nisu oporavljene na agar pločama nakon sortiranja ustvari mrtve ćelije čija je membranska permeabilnost za fluorescentni supstrat značajno niža nego kod živih ćelija. Iako će i ovakve ćelije biti detektovane u kapijama sa visokom zelenom fluorescencijom one neće predstavljati problem prilikom budućih eksperimenata, prevashodno jer iste neće biti regenerisane nakon sortiranja (Kovačević et al., 2018).



Slika 33. FACS histogrami referentnih biblioteka versatilne peroksidaze.

Pojedinačne kolonije kvasca nakon sortiranja referentnih biblioteka zasejane su u pojedinačne bunare mikrotitar ploča i indukovana je ekspresija enzima na njihovoj površini. Aktivnost svake pojedinačne kolonije određena je ABTS esejem u mikrotitar pločama. Analizirane su tri mikrotitar ploče sa 96 bunarića za svaku biblioteku nakon tri sortiranja. U tri bunarića svake mikrotitar ploče nalazile su se kontrolne ćelije. Na ovaj način određen je nivo obogaćenja sortiranih referentnih biblioteka ćelijama koje eksprimiraju versatilnu peroksidazu (tabela 39).

Najveći broj kolonija koje pokazuju aktivnost versatilne peroksidaze dobiven je nakon sortiranja 5% referentne biblioteke, pokazujući finalnu čistoću populacije od skoro 70%. Vrlo slični nivo obogaćenja 5% referentne biblioteke (61%) prijavljen je za sortiranje referentnih biblioteka celulaze u dvostrukim emulzijama (Ostafe et al., 2013), takođe, prijavljen je i viši nivo obogaćenja referentnih biblioteka gena primenom tiramid-fluoresceinskog eseja, ali za sortiranje biblioteka gena glukozo oksidaze u jednostrukim emulzijama (Kovačević et al., 2018).

Tabela 39. Obogaćenje referentnih biblioteka versatilne proksidaze nakon sortiranja ćelija

Procenat aktivnih ćelija u biblioteci pre sortiranja	Procenat aktivnih ćelija u biblioteci nakon sortiranja	Nivo obogaćenja biblioteke
1	37,8±2	37,8
5	68,9±2	13,8
30	46.7±3	1,6

Sortiranje aktivnih ćelija pri njihovim nižim koncentracijama u reakcionoj smeši, kao što je 1% referentna biblioteka može biti afektovano pozadinskim šumom i greškama merenja (Ostafe et al., 2013), ali je nivo obogaćenja ove biblioteke ipak bio najveći. Međutim, nešto niži nivo obogaćenja primećen je i kod sortiranja referentne biblioteke sa većim procentom aktivnih ćelija. Ovo bi mogla da bude posledica kros-reaktivnosti ćelija. Što je veći broj ćelija koje ekspimiraju peroksidaze veća je i verovatnoća da će doći do vezivanja fluorescentnog proizvoda za površinu ćelija koje ne ekspimiraju enzim. Razlika je i dalje mala i ne bi trebala da ima većeg uticaja na sortiranje nasumičnih biblioteka gena.

Na osnovu dobivenih podataka vidi se da je sortiranje sve tri referentne biblioteke dovelo do značajnog obogaćenja biblioteka ćelijama koje ekspimiraju versatilnu peroksidazu i zaključeno je da tiramid-fluoresceinski esej može biti primenjen za sortiranje biblioteka gena versatilne peroksidaze.

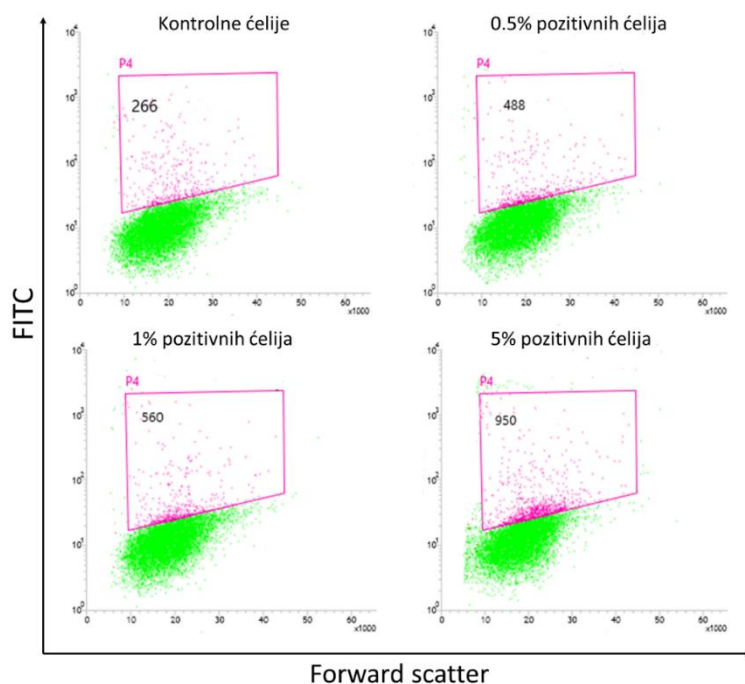
4.2.4 Sortiranje referentnih biblioteka lignin peroksidaze

Za sortiranje referentnih biblioteka lignin peroksidaze pripremljene su tri referentne biblioteke mešanjem ćelija kvasaca koje ekspimiraju lignin peroksidazu i kontrolnih ćelija koje su prethodno transformisane praznim pCTCON2 vektorom u različitim odnosima. Pošto je primećen pad u broju kolonija koje pokazuju aktivnost versatilne peroksidaze nakon sortiranja 30% referentne biblioteke u odnosu na 5% referentnu biblioteku u slučaju lignin peroksidaze referentna biblioteka sa najvećim procentom pozitivnih ćelija (ćelija koje ekspimiraju lignin peroksidaze) bila je 5% referentna biblioteka. Druge dve sortirane biblioteke gena imale su 0,5% i 1% pozitivnih ćelija.

Kao i kod versatilne peroksidaze, ćelije su pomešane sa fluorescentnim supstratom i H_2O_2 i nakon jednog minuta reakcija je stopirana. Nakon više koraka ispiranja viška supstrata ćelije su analiziranje protočnom citometrijom. Na slici 34 prikazani su histogrami za kontrolne ćelije (ćelije *S. cerevisiae* transformisane pCTCON2 vektorom i tretirane na isti način kao ćelije koje ekspimiraju enzim i kasnije referentne biblioteke) i referentne biblioteke lignin peroksidaze. Na histogramima prikazana je zavisnost zelene fluorescencije (mera aktivnosti enzima) i „forward scatter“-a (mera veličine ćelija). Ukupno je prikazano 10^4 ćelija. P4 kapije postavljene su iznad glavne populacije kontrolnih ćelija.

Ponovo se može jasno uočiti veza između broja ćelija sa najvećom zelenom fluorescencijom (ćelija u P4 kapiji) i procenta ćelija koje ekspimiraju lignin peroksidazu ukazujući na to da je porast zelene fluorescencije zaista posledica aktivnosti enzima.

Nakon sortiranja 400 ćelija iz P4 kapije na YNB-CAA ploče sa glukozom i hloramfenikolom pojedinačne kolonije inokulisane su u YNB-CAA tečni medijum sa istim suplementima u zasebne bunariće mikrotitar ploče. Po ekspresiji enzima na površini ćelija broj ćelija koje ekspimiraju lignin peroksidazu nakon sortiranja različitih referentnih biblioteka određen je 2,4-DCP esejem u mikrotitar pločama (tabela 40).



Slika 34. FACS histogrami referentnih biblioteka lignin peroksidaze.

Prilikom sortiranja referentnih biblioteka gena lignin peroksidaze broj detektovanih kolonija koje ekspimiraju enzim, odnosno pokazuju lignin peroksidaznu aktivnost rastao je sa procentom pozitivnih ćelija u referentnoj biblioteci. Najveći procenat aktivnih ćelija nakon sortiranja 5% referentne biblioteke iznosio je 71,2% i vrlo je sličan procentu aktivnih ćelija dobivenih nakon sortiranja 5% referentne biblioteke versatilne proksidaze.

Tabela 40. Nivo obogaćenja referentnih biblioteka lignin peroksidaze nakon sortiranja ćelija protočnom citomeritjom.

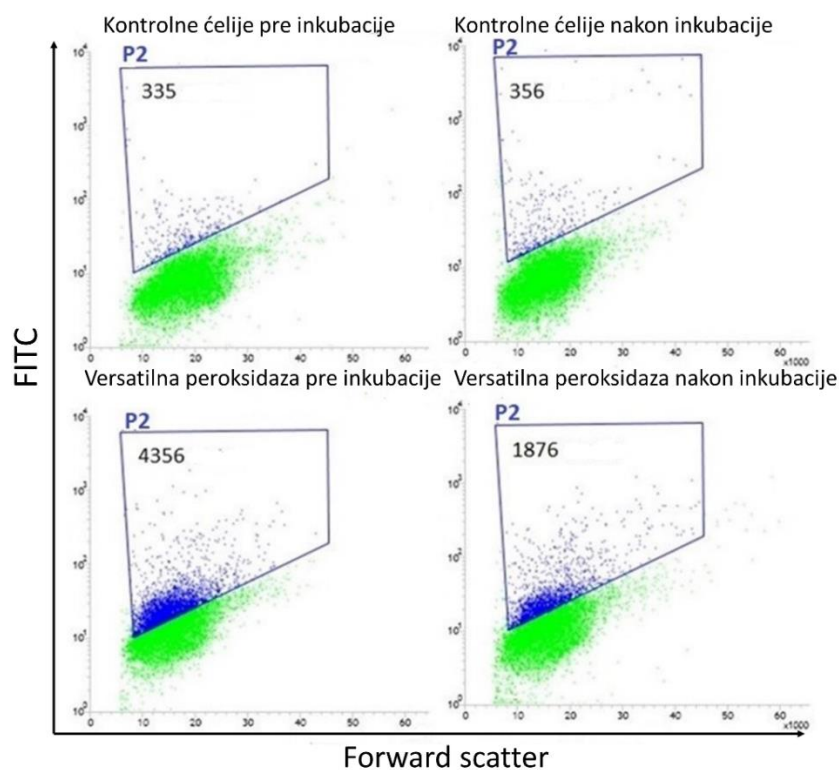
Procenat aktivnih ćelija u biblioteci pre sortiranja	Procenat aktivnih ćelija u biblioteci nakon sortiranja	Nivo obogaćenja biblioteke
0,5	32,5± 4	65,0
1	49,3±3	49,3
5	71,2±4	14,2

Kako je sortiranje sve tri referentne biblioteke dovelo do značajnog obogaćenja biblioteka ćelijama koje eksprimiraju lignin peroksidazu zaključeno je da tiramid-fluoresceinski esej može biti primenjen za sortiranje biblioteka gena lignin peroksidaze.

4.2.5 Sortiranje i analiza nasumično mutiranih biblioteka gena versatilne peroksidaze

Kako bi se iz velikog broja nasumično mutiranih enzima izdvojili oni enzimi koji poseduju željene karakteristike neophodno je izvršiti odgovarajući selektivni pritisak (Wahler et al., 2001). U slučaju pretrage biblioteka gena u cilju pronalaska mutiranih enzima sa povećanom stabilnosti u visokim koncentracijama H_2O_2 ćelije koje eksprimiraju versatilnu peroksidazu i njene mutante preinkubirane su 20 minuta u 30 mM H_2O_2 . Nakon inkubacije i ispiranja ćelija od viška peroksida urađen je tiramid-fluoresceinski esej, kao što je prethodno opisano. Inkubacija ćelija u rastvoru H_2O_2 vodi do inaktivacije onih mutanata enzima koji imaju nisku oksidativnu stabilnost. Ovi mutanti neće biti aktivni i neće dovesti do kovalentnog vezivanja fluorescentnog proizvoda za površinu ćelija. Shodno tome, ćelije koje eksprimiraju enzime niže oksidativne stabilnosti neće imati visoku zelenu fluorescenciju i neće biti sortirane. Za razliku od njih ćelije koje eksprimiraju oksidativno stabilne varijante enzima na svojoj površini imaće aktivne enzime nakon inkubacije u H_2O_2 i najvišu zelenu fluorescenciju.

Kako bi se potvrdila efikasnost izabranog sistema ćelije koje eksprimiraju divlji tip versatilne peroksidaze inkubirane su 20 minuta u 30 mM rastvoru H_2O_2 . Po završetku inkubacije ćelije su isprane i urađen je tiramid-fluoresceinski esej. Pored toga, urađen je tiramid-fluoresceinski esej i sa ćelijama koje eksprimiraju divlji tip versatilne peroksidaze bez prethodne inkubacije u visokoj koncentraciji H_2O_2 . Na oba načina tretirane ćelije analizirane su protočnom citometrijom. Ćelije su prikazane na histogramima zavisnosti zelene fluorescencije od „forward scatter“-a. Na histogramima prikazano je 10^4 analiziranih ćelija (slika 35). Isto je urađeno sa kontrolnim ćelijama (ćelijama kvasca transformisanih praznim pCTOCN2 vektorom i tretiranim na isti način kao ćelije koje eksprimiraju enzim). P2 kapije postavljene su iznad glavne populacije kontrolnih ćelija.



Slika 35. FACS histogrami kontrolnih ćelija i ćelija koje ekspimiraju divlji tip versatilne peroksidaze pre i posle inkubacije u 30 mM H₂O₂

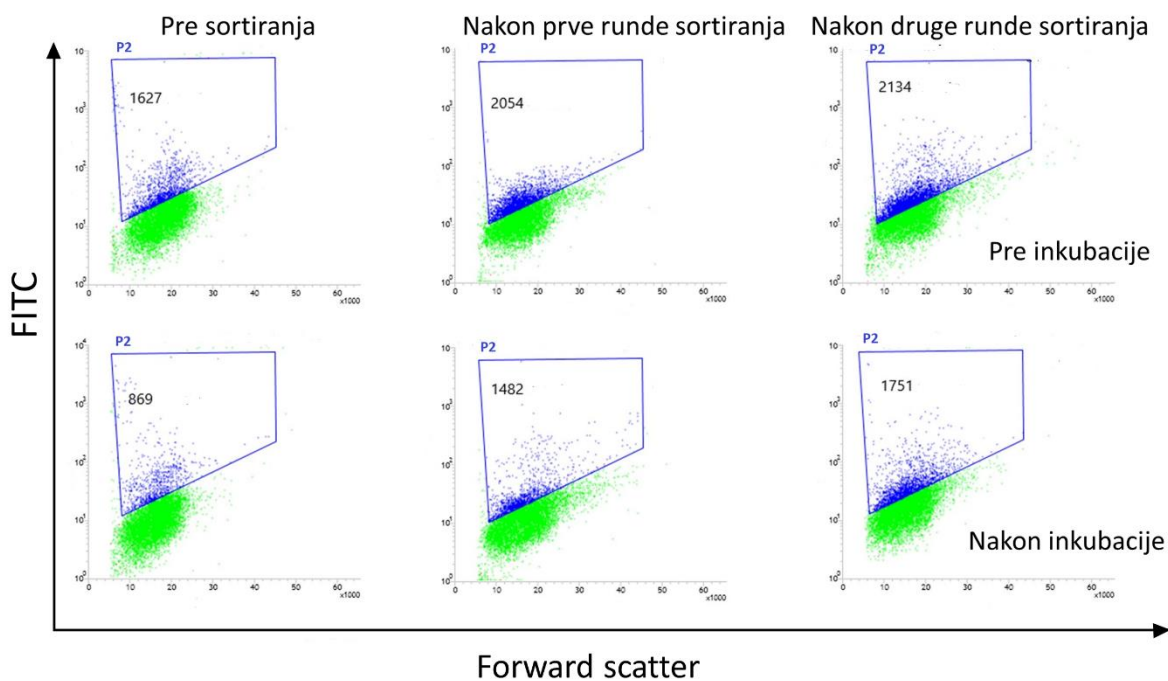
Analiza kontrolnih ćelija pre i nakon inkubacije u visokim koncentracija H₂O₂ pokazala je da se broj ćelija u P2 kapiji neznatno menja. Rezultati su bili značajno drugačiji prilikom analize ćelija koje ekspimiraju divlji tip versatilne peroksidaze. Bez inkubacije u vodonik-peroksidu broj ćelija u P2 kapiji iznosio je 4356 dok je nakon inkubacije pao na 1876, odnosno procenat aktivnih ćelija posle 20 minuta inkubacije u 30 mM H₂O₂ smanjio se za 67%. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da prilikom inkubacije ćelija u H₂O₂ dolazi do delimične inaktivacije versatilne peroksidaze i da ne dolazi do značajnih promena u fluorescenciji kontrolnih ćelija, pa je pristupljeno analizi i sortiranju nasumično mutiranih biblioteka gena. Inkubacija ćelija u višim koncentracijama peroksida nije bila moguća usled vrlo niske stope oporavka ćelija nakon sortiranja.

Nakon ekspresije nasumičnih biblioteka gena versatilne peroksidaze na površini ćelija iste su podeljene na dva dela. Sa jednom polovinom ćelija urađen je tiramid-fluoresceinski esej,

a druga polovina ćelija je pre fluoresceintnog eseja inkubirana 20 minuta u 30 mM rastvoru H₂O₂. Ćelije su analizirane protočnom citometrijom kao u prethodnim eksperimentima. P2 kapija postavljena je iznad glavne populacije kontrolnih ćelija prikazanih na slici 35. Ćelije iz ove kapije koje su pre fluorescentnog eseja inkubirane u 30 mM H₂O₂ sortirane su na YNB-CAA ploče sa glukozom i hloramfenikolom i u isti tečni medijum. U oba slučaja sortirano je po 10⁴ ćelija i one su regenerisane inkubacijom na 28 °C.

Ćelije sortirane u tečni medijum nakon regeneracije i umnožavanja prebačene su u indukcionu medijum. Po završetku ekspresije enzima urađena je još jedna (druga) runda sortiranja. Ponovo su analizirane i ćelije koje su preinkubirane u vodonik-peroksidu i one koje su bez inkubacije korišćene za fluorescentni esej. U ovom slučaju sortirano je 10⁴ ćelija na YNB-CAA ploče sa glukozom i hloramfenikolom i u isti tečni medijum. Nakon regeneracije ćelija iz tečnog medijuma ćelije su ponovo prebačene u indukcionu medijum i podeljene na dva dela. I ćelije preinkubirane u vodonik-peroksidu i ćelije direktno korišćene za fluorescentni esej analizirane su protočnom citometrijom.

Na slici 36 prikazani su FACS histogrami ćelija koje ekspimiraju nasumično mutirane biblioteke gena za versatilnu peroksidazu pre i posle 20 minuta inkubacije u 30 mM H₂O₂ pre i nakon prve i druge runde sortiranja. Broj aktivnih ćelija u nasumičnoj biblioteci gena (broj ćelija u P2 kapiji) pre sortiranja i bez inkubacije bio je približno 73% manji od broja aktivnih ćelija pri analizi ćelija koje ekspimiraju divlji tip versatilne peroksidaze. Ovakvi rezultati jesu očekivani, jer deo mutacija dovodi do inaktivacije enzima. Takođe, u slučaju ekspimirane biblioteke gena ćelije u P2 kapiji mnogo su difuznije i ne formiraju jednu populaciju koja je uočena pri analizi divljeg tipa enzima. Veće razlike u fluorescenciji među ćelijama koje ekspimiraju aktivne varijante enzima posledica su prisustva mutanta različite aktivnosti. Nakon inkubacije ćelija koje ekspimiraju mutirane enzime u vodonik-peroksidu došlo je do smanjenja broja ćelija u P2 kapiji na svega 869, odnosno 53% enzima je zadržalo svoju aktivnost. Ova vrednost je viša od 26% aktivnih enzima nakon inkubacije ćelija koje ekspimiraju divlji tip enzima.

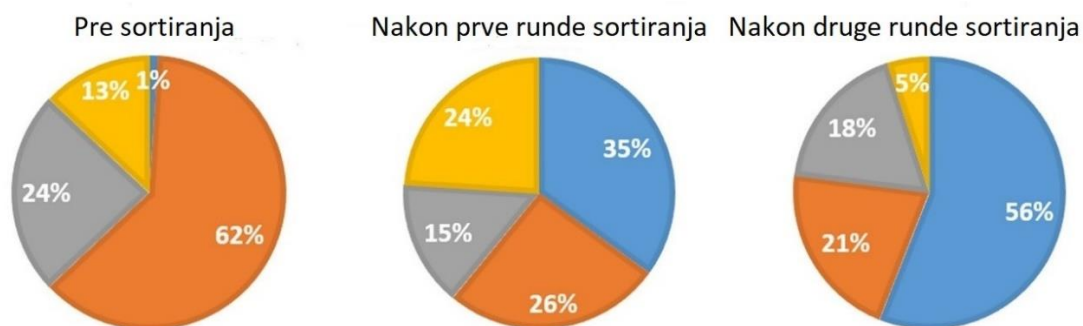


Slika 36. FACS histogrami dobiveni analizom ćelija koje ekspimiraju nasumične biblioteke gena na svojoj površini u toku dve runde sortiranja pre ili nakon inkubacije u 30 mM H₂O₂

Nakon prve runde inkubacije došlo je do porasta broja aktivnih ćelija u P2 kapiji – sa 1627 na 2054 što bi moglo da ukaže na obogaćenje biblioteke aktivnim enzimima. Nakon inkubacije ćelija nakon prve runde sortiranja u vodonik-peroksidu broj ćelija u P2 kapiji smanjio se na 1482, ali je procenat enzima koji je ostao aktivan u biblioteci porastao sa inicijalnih 53% pre sortiranja na 72%. Ovi rezultati ukazuju na obogaćenje biblioteke oksidativno stabilnim varijantama enzima. Analizom ćelija nakon druge runde sortiranja utvrđeno je da je ponovo došlo do malog porasta broja aktivnih ćelija u biblioteci (sa 2054 na 2134), ali još značajnije i do porasta procenta aktivnih varijanti enzima u biblioteci sa 72% nakon prve runde sortiranja na 82% posle druge runde sortiranja, ukazujući na efikasnost primenjenog metoda.

Pojedinačne kolonije ćelija kvasca pre i nakon prve i druge runde sortiranja zasejane su u pojedinačne bunare mikrotitar ploča. Nakon ekspresije enzima aktivnost pojedinačnih mutanata određena je ABTS esejem. Ćelije su zatim inkubirane u 30 mM rastvoru vodonik-

peroksida i ponovo je određena aktivnost na isti način. U svaku mikrotitar ploču uključene su tri kolonije ćelija koje ekspimiraju divlji tip enzima i tri kolonije ćelija transformisanih pCTCON2 vektorom. Na osnovu dobijenih podataka određen je procenat kolonija koje ekspimiraju neaktivne mutante enzima (ćelije koje pokazuju aktivnost manju od 10% aktivnosti koje pokazuju ćelije koje ekspimiraju divlji tip enzima), procenat ćelija koje ekspimiraju mutante enzima manje, iste i veće oksidativne stabilnosti od divljeg tipa enzima (slika 37).



Slika 37. Prikaz broja ćelija koje ekspimiraju varijante versatilne peroksidaze različite oksidativne stabilnosti pre i nakon prve i druge runde sortiranja. Naranđasta boja – ćelije koje ekspimiraju neaktivne mutante VP; Siva boja – ćelije koje ekspimiraju mutante VP niže oksidativne stabilnosti on wtVP; Žuta boja – ćelije koje ekspimiraju varijante enzima sa većom oksidativnom stabilnošću od wtVP.

Pre sortiranja ćelija broj neaktivnih mutanata u biblioteci gena versatilne peroksidaze iznosio je 62%. Međutim, već nakon prve runde sortiranja ovaj broj se značajno smanjio i iznosio je 26%. Do nešto manjeg smanjenja procenta neaktivnih mutanata u bibliotekama gena za versatilnu peroksidazu došlo je i nakon druge runde sortiranja – broj neaktivnih mutanata smanjio se na 21%. Najznačajnije je povećanje procenta mutanata enzima sa povećanom oksidativnom stabilnošću u odnosu na divlji tip enzima sa 1% pre sortiranja na 35% nakon prve runde sortiranja i 56% nakon druge runde sortiranja. Ovo je u skladu sa promenama broja ćelija u P2 kapiji u toku analize sortiranih ćelija i potvrđuje efikasnost primenjenog metoda. Kolonije koje ekspimiraju najstabilnije mutante enzima iskorišćene su za sekvencioniranje gena koji kodiraju date mutante i dalje eksperimente.

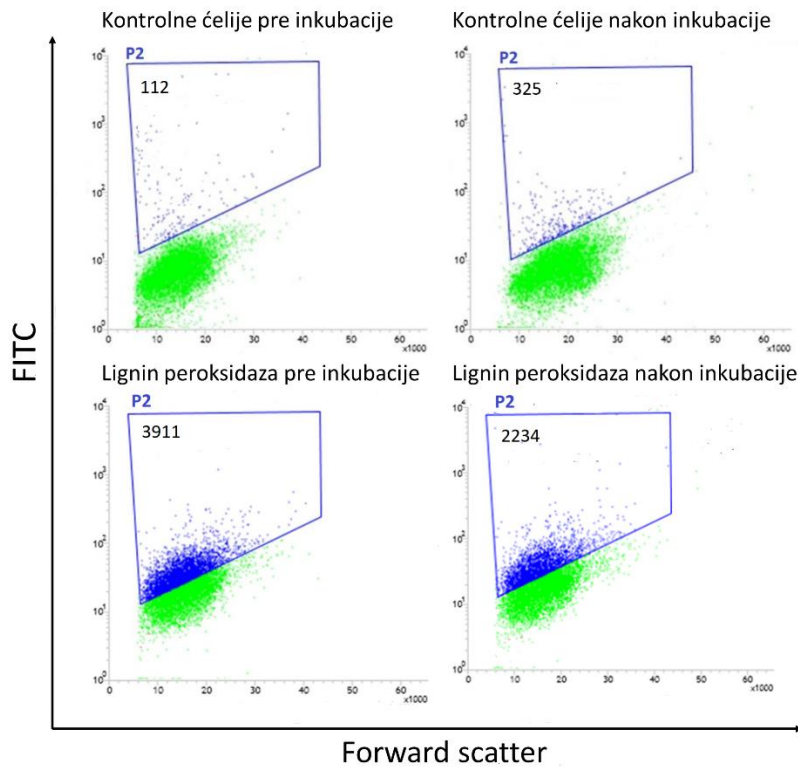
4.2.6 Sortiranje i analiza nasumično mutiranih biblioteka gena lignin peroksidaze

Provera uticaja inkubacije ćelija u visokoj koncentraciji H_2O_2 na aktivnost lignin peroksidaze i sortiranje nasumično mutiranih biblioteka gena lignin peroksidaze urađeno je na isti način opisan kod sortiranja nasumičnih biblioteka gena versatilne peroksidaze. Na slici 38 prikazani su FACS histogrami za kontrolne ćelije i ćelije koje ekspimiraju divlji tip lignin peroksidaze pre i posle 20 minuta inkubacije u 30 mM H_2O_2 .

Vidi se da je kod kontrolnih ćelija došlo do manjeg povećanja broja ćelija u P2 kapiji nakon inkubacije u vodonik-peroksidu sa 112 na 325. Do ovog povećanja moglo je da dođe usled lize ćelija kvasca dejstvom visokih koncentracija vodonik-peroksida koja vodi do unosa fluorescentnog supstrata u ćeliju. Međutim, broj ćelija detektovan u P2 kapiji kontrolnih ćelija je mnogo manji od broja ćelija detektovanim u istoj kapiji kod ćelija koje ekspimiraju lignin peroksidazu.

Nakon inkubacije ćelija koje ekspimiraju divlji tip lignin peroksidaze na površini kvasca u vodonik-peroksidu došlo je do smanjenja broja ćelija u P2 kapiji za 43%. Ovo smanjenje je nešto manje nego kod versatilne peroksidaze (73%), ukazujući na nešto veću oksidativnu stabilnost lignin peroksidaze u odnosu na stabilnost divljeg tipa versatilne peroksidaze.

Na slici 39 prikazani su FACS histogrami ćelija koje ekspimiraju nasumično mutirane biblioteke gena za lignin peroksidazu pre i posle 20 minuta inkubacije u 30 mM H_2O_2 pre i nakon prve i druge runde sortiranja. Broj aktivnih ćelija u nasumičnoj biblioteci gena (broj ćelija u P2 kapiji) pre sortiranja i bez inkubacije bio je približno 65% manji od broja aktivnih ćelija pri analizi ćelija koje ekspimiraju divlji tip lignin peroksidaze. Ova razlika je nešto manja u odnosu na razliku između divljeg tipa versatilne peroksidaze i njene nasumično mutirane biblioteke (73%). Ovakva razlika je očekivana zbog razlika u broju i tipu mutacija kod različitih nasumično generisanih biblioteka. Kao i kod biblioteka versatilne peroksidaze ćelije u P2 kapiji mnogo su difuznije i ne formiraju jednu populaciju koja je uočena pri analizi divljeg tipa enzima.

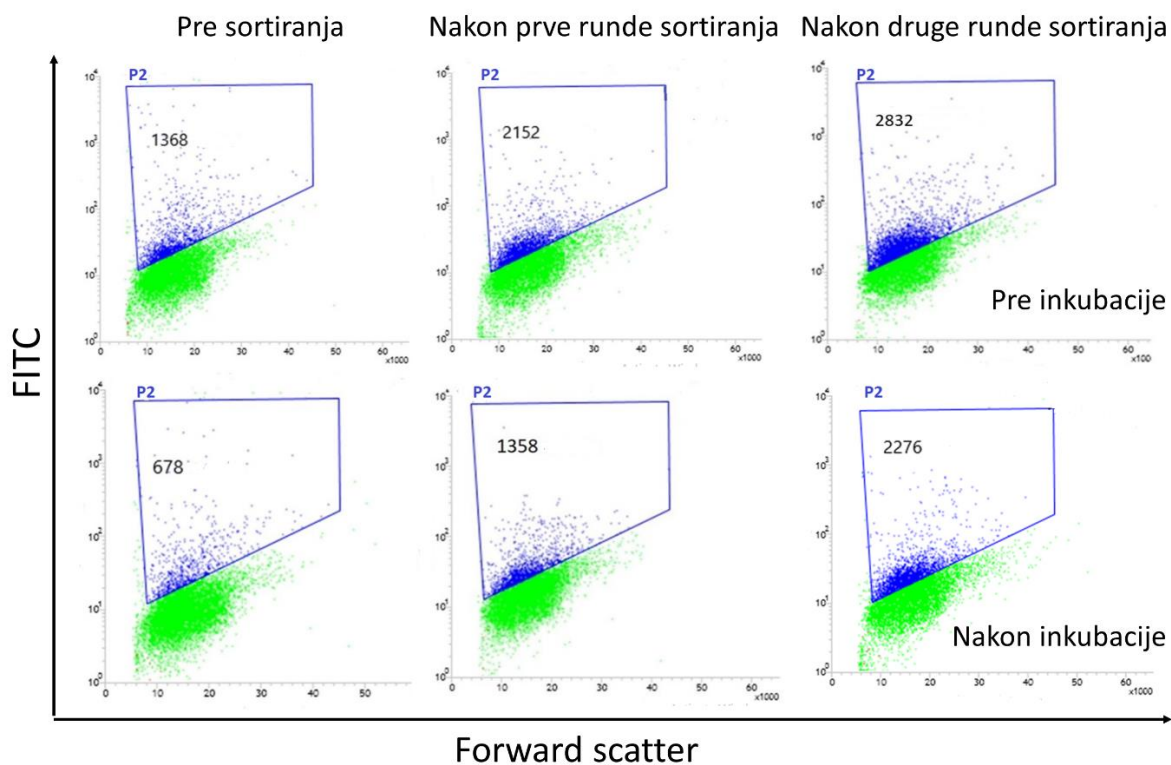


Slika 38. FACS histogrami kontrolnih ćelija i ćelija koje eksprimiraju divlji tip lignin peroksidaze pre i posle inkubacije u 30 mM H₂O₂

Nakon inkubacije ćelija koje eksprimiraju mutirane enzime u visokoj koncentraciji H₂O₂ došlo je do smanjenja broja ćelija u P2 kapiji sa 1368 na svega 678, odnosno oko 50% enzima je zadržalo svoju aktivnost.

Nakon prve runde inkubacije došlo je do porasta broja aktivnih ćelija u P2 kapiji – sa 1368 na 2152, što bi ponovo moglo da ukaže na obogaćenje biblioteke aktivnim enzimima. Nakon inkubacije ćelija nakon prve runde sortiranja u vodonik-peroksidu broj ćelija u P2 kapiji smanjio se na 1358, ali je procenat enzima koji je ostao aktivan u biblioteci porastao sa inicijalnih 50% pre sortiranja na 63%. Ovi rezultati ukazuju na obogaćenje biblioteke oksidativno stabilnim varijantama enzima, ali je nešto niži nego kod biblioteke versatilne peroksidaze gde je procenat aktivnih mutanata nakon prve runde sortiranja bio 72%.

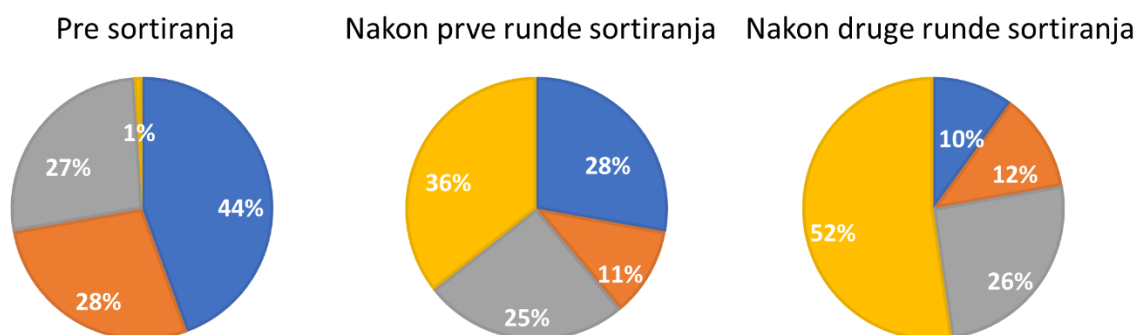
Analizom ćelija nakon druge runde sortiranja utvrđeno je da je ponovo došlo do porasta broja aktivnih ćelija u biblioteci (sa 2152 na 2832), kao i do porasta procenta aktivnih varijanti enzima u biblioteci sa 63% nakon prve runde sortiranja na 80% posle druge runde sortiranja, ukazujući na efikasnost primenjenog metoda. Dve runde sortiranja dovele su do približno istog obogaćenja biblioteka gena lignin i versatilne peroksidaze. Na osnovu sortiranja referentnih biblioteka oba enzima ustanovljeno je da se referentna biblioteka može obogatiti do čistoće nešto veće od 70%, pa se rezultati prikazani na FACS histogramima mogu smatrati vrlo zadovoljavajućim.



Slika 39. FACS histogrami dobiveni analizom ćelija koje ekspimiraju nasumične biblioteke gena lignin peroksidaze na svojoj površini u toku dve runde sortiranja pre ili nakon inkubacije u 30 mM H₂O₂

Pojedinačne kolonije ćelija kvasca pre i nakon prve i druge runde sortiranja zasejane su u pojedinačne bunare mikrotitar ploča. Nakon ekspresije enzima aktivnost pojedinačnih mutanata određena je 2,4-DCP esejem. Ćelije su zatim inkubirane u 30 mM rastvoru vodonik-peroksida i ponovo je određena aktivnost na isti način. U svaku mikrotitar ploču

uključene su tri kolonije ćelija koje ekspimiraju divlji tip enzima i tri kolonije ćelija transformisanih pCTCON2 vektorom. Na osnovu dobijenih podataka određen je procenat kolonija koje ekspimiraju neaktivne mutante enzima (ćelije koje pokazuju aktivnost manju od 10 % aktivnosti koje pokazuju ćelije koje ekspimiraju divlji tip enzima), procenat ćelija koje ekspimiraju mutante enzima manje, iste i veće oksidativne stabilnosti od divljeg tipa enzima (slika 40).



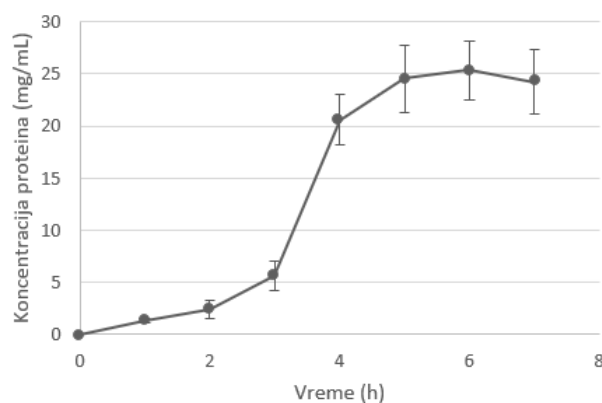
Slika 40. Prikaz broja ćelija koje ekspimiraju varijante lignin peroksidaze različite oksidativne stabilnosti pre i nakon prve i druge runde sortiranja. Narandžasta boja – ćelije koje ekspimiraju neaktivne mutante LiP; Siva boja – ćelije koje ekspimiraju mutante LiP niže oksidativne stabilnosti on wtLiP; Žuta boja – ćelije koje ekspimiraju varijante enzima sa većom oksidativnom stabilnošću od wtLiP.

Pre sortiranja ćelija broj neaktivnih mutanata u biblioteci gena lignin peroksidaze iznosio je 44%. Međutim, već nakon prve runde sortiranja ovaj broj se značajno smanjio i iznosio je 28%. Do ponovnog smanjenja procenta neaktivnih mutanata u bibliotekama gena za lignin peroksidazu došlo je i nakon druge runde sortiranja – broj neaktivnih mutanata smanjio se na 10%. Najznačajnije je povećanje procenta mutanata enzima sa povećanom oksidativnom stabilnošću u odnosu na divlji tip enzima sa 1% pre sortiranja na 36% nakon prve runde sortiranja i 52% nakon druge runde sortiranja. Ovo je u skladu sa promenama broja ćelija u P2 kapiji u toku analize sortiranih ćelija i potvrđuje efikasnost primenjenog metoda. Kolonije koje ekspimiraju najstabilnije mutante enzima iskorišćene su za sekvencioniranje gena koji kodiraju date mutante i dalje eksperimente.

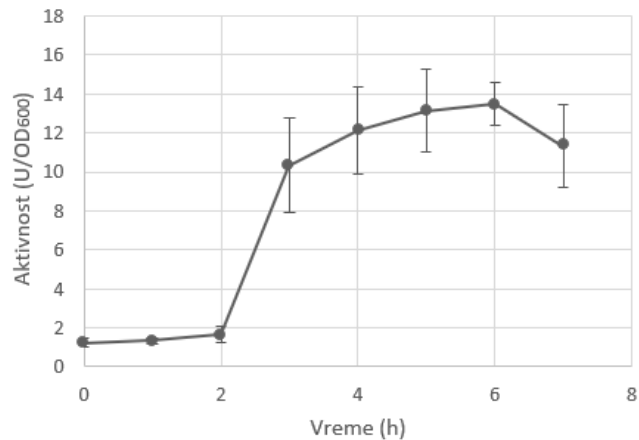
4.2.7 Selekcija oksidativno najstabilnijih varijanti versatilne peroksidaze

Povećana oksidativna stabilnost mutanata versatilne peroksidaze nakon selekcije u miktoritar pločama potvrđena je inkubacijom ćelijskih zidova kvasca obloženih versatilnom peroksidazom u 30 mM rastvoru H_2O_2 u toku 1 h. U toku dugotrajne inkubacije ćelija kvasca u visokim koncentracijama H_2O_2 dolazi do njihove lize i otpuštanja ćelijskog sadržaja u reakcionu smešu (Riberio et al., 2006). Oslobođen ćelijski sadržaj može da utiče na merenje i dovodi do nekoezistentnih rezultata. U cilju prevazilaženja ovog problem ćelije kvasca koje na površini ekspimiranu versatilnu peroksidazu ili njene mutirane varijante lizirane su i isprane od ćelijskog sadržaja. Na taj način pripremljeni ćelijski zidovi primenjeni su za određivanje oksidativne stabilnosti i u višestrukim ciklusima degradacije tekstilne boje, reaktivno crne 5.

Ćelije koje ekspimiraju versatilnu peroksidazu isprane su od medijuma i resuspendovane u 3% (v/v) smeši toluola i vode i inkubirane na 25 °C. Na početku lize i na svakih sat vremena uzeti su alikvoti i merena je enzimaska aktivnost u talogu i koncentracija proteina u supernatantu. Povećanje koncentracije proteina u supernatantu odnosi se na povećanje količine proteina oslobođenih iz ćelije u toku lize ćelija.



Slika 42. Promena koncentracije proteina u supernatantu u toku lize ćelija kvasca koje ekspimiraju versatilnu peroksidazu



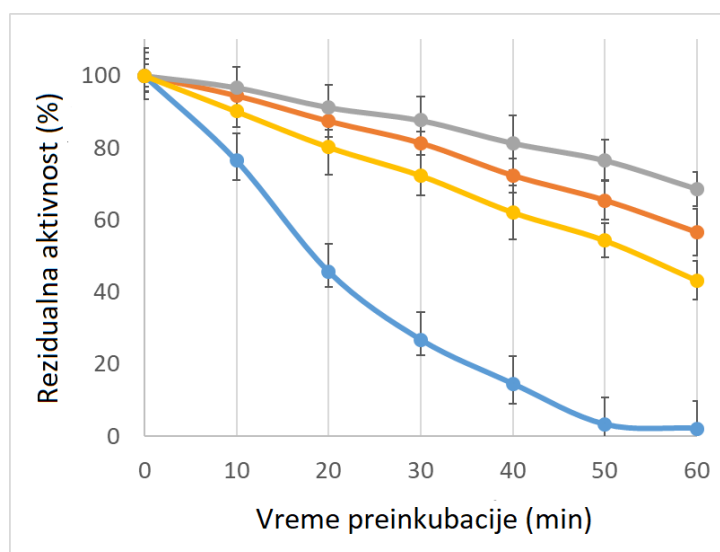
Slika 43. Promena koncentracije aktivnosti enzima u toku lize ćelija kvasca koje eksprimiraju versatilnu peroskidazu

Sa slike 42 može se videti da je koncentracija proteina oslobođenih iz ćelija postepeno rasla u toku 3 h lize, da bi naglo porasla nakon 4 h. Već nakon 5 h lize koncentracija proteina oslobođenih u supernatant dostigla je plato, pa se liza tada mogle smatrati završenom. Što se tiče aktivnosti proteina značajan porast detektovan je već nakon 3 h lize, a aktivnost je lagano rasla do 6 h (slika 43). Do porasta aktivnosti moglo je da dođe usled uklanjanja sadržaja ćelije koji je mogao da sadrži komponente koje inhibiraju enzim ili vraćaju ABTS u redukovanu formu.

Na opisan način pripremljeni su ćelijski zidovi obloženi divljim tipom versatilne peroksidaze i tri mutanta enzima selektovana nakon pretrage u mikrotitar pločama. Ćelijski zidovi resuspendovani su u 30 mM H₂O₂ u Na-tartaratnom puferu pH 3,5. Alikvoti su uzeti na početku inkubacije, nakon svakih deset minuta u toku 1 h. Ćelijski zidovi su razblaženi tako da je koncentracija H₂O₂ iznosila 0,5 mM mešanjem sa reakcionim puferom i ABTS-om kao supstratom. U svakom vremenskom intervalu određena je aktivnost enzima. Sva tri selektovana mutanta enzima pokazala su veću oksidativnu stabilnost od divljeg tipa versatalne peroskidaze (slika 43).

Aktivnost divljeg tipa pala je ispod 20% nakon svega 40 minuta inkubacije, dok više nije mogla da bude detektovana nakon 50 minuta inkubacije. Aktivnost MV1 mutanta nakon 40

minuta inkubacije pala je na oko 70% inicijalne aktivnosti, a nakon sat vremena ovaj mutant je zadržao oko 50% početne aktivnosti. MV2 mutant pokazao je još veću oksidativnu stabilnost. Rezidualna aktivnost ovog mutanta nakon 40 minuta inkubacije u 30 mM H₂O₂ bila je skoro 80%, dok je rezidualna aktivnost nakon 1 h bila više od 60%. Najstabilniji mutant enzima, MV3 je nakon 40 minuta inkubacije zadržao oko 90% aktivnosti, a nakon sat vremena skoro 70%.

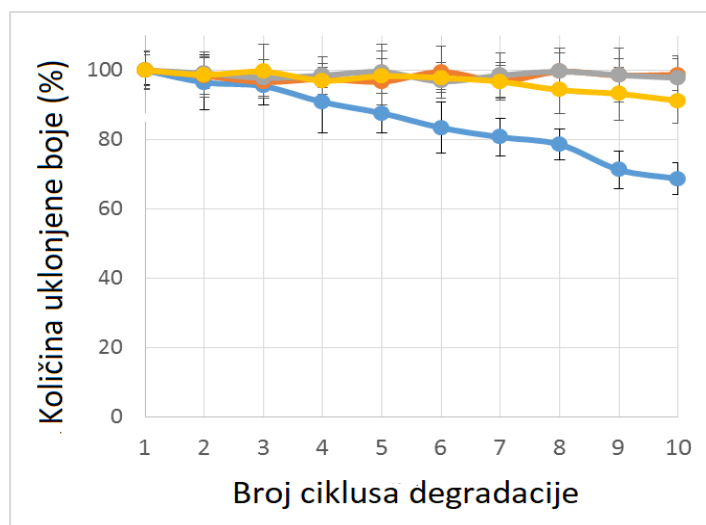


Slika 44. Rezidualna aktivnost versatilne peroksidaze i njenih mutanata nakon inkubacije u 30 mM H₂O₂.

Plavo – divlji tip VP; Žuto – MV1; Narandžasto – MV2; Sivo – MV3

Pored inkubacije u visokoj koncentraciji H₂O₂ povećana oksidativna stabilnost ovih mutanata potvrđena je i u višestrukim ciklusima degradacije reaktivno crnog 5. Čelijski zidovi obloženi versatilnom peroksidazom i njenim mutantima pomešani su sa rastvorom azo boje, reaktivno crno 5 i H₂O₂. Nakon 12 h reakcije određen je procenat degradacije boje, čelijski zidovi su isprani i resuspendovani u svežem rastvoru boje i peroksida. Urađeno je ukupno 10 ciklusa degradacije (slika 45). Divlji tip versatilne peroksidaze bio je u stanju da ukloni skoro celokupnu količinu ove boje iz reakcione smeše u prva tri ciklusa, pri čemu je svakim sledećim ciklusom aktivnost ovog enzima opadala da bi iznosila nešto manje od 70% inicijalne aktivnosti nakon 10 ciklusa. Pokazano je da je aktivnost mutanta značajno veća nakon 10 ciklusa. Mutant MV1 koji je i prethodno pokazao najnižu

oksidativnu stabilnost ukolnio je skoro celokupnu količinu boje iz reakcione smeše u toku prvih 7 ciklusa, a na kraju 10 ciklusa zadržao je skoro 90% inicijalne aktivnosti. Druga dva mutanta, MV2 i MV3 bili su u stanju da uklone skoro celokupnu količinu boje nakon svih 10 ciklusa degradacije. Na ovaj način je potvrđeno da je došlo do poboljšanja oksidativne stabilnosti kod mutiranih enzima, ali i da je to značajno unapredilo proces višestruke degradacije boja od primenom ćelijskih zidova obloženih versatilnom peroksidazom.



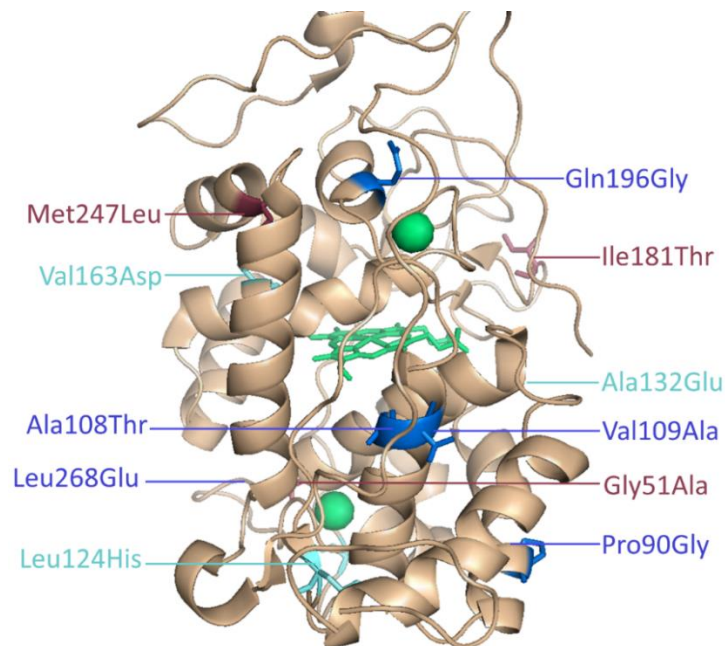
Slika 45. Višestruki ciklusi degradacije reaktivno crnog 5 ćelijskim zidovima obloženim versatilnom peroksidazom. Plavo – divlji tip VP; Žuto – MV1; Narandžasto – MV2; Sivo – MV3

Sa obzirom na to da je povećana oksidativna stabilnost ovih mutanata versatilne peroksidaze još jednom potvrđena plazmidi koji sadrže gene koji ih kodiraju izolovani su iz ćelija kvasca i sekvencionirani (tabela 42, slika 45). Broj mutacija detektovanih u mutiranim genima varirao je od 3 u MV1 i MV3 do 5 u MV2 mutantu. Sve detektovane mutacije nalazile su se na površini enzima, 4 u petljama i 9 u heliksima. Pozitivan uticaj površinski lociranih mutacija na aktivnost i stabilnost različitih enzima potvrđen je veliki broj puta (Voigt et al., 2001; Miyazaki et al., 2001; Rye et al., 2008)

Mutant MV1 sadržao je 3 mutacije, Ala32Glu, Leu124His i Val163Asp. Mutacija Val163Asp nalazi se u blizini katalitičkog Trp164 koji je esencijalan za aktivnost enzima. Ova mutacija je povećala negativno naelektrisanje u ovom regionu i na taj način bi mogla

da doprinese povećanju stabilnosti katjon radikala Trp164 (Ruiz-Dueñas et al., 2007; Pérez-Boada et al., 2005). Sve 3 supstitucije detektovane u MV1 i Leu268Glu supstitucija u MV2 zapravo su bile zamena nenaelektrisanih aminokiselina na površini naelektrisanim. Prethodno je pokazano da je ovaj tip mutacija doveo do unapređenja termalne i oksidativne stabilnosti lignin peroksidaze (Rye et al., 2008; Miyazaki et al., 2001). Ovaj tip mutacija povećava rastvorljivost enzima u polarnim rastvaračima i mogu dovesti do formiranja novih veza kako sa molekulima rastvarača tako i sa ostalim aminokiselinama iz molekula enzima, što može dovesti do stabilizacije proteina. Takođe, ovakve mutacije vrlo se često dobijaju nakon dirigovane evolucije enzima jer često nemaju negativan uticaj na aktivnost enzima, jer ne narušavaju njegovu strukturu (Rye et al., 2008; Semba et al., 2015; Emruzi et al., 2018; Zhu et al., 2020).

U strukturi mutanta MV2 detektovano je 5 mutacija, Pro90Gly, Ala108Thr, Val109Ala, Gln196Gly i Leu268Glu, od kojih je samo poslednje navedena locirana u petlji, a sve ostale u površinskim heliksima. Mutacija Gln196Gly locirana je u blizini Ca^{2+} vezujućeg mesta. Prisustvo 2 jona Ca^{2+} esencijalno je za aktivnost ligninolitčkih peroksidaza. Jon Ca^{2+} u strukturi versatilne peroksidaze učestvuje u stabilizaciji histidina koji učestvuje u koordinaciji hema. Zamena veće aminokisline malom kao što je glicin mogla je da dovede do relaksacije ovog regiona i olakša koordinaciju jona. Mutacije lokalizovane u površinskim petljama kao što je Leu268Glu detektovane su i u MV3 mutantu, Gly51Ala i Ile181Thr. Pokazano je da ovaj tip mutacija može da ima pozitivne efekte na oksidativnu stabilnost enzima, stabilnost u organskim rastvaračima i termalnu stabilnost, pri čemu imaju najmanji negativan uticaj na aktivnost istih. Mutacije u površinskim heliksima mogle su da dovedu do njihovog blagog repozicioniranja i formiranja novih stabilišućih interakcija.



Slika 46. Struktra versatile peroksidaze sa obeleženim mutiranim pozicijama. Svetlo plavo – MV1; Tamno plavo – MV2; Ljubičasti – MV3

Tabela 41. Prikaz mutacija detektovanim u sekvencijama gena za tri selektovana oksidativno stabilna mutanta versatile peroksidaze.

Mutant	Mutacija 1	Mutacija 2	Mutacija 3	Mutacija 4	Mutacija 5
MV1	Ala132Glu	Leu124His	Val163Asp	×	×
MV2	Pro90Gly	Ala108Thr	Val109Ala	Gln196Gly	Leu268Glu
MV3	Gly51Ala	Ile181Thr	Met247Leu	×	×

Pored 2 pomenute supstitucije MV3 mutant sadržao je još jednu mutaciju – Met247Leu. Met247 nalazi se u neposrednoj blizini Trp164 (3,7 Å) (Sáez-Jiménez et al., 2015). Ostaci metionina lako podležu oksidaciji koja može dovesti do inaktivacije enzima. Racionalnim dizajnom versatile peroksidaze pokazano je da supstitucija metionina upravo leucionom može dovesti do unapređenja oksidativne stabilnosti enzima (Bao, Haung, 2014; Sáez-Jiménez et al., 2015). Prijavljeno je da upravo ova mutacija (Met247Leu) povećava stabilnost enzima (Sáez-Jiménez et al., 2015), dok mutacija Met247Phe ne doprinosi stabilnosti (Bao, Haung, 2014). Na osnovu toga ne može se sa sigurnošću tvrditi da li je do

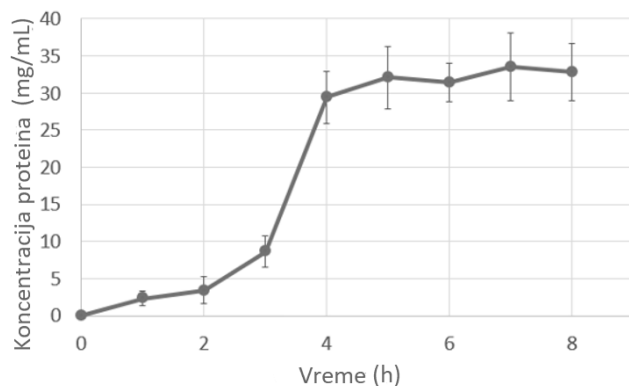
unapređenja stabilnosti enzima došlo usled uklanjanja metionina koji se lako može oksidovati ili zbog zamene aminokiseline u blizini Trp164.

Takođe, na osnovu dobivenih rezultata ne može se zaključiti da li su sve mutacije doprinele unapređenju oksidativne stabilnosti ili su neke slučajne tihe mutacije koje ne utiču ni na stabilnost ni na aktivnost versatilne peroksidaze.

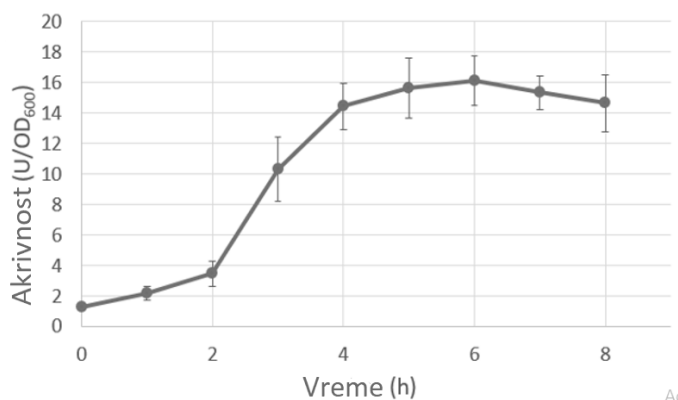
4.2.8 Selekcija oksidativno najstabilnijih varijanti lignin peroksidaze

Povećana oksidativna stabilnost mutanata lignin peroksidaze nakon selekcije u miktoritar pločama potvrđena je inkubacijom ćelijskih zidova kvasca obloženih lignin peroksidazom u 30 mM rastvoru H₂O₂ u toku 1 h. Kao što je već opisano prilikom selekcije najstabilnijih mutanata versatilne peroksidaze, u toku dugotrajne inkubacije ćelija kvasca u visokim koncentracijama H₂O₂ dolazi do njihove lize i otpuštanja ćelijskog sadržaja u reakcionu smešu (Riberio et al., 2006). Oslobođen ćelijski sadržaj može da utiče na merenje i dovodi do nekoezistentnih rezultata. U cilju prevazilaženja ovog problem ćelije kvasca koje na površini eksprimiranu lignin peroksidazu ili njene mutirane varijante lizirane su i isprane od ćelijskog sadržaja. Na taj način pripremljeni ćelijski zidovi primenjeni su za određivanje oksidativne stabilnosti i u višestrukim ciklusima degradacije tekstilne boje, Evans blue.

Ćelije koje eksprimiraju versatilnu peroksidazu isprane su od medijuma i resuspendovane u 3% (v/v) smeši toluola i vode i inkubirane na 25 °C. Na početku lize i na svakih sat vremena uzeti su alikvoti i merena je enzimska aktivnost u talogu i koncentracija proteina u supernatantu. Povećanje koncentracije proteina u supernatantu odnosi se na povećanje količine proteina oslobođenih iz ćelije u toku lize ćelija. Sa slike 47 može se videti da je koncentracija proteina oslobođenih iz ćelija postepeno rasla u toku 3 h lize, da bi naglo porasla nakon 4 h. Već nakon 5 h lize koncentracija proteina oslobođenih u supernatant dostigla je plato, pa se liza tada mogla smatrati završenom. Što se tiče aktivnosti proteina značajan porast detektovan je već nakon 3 h lize, a aktivnost je lagano rasla do 6 h (slika 48).

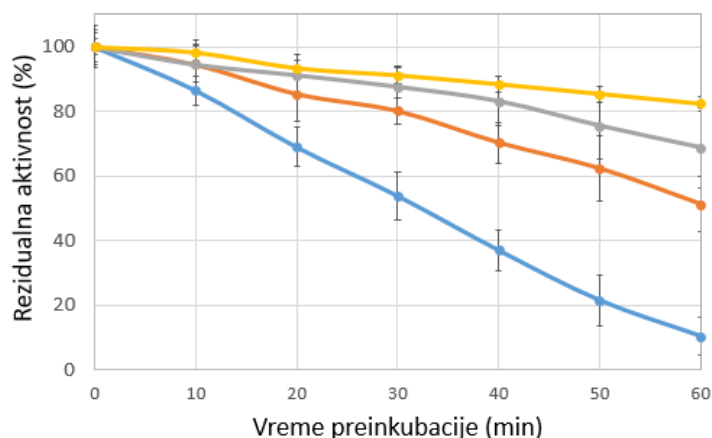


Slika 47. Promena koncentracije proteina u supernatantu u toku lize ćelija kvasca



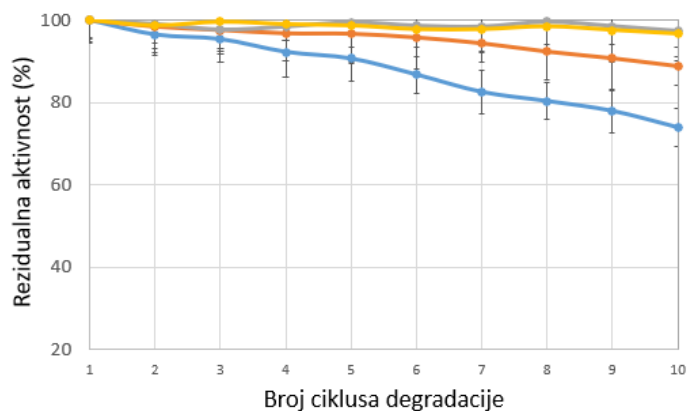
Slika 48. Promena aktivnosti lignin peroksidaze u toku lize ćelija kvasca.

Nakon pripreme ćelijskih zidova obloženih lignin peroksidazom i njenim mutantima pristupljeno je merenju rezidualne peroksidazne aktivnosti nakon preinkubacije u 30 mM H₂O₂. Ćelijski zidovi su pomešani sa H₂O₂ u 100 mM Na-acetatnom puferu pH 4,5 inkubirani u toku 1 h. Alikvoti su uzeti u momentu početka inkubacije i na svakih 10 minuta. Aktivnost je određena 2,4-DCP eseje mu mikrotitar pločama (slika 49). Pokazano je da lignin peroksidaza izgubi oko polovinu svoje aktivnosti, a nakon sat vremena inkubacije zadržava svega 10% inicijalne aktivnosti. Mutanti izabrani nakon pretrage u mikrotitar pločama pokazali su značajno veću oksidativnu stabilnost od divljeg tipa lignin peroksidaze. ML3 mutant zadržao je oko 50%, ML2 65%, a ML1 više od 80% inicijalne aktivnosti nakon 1 h inkubacije.



Slika 49. Rezidualna aktivnost lignin peroksidaze i njenih mutanata nakon inkubacije u 30 mM H₂O₂. Plavo – divlji tip LiP; Žuto – ML3; Narandžasto – ML1; Sivo – ML2

Povećanje oksidativne stabilnosti mutanata potvrđeno je i višestrukim ciklusima degradacije azo boje – Evans blue. Svaki ciklus degradacije trajao je 12 h. Nakon pojedinačnog ciklusa ćelijski zidovi su isprani i resuspendovani u novoj reakcionoj smeši (slika 50). Nakon 10 ciklusa degradacije divlji tip lignin peroksidaze zadržao je oko 75% aktivnosti, dok je ML1 mutant zadržao oko 90% aktivnosti, a druga dva selektovana mutanta zadržala su skoro celokupnu početnu aktivnost. Plazmidi koji sadrže gene za izabrane mutante lignin peroksidaze izolovani su iz ćelija kvasaca i okarakterisani.



Slika 50. Višestruki ciklusi degradacije Evans blue primenom lignin peroksidaze i njenih mutanata. Plavo – divlji tip LiP; Žuto – ML3; Narandžasto – ML1; Sivo – ML2

Sekvencioniranje gena koji kodiraju selektovane mutante enzima potvrdilo je prisustvo dve do četiri mutacija (tabela 42, slika 51). Kao i u slučaju versatilne peroksidaze sve identifikovane mutacije nalazile su se na površini, ali je ovaj put više mutacija detektovano u petljama (6), a manje u površinskim heliksima (3). Pozitivan uticaj površinski lociranih mutacija na aktivnost i stabilnost različitih enzima, uključujući i lignin peroksidazu, potvrđen je veliki broj puta (Voigt et al., 2001; Miyazaki et al., 2001; Rye et al., 2008).

Mutant ML1 imao je 3 mutacije – Gly32Ala, Met56Leu, Ala242Thr. Ostaci metionina lako podležu oksidaciji koja može dovesti do inaktivacije enzima. Racionalnim dizajnom versatilne peroksidaze pokazano je da supstitucija metionina upravo leucionom može dovesti do unapređenja oksidativne stabilnosti enzima (Bao, Haung, 2014; Sáez-Jiménez et al., 2015, Kovačević et al., 2019), međutim, uticaj supstitucije metionina u lignin peroksidazi na oksidativnu stabilnost enzima nije do sada pokazan. Zamena glicina alaninom na površini enzima u suštini predstavlja zamenu jedne male nenaelektrisane aminokiseline drugom i mogla je da dovede do promena u poziciji površinski lociranog heliksa i samim tim uspostavljanja novih veza koje mogu da dovedu do stabilizacije enzima. Supstitucija alanina treoninom dovodi do uvođenja još jedne polarne aminokiseline na površinu enzima koja bi mogla da poveća njegovu stabilnost kroz formiranje vodoničnih veza što sa molekulima vode, što sa nekom drugom aminokiselinom iz samog enzima.

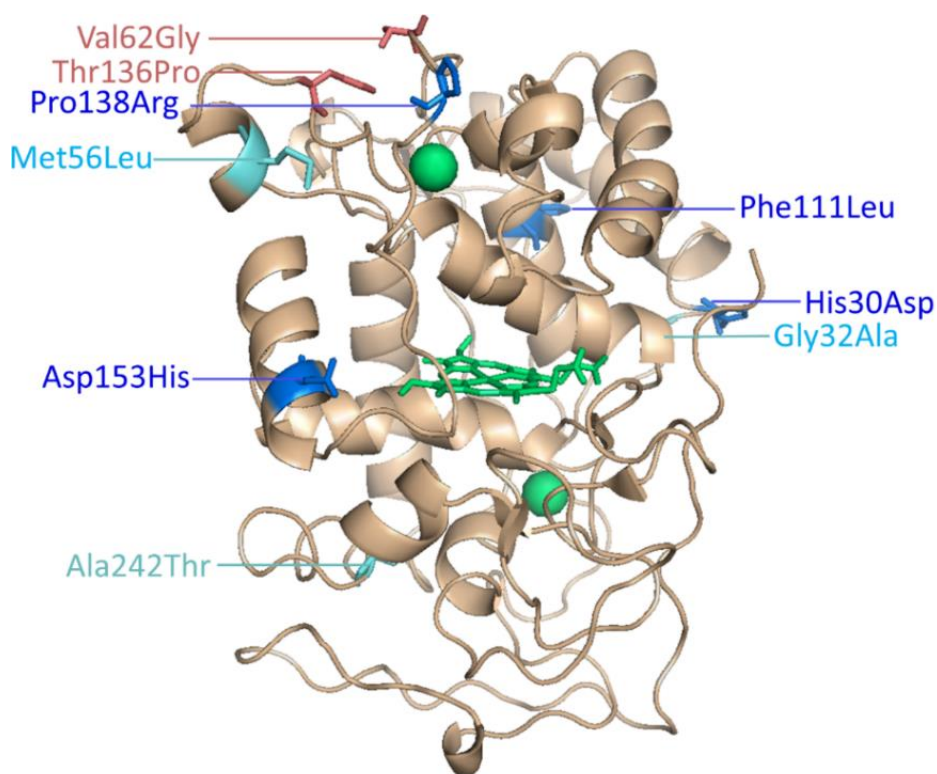
ML2 mutant imao je 2 mutacije locirane u površinskim petljama – Thr136Pro i Val62Gly. Obe mutacije locirane su u blizini proksidmalnog jona kalcijuma, esencijalnog za stabilnost i aktivnost lignin peroksidaze zbog svog uticaja na konformaciju H₂O₂ vezujućeg mesta (Miyazaki, Takahashi, 2001).

U sekvenci gena koji kodira ML3 detektovane su 4 mutacije – His30Asp, Phe111Leu, Pro138Arg i Asp153His. Tri od ove četiri mutacije utiču na naelektrisanje površine enzima. Pokazano je da ovaj tip mutacija može da ima pozitivne efekte na oksidativnu stabilnost enzima, stabilnost u organskim rastvaračima i termalnu stabilnost, pri čemu imaju najmanji negativan uticaj na aktivnost istih (Rye et al., 2008; Miyazaki, Takahashi, 2001, Zhu et al., 2020).

Takođe, na osnovu dobivenih rezultata ne može se zaključiti da li su sve mutacije doprinele unapređenju oksidativne stabilnosti ili su neke slučajne tihe mutacije koje ne utiču ni na stabilnost ni na aktivnost lignin peroksidaze.

Tabela 42. Prikaz mutacija detektovanim u sekvencijama gena za tri selektovana oksidativno stabilna mutanta lignin peroksidaze.

Mutant	Mutacija 1	Mutacija 2	Mutacija 3	Mutacija 4
ML1	Gly32Ala	Met56Leu	Ala242Thr	×
ML2	Thr136Pro	Val62Gly	×	×
ML3	His30Asp	Phe111Leu	Pro138Arg	Asp153His

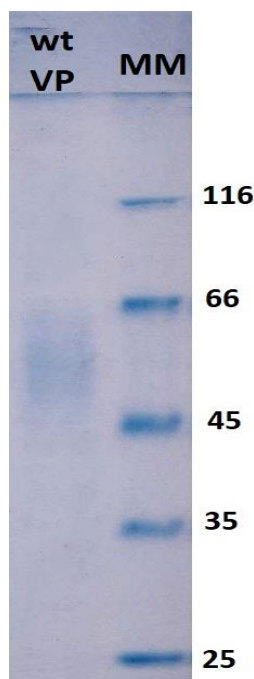


Slika 51. Struktura lignin peroksidaze sa obeleženim mutiranim pozicijama. Svetlo plavo – ML1, Ljubičasto – ML2, Tamno plavo – ML3.

4.2.9 Ekstrakcija i prečišćavanje himernih proteina Aga2-VP i njihova karakterizacija

Iako je ekspresija proteina na površini kvasca izuzetno dobra platforma za razvoj visokoeffikasnih metoda za pretragu biokatalizatora i pretragu biblioteka tačna koncentracija eksprimiranog enzima na površini ćelije ne može da se utvrdi. Ovo onemogućava precizna kinetička merenja. Kako bi se odredili kinetički parametri divljeg tipa versatilne peroksidaze i njenih mutantata Aga2-VP himerni proteini ekstrahovani su sa površine kvasca i prečišćeni jonoizmenjivačkom hromatografijom.

Nakon prečišćavanja himernih proteina urađena je SDS ploakrilamidna gel elektroforeza (slika 52). Na elektroforegramu uočena je vrlo široka traka molekulske mase između 50 i 60 kDa. Detektovana molekulska masa je veća od očekivanih 45,5 kDa (36 kDa od versatilne peroksidaze i Aga2 - 9.5 kDa).

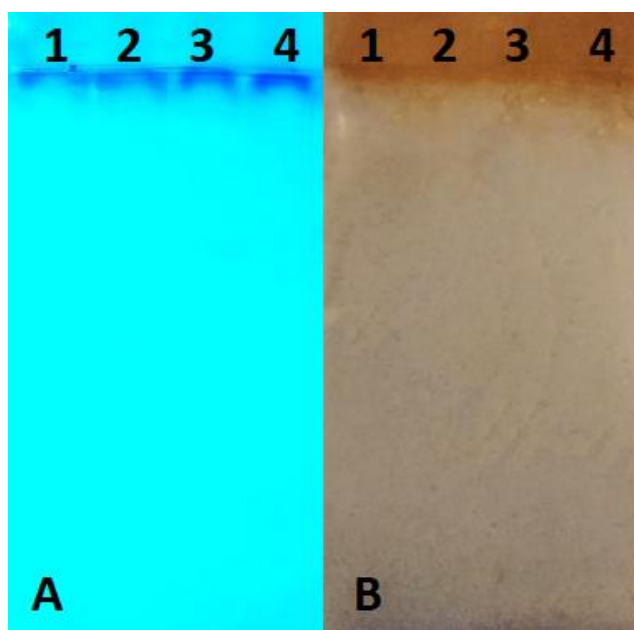


Slika 52. SDS PAGE elektroforegram divljeg tipa versatilne peroksidaze

Vrlo slični rezultati dobiveni su prilikom ekstrakcije i prečišćavanja Aga2 himere sa glukozo-oksidadom (Blažić et al., 2013). U ovom slučaju očekivana molekulska masa bila

je 74,5 kDa, a detektovana je široka traka između 100 i 140 kDa. Do ovakvog porasta molekulske mase u toku sekretovanja proteina od strane kvasca *S. cerevisiae* dolazi usled glikozilacije enzima i detektovan je i prilikom ekspresije drugih proteina (Chu, Maley, 1980).

Da bi se potvrdilo da peroksidazna aktivnost detektovana u uzorku prečišćenih himernih proteina zaista potiče od enzimske aktivnosti urađena je nativna poliakrilamidna gel elektroforeza. Polovina gela obojena je rastvorom CBB boje, a druga polovinom je inkubirana u rastvoru H₂O₂ i gvajakola u 100 mM Na-tartaratnom puferu pH 3.5 (slika 53). Bojenje CBB-om dovelo je do otkrivanja proteinskih traka na samom ulazu u gel za razdvajanje (slika 53A) koje odgovaraju tamno braon trakama pokazanim na gelu posle zimograma koje odgovaraju boji nastalog proizvoda (slika 53B). Isti rezultati su dobiveni za divlji tip peroksidaze i sva tri selektovana mutanta. Na osnovu elektroforegama može se zaključiti da proteinske trake odgovaraju trakama na zimogramu. Ponovo, proteinske trake nisu očekivane ovako visoko. Smatra se da je do toga moglo doći usled oligomerizacije Aga2 proteina u nativnim uslovima (Blažić et al., 2013).



Slika 53. Nativna poliakrilamidna gel elektroforeza (**A**) i zimogram (**B**) za versatilnu peroksidazu i njene mutante. 1 – wtVP, 2 – MV1, 3 – MV2, 4 – MV3.

Na ovaj način prečišćeni proteini iskorišćeni su za određivanje kinetičkih parametara za H₂O₂. Kinetički parametri određeni su ABTS esejem uz variranje koncentracije H₂O₂. Pri računanju kinetičkih parametara uzeta je u obzir stehiometrija reakcije (tabela 43).

Prijavljeno je da mutacija Met247Leu dovodi do sniženja i k_{cat} i K_M vrednosti za H₂O₂ u odnosu na divlji tip enzima, rezultujući u konstanti specifičnosti koja je vrlo slična divljem tipu enzima (Bao, Haung, 2014). MV3 mutant koji sadrži istu tu mutaciju pokazao je blago sniženje u oba parametra koje je isto tako rezultovalo istom konstantom specifičnosti. Ovakav uticaj na kinetičke parametre enzima može biti posledica mutacije u blizini katalitičkog Trp164 (Rye et al., 2018). Međutim, druga dva mutanta, MV1 i MV2 pokazali su značajno veću K_M vrednost od divljeg tipa enzima. MV2 3,3 puta veću, a MV3 2,3 puta veću od divljeg tipa VP, pri čemu ove promene dovode do sniženja konstante specifičnosti enzima za H₂O₂ kao supstrat (MV2 – 2,2 puta i MV3 – 1,9 puta). Sličan porast K_M vrednosti kod oksidativno stabilnih mutanata mangan peroksidaze objašnjen je smanjenjem reaktivnosti enzima sa H₂O₂ koje dovodi do sniženja brzine inaktivacije enzima (Miyazaki, H. Takahashi, 2001).

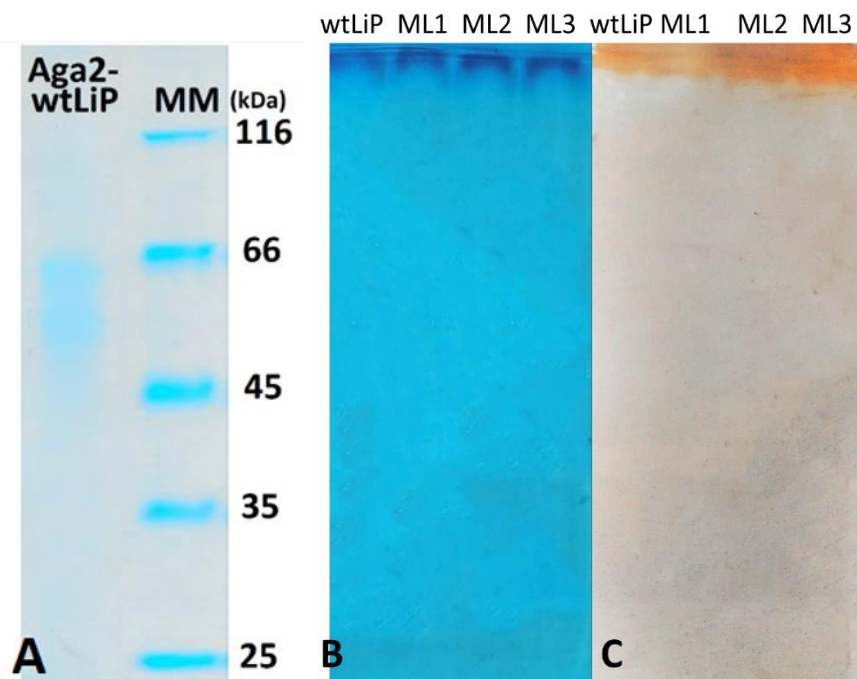
Tabela 43. Kinetički parametri određeni za Aga2-VP himerne proteine.

Parametar	wtVP	MV1	MV2	MV3
k_{cat} (s ⁻¹)	0,89±0,04	1,32±0,03	1,11±0,05	0,76±0,02
K_M (mM)	0,28±0,01	0,92±0,03	0,65±0,03	0,24±0,01
k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)	3,18	1,43	1,71	3,17

4.2.10 Ekstrakcija i prečišćavanje himernih proteina Aga2-LiP i njihova karakterizacija

Aga2-LiP himerni proteini eksprimirani na površini kvasca ekstrahovani su sa ćelijskog zida inkubacijom sa 2-merkaptetanolom i prečišćeni kao što je opisano za versatilnu peroksidazu. SDS poliakrilamidna elektroforeza ponovo je pokazala široku traku na molekulskoj masi većoj od očekivane (slika 54A). Proteinska traka je nešto više na gelu

nego u slučaju versatilne peroksidaze i nalazi se između 50 i 65 kDa iako je očekivana molekulska masa 51,5 kDa – 42 kDa od lignin peroksidaze i 9,5 kDa od Aga2 proteina. Ponovo, ova razlika posledica je mikroheterogenosti i hiperglikozilacije nakon sekrecije proteina od strane *S. cerevisiae* (Blažić et al., 2013).



Slika 54. A. SDS PAGE za divlji tip LiP. **B.** Nativna PAGE za divlji tip LiP i mutante **C.** Zimogram sa gvajakolom kao supstratom.

Da bi se potvrdilo da peroksidazna aktivnost detektovana u uzorku prečišćenih himernih proteina zaista potiče od enzimske aktivnosti urađena je nativna poliakrilamidna gel elektroforeza. Polovina gela obojena je rastvorom CBB boje, a druga polovinom je inkubirana u rastvoru H_2O_2 i gvajakola u 100 mM Na-tartaratnom puferu pH 3,5 (slika 54). Bojenje CBB-om dovelo je do otkrivanja proteinskih traka na samom ulazu u gel za razdvajanje (slika 54B) koje odgovaraju tamno braon trakama pokazanim na gelu posle zimograma koje odgovaraju boji nastalog proizvoda (slika 54C). Isti rezultati su dobiveni za divlji tip peroksidaze i sva tri selektovana mutanta. Na osnovu elektroforegama može se zaključiti da proteinske trake odgovaraju trakama na zimogramu. Ponovo, proteinske trake

nisu očekivane ovako visoko. Smatra se da je do toga moglo doći usled oligomerizacije Aga2 proteina u nativnim uslovima (Blažić et al., 2013).

Na ovaj način prečišćeni proteini iskorišćeni su za određivanje kinetičkih parametara za H₂O₂. Kinetički parametri određeni su 2,4-DCP esejem uz variranje koncentracije H₂O₂ (tabela 44).

Tabela 44. Kinetički parametri za lignin peroksidazu i izabrane mutante za H₂O₂.

Parametar	wtLiP	ML1	ML2	ML3
k_{cat} (s ⁻¹)	0,73±0,04	0,59±0,04	0,66±0,03	0,81±0,08
K_M (mM)	0,25±0,04	0,22±0,03	0,22±0,05	0,82±0,07
k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)	2,92	2,68	3,00	0,99

Uvedene mutacije su imale manji uticaj na kinetičke parametra lignin peroksidaze. Kod ML1 i ML2 došlo je do blagog snižejja k_{cat} , dok se K_M vrednost nije značajno promenila. Ovi rezultati sugerišu da povećanje oksidativne stabilnosti enzima nije imalo direktan uticaj na redukciju H₂O₂. Kinetički parametri dobiveni za ML3 varijantu lignin peroksidaze značajno se razlikuju od prethodna dva mutanta. U ovom slučaju došlo je do blagog povećanja k_{cat} vrednosti, ali i do značajnog povećanja K_M vrednosti (3,28 puta u odnosu na wtLiP). Sličan porast K_M vrednosti kod oksidativno stabilnih mutanata mangan peroksidaze objašnjen je smanjenjem reaktivnosti enzima sa H₂O₂ koje dovodi do sniženja brzine inaktivacije enzima (Miyazaki, H. Takahashi, 2001).

4.3. Unapređenje degradacije sintetičkih boja katalizovane versatilnom i lignin peroksidazom primenom saturacione mutageneze

Ligninolitički enzimi među kojima su lignin i versatilna peroksidaza imaju vrlo široku supstratnu specifičnost, a samim tim i široku primenu u procesima bioremedijacije (Falade et al., 2016). Međutim, i pored velike sličnosti u sekvenciji ova dva enzima (slika 55) i

njihovom katalitičkom mehanizmu njihova supstratna specifičnost se značajno razlikuje. Glavni supstrat lignin peroksidaze je veratril alkohol, mali fenolni molekul (Romero et al. 2019). Versatilna peroksidaza takođe ima sposobnost da oksiduje ovaj supstrat, ali sa daleko nižom efikasnošću od lignin peroksidaze. U suštini, lignin peroksidaza preferira oksidaciju malih fenolnih molekula u odsustvu redoks medijatora (Harvey et al., 1986, Tinoco et al., 2007). Versatilna peroksidaza ima visoku specifičnost za oksidaciju supstrata veće molekulske mase i kompleksnije strukture kao što su molekuli tekstilnih boja, pa se njenim supstratom izbora smatra azo boja reaktivno crno 5. Oksidacija ovog i mnogih drugih supstrata od strane lignin peroksidaze moguća je samo u prisustvu redoks medijatora koji će omogućiti povratak enzima u osnovno stanje, odnosno ponovno formiranje komponente 1. Jedan od najviše primenjivanih i najbolje opisanih redoks medijatora lignin peroksidaze je upravo veratril alkohol (Perez-Boada et al. 2005; Ruiz Duenas, Martínez, 2009).

Triptofan 171 u strukturi lignin peroksidaze okružen je sa četiri kisele aminokiseline (Glu168, Glu250, Asp165 i Asp264) dok je Trp164 u strukturi versatilne peroksidaze okružen sa dve kisele (Glu161 and Glu243), jednom baznom (Arg257) i jednom neutralnom aminokiselinom (Ser158) (slika 55). Pretpostavlja se da je upravo ova razlika u strukturi i naelektrisanju okruženja katalitičkog molekula Trp kod lignin i versatilne peroksidaze ključna za razlike u supstratnoj specifičnosti enzima (Pérez-Boada et al., 2005).

Po dve kisele aminokiseline (VP: Glu161 i Glu243, LiP: Glu168 i Glu250) konzervirane su u strukturi ligninolitičkih peroksidaza i smatra se da mogu imati značajnu ulogu u stabilizaciji katjon radikala koji se formira na molekulu triptofana u toku katalitičkog ciklusa, dok ostale aminokiseline mogu uticati na specifičnost enzima (Pérez-Boada et al., 2005; Tinoco et al, 2007; Ruiz-Dueñas et al, 2008). Tvrdnje o mogućnosti uticaja okruženja triptofana na aktivnost i specifičnost enzima potvrđene su mesto-dirigovanom mutagenozom (Pérez-Boada et al., 2005; Romero et al., 2019). Na primer, supstitucija Asp165 u strukturi lignin peroksidaze molekulom Asn dovela je do smanjenja konstante specifičnosti enzima za veratril alkohol sa $268 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ na $155 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, dok je ista mutacija

na poziciji 264 dovela do smanjenja konstante specifičnosti na $222 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (Romero et al., 2019). Takođe, zamena R257 u strukturi versatilne peroksidaze dovodi do potpunog gubitka aktivnosti ovog enzima sa bojama visokog redoks potencijala (Ruiz-Dueñas et al., 2008).

Druga velika razlika u strukturi okruženja površinskog triptofana je prisustvo dve aminokiseline sa velikim bočnim ostacima u strukturi lignin peroksidaze (L167 i F267) na pozicijama koje odgovaraju značajno manjim aminokiselinama u strukturi versatilne peroksidaze (V160 i A260) (slika 55). Zamena alanina na poziciji 260 fenilalaninom u strukturi versatilne peroksidaze rezultovala je promenom obe kinetičke konstante, k_{cat} i K_{M} ali je katalitička efikasnost enzima sa reaktivno crnim 5 ostala vrlo slična (Ruiz-Dueñas et al., 2008). Sve mutacije uvedene u ovom regionu imale su uticaj na vrednosti kinetičkih parametara versatilne peroksidaze (Pérez-Boada et al., 2005; Ruiz-Dueñas et al., 2008). Nema istraživanja koja bi pokazala efekat promena ovih aminokiselina na aktivnost lignin peroksidaze.

Kako bi se unapredila degradacija boja katalizovana dvema peroksidazama pripremljene su tri saturacione biblioteke gena u kojima su određene aminokiseline iz okruženja triptofana zamenjene sa 20 kodiranih aminokiselina. Saturaciona biblioteka versatilne peroksidaze sadržala je mutacije na dve pozicije – V160N i A260N. Biblioteka lignin peroksidaze imala je mutacije na pozicijama D165N i D264N.

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.452)

Lignin|PDBID|CH  AAVIEKRATCSNGKTVDASCCAWFDVLDLDDIQQLFHGGQCAGAEAHESIRLVFHDLSIAIS
Versatile|PDBID  -----ATCDDGRTTANAACCILFPILDDIQENLFDGANCGEVHESLRLTFHDAIGFS
                  ***.:*:*:*:*:* * :*****:***.:* * :***:*.***:*.:.:

Lignin|PDBID|CH  PAMEAQKFGGGGADGSIMIFDDIETAFHPNIGLDEIVKLOKPFVQKHGVTGDFIAFAG
Versatile|PDBID  PTL-----GGGGADGSIIAFDTIETNFPANAGIDEIVSAQKPFVAKHNISAGDFIQFAG
                  *::          *****: * * * * * . * :****. ***** *:::***** **

Lignin|PDBID|CH  AVALSNCPGAPQMNFTRAPATQPAPDGLVPEPFHTVDQI INRVNDAGEFDELELVWML
Versatile|PDBID  AVGVSNCPGGVRIPFPLGRPDVAASPDHLVPEPFDSVDSILARMGDAG-FSPVEVWLL
                  **.:*****. :: * * * * * . : ** *****:***.: * :*** * . :***:

Lignin|PDBID|CH  SAHSVAAVNDVPTVQGLPFDSTPGIFDSQFFVETQLRGTAFPGSGGNQGEVESPLPGEI
Versatile|PDBID  ASHSIAADKVDPSIPGTPFDSTPEVFDSSQFFIETQLKGRLEPFTADNKGQAQSPLOGEI
                  :*:***.:*:*:*:* * ***** :*****:***:* * **:::***.:*** **

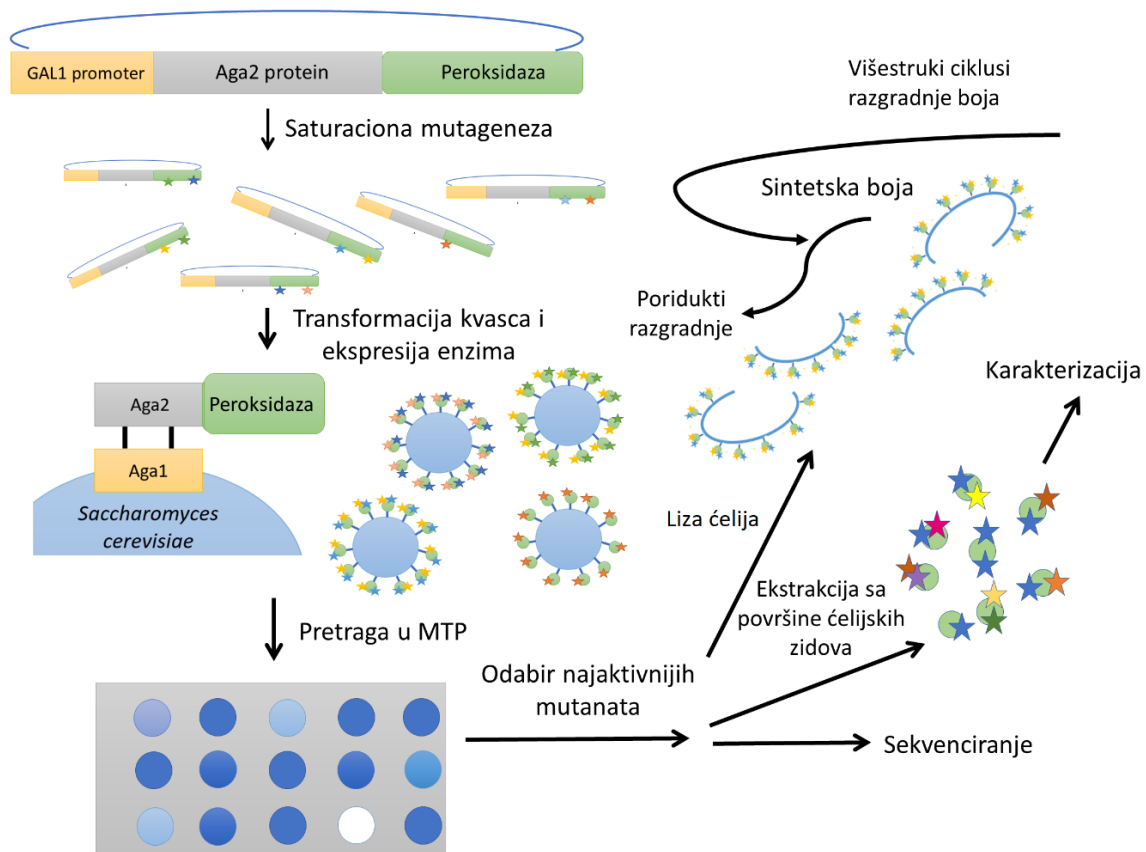
Lignin|PDBID|CH  RIQSDHTIARDSRTACEWQSFVNNQSKLVDDFQFIFLALTQLGQDPNAMTDCSDVIPQSK
Versatile|PDBID  RLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQDKTKLIDCSDVIPTPP
                  *:* * * :***.:*****:***.:* : * : : * * * . : ***** .

Lignin|PDBID|CH  PIPGNLPFSFFPAGKTIKDVQACAETPFPTLTTLPGPETSQVRIPPPFGA
Versatile|PDBID  ALVGA---AHLPAAGFSLSDVEQACAATPFPAALTADPGPVTSV---PPVPGS
                  .: *      :*:*** :*:***** *****:***: * * * * * * * * :

```

Slika 55. Poređenje sekvenci VP iz *P. eryngii* i LiP form *P. chrysosporium* urađen primenom MAFFT algoritma

Nakon kloniranja versatilne i lignin peroksidaze u pCTCON2 vektor pripremljene su tri saturacione biblioteke gena i kvasac *S. cerevisiae* EBY100 transformisan je smešama dobivenih plazmida. Po ekspresiji divljih tipova enzima i biblioteka gena na površini kvasca u mikrotitar pločama pristupljeno je pretrazi biblioteka u cilju pronalaženja mutantata koji razgrađuju različite tekstilne boje sa najvećom efikasnošću. Izabrani mutanti su sekvencionirani i pripremljeni su njima obloženi ćelijski zidovi kvasca. Ćelijski zidovi obloženi divljim tipom peroksidaza i njihovim mutiranim varijantama primenjeni su u višestrukim ciklusima degradacije boja. Mutirani enzimi su ekstrahovani sa površine kvasca, prečišćeni i okarakterisani. Pregled urađenih eksperimenata prikazan je na slici 56.



Slika 56. Pregled urađenih eksperimenata

4.3.1 Priprema saturacionih biblioteka gena

Tri saturacione biblioteke gena za versatilnu i lignin peroksidazu pripremljene su primenom QuickChange Lighting Multi Mutagenesis kita (Agilent technologies). Kao templatna DNA korišćeni su sintetički geni za versatilnu i lignin peroksidazu prethodno klonirani u pCTCON2 vektor. Sekvencije primenjenih prajmera date su u prilogu 3. Mutacije su uvedene zamenom kodona na odgovarajućoj poziciji kodonima koji kodiraju ostale aminokiseline, dok je po desetak nukleotida uzvodno i nizvodno od mesta mutagenoze u prajmerima bilo komplementarno sekvenciji peroksidaze. Istovremeno je u svaku reakcionu smešu dodato po 2 prajmera za različite mutacije. Umnožavanje celog plazmida rađeno je primenom samo *forward* prajmera, prema uputstvu proizvođača. Po završetku PCR-a koji je doveo do uvođenja mutacija u gene templatna DNA je razgrađena inkubacijom smeše sa

DpnI enzimom i reakciona smeša je direktno korišćena za transformaciju ultrakompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold.

Pripremljene su ukupno tri dvosturke saturacione biblioteke gena. Saturaciona biblioteka versatilne peroksidaze sadržala je mutacije na dve pozicije – V160N i A260N, kao i biblioteka gena lignin peroksidaze: D165N i D264N

Veličina biblioteka procenjena je na osnovu broja pojedinačnih kolonija *E. coli* XL10Gold poraslih na LB-amp pločama nakon transformacije (tabela 45). Sa obzirom na to da je broj mogućih kombinacija mutanata 400 može se smatrati da biblioteka veličine preko 10^3 mutiranih gena pokriva sve kombinacije aminokiselina na datim pozicijama.

Tabela 45. Procenjena veličina saturacionih biblioteka gena versatilne i lignin peroksidaze.

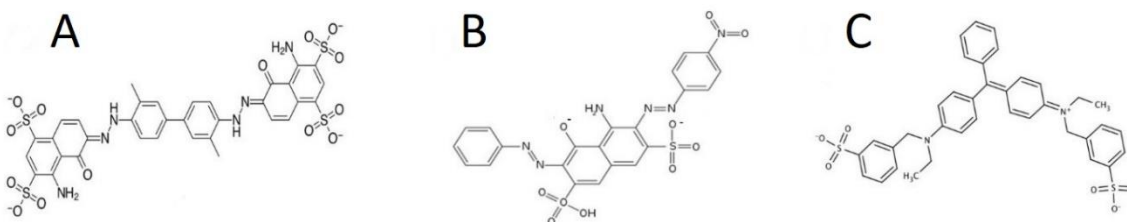
Biblioteka	Veličina biblioteke
VP V160N i A260N	8×10^3
LiP D165N i D264N	9×10^3

Uspešnost uvođenja mutacija u gene potvrđena je sekvenciranjem 10 nasumično odabranih mutanata. Rezultati sekvenciranja pokazali su da je uvođenje mutacija bilo uspešno. Svaki sekvencioniran gen imao je mutaciju ili na jednoj ili na obe pozicije i nisu uočene mutacije u ostalim regionima gena. Nije bilo preferencija u smislu tipa aminokiselina na odgovarajućim pozicijama. Kolonije *E. coli* XL10Gold prikupljene su sa LB-amp ploča i iz njih su izolovani plazmidi koji su potom iskorišćeni za transformaciju *S. cerevisiae* EBY100.

4.3.2 Pretraga saturacione biblioteke gena versatilne peroksidaze

Pojedinačne kolonije kvasca *S. cerevisiae* EBY100 transformisane smešom plazmida koji sadrže mutirane gene zasejane su u posebne bunariće mikrotitar ploče. Po ekspresiji mutiranih enzima na njihovoj površini ćelije su isprane od viška medijuma i izmerena je apsorbanca na 620 nm. Ćelije su pomešane sa različitim sintetičkim bojama (Evans

blue, Amido black 10B i Guinea green (slika 57)) i vodonik-peroksidom u 100 mM Na-tartaratnom puferu pH 3.5 tako da je finalna koncentracija boja bila 0,1 mM. Određen je procenat degradovane boje merenjem apsorbance na 620 nm i isti je standardizovan po količini ćelija u reakcionoj smeši određenoj merenjem optičke gustine na 620 nm. U svakoj mikrotitar ploči u po 3 bunarića zasejane su ćelija koje ekspimiraju divlji tip versatilne peroksidaze i ćelije koje ne ekspimiraju enzim (transformisane pCTCON2 vektorom). Ukupno je pretraženo 10 mikrotitar ploča, odnosno 900 mutanata.



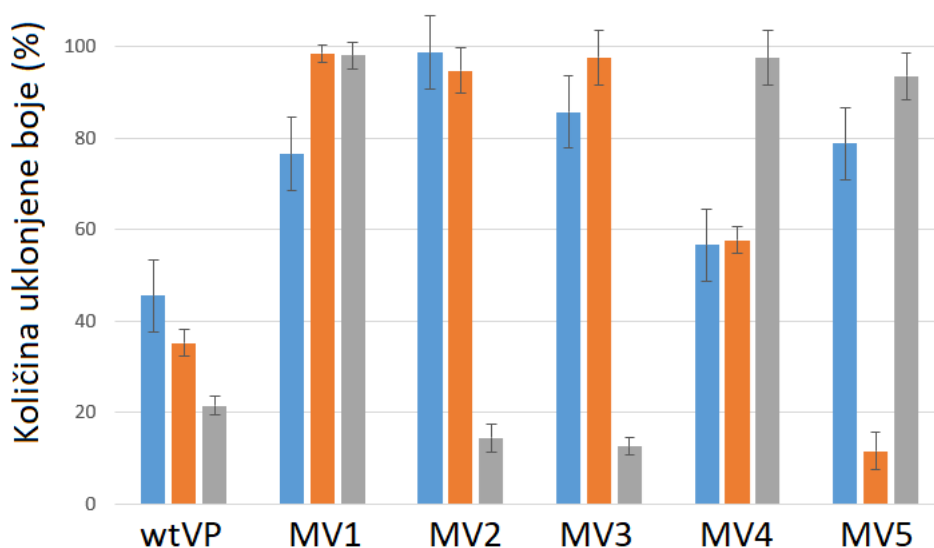
Slika 57. Struktura boja (A) Evans blue (B) Amido black 10B (C) Guinea green

U toku pretrage biblioteka gena uočena je velika raznovrsnost u aktivnosti dobivenih mutanta, a 5 kolonija koje su dovele do uklanjanja najvećeg procenta boje inokulisane su u 20 mL tečnog YNB-CAA medijuma sa glukozom i hloramfenikolom. Po ekspresiji mutiranih enzima na njihovoj površini ćelije su lizirane i ćelijski zidovi obloženi versatilnom peroksidazom i njenim mutantima su isprani od ćelijskog sadržaja.

Ovako pripremljeni ćelijski zidovi ponovo su pomešani sa rastvorom boje i peroksida i procenat uklonjene boje određen je nakon 12 h reakcije merenjem apsorbance na 620 nm (slika 58). Divlji tip versatilne peroksidaze bio je u stanju da ukloni oko 50% Evans blue, dok je mutant MV4 uklonio malo više (oko 55%).

Svi ostali izabrani mutanti uklonili su značajno veću količinu ove boje od divljeg tipa enzima. MV1, MV3 i MV5 uklonili su oko 80% boje iz reakcione smeše, dok je mutant MV2 uklonio skoro celokupnu količinu boje. Slični rezultati dobiveni su sa druge dve primenjene sintetičke boje. Divlji tip versatilne peroksidaze uklonio je oko 35% Amido black 10B, a mutanti MV1, 2 i 3 uklonili su između 90 i 99% boje. Mutant MV4 je takođe uklonio više boje od divljeg tipa enzima, oko 60%, ali je MV5 uklonio manje od 10% boje

iz reakcione smeše. Divlji tip enzima i MV2 i MV3 ukolnili su oko 20% ili manje od 20% Guinea green, a MV1, 4 i 5 skoro celokupnu količinu ove azo boje. Iz dobivenih rezultata može se videti značajan utičaj uvedenih mutacija na supstratnu specifičnost vresatilne peroksidaze, kao i to da u nekim slučajevima porast aktivnosti prema dva supstrata vodi sniženu aktivnosti sa trećim. Sa obzirom na to da su svih 5 izabranih mutanata pokazali veću sposobnost uklanjanja jedne ili više testiranih boja od divljeg tipa enzima isti su ekstrahovani sa površine kvasca i prečišćeni, kao što je prethodno opisano, a plazmidi koji sadrže gene koji ih kodiraju su izolovani iz kvasca i sekvencionirani.



Slika 58. Količina uklonjene boje nakon 12 h reakcije određena primenom ćelijskih zidova obloženih divljim tipom versatilne peroksidaze i njenim mutantima. Plavo – Evans bule, narandžasto –Amido black 10B, sivo – Guinea green.

4.3.3 Karakterizacija izabranih mutanata versatilne peroksidaze

Sekvencioniranje plazmida izolovanih iz ćelija kvasca koje su ekspimirale najaktivnije varijante enzima potvrdilo je prisustvo mutacija na jednoj ili obe ciljane pozicije (tabela 46). Na poziciji 160 na kojoj se u divljem tipu enzima nalazi valin detektovane su 3 različite aminokiseline – leucin, tirozin i izoleucin. Pri čemu su sve tri značajno veće od valina. Na poziciji 260 na kojoj se u divljem tipu nalazio alanin do mutacije nije došlo kod mutanta MV2, a u preostala 4 mutanta pronađene su 4 različite aminokiseline – serin,

glicin, arginin i valin. Od svih identifikovanih aminokiselina ni jedna nije negativno naelektrisana, a samo jedna je naelektrisana pozitivno.

Tabela 46. Identifikovane mutacije u genu za versatilnu peroksidazu.

Varijanta	Pozicija 160	Pozicija 260
WT	Val	Ala
MV1	Leu	Ser
MV2	Tyr	Ala
MV3	Tyr	Arg
MV4	Ile	Gly
MV5	Ile	Val

Nakon prečišćavanja himernih proteina određeni su kinetički parametri za divlji tip versatilne peroksidaze i 5 izabranih mutiranih proteina. Za divlji tip enzima k_{cat} vrednost za tri supstrata bila je između 0,81 i 1,17 s⁻¹, a K_M vrednost između 15,76 i 31,28 μM (tabela 48). Do sada objavljene vrednosti kinetičkih parametara za ovaj enzim bile su za k_{cat} prema reaktivno crnom 5 5,5 s⁻¹, dok je K_M vrednost bila 3,4 μM, što je u istom opsegu kao dobiveni rezultati za druge tri sintetičke azo boje sa himernim proteinima (Perez-Boada et al., 2005).

Takođe, objavljeni rezultati za Aga2 himerni protein sa glokazo-oksidazom pokazali su da su vrednosti za k_{cat} manje, a K_M veće i za divlji tip i za prijavljenog mutanta kada su u obliku himernih proteina nego kada su u pitanju solubilni proteini (Blažić et al., 2013). Do ovih promena verovatno dolazi zbog limitirane brzine difuzije molekula supstrata i proizvoda.

Kinetička karakterizacija pokazala je značajne razlike u parametrima izmerenim za divlji tip enzima i izabrane mutante, što je u skladu sa rezultatima dobivenim kod degradacije azo boja divljim tipom i mutiranim enzimima. Takođe, potvrđeno je da mutacije u okruženju triptofana utiču i na brzinu katalize reakcije, ali i na afinitet enzima prema odgovarajućem supstratu. Dobiveni rezultati prikazani su u tabeli 47.

Tabela 47. Kinetički parametri Aga2-VP himernih proteina za divlji tip enzima

Enzim	k_{cat} (s⁻¹)	K_M(μM)	k_{cat}/K_M (mM⁻¹s⁻¹)
Evans blue			
WT VP	1,17±0,2	27,52±3	42,51
MV1	1,95±0,2	7,74±1	251,94
MV2	2,95±0,1	6,54±1	451,07
MV3	2,03±0,6	37,32±7	54,39
MV4	1,30±0,2	9,92±1	110,89
MV5	1,58±0,1	8,15±0,5	193,86
Amido black 10B			
WT VP	1,05±0,4	15,76±3	66,62
MV1	5,14±0,8	6,91±1	743,85
MV2	4,64±0,8	17,53±1	260,47
MV3	6,34±0,9	5,88±1	1078,23
MV4	1,99±0,2	11,23±2	177,20
MV5	0,50±0,3	19,43±2	25,57
Guinea green			
WT VP	0,81±0,2	31,28±5	25,89
MV1	3,24±0,2	19,91±2	162,73
MV2	0,33±0,1	40,15±2	82,19
MV3	0,53±0,1	38,34±2	13,82
MV4	5,14±0,4	8,23±1	624,54
MV5	3,96±0,8	11,52±3	343,75

Vrednost k_{cat} parametra za Evans blue mutanta MV1 (Leu160, Ser260) bila je 1,7 puta veća od vrednosti dobivene za divlji tip enzima, a K_M 3,5 puta niža, što je rezultovalo u značajnom povećanju konstante specifičnosti enzima. Kod mutanata MV2 i MV3 koji imaju istu aminokiselinu na poziciji 160 (Tyr) pokazali su još veći porast u k_{cat} vrednosti, ali mutant MV2 (Ala260) imao je nižu K_M vrednost od divljeg tipa VP (4,2 puta), dok je mutant MV3 (Arg260) imao veću K_M vrednost za Evans blue od divljeg tipa (1,4 puta), sugerišući da prisustvo velike pozitivno nalektrisane aminokiseline na poziciji 260 nije odgovarajuće za degradaciju Evans blue. Dva mutanta koji imaju izoleucin na poziciji 160 imaju i veoma slične kinetičke parametre za razgradnju Evans blue – blago nižu katalitičku konstantu i značajno nižu K_M vrednost od divljeg tipa enzima, ali ova dva mutanta oba imaju i male nenaelektrisane aminokiseline na poziciji 260.

Mutanti MV1-4 pokazali su i do 6 puta veću k_{cat} vrednost od divljeg tipa enzima za degradaciju Amido black 10B, dok je mutant MV5 imao 2 puta nižu k_{cat} vrednost od divljeg tipa za degradaciju ovog supstrata. Dobiveni rezultati su u skladu sa količinom degradovane boje od strane mutanata i divljeg tipa enzima na površini ćelijskih zidova, pri čemu je samo MV5 doveo do razgradnje manje količine ove azo boje od divljeg tipa enzima. Dobiveni rezultati ukazuju na negativan uticaj prisustva valina na poziciji 260 za degradaciju Amido black 10B. Najveća konstanta specifičnosti za razgradnju Amido black 10B dobivena je za MV3 (Tyr160, Arg260), 16 puta veća nego kod divljeg tipa enzima.

Mutanti MV1, 4 i 5 imali su značajno veće vrednosti k_{cat} i niže vrednosti K_M za Guinea green kao supstrat od divljeg tipa enzima, pri čemu je najveća konstanta specifičnosti zabeležena kod mutanta MV4 (24 puta veća nego kod divljeg tipa versatilne peroksidaze). U degradaciji Guinea green najbolje su se pokazala upravo dva mutanta koja imaju mutaciju alanina na poziciji 160 u tirozin. Međutim, i varijante sa mutacijom alanina u izoleucin na poziciji 160 pokazale su značajno povećanje u k_{cat} vrednosti za Guinea green – MV4 imao je 6,3 puta veći k_{cat} od divljeg tipa enzima.

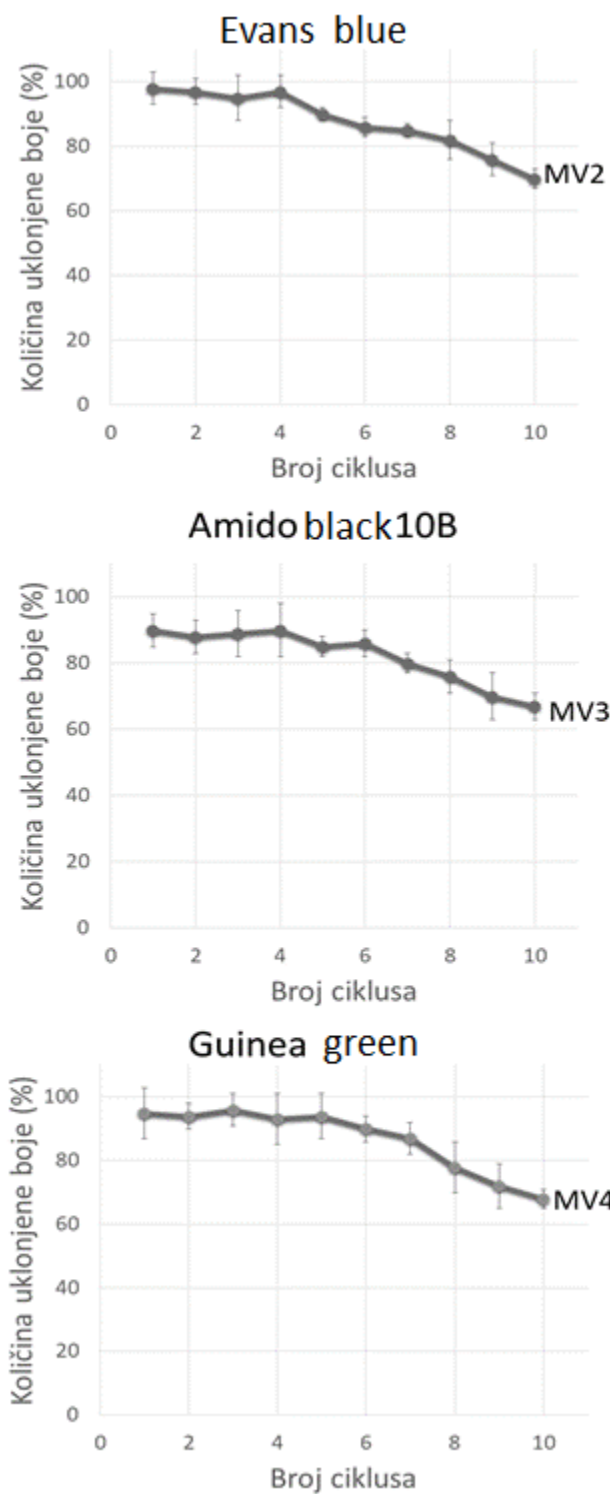
Dobiveni rezultati ukazali su na to da mutacije u regionu triptofana 164 značajno utiču na supstratnu specifičnost enzima. Najveće promene zabeležene su na poziciji 160 gde je mala

nenaelektrisana aminokiselina alanin zamenjena značajno većim aminokiselinama tirozinom, leucinom i izoleucinom. Kod 5 izabranih mutanata tirozin je detektovan 2 puta. Ova aromatična aminokiselina mogla bi da dovede do unapređenja LERT puta u versatilnoj peroksidazi i na taj način doprinese njenoj sposobnosti da degraduje azo boje. Najveći broj aminokiselina detektovanih na poziciji 260 bile su male i nenaelektrisane, sa izuzetkom arginina kod mutanta MV3. Međutim, iako su bile prisutne u sekvencijama nasumično izabranih mutanata ni jedan od izabranih mutanata nije imao negativno naelektrisanu aminokiselinu na ciljanim pozicijama. Ovo je i očekivano usled negativnog naelektrisanja azo boja. Kao što je ranije naznačeno, najveći problem u degradaciji sintetičkih tekstilnih boja je upravo raznovrsnost njihove sturkture, a mutacijom dve aminokiseline postignut je porast u katalitičkoj efikasnosti za sve tri testirane boje.

4.3.4 Višestruki ciklusi degradacije boja mutantima versatilne peroksidaze

Kako bi enzimi mogli da budu primenjeni kao biokatalizatori u procesima bioremedijacije mora biti obezbeđena njihova višestruka primena i njihovo uklanjanje iz reakcionih smeša (Datta et al., 2013). Ovo se može postići imobilizacijom enzima na čvrstim podlogama, ali veliki broj metoda imobilizacije enzima dovodi do parcijalne inaktivacije enzima i limitacije njihove aktivnosti usled restrikcije difuzije molekula (Datta et al., 2013). Ovi problemi se mogu prevazići *in situ* imobilizacijom enzima njihovom ekspresijom na površini ćelija (Kuroda, Ueda, 2013; Cherf, Cochran, 2015). Na primer, ćelije kvasca sa eksprimiranim enzimima na površini mogu se koristiti kao biokatalizatori za višestruku upotrebu (Gai, Wittrup, 2007).

Kako bismo testirali stabilnosti i mogućnost višestruke upotrebe ćelijskih zidova kvasca obloženih mutantima versatilne peroksidaze isti su primenjeni za degradaciju azo boja u većem broju ciklusa. Svaki ciklus degradacije trajao je 12 časova i po njegovom završetku ćelijski zidovi su isprani i pomešani sa svežim rastvorom boje i vodonik-peroksida. Za degradaciju sve tri testirane boje izabrani su najaktivniji mutirani enzimi – MV2 za Evans blue, MV3 za Amido black 10B i MV4 za Guinea green (slika 59).

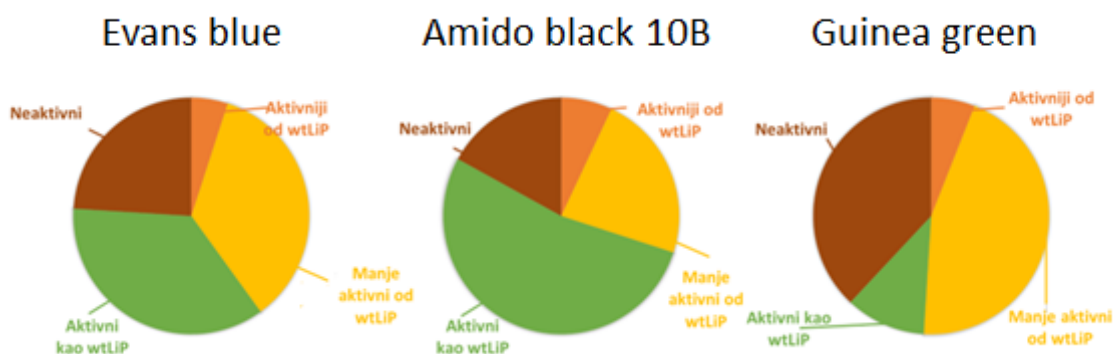


Slika 59. Višestruki ciklusi degradacije boja mutantima versatilne peroksidaze.

Sva tri mutanta uspešno su uklonila skoro celokupnu količinu tekstilnih boja iz reakcione smeše u toku prvih 5 ciklusa. Od šestog do desetog ciklusa procenat nerazgrađene boje lagano se povećavao, ali je u svakom slučaju i nakon deset ciklusa iz reakcione smeše uklonjeno više od 60% boje pokazujući efikasnost razvijene bioremedijacione platforme.

4.3.5 Pretraga saturacione biblioteke gena lignin peroksidaze

Pojednjačne kolonije kvasca *S. cerevisiae* EBY100 transformisane smešom plazmida koji sadrže mutirane gene zasejane su u posebne bunariće mikrotitar ploče. Po ekspresiji mutiranih enzima na njihovoj površini ćelije su isprane od viška medijuma i izmerena je apsorbanca na 620 nm. Ćelije su pomešane sa različitim sintetičkim bojama (Evans blue, Amido black 10B i Guinea green), vodonik-peroksidaom i veratril alkoholom u 100 mM Na-tartaratnom puferu pH 3,5 tako da je finalna koncentracija boja bila 0,1 mM. Određen je procenat degradovane boje merenjem apsorbance na 620 nm i isti je standardizovan po količini ćelija u reakcionoj smeši određenoj merenjem optičke gustine na 620 nm. U svakoj mikrotitar ploči u po 3 bunarića zasejane su ćelija koje ekspimiraju divlji tip versatilne peroksidaze i ćelije koje ne ekspimiraju enzim (transformisane pCTCON2 vektorom). Ukupno je pretraženo 10 mikrotitar ploča, odnosno 900 mutanata.



Slika 60. Prikaz broja mutanata koji su bili neaktivni nakon uvođenja mutacija i mutanata koji su pokazali manju aktivnost od lignin peroksidaze, istu aktivnost kao divlji tip enzima ili veću aktivnost od divljeg tipa enzima.

Pretraga saturacione biblioteke gena lignin peroksidaze pokazala je prisustvo mutiranih enzima sa velikim razlikama u aktivnosti (slika 60). Raznovrsnost profila degradacije boja od strane mutiranih enzima ukazala je na značajan uticaj mutiranih pozicija na supstratnu specifičnost ali i samu aktivnost enzima. Procenat neaktivnih varijanti varirao je između 17 i 38%, ali veliki broj neaktivnih varijanti nije pokazivao aktivnost ni sa jednom bojom. U ovom slučaju došlo je do potpune inaktivacije enzima ili promenom topologije oktuženja triptofana i narušavanjem LRET puta ili usled uvođenja stop kodona u gensku sekvenciju. Procenat varijanti aktivniji od divljeg tipa lignin peroksidaze varirao je od 5 do 7, u zavisnosti od boje. Različiti profili razgradnje boja i jesu očekivani usled velikih razlika u njihovoj strukturi. Deset mutanata koji su uklonili najveću količinu jedne ili više boja iz reakcione smeše sekvencionirani su i okarakterisani.

4.3.6 Karakterizacija izabranih mutanata lignin peroksidaze

Sekvencioniranje izabranih mutanata lignin peroksidaze potvrdilo je prisustvo mutacija u genima za lignin peroksidazu, ali je i pokazalo veliku raznovrsnost u tipu uvedenih aminokiselina (tabela 48). Na poziciji 165 identifikovano je 5 aminokiselina pored originalnog Asp: Val, Gly, Glu, Arg, kao i na poziciji 264 Gly, Ile, Val, Glu, Ala.

Himerni proteini Aga2-LiP ekstrahovani su sa sa površine kvasca i prečišćeni kao što je prethodno opisano. Kinetičke konstante za tri različite tekstilne boje određene su u prisustvu H₂O₂, veratril alkohola i različitim koncentracijama boja, Evans blue, Amido black 10B i Guinea green. Primećene su značajne varijacije između kinetičkih parametara divljeg tipa lignin peroksidaze i izabranih mutanata enzima (tabela 49).

Zamena negativno naelektrisanih aspartata u divljem tipu lignin peroksidaze malim nenaelektrisanim aminokiselinama na obe pozicije u varijantama M11, ML3 i ML7 imale su različit efekat na razgradnju različitih tekstilnih boja. ML1 mutant (Asp165Val, Asp264Gly) pokazao je značajno veću katalitičku efikasnost u odnosu na divlji tip peroksidaze – konstanta specifičnosti bila je 6,6 puta veća, pre svega usled povećanja afiniteta ka supstratu (K_M vrednost je bila 5,3 puta manja od vrednosti za divlji tip). Za razliku od Evans blue i k_{cat} i K_M vrednosti značajno su promenjene kod razgradnje druge

dve boje. ML1 k_{cat} vrednost bila je 2,7 puta veća za Amido black 10B i 1,7 puta veće od divljeg tipa za Guinea green, dok je K_M vrednost bila 1,2 puta manja za Amido black 10B i 2,5 puta manja od divljeg tipa za Guinea green.

Tabela 48. Identifikovane mutacije u genu za lignin peroksidazu.

Variant	Pozicija 165	Pozicija 264
wtLiP	Asp	Asp
ML1	Val	Gly
ML2	Glu	Gly
ML3	Gly	Gly
ML4	Glu	Asp
ML5	Ser	Ile
ML6	Val	Asp
ML7	Val	Val
ML8	Arg	Glu
ML9	Asp	Ala
ML10	Arg	Gly

U slučaju ML3 mutanta (Asp165Gly, Asp264Gly) promena valina iz ML1 mutanta u glicin na poziciji 165 značajno je povećala katalitičku konstantu za Evans blue – 3,6 puta veća u odnosu na divlji tip. Ovaj mutant je pokazao još veću aktivnost pri razgradnji Amido black 10B i Guinea green usled povećanja kinetičke konstante 4,5 puta, a zatim i konstante specifičnosti 3 puta u odnosu na divlji tip.

U slučaju mutanta ML7 (Asp165Val, Asp264Val) prisustvo dva valina na selektovanim pozicijama nije imalo značajan uticaj na kinetičke parametre za Evans blue u odnosu na divlji tip enzima ali je smanjilo kinetičku konstantu 4 puta u odnosu na ML3 i konstantu specifičnosti 6 puta u odnosu na ML1, pokazujući da je kombinacija glicina i valina na pozicijama 165 i 264 najbolja za razgradnju ove boje. Međutim, konstanta specifičnosti ML7 mutanta bila je 3 puta veća od divljeg tipa enzima za guinae zeleno, pa se može smatrati da je ova kombinacija sa dva valina bolja za degradaciju Guinea green.

U suštini, može se zaključiti da je zamena dve negativno naelektrisane aminokiseline u regionu triptofana lignin peroskidaze dovela do unapređenja degradacije azo boja.

Zamena Asp264 malim, nenaelektrisanim aminokiselinama pri čemu je Asp165 zadržan u strukturi mutanta (ML9: Asp264Ala) ili zamena iste drugom negativno naelektrisanom aminokiselinom (ML2: Asp165Glu, Asp264Gly) takođe je imala značajan uticaj na degradaciju boja. Mutacije u varijanti ML2 nisu imale uticaj na kinetičke parametre za Evans blue i Guinea green, ali su unapredile kinetičku konstantu za Amido black 10B 6,8 puta u odnosu na divlji tip enzima što je dovelo do povećanja konstante specifičnosti 3,3 puta. ML9 pokazao je povećan afinitet prema Evans bluemu smanjenjem K_M vrednosti 4,6 puta u odnosu na divlji tip enzima, dok je došlo do unapređenja i kinetičke konstante i konstante specifičnosti za Amido black 10B, 1,8 puta i 4,4 puta, tim redosledom i za Guinea green, 2,4 i 2,3 puta, tim redosledom. Ovi rezultati sugerišu da mutacija Asp264Ala ima pozitivan efekat na degradaciju ove dve boje. Mutacija Asp165Glu u mutantu ML4 povećala je aktivnost enzima sa sve tri boje povećavajući k_{kat} vrednost oko 2 puta i katalitičku efikasnost enzima više od dva puta u odnosu na divlji tip enzima za Amido black 10B i Guinea green, ali i više od 5 puta za Evans blue u odnosu na divlji tip enzima.

Mutacije u ML5 (Asp165Ser, Asp264Ile) nisu pokazale značajan uticaj na razgradnju Evans blue ali su blago povećale katalitičku efikasnost lignin peroksidaze za druge dve analizirane boje. Dva mutanta imala su mutaciju aspartata na poziciji 165 u arginin – ML8 i 10, prevodeći negativno naelektrisanje u pozitivno, pri čemu je ML8 zadržao originalni aspartat na poziciji 264 dok je ML10 imao mutaciju Asp264Gly. Uvođenje arginina u okruženje triptofana 171 u strukturi lignin peroksidaze povećalo je k_{cat} vrednost za Evans blue 5 puta uz malo smanjenje afiniteta ka supstratu. Dodatna mutacija Asp264Gly u ML10 varijanti dovelo je do povećanja katalitičke konstante ali i do povećanja afiniteta za Evans blue 6 puta u odnosu na divlji tip enzima. Oba mutanta su takođe pokazala 3 do 4 puta manje K_M vrednosti za Amido black 10B.

Tabela 49. Kinetički parametri Aga2-LiP himera divljeg tipa i izabranih mutanata

Enzim	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} mM^{-1}$)
Evans blue			
wtLiP	0,55±0,07	31,21±2	17,62
ML1	0,68±0,05	5,85±2	116,24
ML2	0,42±0,02	32,80±2	12,80
ML3	2,01±0,20	67,90±4	29,60
ML4	0,84±0,08	8,37±1	100,36
ML5	0,93±0,09	52,21±2	17,81
ML6	0,75±0,07	18,21±3	41,19
ML7	0,53±0,05	30,64±3	17,30
LM8	3,53±0,40	49,32±3	71,57
ML9	0,58±0,05	6,83±1	84,92
ML10	1,11±0,06	4,92±1	225,61
Enzim	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} mM^{-1}$)
Amido black 10B			
wtLiP	0,31±0,09	22,48±2	13,79
ML1	0,85±0,2	17,98±3	47,27
ML2	2,11±0,1	46,19±4	45,68
ML3	0,53±0,09	21,53±3	24,62
ML4	0,65±0,08	21,65±1	30,02
ML5	0,45±0,05	9,10±1	49,45
ML6	0,91±0,05	51,40±4	17,70
ML7	0,46±0,09	7,54±1	61,01
LM8	0,71±0,08	5,51±1	128,86
ML9	0,57±0,1	9,53±1	59,81
ML10	0,26±0,04	6,54±1	39,75

Enzim	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Guinea green			
wtLiP	0,41±0,03	45,51±2	9,01
ML1	0,71±0,08	18,43±1	38,52
ML2	0,43±0,2	44,56±3	9,65
ML3	1,85±0,1	66,65±5	27,76
ML4	0,82±0,1	45,32±4	18,09
ML5	1,23±0,09	81,23±6	15,14
ML6	0,49±0,08	61,23±6	8,00
ML7	0,56±0,06	20,63±5	27,14
LM8	0,95±0,1	82,24±6	11,55
ML9	0,99±0,08	48,24±3	20,52
ML10	0,36±0,08	33,34±3	10,98

Najveći broj mutacija uticao je na oba kinetička parametra značajnim povećanjem kinetičke konstante uz manje smanjenje afiniteta ka supstratu, koje je rezultovalo povećanjem katalitičke efikasnosti (ML3, ML8 za Evans blue; ML3 i ML6 za Amido black 10B i ML3 i ML5 za Guinea green). U drugom slučaju došlo je do blažeg povećanja kinetičke konstante ali i do značajnog povećanja afiniteta ta supstratu (ML1, ML9 i ML10 za Evans blue; ML5, ML7, ML8, ML9 i ML10 za Amido black 10B i ML1 za Guinea green).

Vrlo slična situacija bila prijavljena je za versatilnu peroksidazu kada su mutacije uvedene u region Trp164. Na primer mutacija Ser158Asp povećala je afinitet versatilne peroksidaze za reaktivno crno 5 2,4 puta, a blago je smanjilo k_{cat} , finalno dovodeći do povećanja konstante specifičnosti 2,2 puta (Perez-Boada et al., 2005).

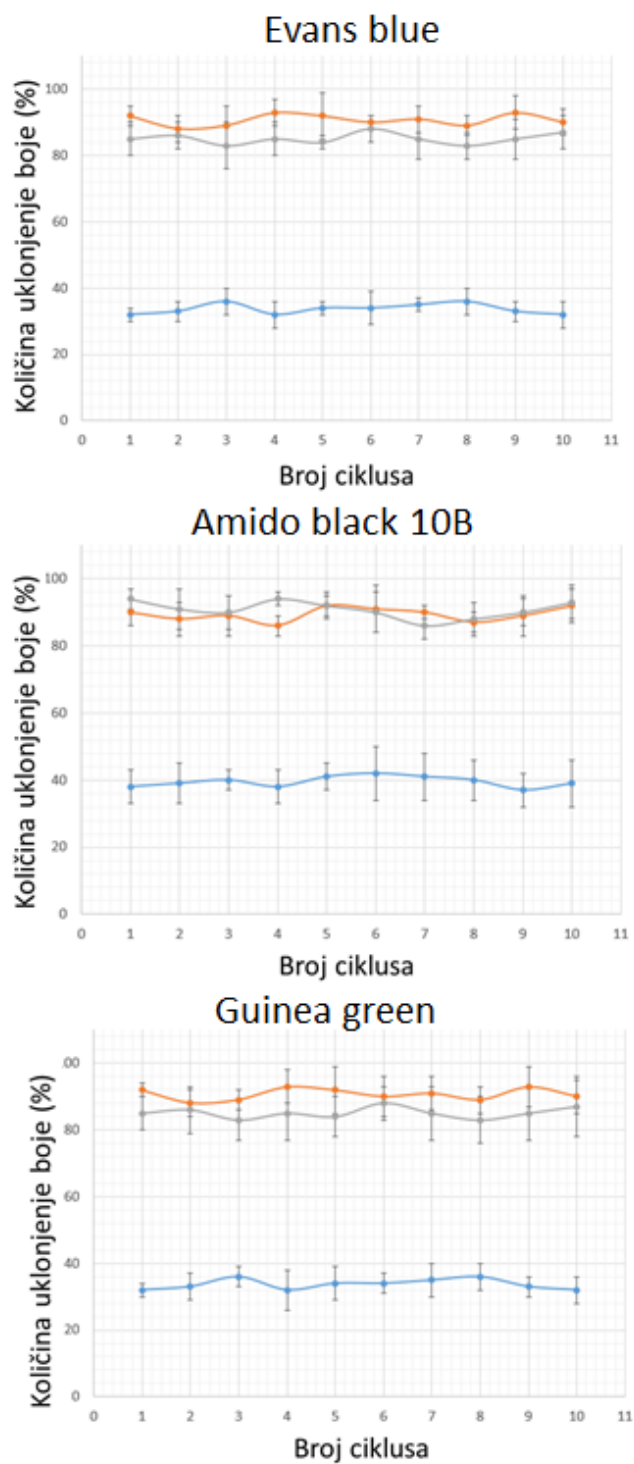
4.3.7 Višestruki ciklusi degradacije boja mutantima lignin peroksidaze

Mutanti lignin peroksidaze koji su pokazali najveću aktivnost u toku razgradnje tri azo boje ekspimirani su na površini kvasca. Čelije kvasca su lizirane i pripremljeni su ćelijski zidovi kao što je prethodno opisano. U cilju provere primenljivosti mutiranih enzima koji oblažu ćelijske zidove kvasca isti su primenjeni u višestrukim ciklusima degradacije boja.

Ćelijski zidovi obloženi lignin peroksidazom pomešani su sa rastvorom boje, vodonik peroksidom i veratril alkoholom i inkubirani 8 h. Nakon 8 h reakcije ćelijski zidovi su isprani i dodata im je sveža reakciona smeša. Ukupno je urađeno 10 ciklusa. Aktivnost izabranih mutiranih enzima upoređena je aktivnošću divljeg tipa lignin peroksidaze.

Primenom divljeg tipa lignin peroksidaze nakon prvog ciklusa razgrađeno je oko 60% Evans blue, ali je primenom mutanata ML3 i ML9 ovaj procenat porastao na 99 (slika 61). Aktivnost divljeg tipa enzima, kao i svih mutanata ostala je konstanta u vremenu u toku svih deset ciklusa uz manje oscilacije koje su verovatno posledica greške samog merenja. Kod upotrebe mutanata versatilne peroksidaze i njenih mutanata u cilju degradacije boja pokazano je da se aktivnost smanjivala nakon petog ciklusa degradacije. Međutim, ciklusi degradacije boja versatilnom peroksidazom trajali su 12 h jer je koncentracija boja bila veća, a i ispitivanja oksidativne stabilnosti, prethodno opisana pokazala su da je lignin peroksidaza nešto stabilnija od versatilne.

Prilikom razgradnje Amido black 10B i Guinea green dobiveni su slični rezultati. Divlji tip enzima bio je u stanju da ukloni oko 40% Amido black 10B iz reakcione smeše, dok su ML2 i ML6 uspeli da uklone više od 95% boje. U toku 10 ciklusa degradacije Guinea green divlji tip enzima uklonio je oko 35% boje po ciklusu. Mutant ML9 uklonio je oko 85% boje po ciklusu, a ML3 više od 95%.



Slika 61. Višestruki ciklusi razgradnje azo boja. Plavo – divlji tip LiP; Evans blue: narandžasto - ML3, sivo – ML8; Amido black 10B: narandžasto – ML2, sivo – ML6; Guinea green: narandžasto - ML3, sivo – ML9.

6. Zaključci

- Uspešnost kloniranja lignin i versatilne peroksidaze u pCTCON2 ekspresioni vektor potvrđena je sekvencioniranjem dobivenih konstrukata. Ovo je omogućilo ekspresiju dve ligninolitičke peroksidaze na površini ćelija kvasca *S. cerevisiae* EBY100.
- Variranjem nekoliko različitih parametara optimizovani su uslovi za ekspresiju enzima. Zaključeno je da je neophodan dodatak 5-aminolevuleinske kiseline i da je optička gustina ćelija u momentu indukcije ekspresije gena ključna za postizanje reproduktivnih rezultata. Dodatak prekursora za sintezu hema omogućio je dovoljnu količinu ovog kofaktora za ekspresiju peroksidaza. Niska koncentracija ćelija ($OD_{600}=3.5-4$) podrazumeva da se ćelije nalaze u logaritamskoj fazi rasta.
- Ekspresija peroksidaza na površini ćelija kvasca omogućila je razvoj metoda za visokoefikasnu pretragu biokatalizatora primenom fluorescencijom aktiviranog ćelijskog sortiranja zasnovanog na tiramid-fluoresceinskom eseju bez dodatne kompartmentalizacije ćelija. Efikasnost metoda potvrđena je sortiranjem referentnih biblioteka gena pri čemu je procenat ćelija koje eksprimiraju enzim podignut sa 5% pre sortiranja na 69% za versatilnu peroksidazu i 71% za lignin peroksidazu.
- Nasumične biblioteke gena lignin i versatilne peroksidaze uspešno su pripremljene primenom *Mutazyme* DNA polimeraze i ultra-kompetentnih ćelija *E. coli* XL10Gold. Veličina biblioteka bila je između 1 i 3×10^6 , a prisustvo mutacija u genima potvrđeno je sekvencioniranjem nasumično odabranih mutanata. Pripremljene biblioteke gena su sortirane primenom razvijenog enzimskog eseja.
- Analiza ćelija divljeg tipa peroksidaza protočnom citometrijom pre i nakon preinkubacije ćelija 20 minuta u 30 mM H_2O_2 pokazala je da dolazi do smanjenja broja ćelija koje eksprimiraju aktivan enzim, pri čemu je zaključeno da navedeno

vreme i koncentracija peroksida mogu da se primene u cilju sortiranja nasumičnih biblioteka gena za povećanje oksidativne stabilnosti ligninolitičkih peroksidaza.

- Pre sortiranja procenat analiziranih ćelija iz biblioteka gena koje eksprimiraju varijante enzima oksidativno stabilnije od divljih tipova obe peroksidaze bio je oko 1%, dok je isti nakon dve runde sortiranja povećan na 52% za lignin peroksidazu i 56% za versatilnu peroksidazu. Analiza FACS histograma takođe je pokazala povećanje broja ćelija koje eksprimiraju aktivan enzim nakon preinkubacije ćelija u visokoj koncentraciji vodonik-peroksida nakon prvog i drugog ciklusa sortiranja ćelija.
- Unapređenje oksidativne stabilnosti izabranih najstabilnijih mutanata nakon analize sortiranih ćelija u mikrotitar pločama potvrđena je preinkubacijom ćelijskih zidova obloženih lignin i versatilnom peroksidazom i njihovim mutantima u istoj koncentraciji vodonik-peroksida. Dok se aktivnost versatilne peroksidaze više nije mogla detektovati nakon 50 minuta inkubacije rezidualna aktivnost mutanat bila je između 50 i 80%. Slično je zabeleženo za lignin peroksidazu. Nakon sat vremena preinkubacije u visokoj koncentraciji vodonik-peroksida divlji tip lignin peroksidaze zadržao je svega 10% aktivnosti, dok je rezidualna aktivnost tri izabrana mutanta bila između 50 i 80%.
- Povećanje oksidativne stabilnosti mutiranih enzima potvrđeno je u višestrukim ciklusima degradacije tekstilnih boja. Dok su divlji tipovi enzima do desetog ciklusa izgubili i do 30% svoje aktivnosti neki od mutanata skoro potpuno su zadržali svoju inicijalnu aktivnost. Navedeni rezultati potvrdili su da je povećanje oksidativne stabilnosti unapredilo proces degradacije boja katalizovan ligninolitičkim peroksidazama.
- Sekvencionirane gene koji kodiraju izabrane mutirane gene potvrdile su prisustvo mutacija u genima. Sve uvedene mutacije bile su locirane na površini enzima. Veliki broj uvedenih mutacija bile su promene nenaelektrisanih aminokiselina u

naelektrisane. Na ovaj način moglo je da dođe do stabilizacije enzima usled uspostavljanja stabilizujućih interakcija sa molekulima rastvarača ili formiranja sonih mostova sa drugim aminokiselinama iz molekula proteina. Ovaj tip mutacija je vrlo čest kod mutanata sa povećanom stabilnošću, prevashodno jer nema veliki uticaj na aktivnost enzima. Takođe, uočene su mutacije u blizini vezivnih mesta za jone kalcijuma, neophodne za stabilizaciju hema u centralnoj šupljini enzima. Po jedan mutant lignin i versatilne peroksidaze imao je mutaciju metionina u leucin. Do sada je pokazano da se metionini lako oksiduju i na taj način mogu da dovedu do inaktivacije enzima.

- Divlji tipovi i mutirani enzimi ekstrahovani su sa površine ćelija kvasca u obliku himernih proteina sa Aga2 proteinom. Njihova analiza SDS PAGE pokazala je prisustvo širokih traka veće molekulske mase od očekivane usled glikozilacije proteina nakon njihove sekrecije iz ćelije kvasca. Činjenica da aktivnost potiče od samog enzima potvrđena je zimogramom. Proteinske trake nalazile su se na samom ulazu u gel, verovatno usled oligomerizacije Aga2 proteina.
- Na ovaj način prečišćeni himerni proteini iskorišćeni su za određivanje kinetičkih parametara divljih tipova enzima i njihovih mutanata. Veći broj mutiranih enzima pokazao je slične vrednosti k_{cat} kao i divlji tipovi enzima, ali i veće vrednosti za K_M . U ovim slučajevima može se pretpostaviti da je do povećanja stabilnosti enzima došlo usled smanjenja reaktivnosti sa vodonik-peroksidom, a samim tim i usporavanja procesa inaktivacije.
- Uspešnost pripreme saturacionih biblioteka gena lignin peroksidaze (D165N, D264N) i versatilne peroksidaze (V160N, A260N) potvrđena je sekvencioniranjem. Po ekspresiji biblioteka gena iste su pretražene u mikrotitar pločama u cilju pronalaska mutiranih enzima sa povećanom aktivnošću za degradaciju tri tekstilne azo boje – Evans blue, Amido black 10B i Guinea green.

-
- Analiza dobivenih rezultata pokazala je da mutacije na odabranim pozicijama imaju značajan efekat na supstratnu specifičnost enzima. Mutirani enzimi koji su pokazali najveću aktivnost u degradaciji jedne ili više testiranih boja su sekvencionirani, ekstrahovani sa površine kvasca i okarakterisani.
 - Primenom saturacione mutageneze u regionu katalitičkog triptofana katalitička efikasnost enzima poboljšana je i do 16 puta u odnosu na divlji tip enzima. Sve aminokiseline detektovane na poziciji 160 bile su značajno veće od originalno prisutnog alanina. U dva mutanta identifikovano je prisustvo tirozina, aromatične aminokiseline koja bi mogla da dovede do unapređenja u LRET puta. Aminokiseline detektovane na poziciji 260 bile su značajno manje i nenaelektrisane sa izuzetkom arginina u jednom mutiranom genu. Na ovaj način dobiveni su mutanti sa povećanom katalitičkom efikasnošću za razgradnju sve tri testirane boje.
 - Raznovrsnost aminokiselina detektovanih u genima koji kodiraju mutirane enzime lignin peroksidaze bila je značajno veća. Ponovo, identifikovani su mutirani enzimi sa unapređenom katalitičkom efikasnošću za degradaciju sve tri primenjene boje (do 13 puta većom od divljeg tipa enzima). Mutacije su u najvećem broju slučajeva dovele do blagog povećanja k_{cat} i značajnijeg smanjenja K_M vrednosti koje je dovelo do povećanja konstante specifičnosti. U slučajevima kada je došlo do značajnijeg povećanja katalitičke konstante došlo je i do smanjenja afiniteta za određenu boju.
 - Čelijski zidovi obloženi ligninolitničkim peroksidazama i njihovim mutantima primenjeni su u višestrukim ciklusima degradacije boja. Dobiveni rezultati pokazali su da su mutirani enzimi bili sposobni da uklone značajno veći procenat sve tri boje iz reakcione smeše od divljih tipova enzima. Lignin peroksidaza, kao i njeni mutanti zadržali su skoro celokupnu aktivnost nakon 10 ciklusa degradacije boja. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je primena čelijskih zidova kvasca obloženih lignin i versatilnom peroksidazom vrlo efikasan način *in situ* imobilizacije enzima koji omogućava višestruku primenu u uklanjanju tekstilnih boja.

7. *Literatura*

Abadulla, E., Robra, K., Gübitz, G., Silva, L.M., Cavaco-Paul, A. 2000. Enzymatic decolourization of textile dyeing effluents. *Text. Res. J.* 70, 409–414.

Abdel-Hamid, A.M., Solbiati, J.O., Cann, I.K.O. 2013. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 82, 1–28.

Aharoni, A., Thieme, K., Chiu, C.P., Buchini, S., Lairson, L.L., Chen, H., Strynadka, N.C., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G. 2006. High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases. *Nat. Methods* 3, 609–614.

Ahrens, M.J., Morrisey, D.J. 2005. Biological effects of unburnt coal in the marine environment. *Oceanog. Marine Biol.* 43, 69–122.

Alam, M.Z., Mansor, M.F., Jalal, K.C.A. 2009. Optimization of decolorization of methylene blue by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium*. *J. Hazard. Mater.* 162, 708–715.

Amin, K.A., Abdel Hameid, H., Abd Elsttar, A.H. 2010. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2994–2999.

Andreadeli, A., Platis, D., Tishkov, V., Popov, V., Labrou, N.E. 2008. Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP⁺. *FEBS J.* 275, 3859–3869.

Arnold, F.H. 2001. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 409, 253–257.

Asgher, M., Ahmad, Z., Iqbal, H.M.N. 2013. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio- ethanol production. *Indust. Crops Produc.* 44, 488–495.

Ayala-Aceves, M., Baratto, M.C., Basosi R, Vázquez-Duhalt R, Pogni R. 2001. Spectroscopic characterization of a manganese–lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein-centred radical by hydrogen peroxide. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 16, 159–167.

Bao, X., Haung, X. 2014. Improvement of hydrogen peroxide stability of *Pleurotus eryngii* versatile ligninolytic peroxidase by rational protein engineering. *Enz. Microb. Tech.* 54, 51–58.

Baret, J.C., Miller, O.J., Taly, V., Ryckelynck, M., El-Harrak, A., Frenz, L., Rick, C., Samuels, M.L., Hutchison, J.B., Agresti, J.J., Link, D.R., Weitz, D.A., Griffiths, A.D. 2009. Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab. Chip.* 9, 1850–1858.

Becker, S., Hobenreich, H., Vogel, A., Knorr, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K. E., Reetz, M. T., Kolmar, H. 2008. Single-cell high-throughput screening to identify enantioselective hydrolytic enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 5085–5088.

Beckman, R.A., Mildvan, A.S., Loeb, L.A. 1985. On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry* 24, 5810–5817.

Ben-David, A., Shoham, G., Shoham, Y. 2008. A universal screening assay for glycosynthases: directed evolution of glycosynthase XynB2 (E335G) suggests a general path to enhance activity. *Chem. Biol.* 15, 546–551.

Benkhaya, S., El Harfi, S., El Harfi A. 2017. Classifications, properties and applications of textile dyes: A review *Appl. J. Envir. Eng. Sci.* 3, 311–320.

-
- Bershtein, S.; Tawfik, D.S. 2008. Advances in laboratory evolution of enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 151-158.
- Blažič, M., Kovačević, G., Prodanović, O., Ostafe, R., Gavrović-Jankulović, M., Fischer, R., Prodanović, R. 2013. Yeast surface display for the expression, purification and characterization of wild-type and B11 mutant glucose oxidases. *Prot. Expr. Pur.* 89, 175-180.
- Blodig, W., Smith, A.T., Doyle, W.A., Piontek, K. 2001. Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* 305, 851-861.
- Bloom, J.D., Labthavikul, S.T., Otey, C.R., Arnold, F.H. 2006. Protein stability promotes evolvability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 5869–5874.
- Boder, E.T., Wittrup, K.D., 2000. Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity and stability. *Method. Enzymol.* 328, 430-444.
- Boder, E.T., Wittrup, K.D. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.*, 15, 553-557.
- Boersma, Y. L., Droge, M. J., van der Sloot, A. M., Pijning, T., Cool, R. H., Dijkstra, B. W., Quax, W. J. 2008. A novel genetic selection system for improved enantioselectivity of *Bacillus subtilis* lipase A. *Chem. bio. chem.* 9, 1110–1115.
- Bommarius, A.S., Paye, M.F. 2013. Stabilizing biocatalysts. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6534-6565.
- Borgo, B., Havranek, J.J. 2012. Automated selection of stabilizing mutations in designed and natural proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 1494-1499.
- Bornscheuer, U.T., Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C., Robins, K. 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485, 185-194.
- Brender, J.R., Shultis, D., Khattak, N.A., Zhang, Y. 2017. An Evolution-Based Approach to De Novo Protein Design. *Methods Mol. Biol.* 1529, 243-264.
- Buswell, J.A. 1991. Fungal degradation of lignin. In *Handbook of Applied Mycology Soil and Plants*. 1, 425–480. Marcel Dekker Inc., Madison, USA.
- Cadwell, R.C.; Joyce, G.F. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 2, 28-33.
- Caramero, S., Ruiz-Duenas, F. J., Sarkar, S., Martinez, M. J. and Martinez, A. T. 2000. The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. *FEMS Microbiol. let.* 191, 37-43.
- Caramero, S., Sarker, S., Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, M.J. and Martinez, A.T. 1998. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biological Chem.* 274, 10324-10330.
- Chang, J.-S., Lin, C.-Y. 2001. Decolorization kinetics of a recombinant *Escherichia coli* strain harboring azo-dye-decolorizing determinants from *Rhodococcus sp.* *Biotechnol. Lett.* 23, 631–636.
- Chaput, J.C., Woodbury, N.W., Stearns, L.A., Williams B.A. 2008. Creating protein biocatalysts as tools for future industrial applications. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 8, 1087-1098.
- Chen, J., Yu, H., Liu, C., Liu, J., Shen, Z. 2012. Improving stability of nitrile hydratase by bridging the salt-bridges in specific thermal-sensitive regions. *J. Biotechnol.* 164, 354-362.
- Chen, K.Q., Arnold, F.H. 1991. Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *Biotechnol.* 9, 1073-1077.

-
- Chen, Y., Stemple, B., Kumar, M., Wei, N. 2016. Cell Surface Display Fungal Laccase as a Renewable Biocatalyst for Degradation of Persistent Micropollutants Bisphenol A and Sulfamethoxazole. *Eviron. Sci. Tech.* 50, 8799-8808.
- Cherf, G.M., Cochran, J.R., 2015. Applications of yeast surface display for protein engineering. *Methods Mol. Biol.* 1319, 155-175.
- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K. H., Piontek, K. 1999. The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C β of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle. *J. Mol. Biol.* 286, 809–827.
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H., Vyas, B.R.M. 2005. Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase- catalyzed oxidative decolorization of Remazol brilliant blue R. *Enzyme Microb. Tech.* 36, 426–431.
- Christman, R.F., Oglesby, R.T. 1971. Microbiological degradation and the formation of humus. In *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions.* 769–795. Wiley Intersciences, New York, USA.
- Christopher, L. P., Yao, B., Ji, Y. 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Front. energy res.* 2, 1-13.
- Chu, F.K., Maley, F. 1980. The effect of glucose on the synthesis and glycosylation of the polypeptide moiety of yeast external invertase. *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 6392–6397.
- Cicerone, M., Giri, J., Shaked, Z., Roberts, C. 2015. Protein stability - an underappreciated but critical need for drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 93, 1.
- Cline, J., Braman, J.C., Hogrefe, H.H. 1996. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 24, 3546-3551.
- Cox, E.C. 1976. Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation. *Annu. Rev. Genet.* 10, 135-156.
- Cullen, D., Kersten, P.J. 2004. Enzymology and molecular biology of lignin degradation. In *the mycota III, biochemistry and molecular biology.* 2nd ed. 249–273. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne.
- Salvachúa, D. A. Prieto, M.L. Mattinen, T. Tamminen, T. Liitiä, M. Lille, S. Willför, A.T. Martínez, M.J. Martínez, C.B. Faulds. Versatile peroxidase as a valuable tool for generating new biomolecules by homogeneous and heterogeneous cross-linking. *Enz. Microb. Tech.* 52 (2013) 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.03.010>
- Daniel, R.M., Danson, M.J., Hough, D.W., Lee, C.K., Peterson, M.E., Cowan, D.A. 2008. Enzyme stability and activity at high temperatures. Nova Science Publishers, New York.
- Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S., 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnol.* 3, 1–9.
- Draeos, Z.D. 2015. A split- face evaluation of a novel pigment- lightening agent compared withno treatment and hydroquinone. *J. Amer. Acade. Dermatol.* 72, 105–107.
- Duran, R., Deschler, C., Precigou, S., Goulas, P. 2002. Degradation of chlorophenols by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of 3,4- dichlorophenol on extracellular peroxidase activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 284–288.
- Dwevedi, A., Kayastha, A.M., 2012. Enzyme immobilization: a breakthrough in enzyme technology and boon to enzyme-based industries. *Proteome Res.* J. 3, 333.
- Eckert, K.A., Kunkel, T.A. 1991. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl.* 1, 17-24.
- Edwards, S.L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M.H., Poulos, T.L. 1993. Crystal structure of lignin peroxidase. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 90, 750–754

-
- Eijsink, V.G., Bjork, A., Gaseidnes, S., Sirevag, R., Synstad, B., van den Burg, B., Vriend, G. 2004. Rational engineering of enzyme stability. *J. Biotechnol.* 113, 105-120.
- Emruzi, Z., Aminzadeh, S., Karkhane, A.A., Alikhajeh, J., Hagjbeen, K., Gholami, D. 2018. Improving the thermostability of *Serratia marcescens* B4A chitinase via G191V site-directed mutagenesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 116, 64-70.
- Eriksson, K.E., Blanchette, R.A., Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. In Springer Series in Wood Science Springer-Verlag, Heidelberg, Germany 407.
- Fagerstedt, K.V., Kukkola, E.M., Koistinen, V.V.T., Takahashi, J., Marjamaa, K. 2010. Cell wall lignin is polymerised by class II secretable plant peroxidases in Norway spruce. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 186–194.
- Falade, A.O., Nwodo, U.U., Iweriebor, B.C., Green, E., Mabinya L.V., Okoh, A.I. 2017. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiol. Open* 6, e00394.
- Farrell R., Murtagh, K., Tien, M. 1989. Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 322-328,.
- Fernández-Fueyo, E., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T. 2014. Engineering a fungal peroxidase that degrades lignin at very acidic pH. *Biotechnol. Biofuels* 7, 114-126.
- Fernández-Fueyo, E., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T., 2014. Engineering a fungal peroxidase that degrades lignin at very acidic pH. *Biotechnol. Biofuels* 7, 114-126
- Ferreira-Leitao, V.S., Andrade de Carvalho, M.E., Bon Elba, P.S. 2007. Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: comparison to reported methods. *Dyes Pigm.* 74, 230–236.
- Ferrer, M., Martínez-Martínez, M., Bargiela, R., Streit, W.R., Golyshina, O.V., Golyshin, P.N. 2016. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. *Microb. Biotechnol.* 9, 22-34.
- Fujii, R., Kitaoka, M., Hayashi, K. 2004. One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res.* 32, e145.
- Furukawa, T., Bello, F.O., Horsfall, L. 2014. Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation. *Front. Biol.* 9, 448–471.
- Gai, S.A., Wittrup, K.D., 2007. Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 17, 467-473.
- Garcia-Ruiz, E., Gonzalez-Perez, D., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T., Alcalde M., 2012. Directed evolution of a temperature-, peroxide- and alkaline pH-tolerant versatile peroxidase. *Biochem. J.* 441 (2012) 487-498.
- Giardina P, Palmieri G, Fontanella B, Rivieccio V, Sanna G. 2000. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Archiv. Biochem. Biophys.* 376, 171–179.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2, 31-34.
- Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M., Gold, M.H. 1983. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 1077–1083.
- Goddard, J.P., Reymond, J.L., 2004. Enzyme assays for high-throughput screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 314-322.
- Gold, M.H., Youngs, H.L., Gelpke, M.D. 2000. Manganese peroxidase. *Metal ions Biol. Syst.* 37, 559–586.

-
- Guaratini C.C.I., Zanoni, M.V.B. 2000. Textile Dyes. *Química Nova* 23, 71-78.
- Haider, K., Trojanowski, J. 1980. A comparison of the degradation of ¹⁴C labeled DHP and corn stalk lignins by micro- and macrofungi and bacteria. In *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications*. 1, 111–134. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Hammel, K.E., Cullen, D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 349–355.
- Harvey, P.J., Palmer, J. M. 1990. Oxidation of phenolic compounds by ligninase. *J. Biotechnol.* 13, 169–179.
- Haseltine, E.L., Arnold, F.H. 2007. Synthetic gene circuits: design with directed evolution. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 1-19.
- Henke, E., Bornscheuer, U.T. 1999. Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay. *Biol. Chem.* 380, 1029-1033.
- Hertzberg, R.P., Pope, A.J. 2000. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 445-451.
- Hida, K., Hanes, J., Ostermeier, M. 2007. Directed evolution for drug and nucleic acid delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1562-1578.
- Higuchi, T. 1983. Biosynthesis and microbial degradation of lignin. In *the new frontiers in plant biochemistry*. 23–46. Japan Scientific Society Press, Tokyo, Japan.
- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24, 23–63.
- Hiner, A.N., Hernández-Ruíz, J., Rodríguez-López, J.N., García-Canovas, F., Brisset, N.C. Smith A.T., et al. 2002. Reactions of the class II peroxidases, lignin peroxidase and *Arthromyces ramosus* peroxidase, with hydrogen peroxide. Catalase-like activity, compound III formation, and enzyme inactivation. *J. Biol. Chem.* 277, 26879–26885.
- Hopman, A.H.N., Ramaekers, F.C.S., Speel, E.J.M. 1998. Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and uorochrome-labeled tyramides and their application for in situ hybridization using CARD amplification. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 771-777
- Huebner, A., Olguin, L. F., Bratton, D., Whyte, G., Huck, W. T., de Mello, A. J., Edel, J. B., Abell, C., Hollfelder, F. 2008. Development of quantitative cell-based enzyme assays in microdroplets. *Anal. Chem.* 80, 3890–3896.
- Ivancich, A., Mazza, G., Desbois, A. 2001. Comparative electron paramagnetic resonance study of radical intermediates in turnip peroxidase isozymes. *Biochem.* 40, 6860–6866.
- Jarosz-Wilkolazka, A., Kochmanska-Rdest, J., Malarczyk, E., Wardas, W., Leonowicz, A. 2002. Fungi and their ability to decolorize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme Microb. Tech.* 30, 566-572.
- Johansson, T., Welinder, K.G., Nyman, P. O. 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white- rot basidiomycete *Trametes versicolor*. II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 57–62.
- Kabe, Y., Osawa, T., Ishihara, A., Kabe, T. 2005. Decolorization of coal humic acid by extracellular enzymes produced by white-rot fungi. *Coal Prep.* 25, 211–220.
- Kawai, S., Umezawa, T., Higuchi, T. 1988. Degradation mechanisms of phenolic b-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Archiv. Biochem. Biophys.* 262, 99–110.

-
- Kegler-Ebo, D.M., Docktor, C.M., Di Maio, D., 1994. Codon cassette mutagenesis: a general method to insert or replace individual codons by using universal mutagenic cassettes. *Nucleic Acids Res.*, 1994, 1593-1599.
- Kelly, R.M., Leemhuis, H., Gatjen, L., Dijkhuizen, L. 2008. Evolution toward small molecule inhibitor resistance affects native enzyme function and stability, generating acarbose-insensitive cyclodextrin glucanotransferase variants. *J. Biol. Chem.* 283, 10727–10734.
- Kenrick, P., Crane, P.R. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389, 33–39.
- Khindaria, A., Yamazaki, I., Aust, S.D. 1996. Stabilization of the veratryl alcohol cation radical by lignin peroxidase. *Biochem.* 35, 6418– 6424.
- Khuong, L. D., Kondo, R., De Leon, R., Anh, T. K., Meguro, S., Shimizu, K., Kamei, I. 2014. Effect of chemical factors on integrated fungal fermentation of sugarcane bagasse for ethanol production by a white-rot fungus, *Phlebia sp.* MG- 60. *Biores. Technol.* 167, 33–40.
- Kim, Y.J., Uyama, H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Molecul. Life Sci.* 62, 1707–1723.
- Kindred, C., Okereke, U., Callender, V.D. 2013. Skin- lightening agents: an overview of prescription, office- dispensed, and over- the- counter products. *Cutis*, 5, 18–26.
- Kirk, T.K., Chang, H.M., Lorenz, L.F. 1975. Topochemistry of the fungal degradation of lignin in birch wood as related to the distribution of guaiacyl and syringyl lignins. *Wood Sci. Technol.* 9, 81–86.
- Kirk, T.K., Farrel, R.L. 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 465–505.
- Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. 3rd ed, New York: Wiley-Inter Science, 1979, pp. 1-172.
- Kondo, A., Ueda, M., 2004. Yeast cell-surface display – applications of molecular display, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 28-40.
- Kotzia, G.A., Labrou, N.E. 2009. Engineering thermal stability of lasparaginase by *in vitro* directed evolution. *FEBS J.*, 276, 1750-1761.
- Kovačević, G., Ostafe, R., Balaž, A.M., Fischer, R., Prodanović, R. 2018. Development of GFP-based high-throughput screening system for directed evolution of glucose oxidase. *J. Biosci. Bioeng.* 127, 30-37.
- Kovačević, G., Ostafe, R., Fischer, R., Provanović, R. 2019. Influence of methionine residue position on oxidative stability of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.* 146 (2019) 143-149.
- Kumar, P.G.N., Sumangala, K.B. 2011. Fungal degradation of azo dye-red 3BN and optimization of physico- chemical parameters. *Internat. J. Environ. Sci.* 1, 6.
- Kundell, T.K., Makela, M.R., Hilden, K. 2010. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes—Ecological, functional and phylogenetic review. *J. Basic Microbiol.* 50, 5–20.
- Kuroda, K., Ueda, M. 2013. Arming technology in yeast-novel strategy for whole-cell biocatalyst and protein engineering. *Biomolecules* 3, 632–650.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169, 247–250.
- Lee, C.W., Wang, H.J., Hwang, J.K., Tseng, C.P. 2014. Protein thermal stability enhancement by designing salt bridges: a combined computational and experimental study. *PLoS One* 9, e112751.

-
- Leemhuis, H., Stein, V., Griffiths, A.D., Hollfelder, F. 2005. New genotype-phenotype linkages for directed evolution of functional proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 472–478.
- Leung, D.W., Chen, E., Goeddel, D.V. 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1, 11-15.
- Lin, W.P., Lai, H.L., Liu, Y.L., Chiung, Y.M., Shiau, C.Y., Han, J.M., et al. (2005). Effect of melanin produced by a recombinant *Escherichia coli* on antibacterial activity of antibiotics. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 38, 320–326.
- Lipovsek, D., Antipov, E., Armstrong, K. A., Olsen, M. J., Klibanov, A. M., Tidor, B., Witttrup, K. D. 2007. Selection of horseradish peroxidase variants with enhanced enantioselectivity by yeast surface display. *Chem. Biol.* 14, 1176–1185.
- Liu, Q., Xun, G., Feng, Y., 2019. The state-of-the-art strategies of protein engineering for enzyme stabilization. *Biotechnol. Adv.* 37, 530-537.
- Lorenz, P., Eck, J. 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 510-516.
- Majcen-Le Marechal A., Slokar Y.M., Taufer T. 1997. Decoloration of Chlorotriazine Reactive Azo Dyes with H₂O₂/UV. *Dyes Pigm.* 33, 281-298.
- Marco-Urrea, E., Reddy, C.A. 2012. Degradation of chloro-organic pollutants by white-rotfungi. *Microbial degradation of xenobiotics.* 31–66. Berlin: Springer.
- Martínez M.J., Ruiz-Dueñas F.J., Guillén F., Martínez, A.T. 1996. Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Europ. J. Biochem.* 237, 424–432.
- Martínez, A.T., 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degradating heme peroxidases. *Enzyme Microbiol. Technol.* 30, 425-444.
- Martinez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M.J., Gutierrez, A., Del Rio, J.C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Internat. Microbiol.* 8, 195–204.
- Martinez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D., Huang, K., Chapman, J. 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnol.* 22, 695–700.
- Mastrobattista, E., Taly, V., Chanudet, E., Treacy, P., Kelly, B.T., Griffiths, A.D. 2005. High-throughput screening of enzyme libraries: *in vitro* evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions. *Chem. Biol.* 12, 1291–1300.
- Mauricio, T., Karmon, Y., Khaiat, A. 2011. A randomized and placebo- controlled study to compare the skin- lightening efficacy and safety of lignin peroxidase cream vs 2% hydroquinone cream. *J. Cosm. Dermatol.* 10, 253–259.
- Maynard, J.A., Chen, G., Georgiou, G., Iverson, B.L. 2002. *In vitro* scanning –saturation mutagenesis. *Methods Mol. Biol.*, 2002, 182, 149163.
- Michaels, G.B., Lewis, D.L. 1985. Sorption and toxicity of azo and triphenyl methane dyes to aquatic microbial populations. *Environ. Contam. Toxicol.* 34, 323-330.
- Miyazaki, C., Takahashi, H. 2001. Engineering of the H₂O₂-binding pocket region of a recombinant manganese peroxidase to be resistant to H₂O₂. *FEBS lett.* 509, 111-114.
- Miyazaki, K., Takenouchi, M. 2002. Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid. *Biotech.* 33, 1033–1038.
- Mohan, U., Banerjee, U.C. 2008. Molecular evolution of a defined DNA sequence with accumulation of mutations in a single round by a dual approach to random chemical mutagenesis (DuARChEM). *Chembiochem.* 9, 2238-2243.

-
- Moilanen, A.M., Lundell, T., Vares, T., Hatakka, A. 1996. Manganese and malonate are individual regulators for the production of lignin and manganese peroxidase isozymes and in the degradation of lignin by *Phlebia radiata*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 792–799.
- Nam, S., Renganathan, V. 2000. Non-enzymatic reduction of azo dyes by NADH. *Chemosphere* 40, 351-357.
- Novotný, C., Dias, N., Kapanen, A., Malachová, K., Vándrovová, M., Itävaara, M., Lima, N. 2006. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo and anthraquinone dyes. *Chemosphere* 63, 1436-1442.
- Ollikka, P., Alhoniemi, K., Leppänen, V., Glumoff, T., Rajjola, T., Suominen, I. 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4010–4016.
- Ostafe, R., Prodanovic, R., Commandeur, U., Fischer, R. 2013. Flow cytometry-based ultra-high-throughput screening assay for cellulase activity. *Anal. Biochem.* 435 (2013) 93-98.
- Ostafe, R., Prodanović, R., Commandeur, U., Fischer, R. 2013. Flow cytometry-based ultra-high-throughput screening assay for cellulase activity. *Anal. Biochem.* 435, 93-98.
- Ostafe, R., Prodanović, R., Nazor, J., Fischer, R. 2014. Ultra-high-throughput screening method for the directed evolution of glucose oxidase. *Chem. Biol.* 21, 414-421.
- Ostafe, R., Prodanovic, R., Nazor, J., Fischer, R. 2014. Ultra-high-throughput screening method for the directed evolution of glucose oxidase. *Chem. Biol.* 21, 414-421.
- Pace, N.C., Scholtz, J.M., Grimsley, G.R. 2014. Forces stabilizing proteins. *FEBS Lett.* 588, 2177-2184.
- Paliwal, R., Rawat, A.P., Rawat, M., Rai, J.P. 2012. Bioligninolysis: recent updates for biotechnological solution. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1865–1889.
- Parikh, M. R., Matsumura, I. 2005. Site-saturation mutagenesis is more efficient than DNA shuffling for the directed evolution of beta-fucosidase from beta-galactosidase. *J. Mol. Biol.* 352, 621–628.
- Parshetti, G.K., Parshetti, S., Kalyani, D.C., Doong, R., Govindwar, S.P. 2012. Industrial dye decolorizing lignin peroxidase from *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Ann. Microbiol.* 62, 217–223.
- Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M.J., Piontek, K., Martínez, A.T. 2005. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigations of three long-range electron transfer pathways. *J. Mol. Biol.* 354, 385–402.
- Pezzullo, M., Del Vecchio, P., Mandrich, L., Nucci, R., Rossi, M., Manco, G. 2013. Comprehensive analysis of surface charged residues involved in thermal stability in *Alicyclobacillus acidocaldarius* esterase 2. *Protein. Eng. Des. Sel.* 26, 47-58.
- Piontek, K., Glumoff, T., Winterhatter, K. 1993. Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 315, 119–124.
- Pizzul, L., Castillo, M.D.P., Stenström, J. 2009. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation* 20, 751–759.
- Plückthun, A., Schaffitzel, C., Hanes, J., Jermutus, L. 2001. In vitro selection and evolution of proteins. *Adv. Protein Chem.* 55, 367-403.
- Prodanović, O., Spasojević, D., Prokopijević, M., Radotić, K., Marković, N., Blažić, M., Prodanović, R. 2015. Tyramine modified alginates via periodate oxidation for peroxidase induced hydrogel formation and immobilization. *React. Funct. Polym.* 93, 77-83.

-
- Prodanovic, R., Ostafe, R., Blanusa, M., Schwaneberg, U. 2012. Vanadium bromoperoxidase-coupled fluorescent assay for flow cytometry sorting of glucose oxidase gene libraries in double emulsions. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 1439-1447.
- Pucci, F., Rooman, M. 2017. Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 42, 117-128.
- Pulgare, S.S., Kalyani, D.C., Patil, A.V., Jadhav, J.P. 2010. Textile dye degradation by bacterial consortium and subsequent toxicological analysis of dye and dye metabolites using cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. *J. Hazard. Mater.* 186, 713-723.
- Rajasundari, K., Murugesan, R. 2011. Decolourization of distillery waste water –role of microbes and their potential oxidative enzymes (review). *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 1, 54–68.
- Reetz, M.T. 2013. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 12480-12496.
- Reetz, M.T., Carballeira, J.D. 2007. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Protoc.* 2, 891-903.
- Reetz, M.T., Höbenreich, H., Soni, P., and Fernández, L. 2008. A genetic selection system for evolving enantioselectivity of enzymes. *Chem. Commun.* 43, 5502–5504.
- Reetz, M.T., Kahakeaw, D., Sanchis, J. 2009. Shedding light on the efficacy of laboratory evolution based on iterative saturation mutagenesis. *Mol. Biosyst.* 5, 115-22.
- Reetz, M.T., Wu, S. 2008. Greatly reduced amino acid alphabets in directed evolution: making the right choice for saturation mutagenesis at homologous enzyme positions. *Chem. Commun. (Camb)*. 43, 5499-501.
- Reidhaar-Olson, J.F., Sauer, R.T. 1988. Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. *Science* 241, 53-58.
- Riberiro, G.F., Côrte-Real, M., Johansson, B. 2006. Characterization of DNA Damage in Yeast Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide, Acetic Acid, and Hyperosmotic Shock. *Mol. Biol. Cell.* 17, 4584-4591
- Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K.F., Scheper, T. 2001. Flow cytometry in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 350–360.
- Robinson, T., McMullan G., Marchant R., Nigam, P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour. Technol.* 77, 247-255.
- Romero, J.O., Fernández-Fueyo, E., Avila-Salas, F, Racabarren, R., Azate-Morales, J., Martínez, A.T. 2019. Binding and catalytic mechanism of veratryl alcohol oxidation by lignin peroxidase: a theoretical and experimental study. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17, 1066-1074.
- Ruel, K., Amber, K., Joseleau, J.P. 1994. Influence of the enzyme equipment of white-rot fungi on the patterns of wood degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 241–254.
- Ruiz-Dueñas F.J., Martínez, M.J., Martínez A.T. 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* 31, 223-235.
- Ruiz-Dueñas F.J., Morales, M., Mate M.J., Romeo A., Martínez M.A., Smith, A.T. Martínez, A.T. 2008. Site-directed mutagenesis of the catalytic tryptophan environment in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *Biochemistry* 47 (2008) 1685-1695.
- Ruiz-Dueñas F.J., Morales, M., Pérez-Boada, M., Choinowski, T., Martínez M.J., Piontek, K., Martínez, A.T. 2007. Manganese oxidation site in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase: a site directed mutagenesis, kinetic and crystallographic study. *Biochemistry* 46, 66-77.

-
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez A.T. 2009. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature how we can take advantage of this. *Microb. Biotechnol.* 2, 164-177.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Morales, M., Mate, M.J., Romeo, A., Martínez, M.J., Smith, A.T., Martínez, A.T. 2008. Site-directed mutagenesis of the catalytic tryptophan environment in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *Biochem.* 47, 1685-1695.
- Rye, K., Hwang, S.Y., Kim, K.H., Kang, J.H., Lee, E.K. 2008. Functionality improvement of fungal lignin peroxidase by DNA shuffling for 2,4-dichlorophenol degradability and H₂O₂ stability. *J. Biotechnol.* 133, 110-115.
- Sabnis, R.W. 2016. The Gewald reaction in dye chemistry. *Color. Technol.* 132, 49–82.
- Sáez-Jiménez, V., Acebes, S., Guallar, V., Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J. 2015. Improving the oxidative stability of a high redox potential fungal peroxidase by rational design, *PLOS ONE*, 10, e0124750.
- Sanchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* 27, 185–194.
- Sánchez, O., Sierra, R., Alméciga-Díaz, C.J. 2011. Delignification process of agro-industrial wastes an alternative to obtain fermentable carbohydrates for producing fuel. In M. Manzanera (Ed.), *Alternative fuel* 111–154. InTech.
- Semba, Y., Ishida, M., Yokobori, S., Yamadishi, A. 2015. Ancestral amino acid substitution improves the thermal stability of recombinant lignin peroxidase from white-rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium* strain UAMH 3641. *Prot. Engin. Des. Selec.* 28, 221–230.
- Sen, S., Venkata Dasu, V., Mandal, B. 2007. Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 212-223.
- Siddiqui, K.S. 2017. Defying the activity-stability trade-off in enzymes: taking advantage of entropy to enhance activity and thermostability. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 309-322.
- Silveira, E., Marques, P.P., Silva, S.S., Lima-Filho, J.L., Porto, A., Tambourgi, E. 2009. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 63, 230-235.
- Singh, M.V., Weil, P.A., 2002. A method for plasmid purification directly from yeast. *Analytical Biochem.* 307, 13-17.
- Smith, A.T., Doyle, W.A., Dorlet, P., Ivancich, A., 2009. Spectroscopic evidence for an engineered, catalytically active Trp radical that creates the unique reactivity of lignin peroxidase. *PNAS* 106, 16084-16089.
- Smith, M. 1994. Nobel lecture. Synthetic DNA and biology. *Biosci. reports* 14, 51-66.
- Stemmer, W. P. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370, 389–391.
- Stolz, A. 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 69-80.
- Sugiura, T., Yamagishi, K., Kimura, T., Nishida, T., Kawagishi, H., Hirai, H. 2009. Cloning and homologous expression of novel lignin peroxidase genes in the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK- 624. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1793–1798.
- Sun, F.H., Li, J., Yuan, Y.X., Yan, Z.Y., Liu, X.F. 2011. Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover. *Internat. Biodet. Biodegrad.* 65, 931–938.
- Sundaramoorthy, M., Youngs, H.L., Gold, M.H., Poulos, T.L. 2005. High-resolution crystal structure of manganese peroxidase: substrate and inhibitor complexes. *Biochem.* 44, 6463–6470.
- Taly, V., Kelly, B. T., Griffiths, A.D. 2007. Droplets as microreactors for high-throughput biology. *Chem. Bio. Chem.* 8, 263–272.

-
- Tawfik, D.S., Griffiths, A.D. 1998. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.* 16, 652–656.
- Tien, M., Kirk, K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science* 221, 661–663.
- Tindall, K.R., Kunkel, T.A. 1988. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27, 6008-6013.
- Tinoco, R., Verdín, J., Vázquez-Duhalt, R. 2007. Role of oxidizing mediators and tryptophan 172 in the decoloration of industrial dyes by the versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 46, 1-7.
- Tisma, M., Zelic, B., Vasic-Racki, D. 2010. White- rot fungi in phenols, dyes and other xenobiotics treatment - a brief review. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2, 34–47.
- Tokuriki, N., Tawfik, D.S. 2009. Stability effects of mutations and protein evolvability. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 596-604.
- Torres-Duarte, C., Vazquer-Duhalt, R. 2010. Applications and prospective of peroxidase biocatalysis in the environmental field. *Biocatalysis based on heme peroxidases*. ISBN 978-3-642-12626-0. Springer-Verlag Berlin, 179-199.
- Tracewell, C.A., Arnold, F.H. 2009. Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 3-9.
- Valderrama, B., Ayala, M., Vázquez-Duhalt, R. 2002. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem. Biol.* 9, 555–565.
- Vanhercke, T., Ampe, C., Tirry, L., Denolf P. 2005. Reducing mutational bias in random protein libraries. *Anal. Biochem.* 339, 9-14.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 153, 895–905.
- Varadarajan, N., Rodriguez, S., Hwang, B. Y., Georgiou, G., Iverson, B.L. 2008. Highly active and selective endopeptidases with programmed substrate specificities. *Nat. Chem. Biol.* 4, 290–294.
- Vartanian, J.P., Henry, M., Wain-Hobson, S. 1996. Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Res.*, 24, 2627-2631.
- Ventura-Camargo, B.C., Marin-Morales, M.A. 2013. Azo dyes: characterization and toxicity-A review. *TLIST*, 2, 85-103.
- Voigt, C.A., Mayo, S.L., Arnold, F.H., Wang, Z.G. 2001. Computational method to reduce the search space for directed protein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3778-3783.
- Wahler, D., Reymond, J.L. 2001. High-throughput screening for biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 535–544
- Wang, F.Q., Xie, H., Chen, W., Wang, E.T., Du, F.G., Song, A.D. 2013. Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis. *Biores. Technol.* 144, 572–578.
- Wang, Y.X., Vázquez-Duhalt, R., Pickard, M.A. 2003. Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Can. J. Microbiol.* 49, 675-682.
- Wariishi, H., Gold, M.H. 1990. Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265, 2070–2077.
- Watkins, D.W., Jenkins, J.M.X., Grayson, K.J., Wood, N., Steventon, J.W., Le Vay, K.K., Goodwin, M.I., Mullen, A.S., Bailey, H.J., Crump, M.P., MacMillan, F., Mulholland, A.J., Cameron, G., Sessions, R.B., Mann, S., Anderson, J.L.R.

-
2017. Construction and in vivo assembly of a catalytically proficient and hyperthermostable *de novo* enzyme. *Nat. Commun.* 8, 358.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N. 2003. White- rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22, 161–187.
- Williams, G.J., Zhang, C., Thorson, J.S. 2007. Expanding the promiscuity of a natural-product glycosyltransferase by directed evolution. *Nat. Chem. Biol.* 3, 657–662.
- Wohlgemuth, R. 2012. Industrial biotechnology - past, present and future. *N. Biotechnol.* 29, 165.
- Wong, D.W.S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157, 174–209.
- Woo, S.H., Cho, J.S., Lee, B.S., Kim, E.K. 2004. Decolorization of melanin by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Bioproc. Engin.* 9, 256–260.
- Xiao, H., Bao, Z., Zhao, H. 2015. High throughput screening and selection methods for directed enzyme evolution. *Ind. Eng. Chem. Res.* 54, 4011–4020.
- Xu, H., Heinze, T.M., Paine, D.D., Cerniglia, C.E., Chen, H. 2010. Sudan azo dyes and Para Red degradation by prevalent bacteria of the human gastrointestinal tract. *Anaerobe* 16, 114-119.
- Yang, G.Y., Li, C., Fischer, M., Cairo, C.W., Feng, Y., Withers, S.G. 2015. A FRET probe for cell-based imaging of ganglioside-processing enzyme activity and high-throughput screening. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 5389-5393.
- Yanto, D.Y.H., Tachibana, S., Itoh, K. 2014. Biodecolorization of textile dyes by immobilized enzymes on a vertical bioreactor system. 4th International conference on sustainable future for human security, SustaiN 2013. *Procedia Environ. Sci.* 20, 235–244.
- Zhang, X.F., Yang, G.Y., Zhang, Y., Xie, Y., Withers, S.G., Feng, Y. 2016. A general and efficient strategy for generating the stable enzymes. *Sci. Rep.* 6, 33797.
- Zhang, Y., Geißen, S.U. 2010. *In vitro* degradation of carbamazepine and diclofenac by crude lignin-peroxidase. *J. Hazard. Mater.* 176, 1089-1092
- Zheng, Z., Obbard, J.P. 2002. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Tech.* 31, 3–9.
- Zhu, F., He, B., Deng, H., Chen, C., Wang, W., Chen, N. 2020. Improvement in organic solvent resistance and activity of metalloprotease by directed evolution. *J. Biotechnol.* 309, 68-74.

Biografija

Karla Ilić Đurđić, rođena je 28.09.1993. godine u Zrenjaninu. Osnovnu školu „Petar Petrović Njegoš“ kao i srednju Medicinsku školu, smer „Farmaceutski tehničar“ završila je u Zrenjaninu. Osnovne akademske studije Biohemije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu pohađala je u periodu od 2012. do 2015. godine, kada je diplomirala sa prosečnom ocenom 9.97 i ocenom 10 na Završnom radu. Dobitnica je diplome „Đorđe Stefanović“ za najboljeg studenta generacije smera „Biohemičar“, Hemijskog fakulteta; Godišnje nagrade Srpskog hemijskog društva; Nagrade Rektorata Univerziteta u Beogradu za najboljeg studenta generacije Hemijskog fakulteta i Nagrade Hemijskog fakulteta za najboljeg studenta generacije. Master akademske studije biohemije upisala je 2015., a završila 2016. godine sa prosečnom ocenom 10.00 i ocenom 10 na Master radu. U toku završne godine Osnovnih studija i u toku Master studija dobitnica je stipendije Fonda „Dositeja“. Doktorske akademske studije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu upisala je 2016. godine pod rukovodstvom redovnog profesora Hemijskog fakulteta dr Radivoja Prodanovića gde se bavi istraživanjima na temu proteinskog inženjeringa ligninolitičkih peroksidaza.

Karla Ilić Đurđić je od 2015. godine angažovana kao saradnik u nastavi, a 01.11.2016. zaposlena je kao Istraživač-pripravnik na Hemijskom fakultetu. Od tada je angažovana na projektu Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja Republike Srbije broj 172049 pod nazivom „Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki značajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj“, pod rukovodstvom redovnog profesora Hemijskog fakulteta, dr Marije Gavrović-Jankulović. Od 19.04.2018. godine do danas zaposlena je kao Asistent Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Aktivno učestvuje u radu Hemijskog fakulteta kao član većeg broja Komisija.

U toku izrade doktorske disertacije, Karla Ilić Đurđić je provela 6 meseci na Fraunhofer institutu za molekularnu biologiju i primejenu ekologiju, Ahen, Nemačka, kao dobitnica stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije za studijske boravke u inostranstvu, po ugovoru o autorskom delu sa RWTH Univerzitetom u Ahenu i

kao dobitnica „DAAD“ stipendije za kratke istraživačke boravke u Nemačkoj. Tokom boravka na Fraunhofer institutu radila je na pripremi biblioteka gena lignin i versatilne peroksidaze i razvoju i optimizaciji metoda za njihovu pretragu.

Od kako se bavi naučno-istraživačkim radom, Karla Ilić Đurđić je objavila i učestvovala u izradi šest radova u međunarodnim časopisima (tri rada kategorije M21 i tri rada kategorije M22), od kojih četiri kao prvi autor i jedan kao autor za korespondenciju i ima dve saopštenja iz oblasti doktorske disertacije na skupovima od međunarodnog značaja (M34), pri čemu je na IX konferenciji Biohemijskog društva Srbije 2019. godine osvojila nagradu za najbolju poster prezentaciju.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Карла Илић Ђурђић _____

број уписа _____ ДБ07/2016 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом „**Протеински инжењеринг лигнинолитичких пероксидаза у циљу унапређења деградације текстилних боја**“

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Карла Илић Ђурђић _____

Број уписа _____ ДБ07/2016 _____

Студијски програм _____ Доктор биохемијских наука _____

Наслов рада “Протеински инжењеринг лигнинолитичких пероксидаза у циљу
унапређења деградације текстилних боја“

Ментор др Радивоје Продановић, редовни професор Хемијског факултета,
Универзитета у Београду

Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

“Протеински инжењеринг лигнинолитичких пероксидаза у циљу

унапређења деградације текстилних боја“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

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 прераде. 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 прераде. 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.