



Пловдивски университет
„Паисий Хилендарски”



Биологически факултет
Катедра „Биохимия и Микробиология”

СТАНИМИРА АНГЕЛОВА АНГЕЛОВА

ИЗСЛЕДВАНЕ СВОЙСТВАТА НА БИОИНЖЕНЕРНИ
АЛФА-D-ГЛЮКАНИ, СИНТЕЗИРАНИ ОТ МУТАНТНА
ГЛЮКАНЗАХАРАЗА URE 13-300

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен „доктор”
Област на ВО: **4.** Природни науки, математика и информатика
Професионално направление: **4.3.** Биологически науки;
Докторска програма: **Биохимия**

Научен ръководител: проф. д-р Илия Николов Илиев

Пловдив, 2023

Дисертационният труд съдържа 157 страници, 5 таблици, 37 фигури, 12 приложения и 175 литературни източника.

Експерименталните изследвания са проведени в катедра „Биохимия и микробиология“ към Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и в лабораториите на Център по технологии към ПУ „Паисий Хилендарски“.

Докторантът има публикувани общо 3 статии по тематиката на дисертационния труд, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus).

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на катедра „Биохимия и микробиология“ при Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски“, проведен на 11.12.2023 г.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 07.03.2024г. от 11:00 часа в зала „Компас“ на ПУ „П. Хилендарски“.

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуващите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Автор: Станимира Ангелова Ангелова

Заглавие: Изследване свойствата на биоинженерни алфа-D-глюкани, синтезирани от мутантна глюканзахараза URE 13-300

Научно жури:

акад. проф. д-н Атанас Иванов Павлов
проф. д-н Искра Витанова Иванова
проф. д-н Мария Богомилова Ангелова-Дянкова
проф. д-р Георги Тодоров Добрев
проф. д-р Соня Костадинова Трифонова

Резервни членове:

доц. д-р Боряна Йорданова Жекова
доц. д-р Нина Димитрова Димчева

ВЪВЕДЕНИЕ

Полимерите се използват като основни материали за производството на множество продукти от ежедневието, както и за по-сложни материали в медицината, диагностиката и леката химическа индустрия. Загрижеността за опазването на околната среда и нейната устойчивост тласка напред изследванията върху възобновяеми и рециклируеми биобазирани структури, предоставящи нови или подобрени физикохимични свойства. Между полимерите с биологичен произход, полизахаридите от растения, водорасли, гъби или микробни организми днес се считат за обещаващи варианти на нови структури за замяна на продуктите на петролна основа. Също така, многобройните установени ензимни последователности и напредъка в дизайна на ензимната катализа обуславят увеличено търсене и предлагане на полимери, синтезирани от микробни източници.

В този смисъл, особено привлекателни обекти са α -глюканите, продуцирани от различни родове млечнокисели бактерии (МКБ) (главно *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*), култивирани върху захароза (Molina, M. *et al.* 2021). Групата от ензими, отговорни за техния синтез са класифицирани в семейството на гликозид хидролазите 70 (GH70). Глюкановите полимери се различават по размер, тип връзки и степен на разклоняване. Тези характеристики влияят върху физико-химичните свойства на полизахаридите (van Hijum, S. A. *et al.*, 2006). Според типа на α -гликозидните връзки в полимерите, синтезирани от глюканзахаразите, се различават: глюкан, мутан, реутеран, декстран и алтернан (Korakli, M. & Vogel, R., 2006).

Молекулната организация на глюканзахаразите е доменна, като в каталитичния домен се различават пет различни района, притежаващи допълващи се функции в хода на глюкановия или олигозахаридния синтез – А, В, С, IV и V. В последните години са направени множество изследвания с аминокиселинни замествания чрез сайт-насочен мутагенез, доказващи функцията на различни аминокиселини, разположени в или около каталитичния център на глюканзахаразите, които са ключови за ензимната активност и типа на връзките между глюкозните остатъци в съответните глюкани. Благодарение на напредъка в рационалния дизайн на глюканзахаразите за получаване на полимери с желани свойства, те имат потенциал за множество приложения в хранително-вкусовата, медицинската и козметичната промишленост като продукти с добавена стойност.

Щам *Leuconostoc mesenteroides* URE 13, изолиран от български ферментирали зеленчуци, продуцира високомолекулна глюканзахараза с молекулна маса над 300 kDa. Генът, кодиращ глюканзахараза URE 13-300 е успешно клониран и се експресира в *E. coli* BL21. Глюканът, синтезиран от този ензим е неразтворим и съдържа значително количество α -(1 \rightarrow 3) връзки, а олигозахаридите притежават пребиотичен потенциал (Bivolarski, V. *et al.*, 2018). В настоящата работа са описани експериментите по оптимизация синтеза на глюканзахараза URE 13-300 от рекомбинантния щам и получаване на мутантен негов вариант чрез сайт-насочен мутагенез. Полученият ензим е биохимично охарактеризиран. Свойствата на синтезираните от родителския и мутантния ензим глюкани бяха анализирани и сравнени.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се изследва взаимовръзката на структурата на синтезираните глюкани и промяната на аминокиселинната последователност на каталитичен домен 1 на глюканзахараза URE 13-300 чрез сайт-насочен мутагенез.

За постигане на поставената цел е необходимо да се решат следните задачи:

1. Да се оптимизират условията за получаване на глюканзахараза URE13-300 при култивиране от рекомбинантен щам *E. coli* BL21 URE 13-300.
2. Да се изследва влиянието на органични разтворители върху трансферазната реакция на глюканзахараза URE 13-300 при синтез на олигозахариди.
3. Провеждане на биоинформатичен анализ за откриване възможните места за въвеждане на аминокиселинна замяна и дизайн на мутагенни праймери.
4. Провеждане на сайт-насочен мутагенез за получаване на мутантна глюканзахараза URE 13-300.
5. Оптимизиране условията на получаване на мутантен ензим, клониран в *E. coli* BL21.
6. Определяне на кинетичните параметри на получения мутантен ензим.
7. Ензимен синтез на полизахарид и олигозахариди, синтезирани от мутантния ензим и определяне на тяхната структура.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микробиологични методи

1.1. Бактериални щамове и вектори

За експресия на изходния тип глюкозахараза URE 13-300 беше използван рекомбинантен щам *Escherichia coli* BL21 URE 13-300, разработен в катедра „Биохимия и микробиология“ на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, съдържащ плазмиден вектор pETite N-His SUMO (Lucigen Corporation, Middleton, USA), в който е клониран генът, кодиращ глюкозахараза URE 13-300. Посоченият вектор служи и за ДНК матрица за въвеждане на точкова мутация по метода за сайт-насочения мутагенез. Провеждането му беше осъществено с помощта на специализиран кит за сайт-насочен мутагенез QuikChange II XL (Agilent Technologies, Cat. № 200522). За трансформация с получения плазмид, съдържащ мутирания ген, бяха използвани *E. coli* XL10-Gold ултракомпетентни клетки, предоставени в кита. За експресията на мутантния ензим бяха използвани отново хемокомпетентни клетки *E. coli* BL21 (DE3) (Lucigen Corporation, Middleton, USA).

1.2. Хранителни среди

2. Молекулярно-биологични методи и биоинформатичен анализ

2.1. Изолиране на плазмидна ДНК от рекомбинантни клетки *E. coli* BL21

За изолиране на плазмидната ДНК от рекомбинантните клетки, носещи гена, кодиращ глюкозахараза URE 13-300 беше използван кит QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Германия).

2.2. Сайт-насочен мутагенез

2.2.1. Дизайн на праймерите, кодиращи замяната на аминокиселината глицин на позиция 449 с лизин

Следните праймери (синтезирани от Bioneer, Южна Корея) бяха използвани за въвеждане на аминокиселинното заместване (заместеният кодон е подчертан):

ForG449K

5'CATTAGTAGTGAGTCTAAAAAAACAGATCATTTGCAAGGTGGTGCCTC 3';

RevG449K

5'GAGCGCACCCACCTTGCAAATGATCTGTTTTTTTAGACTCACTACTAATG 3'.

Праймерите бяха проектирани съгласно инструкциите в кита за сайт-насочен мутагенез. След тяхното моделиране, бяха проверени чрез софтуера OligoEvaluator (<http://www.oligoevaluator.com>) за формиране на вторични структури.

Проверката за свързване на праймерите в точните места в правата или обратната матрична ДНК верига се извърши чрез веб-базирания софтуер Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

2.2.2. Провеждане на сайт-насочен мутагенез

2.2.3. Провеждане на PCR за замяна на кодона на глицина с кодона за лизин, чрез мутагенни праймери

PCR за провеждане на сайт-насочения мутагенез.

Разрязване на метилираната (матрична) ДНК верига.

Трансформация в химически ултракомпетентни клетки *E. coli* XL10-Gold

2.2.4. Култивиране на колонии, съдържащи мутацията

2.2.4. Трансформация в щам *E. coli* BL21 (DE3) Hi-control за експресия на мутантния ген

2.2.5. Определяне концентрацията на плазмидна ДНК чрез агарозна гел електрофореза

2.3. Биоинформатичен анализ и изграждане на хомоложен модел

Сравняването на аминокиселинната последователност на URE 13-300 с други глюканзахарази беше извършено чрез уеб-базираните инструменти Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), Pairwise Sequence Alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) и ESPript v3.0. (<https://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>). Източник на аминокиселинните последователности на глюканзахаразите беше базата данни NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Бяха използвани настройките по подразбиране. Хомоложният модел на CD1 на URE 13-300 ензима е създаден чрез уеб сървър на Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>) въз основа на кристалната структура на глюканзахараза GtfB от *S. mutans* GS5 (PDB ID: 8FJ9; Schormann, N. et al., 2023). Моделът беше оптимизиран чрез минимизиране на енергията в програмата YASARA, v22.5.

2.4. Праймери за секвениране и обработка на данните от секвенирането

За потвърждаване на правилната аминокиселинна замяна се извърши секвениране на частта от гена на URE 13-300, в която се намира мутацията. Използвани бяха следните праймери (Bioneer, Южна Корея):

F1: 5' GAACAGTTTGACGGATACGG 3'

F2: 5' TGGCTATCTAACGGCTAACAG 3'

R2: 5' GCCAACAGCATCTCATAGCC 3'

Праймерите и плазмидите, съдържащи мутацията бяха изпратени в Macrogen Europe (<https://order.macrogen-europe.com/>). Резултатите бяха анализирани чрез уеб софтуера Benchling (<https://benchling.com>).

3. Биохимични методи

3.1. Определяне на ензимна активност

3.2. Изследване влиянието на температурата, рН и субстратната концентрация върху глюканзахаразната активност

3.3. Влияние на металните йони върху ензимната активност

3.4. Количествено определяне на белтък

3.5. Трис-глицинова SDS-полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE)

3.6. Дезинтегриране на клетки от *Escherichia coli* BL21 URE-13 300

4. Ензимен синтез и анализ на α -глюкани, синтезирани от мутантна глюканзахараза U13M1

4.1. Реакция за синтез на модифициран α -глюкан

4.2. Утаяване и пречистване на синтезирания полизахарид

4.3. ЯМР анализ на α -глюкан, синтезиран от мутантна глюканзахараза U13M1

4.4. Ензимен синтез на олигозахариди

4.5. HPLC анализ на олигозахариди

4.6. Анализ на ензимни реакции в присъствие на малтоза като акцептор в присъствие на органични разтворители

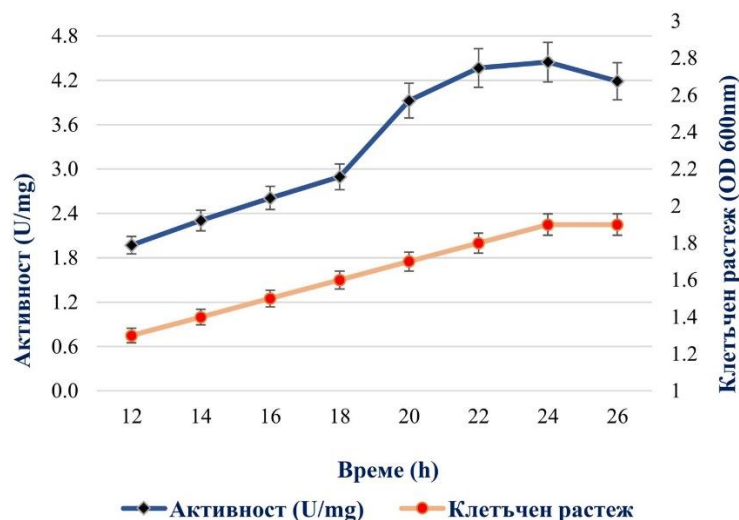
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Синтез на полизахарид и олигозахариди от глюканзахараза URE 13-300

1.1. Оптимизиране продуцирането на глюканзахараза URE 13-300 от рекомбинантен щам *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Генът, кодиращ глюканзахараза URE 13-300 е успешно изолиран и клониран в рекомбинантен щам *Escherichia coli* BL21 (DE3) от колектива в катедра „Биохимия и микробиология“. Глюканзахаразата е изолирана от щам *Leuconostoc mesenteroides* URE 13, открит във ферментирали български зеленчуци (Bivolarski V. et al., 2018). Оптималните условия на секреция на глюканзахараза URE 13-300 са установени от предходни изследвания на колектива: начална температура на клетъчен растеж – 37 °C; след достигане на оптимален клетъчен растеж при оптична плътност (OD_{600nm}) от 0.6 до 0.8 се добавя индуктор IPTG с крайна концентрация 1 mmol/L, след което ферментацията протича при 16 °C в клатъчен апарат със скорост 250 об./мин.

Беше изследвана продължителността на култивиране с цел оптимизиране времето за постигане на максимална продукция на глюканзахараза URE 13-300. След провеждане на серия от ферментации се установи максимална ензимна активност на 24-тия час след добавяне на индуктор IPTG с концентрация 1 mmol/L. Най-забележителен скок в ензимната активност беше наблюдаван в периода между 18-ти и 20-ти час след добавяне на IPTG – от 2.5 до 3.9 U/mg белтък. Максималните стойности се достигнаха в периода между 22-ри и 24-ти час, а именно 4.4 U/mg белтък. Стойностите на оптичната плътност в тези часове варираха между 1.8 и 1.9. В сравнение с OD_{600nm} преди добавяне на индуктор бележи увеличение повече от два пъти. При оценка на получените данни се наблюдава плавно увеличение на биомасата в хода на ферментацията, което е съпоставимо с плавно повишаване на ензимната активност (Фиг. 1). Намалването на активността на секретирания ензим между 24-ти и 26-ти час може да се обясни с настъпването на фазата на отмиране на клетките, което е придружено с клетъчен лизис и освобождаване на вътреклетъчните протеази.



Фигура 1. Изследване корелацията между ензимната активност и акумулирането на биомаса във времето за продуциране на ензима.

1.2. Оптимизиране на условията за ензимен синтез на α -глюкан в биореактор

Бяха проведени серии от реакции, за да се изследва динамиката на синтеза на глюкан от глюканзахараза URE 13-300. Влиянието на началната активност на глюканзахараза URE 13-300 върху синтеза на глюкан беше изследвано чрез използване на ензимни разтвори с нарастваща ензимна активност – 0.1 U/mL; 0.2 U/mL; 0.5 U/mL и 0.7 U/mL. При сравнение на глюкановите фракции, получени от всяка реакционна смес, се оказа, че няма значителна промяна в добива на глюкан. Следователно, дори при ниска концентрация на глюканзахараза успешно се синтезира оптимално количество глюкан. В следващите изследвания бяха използвани концентрации между 0.1 U/mL и 0.2 U/mL.

Ензимният синтез на глюкани се проследи при нарастващ обем на реакционната среда от 100 mL до 2000 mL (в биореактор) при продължителност на процеса до 48 часа. Реакциите се проведоха при температура 30 °C и 100 об./мин. разбъркване. Получените резултати показват, че интензивен синтез на полизахарида се осъществява през първите осем часа на реакцията. Скоростта на синтезната реакция съществено намалява след този час. Между 24-ия и 48-ия час от началото на реакциите, се синтезира само 5% от глюкана. Отчитайки постигнатите резултати може да се заключи, че през първите 8 часа се синтезират 60% от тоталното количество глюкан при степен на конверсия на субстрата от 52%. Лиофилизираният глюкан представлява бяла кристалноподобна маса с вид на памук.

2. Изследване приложението на глюканзахараза URE 13-300 при провеждане на ензимни реакции във водно-органична среда

В много случаи продуктите на трансгликозилирането са олигозахариди с разклонена структура и имат пребиотични свойства (Gangoiti et al., 2018; Bivolarski et al., 2018). В различни проучвания е показано, че малтозата е най-добрата сред широк спектър от акцептори и количеството D-глюкоза, прехвърлено към акцептора, зависи от съотношението акцептор: донор (Mayer R. et al., 1981; Su D. and Robyt, 1993). Провеждането на синтеза на глюкан от гликозилтрансферази в среда с органични разтворители носи предимства в различни случаи. Много неконвенционални акцептори са слабо разтворими във вода, но тяхната разтворимост се увеличава с добавянето на органични разтворители (Robyt JF, Eklund, 1983; Girard E, Legoy M.D, 1999).

В случай на гликозилиране на слабо разтворими акцептори като фенолни или терпеноидни съединения, органичните разтворители повишават тяхната разтворимост, следователно улесняват взаимодействието между ензима и акцептора. Съставките на етеричните масла са интересен обект за гликозилиране поради тяхната разнообразна биоактивност. Тяхната комбинация с конвенционалните антибиотици може да осигури алтернативни методи за преодоляване на проблема с резистентността на патогенните бактерии, предизвикващи развала на храните и произвеждане на токсични вещества. Например, антибактериалното действие и превенцията за образуване на биофилми от страна на компонентите етеричните масла, като карвакрол и тимол, са тествани в комбинация с тетрациклин срещу орални бактерии със селективна антимикробна активност (Miladi H. et al., 2017).

2.1. Влияние на органични разтворители върху активността на глюканзахараза URE 13-300

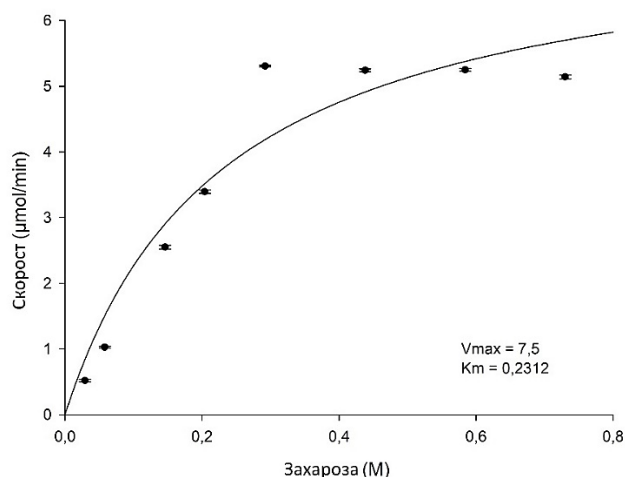
С цел установяване техният ефекта на хетерогенна среда върху активността на глюканзахараза URE 13-300, бяха изследвани девет органични разтворителя. Експериментите бяха проведени до достигане на 50% загуба на активност на

глюканзахаразата за разлика от измерената активност в контролната реакция, зададена като 100%. Сред изследваните алкохоли, добавянето на n-бутанол или изоамилов алкохол доведе до почти пълно инхибиране на ензимната активност при концентрации от 5% – съответно 99.5% и 98.5%. Дрaстичен инхибиращ ефект беше наблюдаван и при реакции, съдържащи 5% етилацетат и 5% ацетонитрил, равняващ се съответно на 78% и 67% инхибиране. Изопропанолът и етанолът оказаха умерен инхибиращ ефект с повече от 50% понижаване на активността при 10% и 20% концентрации на алкохол. При 10% концентрация на изопропанол беше отчетено над 55% инхибиращо действие. Експериментите с октанол показаха инхибиращ ефект при ниски концентрации, но при концентрация над 20% не беше наблюдаван такъв. Това вероятно се дължи на разделянето на реакционната смес на две фази - водна и органична, което ограничава взаимодействието на ензима с разтворителя. Активността на глюканзахаразата в присъствието на ДМСО намалява постепенно, като при 50% концентрация ензимът запазва около половината от общата си активност. В контраст с получените в настоящата работа резултати, инхибиторният ефект на диметилсулфоксид върху декстранзахараза В-512F и алтернанзахараза В-23192 е значително по-висок, достигайки повече от 60% понижаване на ензимната активност при 40% органична фаза (Bertrand A. et al., 2006). Следователно, активността на глюканзахараза URE 13-300 се повлиява в по-ниска степен от присъствието на ДМСО в ензимната реакция. Ming Miao и съавтори докладват подобни резултати по отношение на ДМСО и n-хексан, където активността на глюканзахараза, продуцирана от *Lb. reuteri* SK24.003 е относително висока. За разлика от глюканзахараза URE 13-300, обаче, изследваната глюканзахараза проявява по-висока активност при високи концентрации на етанол, изопропанол и n-бутанол (Miao M. et al., 2017).

Активността на глюканзахараза URE 13-300 не беше повлияна от n-хексан във всички проведени експерименти. От всички тествани органични разтворители, ДМСО, n-хексан и октанол показаха най-слаб инхибиращ ефект, заедно с 5% концентрация на етанол. Вземайки предвид получените резултати, тези органични разтворители бяха избрани за изследване влиянието им върху реакциите за синтез на олигозахариди.

2.2. Влияние на различни органични разтворители върху трансферазните реакции в присъствието на малтоза като акцептор

Отчитайки първоначалния анализ на активността на глюканзахараза URE 13-300 в присъствието на различни органични разтворители, четири от тях бяха избрани за Беше оценен ефектът на ДМСО, n-октанол, n-хексан и етанол върху трансферазната реакция в две концентрации – 5% и 20%, като при използването на етанол беше изследвана само реакция при 5% концентрация на етанол. Бяха проведени ензимни анализи с цел изследване влиянието на първоначалната концентрация на захароза и малтоза върху акцепторната реакция във водна среда. Бяха използвани нарастващи концентрации на донорния субстрат захароза от 0.028 M до 0.730 M и при постоянно съотношение спрямо акцептор малтоза – $M/3=0.5$. Стойностите на K_m и V_{max} бяха изчислени чрез уравнението на Михаелис-Ментен, използвайки нелинейния регресионен подход (Фиг. 2).



Фигура 2. Влияние на концентрацията на захарозата в присъствие на малтоза (в съотношение малтоза:захароза=0.5) върху скоростта на ензимната реакция, катализирана от глюканзахараза URE 13-300.

От предишни изследвания на колектива беше установено, че малтозата е най-подходящият акцептор за синтеза на олигозахариди чрез трансферазна реакция, катализирана от изследвания ензим GS URE 13-300. В присъствие на малтоза беше отчетена ензимна активност от 3.6 U/mg, което представлява 30% повишение, в сравнение с реакцията само в 10% (292 mM) захароза. Стойността на K_m в присъствието на акцептор малтоза беше 5-кратно повишена, следователно афинитетът към субстрата е по-слаб. Подобни резултати са получени от Pham и съавтори, които съобщават за почти идентична корелация при използване на акцептор малтоза (Pham H. *et al.*, 2018). Изчислените $K_m = 0.231$ M и $V_{max} = 3.6$ U/mg бяха определени за контролни стойности.

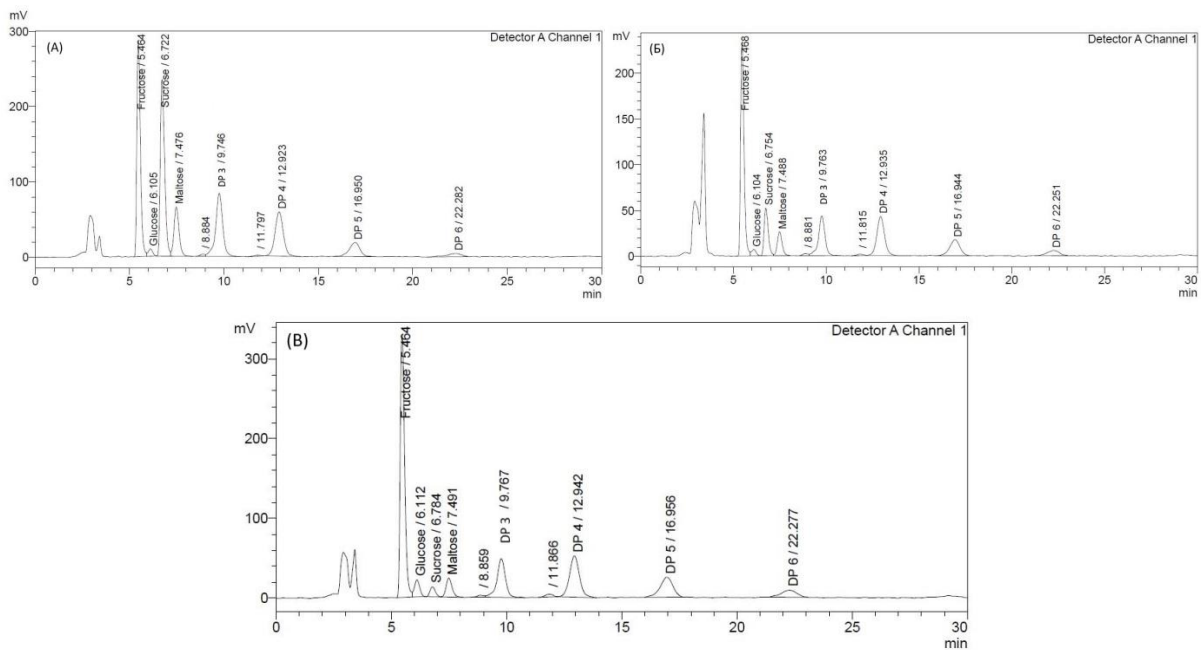
Кинетичните параметри бяха изследвани и в присъствие на избраните органични разтворители в концентрации 5% и 20% - ДМСО, n-хексан и октанол, както и 5% етанол. Въз основа на получените резултати беше установено, че добавянето на 5% ДМСО и октанол оказват слабо влияние върху стойностите на V_{max} съответно 3.5 и 3.3 U/mg. Същата тенденция се наблюдава и при стойностите на K_m – съответно 0.216 M и 0.248 M. Тези резултати корелират добре с наблюдаваното инхибиране на ензимната активност. Въпреки това, добавянето на 5% n-хексан в реакционната смес води до леко повишаване на ензимната активност с едновременно повишаване на стойността на K_m – 0.271 M захароза. В присъствието на 20% ДМСО, стойностите на K_m на октанол и n-хексан се повишават между 13% и 26%, което съответства с наблюдавания инхибиращ ефект на тези органични разтворители.

2.3. Влияние на органичните разтворители върху степента на полимеризация на глюкоолигозахаридите, синтезирани от глюканзахараза URE 13-300

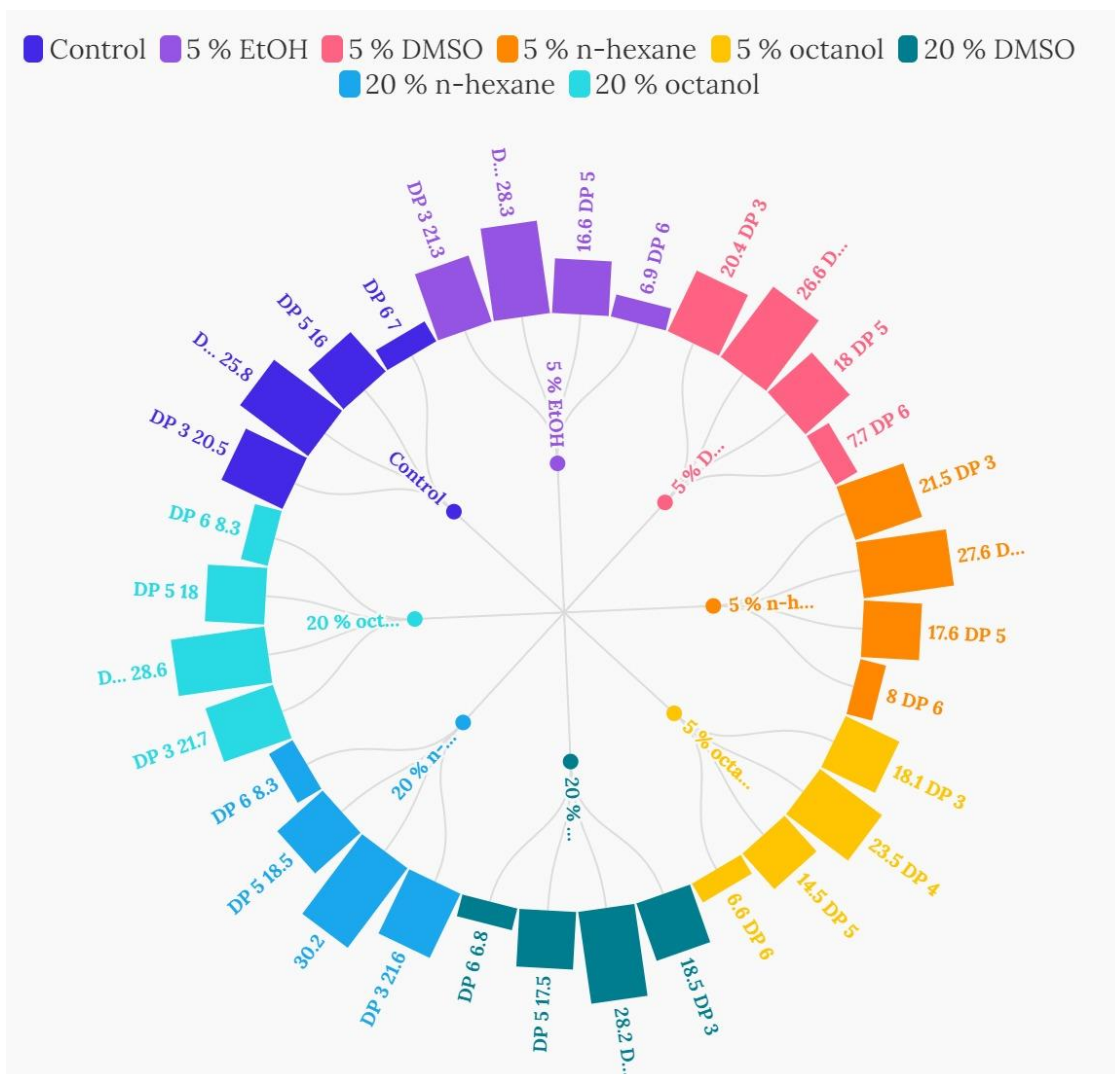
Беше проведена контролна акцепторна реакция с малтоза в съотношение акцептор:захароза=0.5, за да се проследи динамиката на олигозахаридния синтез. За използваното съотношение е известно, че глюканзахараза URE 13-300 синтезира олигозахариди със степен на полимеризация от 3 до 6 (Bivolarski V. *et al.*, 2018). Изследвани бяха проби на 30-та минута, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часа и 24 часа от началото на трансферазната реакция. На фиг. 3 са показани хроматограми от 30-та минута, 1 час и 24 часа.

Както се потвърждава от различни доклади в литературата, малтозата е силен акцептор на глюкозни единици по време на синтеза на GOS от глюканзахарази, което генерира серия от олигозахаридни продукти с повишено DP (Robyt J.F. & Eklund Sh. 1983). Продуктите от всяка акцепторна реакция служат на свой ред като акцептори за производството на GOS с по-висока степен на полимеризация. Всяка нова фракция е по-малко ефективна като акцептор от предишната и това води до по-малко натрупване на GOS с по-високо DP. От друга страна, намаляването на GOS с DP3 по време на късните етапи на реакцията се дължи на тяхното използване като акцептори, което води до натрупване на DP 4 и 5 продукти, които са значително по-малко ефективни акцептори (Bivolarski V. *et al.*, 2018). Същата тенденция се наблюдава и в хода на трансферазните контролни реакции (Фиг. 3).

Определяне влиянието на избраните органични разтворители върху състава и съотношението между синтезираните от глюканзахараза URE 13-300 олигозахариди беше осъществено чрез анализ на проби в хода на трансферазната реакция. През първите 30 минути от проведените реакции се отчете преобладаващ синтез на GOS със DP 3, представен от 25% до 27% в присъствието на 5% ДМСО, хексан и октанол. С напредването на реакцията до 24-ия час, синтезът на глюко-олигозахариди беше намален между 20% и 28%, в зависимост от използвания органичен разтворител, което от друга страна се свързва с повишени концентрации на GOS с DP 4 до 6 (Фиг. 4). Синтезираните добиви на олигозахариди с DP 4 в присъствието на трите разтворителя бавно се повишиха с 15% от 30-та минута до края на реакцията, като варираха от 24 mg/mL до 28 mg/mL.



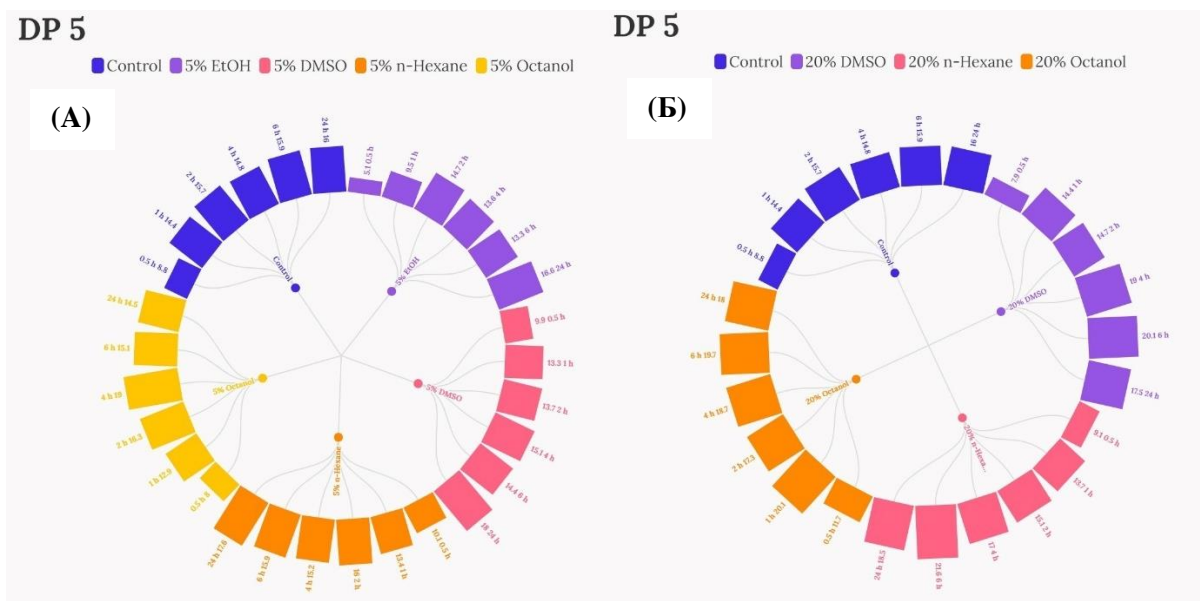
Фигура 3. Олигозахариден профил на продуктите на трансферазната реакция с акцептор малтоза, синтезирани в различни етапи от прогреса на реакцията. (А): профил на синтезираните олигозахариди половин час след началото на реакцията; (Б) един час след началото; (В) 24 часа след началото.



Фигура 4. Общ преглед на олигозахаридите според степента им на полимеризация от 3 до 6 (отляво надясно) на 24-тия час от началото на трансферазната реакция. Концентрациите на синтезираните продукти са представени като mg/mL.

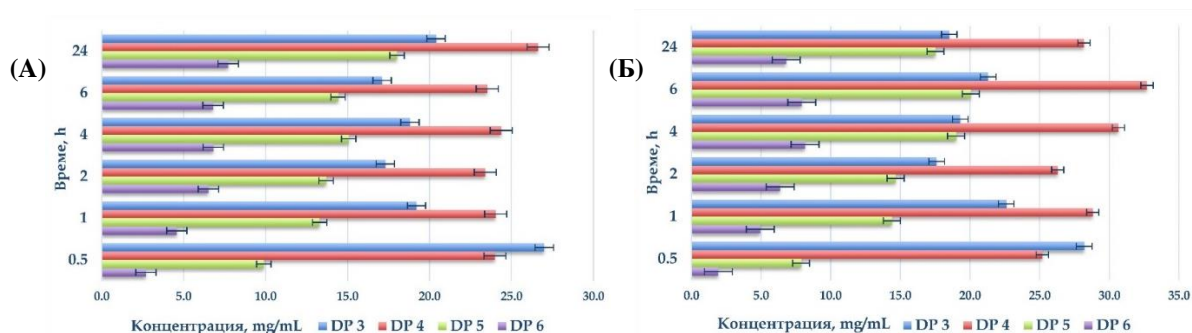
Изявена промяна в динамиката на синтеза на олигозахариди беше отчетена при олигозахариди с DP 5 (Фиг. 5). В присъствието на 5% ДМСО се наблюдава пик от 20 mg/mL GOS със DP 5 на 6-ия час от трансферазната реакция (показва 61% увеличение в сравнение с концентрация на 30-та минута). Подобен пик беше наблюдаван при реакции в среда с 5% октанол – 19.0 mg/mL на 4-ия час с последващо намаление до 14.5 mg/mL в края на реакцията (24-ия час). Получените олигозахариди със DP 6 бяха с най-нисък добив – от 3.0 mg/mL на 30 min до 8.0 mg/mL на 24-тия час.

Получените резултати от синтеза на глюкоолигозахариди в присъствието на 20% органични разтворители показаха сходна динамика с тези при 5% концентрация. При реакции с 20% ДМСО на 30-та минута от започване на реакцията се синтезираха олигозахариди с DP 3 при концентрация 28 mg/mL, като количеството им беше намалено с 34% в края на реакцията. Концентрацията на олигозахариди с DP 4, 5 и 6 беше повишена в хода на реакцията, като беше достигнат пик на 6-ия час, където фракцията на GOS с DP 5 беше с концентрация 20 mg/mL. Сравними резултати се получиха при използване на водно-органична среда с 20% хексан и 20% октанол с максималното количество GOS с DP 5 съответно – 21.6 mg/mL и 20 mg/mL. И в двата варианта на реакцията се отчете с понижаване до близо 18 mg/ml в края на реакцията.



Фигура 5. Динамика на синтеза на олигозахариди с DP 5: (A) в присъствието на 5% органични разтворители, спрямо контролната реакция; (B) в присъствието на 20% органични разтворители, спрямо контролната реакция.

Наличието на ДМСО, независимо от концентрацията му, насочва реакцията към синтез на олигозахариди с DP 5 (Фиг. 6). Продуктите с DP 6 също са увеличени с 10%, но те са с най-ниска концентрация във всички тествани проби. Сравними констатации се съобщават за други ензими, използващи въглехидратни субстрати, където се наблюдава повишена специфичност към определени олигозахаридни продукти (Abdul Manas, NH. *et al.*, 2014; Doukyu, N. *et al.*, 2007). При 5% концентрация на октанол се наблюдава намаляване синтезата на всички олигозахариди, което потвърждава резултатите от анализите на общата ензимна активност и тяхното инхибиране. Обратно, същият органичен разтворител в 20% концентрация подобрява синтезата на всички глюкоолигозахаридни продукти.



Фигура 6. Динамика на промените на трансферазната реакция с акцептор малтоза във водно-органична среда с: (A) 5% ДМСО и (B) 20% ДМСО.

Получените резултати показаха, че синтеза на олигозахариди в резултат на трансферазната реакция не се повлиява значително в хетерогенна среда с 5% или 20% ДМСО, п-хексан и октанол. В посочените реакции се наблюдава синтез на олигозахариди със степен на полимеризация от 3 до 6, също както в контролната реакция без органични разтворители. Следователно, независимо от наблюдавания частичен инхибиращ ефект на тези разтворители върху изследваната

гликозилтрансфераза, не беше променена ефективността на акцепторната реакция по отношение на степента на полимеризация на синтезираните олигозахариди. Разтворители като *n*-хексан и октанол не се смесват с вода, но тяхното присъствие в реакционната среда води до преразпределение на олигозахаридите в различни етапи от трансферазната реакция, изразяващ се в повишаване добива на GOS с DP 4 и 5. Като следствие, тази функция може да се окаже изгодна за адаптиране на синтеза на различни продукти.

Известно от проведени изследвания досега, че използването на бифазни системи с несмесващи се с вода органични разтворители, биват успешно внедрени при гликозилиране на алифатни алкохоли, монотерпеноиди, ароматни алкохоли и феноли. Сред предимствата на бифазните системи са подобрената ензимна стабилност и по-лесното възстановяване на продукта, като същевременно се избягва инхибирането от субстратното инхибиране (De Winter, K. *et al.*, 2014). В това отношение, получените данни за динамиката на акцепторните реакции, катализирани от глюканзахараза URE 13-300 са добра предпоставка за приспособяване на синтеза на продукта след рационален или полу-рационален дизайн на мутации на ключови аминокиселинни остатъци (Malbert, Y. *et al.*, 2014; Meng, X. *et al.*, 2022).

2.4. Влияние на компоненти от етерични масла, разтворени в 20% ДМСО върху активността на глюканзахараза URE 13-300

Беше изследвано влиянието на три монотерпеноидни съединения от етерични масла карвакрол, тимол и ментол върху общата активност на гликозилтрансфераза URE 13-300. Крайните концентрации на тези съединения в реакционната смес варираха между 10 и 80 mmol/L. При всички реакции с карвакрол и тимол не се установи инхибиране на ензимната активност. Напротив, беше отчетено неутрализиране на инхибиращия ефект на ДМСО, който е добавен като съразтворител в 20% концентрация. При реакции с ментол, инхибиторният ефект върху активността на GS URE 13-300 достига 28% при концентрация от 50 mmol/L, а остава непроменен при добавянето на 80 mmol/L ментол към ензимната реакция.

Такива терпенови алкохоли могат да бъдат освободени от съответните им гликозидни прекурсори чрез ензимна хидролиза, което води до контролирано освобождаване на аромат. Нещо повече, противораковите, антибактериалните, аналгетичните и противовъзпалителните действия на ментола са привлекателни за въвеждането му в продукти с добавена стойност (Nisar, S., 2022). Наскоро са разработени енкапсулиране с ментол и лутеолин в микрокапсули в присъствието на малтодекстрин и соеви протеини в ароматни напитки (Mora-Flórez, L.S. *et al.*, 2023). От подробното изследване на пребиотичните свойства на GOSs, синтезирани от глюканзахараза URE 13-300 е видно, че олигозахаридните продукти имат пребиотичен потенциал (Bivolarski, V. *et al.*, 2018). Заедно с модификацията на съотношението акцептор: донор, добавянето на различни органични разтворители към трансферазната реакция може да се окаже подходящо за по-нататъшни приложения за персонализирани продукти.

2.5. Заключение

Проведеното изследване за динамиката на акцепторни реакции с малтоза, катализирани от глюканзахараза URE 13-300, дефинира за първи път синтеза на олигозахариди в хода на трансферазната реакция и техните кинетични характеристики. Също така, беше определено влиянието на органичните разтворители върху ензимната

активност на изследвания ензим. Органичните разтворители ДМСО, n-хексан и октанол показаха сравнително слаб инхибиторен ефект до 20% концентрация в реакционната среда. Някои от тези разтворители оказаха влияние върху синтеза на олигозахариди по време на трансферазната реакция към GOS с по-висока степен на полимеризация, като не инхибират трансферазната реакция. Гликозилирането на терпеноиди, производни на етерични масла като ментол, могат да бъдат включени в моделирането на хранителни добавки с добавена стойност.

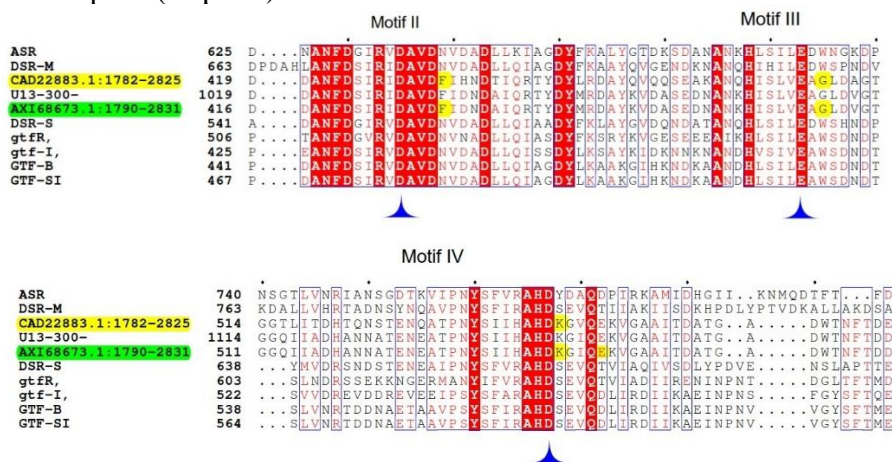
3. Сайт-насочен мутагенез в гена, кодиращ глюканзахараза URE 13-300

Натрупването на данни за биохимичното охарактеризиране на множество ензимни семейства и развитието на молекулярната биология през последните десетилетия е изместил използването на случайния подход към рационален и полу-рационален подход.

Методът сайт-насочен мутагенез (SDM) е разработен от Майкъл Смит през 1978 г. и дава възможност да се изследва значението на специфична аминокиселина върху структурата и функцията на ензима, което е важна предпоставка за изучаване на връзката между тях (Hutchison *et al.*, 1978; Qu, G. *et al.*, 2018). Той включва въвеждането на т. нар. точкови мутации, при които дадена аминокиселина при предварително определено място в белтъчната молекула се заменя с една от другите 19 аминокиселини. Необходимо условие е наличието на достатъчно богата база данни за структурните особености на съответното ензимно семейство. Също така, разбирането за ензимния каталитичен механизъм повлиява точността и степента на успех на рационалния дизайн.

3.1.Биоинформатичен анализ и дизайн на мутагенни праймери

В първата стъпка за получаване на молекулярен мутант със замяна на една аминокиселина се извърши подробен биоинформатичен анализ. Аминокиселинната секвенция на глюканзахараза URE 13-300 беше сравнена с тези на някои изучени глюканзахарази, подложени на мутация. Бяха идентифицирани седемте консервативни мотива, съдържащи важни аминокиселини за специфичността на връзките в синтезираните продукти. На фиг. 7 са показани мотиви II, III и IV, където се намират каталитичните остатъци (триада), съответно нуклеофилът аспарат (Asp543), киселинно-основният катализатор глутамат (Glu581) и стабилизаторът на преходното състояние – аспарат (Asp654).



Фигура 7. Подравняване на аминокиселинната последователност на глюканзахараза URE 13-300 спрямо различни глюканзахарази от семейство GH70.

От проведения анализ стана ясно, че каталитичен домен 1 притежава характерните за семейство GH70 строго консервативни аминокиселинни остатъци. В тези три мотива представляват Множеството от проведените досега мутации засягат консервативните мотиви в домен А. За сравнение, ключови аминокиселинни замени в ключови места в домен В, който също заема важна роля при формирането на каталитичния джоб, ориентирането на акцепторите при формиране на специфичните гликозидни връзки и взаимодействието им с нарастващата глюканова верига, се докладват по-рядко. В следващ MSA анализ подравняване на множество секвенции бяха сравнени следните ензими от семейство GH70 с GS URE 13-300: GTF180 (AY697430.1) от *Lb. reuteri* 180; GTFR (AB025228.1) от *S. oralis* ATCC 10557; DSRS (AAD10952.1) от *Ln. mesenteroides* NRRL B-512; ASR (AJ250173.2) от *Ln. mesenteroides* NRRL B-1355, DSRE от *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299; GTF8293 (ABJ61965) от *Ln. mesenteroides* ATCC 8293 и GTFI (AAC63063.1) от *S. downei* MFe28 (Фиг. 8).

След преглед на ефектите, получени в следствие на аминокиселинна замяна в някои от посочените ензими, беше избрана аминокиселината глицин, намираща се на позиция 449. Тази позиция не е строго запазена в тях, но се появява най-често при анализа на множество секвенции. В мутанзахараза GtfI на тази позиция присъства тирозин (Tyr, Y), в декстранзахараза GTFR присъства лизин (Lys, K), а в декстранзахараза DSRS – серин (Ser, S).

Мутации са били провеждани в някои от близкостоящите аминокиселини, като се доказва, че те са определящи за типа връзки в полизахаридните продукти (Meng, X et al., 2014; Funane K. et al., 2005; Molina M. et al., 2019). В позициите, съответстващи на 449 в GS URE 13-300 беше открита една проведена до момента мутация, в декстранзахараза DSRS, която съответства на серин в позиция 445. Серинът е полярна аминокиселина и е заменена с лизин, притежаваща основни свойства. В настоящият случай, оригиналната АК е с амфотерни свойства. Аминокиселината лизин беше избрана за замяна, по модела на изследването на Funane и съавтори (2000). Също така, лизин присъства на съответната позиция в декстранзахараза GTFR. Интересно беше да се проследи как замяната с аминокиселинен остатък, противоположна по големина и заряд, би повлияла образуването на типа гликозидни връзки в структурата на синтезираните от URE 13-300 глюкани.

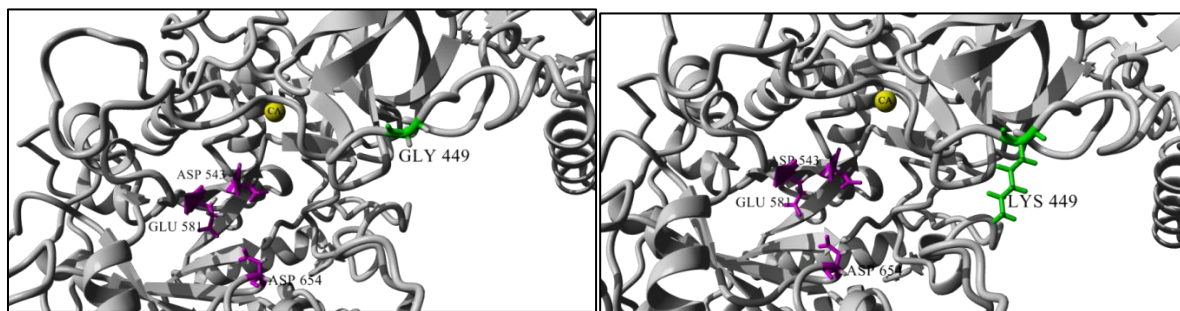
GTF13-300	431	MNQMVDSQSNWNISS	ESK	GTDH	LOGG	GALLYVN	.SDL
GTF180	916	MNEFVTKNSMWNKDS	ENVDY . .	GGLQ	LOGG	FLKYVN	.SDL
GTFR	398	MGA FVK TQP NWN	IKTESETTGT	KKDH	LOGG	ALLYTN	.NEK
DSRS	437	MAAFIVAQPQWN	NETSEDM . . .	SNDH	LQNG	ALTYVN	.SPL
ASR	519	IDSFVK TQANWN	KQTEDEAFD	GLQW	LOGG	FLAYQDD	SHR
DSRE	415	MNKLIDSQANWN	IDS	ESK	GNDH	LOGG	ALLYVN
GTF8293	411	MNQMVDSQSNWN	ISS	ESK	GTDH	LOGG	ALLYVN
GTFI	334	ISAFVK TQP QWN	GES	EKP	YDDH	LQNG	ALKFDNQSDL

Фигура 8. Подравняване на аминокиселинната последователност в домен В.

3.2. Изграждане на хомоложен модел на каталитичен домен 1

С цел визуализация на аминокиселинната замяна и оценка на конформационните промени, беше изграден хомоложен модел на каталитичен домен 1 на база решената кристалографска структура на GtfB от *S. mutans* (Schormann et al., 2023). Аминокиселината се намира в гънка В1, която оформя периферната част на каталитичния джоб, както и на пътя на нарастващата глюканова верига. Намира се пространствено далеч от каталитичната триада, но в близост до подмясто +II, подпомагащо свързването на акцептора (Meng et al., 2014). На фиг. 9 е показан

хомоложния модел на CD1, заедно с предполагаемата конформация на ензима преди и след аминокиселинната замяна.

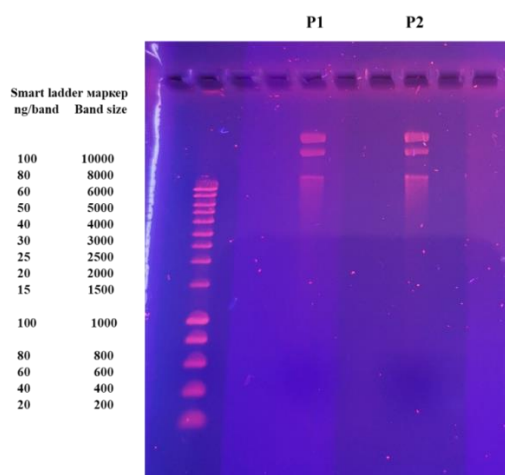


Фигура 9. Хомоложен модел на каталитичен домен 1 на глюканзахараза URE 13-300. (А) Конформация на каталитичен домен 1 с оригиналната аминокиселина глицин; (Б) Конформация на каталитичен домен 1 със заменената аминокиселина лизин.

3.3. Получаване на мутант на глюканзахараза URE 13-300

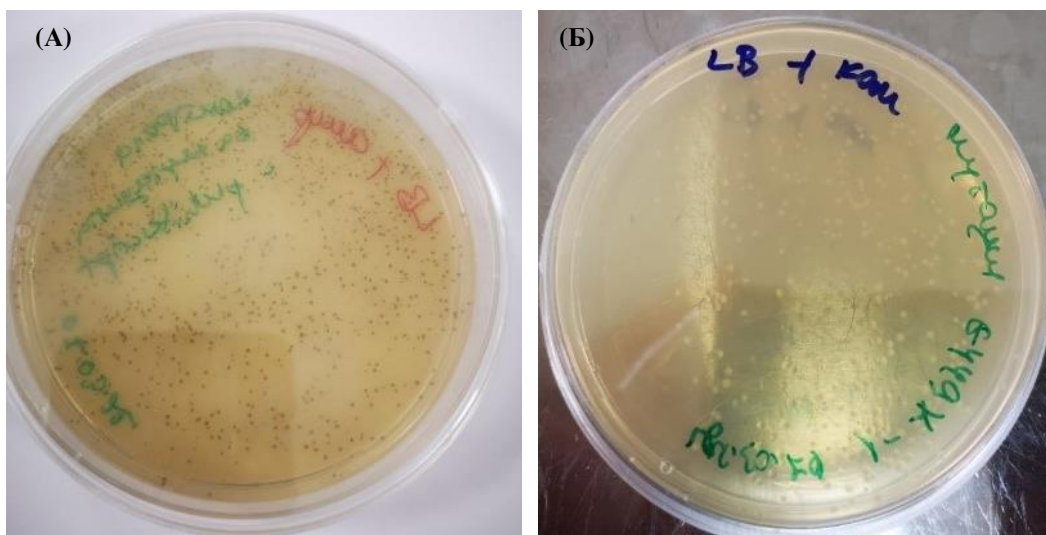
3.3.1. Сайт-насочен мутагенез

От рекомбинантен щам *E. coli* BL21 URE 13-300 беше изолиран плазмидът, съдържащ гена, кодиращ глюканзахараза URE 13-300 (Фиг. 10).



Фигура 10. Агарозна гел-електрофореза за визуализация на изолираните и пречистени плаزمиди, носещи гена, кодиращ глюканзахараза URE 13-300. *Легенда:* Smart ladder маркер – ДНК стандарт с известна молекулна маса и интензитет. Проба P1 и P2 – изолираните и пречистени плазмиди.

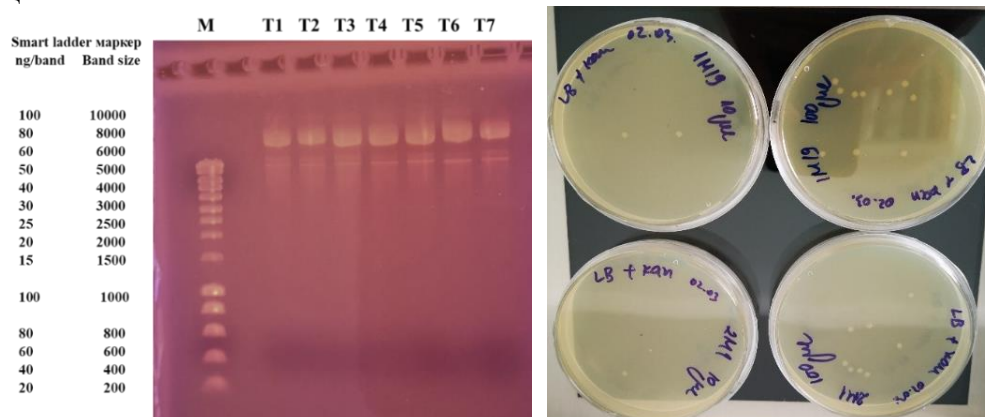
След получаване на PCR продуктите и разграждането на метилираните (матричните) ДНК вериги, беше проведена трансформация в субклониреща система, представляваща хемокомпетентни клетки *E. coli* XL10 Gold. Пробата, съдържаща контролния плазмид беше култивирана на хранителна LB агарова среда с ампицилин. Пробата с мутацията в гена, кодиращ URE 13-300, беше разпределена в две LB агарови среди, съдържащи канамицин. Така пригответените щамове бяха култивирани за 16 часа при 37 °С. След изтичане на времето за култивиране се наблюдаваха единични колонии, както в контролната мутация, така и в мутацията на URE 13-300 (Фиг. 11). Ефективността на проведената мутация беше над 95%. Единични колонии от получените трансформанти бяха култивирани в LB течна среда с канамицин.



Фигура 11. Контролна мутация (А) и мутация на URE 13-300 с праймер G449K (Б)

3.3.2. Изолиране на мутант

Проведе се изолиране и пречистване на плазмидна ДНК, носеща мутантния ген от култивираните трансформанти (Фиг. 12). Два от пречистените плаزمиди бяха трансформирани в *E. coli* BL21 Hi-control клетки с цел експресия на мутантния ген (Фиг. 12). Два от новите трансформанти бяха култивирани в LB хранителна среда за една нощ.



Фигура 12. Изолиране на плазмиди, носещи мутантния ген и получени колонии *E. coli* BL21 след извършената трансформация с плазмиди T3 и T4. Проби в гела: М – Smart ladder маркер; T1 до T7 – изолирани плазмиди от трансформанти.

Културите от щам *E. coli* BL21 показаха добро развитие и бяха посети в 5 mL течна ТВ среда, която е доказано по-подходяща при експресия на рекомбинантните протеини (Пиев, I. *et al.*, 2018). За проверка синтеза на полизахарид от мутантния ензим, двете култури бяха култивирани на агарови среди, съдържащи захароза и индуктор IPTG (Фиг. 13).

Наблюдаваха се мукозни колонии, което доказва продуцирането на активен мутантен ензим от рекомбинантния щам *E. coli* BL21. Също така се забелязва, че количеството на синтезирания полизахарид е по-малко, в сравнение с изходния ензим. Не беше наблюдавана разлика между външния вид и количеството синтезиран продукт между двата трансформанта, затова са следващите анализи беше избран само един от тях. Мутантният ензим беше означен като U13M1, за да бъде разграничаван от

изходния ензим. Двата варианта на изследваната глюканзахараза бяха сравнени чрез SDS-PAGE електрофореза.

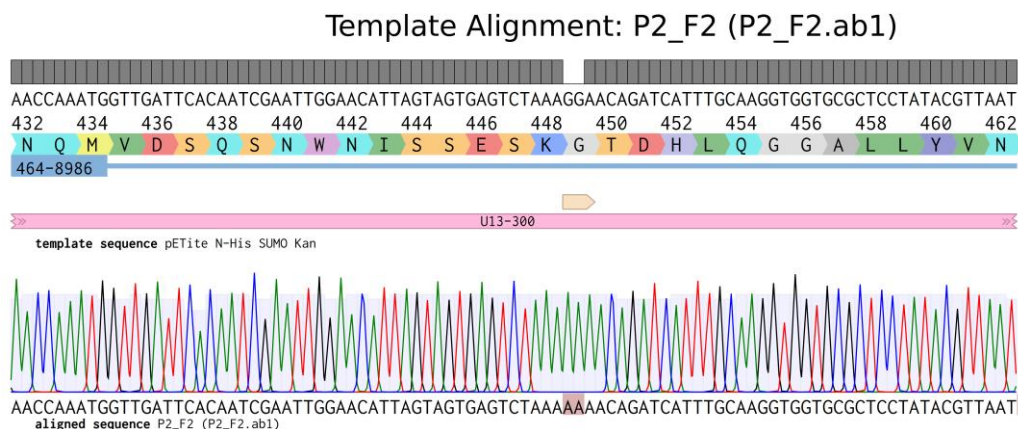


Фигура 13. Скрининг на трансформантите за рекомбинантна експресия на ензима върху агарови среди с 20% захароза. Ляво – рекомбинантен щам *E. coli* BL21 URE 13-300; дясно – *E. coli* BL21-T1; средно – *E. coli* BL21-T2.

Глюканзахараза URE 13-300 има потвърдено молекулно тегло от 311.85 kDa, потвърдено и от проведено секвениране (Bivolarski, V. *et al.*, 2018). От получените резултати от проведеният *in situ* анализ беше доказано, че двете форми на глюканзахараза URE 13-300 показват еднакви ивици, около 300 kDa. Замяната само на една аминокиселина не довежда до видима промяна в молекулното тегло, следователно можем да заключим, че в следствие на проведената мутация не са настъпили допълнителни промени в аминокиселинната последователност на ензима.

3.3.3. Секвениране на частта от гена, кодиращ глюканзахараза URE 13-300, в която е въведена мутацията.

За потвърждение на протеклата мутация и вида на заменената аминокиселина, от клетки *E. coli* BL21 U13M1 беше изолирана плазмидна ДНК, изпратена за секвениране. Получените резултати недвусмислено показаха правилната замяна на аминокиселината глицин (G) с лизин (K). Подравняване на получените секвенции с матричната верига ДНК са показани на фиг. 14.



Фигура 14. Резултати от секвенирането на част от гена, кодиращ глюканзахараза URE 13-300, в който се намира заменената аминокиселина. Кодонът AAA, кодиращ лизин, се намира на съответната позиция на кодон GGA, доказвайки настъпилата мутация.

4. Оптимизиране условията на получаване на мутантна глюканзахараза U13M1 и условията на ензимната реакция

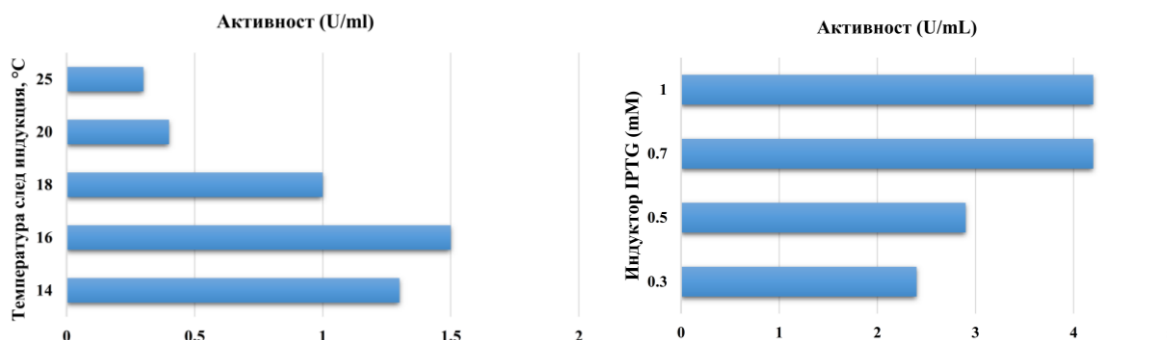
4.1. Оптимизиране условията за получаване на мутантна глюканзахараза U13M1

4.1.1. Влияние на температурата върху експресията на мутантен ензим U13M1

Секрецията на мутантен ензим U13M1 беше изследвана при следните температури след добавяне на индуктор: 14, 16, 18, 20 и 25 °C и с продължителност 24 часа след индукция. Най-висока активност се отчете при 16 °C – 1.5 U/mL, а най-ниската при 20 и 25 °C, където активността беше на границата на детекция. Близките до оптималната температура при индукция – 14 и 18 °C се отчетоха активности съответно 86% и 75% от максималната активност (Фиг. 15). Температурата на експресия се запази идентична с тази на изходният ензим. Този резултат също се подкрепя и от други автори, като е прието, че по-ниската температура след индукция е предпочитана за рекомбинантната експресия.

4.1.2. Влияние на концентрацията на индуктор IPTG върху експресията на мутантен ензим U13M1

Бяха изследвани концентрации на индуктор IPTG 0.3, 0.5, 0.7 и 1.0 mM (Фиг. 15). Резултатите, отчетени при последните две концентрации показват, че оказват сравнимо влияние върху продукцията на ензима, затова могат да се използват и двете концентрации. За следващите анализи беше избрана крайна концентрация от 0.7 mM, тъй като IPTG оказва токсичен ефект върху клетките.



Фигура 15. Влияние на температурата и концентрацията на индуктор върху продукцията на мутантна глюканзахараза U13M1 от рекомбинантни клетки *E. coli* BL21.

4.1.3. Определяне на оптимален клетъчен разтеж преди добавяне на индуктор и определяне продължителността на ферментацията

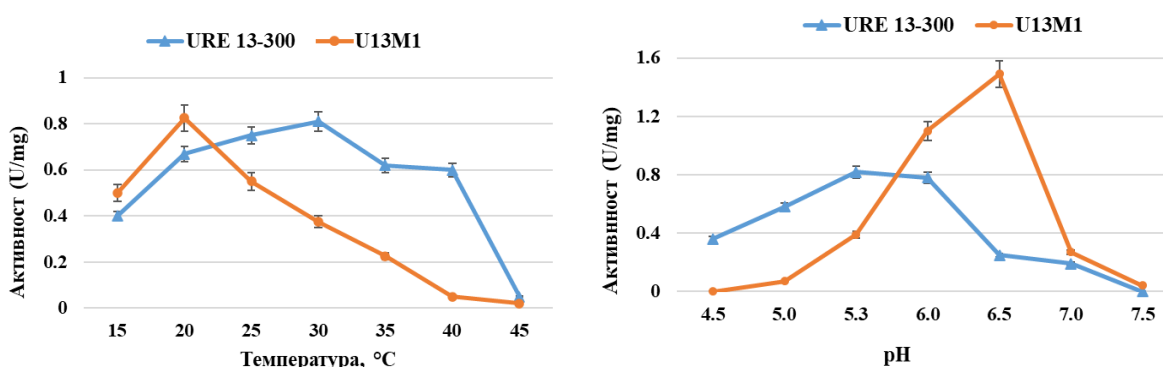
След провеждане на серия от ферментации се установи, че оптималното продуциране на мутантния ензим се достига при добавяне на индуктор IPTG след като клетъчните култури са преминали експоненциалната фаза на разтеж. Максимална ензимна активност от 0.7 U/mg се достигна при OD_{600nm} между 1.7 и 1.8. За продължителността на провеждане на рекомбинантната експресия беше отчетена най-висока ензимна активност между 11-ти и 13-ти час, със стойности 2.0 U/mL. След този етап, добивът намаля постепенно и до 24-тия час от ферментацията намаля с 25%. Оптималната температура на индукция беше 16 °C.

4.2. Сравнение между условията на експресия на изходната глюканзахараза URE 13-300 и мутантен вариант U13M1

При сравняване на условията на експресия при двата ензима се открояват съществени разлики. Мутантният ензим U13M1 се продуцира успешно при по-късен етап от клетъчния растеж. По отношение количеството на индуктор се наблюдават приблизително еднакъв добив на ензим U13M1 при концентрация 0.7 и 1 mmol/L IPTG. Температурата след индукция остава еднаква, а продължителността на ферментацията се намаля от 24 часа до 13 часа. При изследването на ензимната активност на мутант U13M1 при оптималните условия, определени за изходната глюканзахараза URE 13-300 се открива значителна разлика – най-високата стойност за ензимна активност на U13M1 беше 0.7 U/mg.

4.3. Оптимизиране условията на ензимната реакция на U13M1

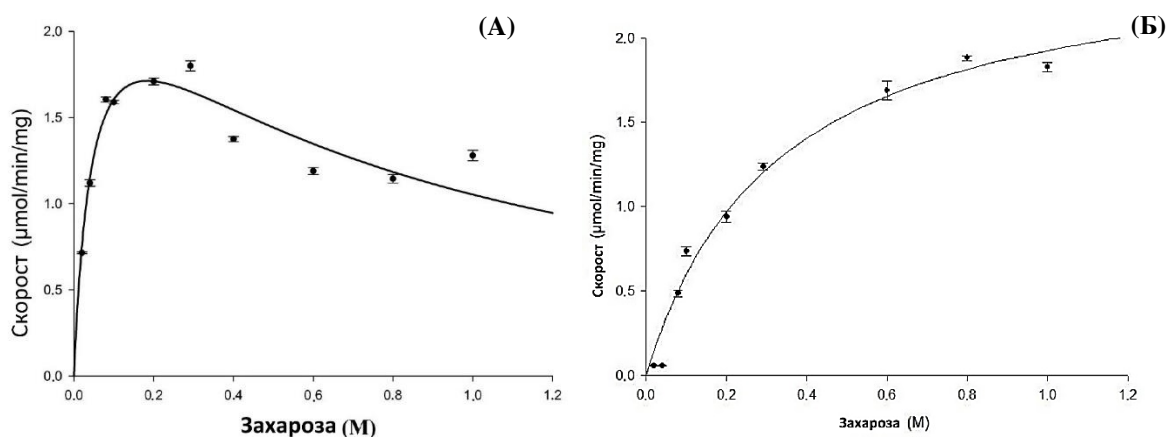
Биохимичните характеристики на мутантният ензим U13M1 бяха определени, за да се оцени влиянието на аминокиселинната замяна върху ензимните свойства. Температурният оптимум беше определен като се проведеха реакции между 15 и 45°C. Най-висока ензимна активност беше отчетена при 20°C, за разлика от оптималната температура при изходната глюканзахараза URE 13, която е 30°C. При 30°C беше отчетена с близо 50% понижена активност на глюканзахараза U13M1. Провеждането на ензимната реакция при 40°C доведе до почти пълна загуба на активност. Оптималните стойности на рН за ензимната реакция на мутантния вариант също показаха много съществени различия в сравнение с родителския тип. Най-висока активност се достигна при рН 6.5. При използването на неутрални буфери се отчете драстично понижение на ензимната активност – повече от 80% при рН 7.0 и почти пълна загуба на активност при рН 7.5. Активността на U13M1 в киселинни буфери също беше значително намалена – около 70% по-ниска при рН 5.5, а при рН 4.5 не се отчете ензимна активност. На фиг. 16 са представени резултатите за ензимната активност на мутантния ензим и са сравнени с тези за изходната глюканзахараза URE 13-300, определени при предишни изследвания (Piev, I. *et al.*, 2021). Изходният ензим запазва своята активност в по-широк диапазон температури, както и притежава по-широк рН диапазон.



Фигура 16. Определяне на оптимални температура и рН за активността на мутантна глюканзахараза U13M1.

4.4. Сравнение между кинетичните показатели на двата варианта на глюканзахараза URE 13-300

Кинетичните параметри за мутантния вариант бяха изследвани и сравнени с тези, присъщи за изходната глюканзахараза URE 13-300 (Фиг. 17). Използвайки уравнението на Михаелис-Ментен и подхода на нелинейна регресия, стойността на $K_m = 0.33$ M захароза, ензимната реакция достига максимална скорост от $V_{max} = 2.6$ U/mg, а константата представлява субстратното инхибиране беше $K_i = 1.6$ M захароза. Стойността на K_m за U13M1 е седемкратно повишена спрямо изходния ензим, $K_m = 0.048$ M, но не беше отчетена промяна в стойността на V_{max} . Афинитетът между субстрата и ензима е много по-нисък при мутантния ензим U13M1. Оптималната субстратна концентрация на мутирания ензим се равнява на 0.6 M захароза, което е двойно повече в сравнение с изходния ензим. Субстратно инхибиране на мутантния ензим се наблюдава при концентрация на захароза 1.6 M, докато K_i на изходния тип е 0.69 M.



Фигура 17. Сравнение между ензимната кинетика на глюканзахараза URE 13-300 (А) и мутантен вариант U13M1 (Б).

4.5. Влияние на металните йони върху ензимната активност на URE 13-300 и U13M1

След анализ на триизмерните структури на скъсените форми на няколко глюканзахарази, беше установено, че те включват калциев йон в същата позиция близо до каталитичните домени А и В. Според Vujičić-Žagar и съавтори, отстраняването на Ca^{2+} йони от активния център води до намаляване на ензимната активност с около 40%. Този ефект вероятно се дължи на компрометирано свързване на субстрата или акцептора на съответното място.

Беше изследвано влиянието на екзогенни Ca^{2+} йони върху ензимната активност на изходния тип глюканзахараза URE 13-300 и неговия мутантен вариант (Таблица 4). Както беше докладвано за други глюканзахарази, инкубирането на ензимите с хелатиращ агент има отрицателно влияние върху ензимните активности, което се преодолява с добавяне на калциеви йони. И двата ензима се активират от Ca^{2+} йони при крайна концентрация от 5 mM, но ефектът на активиране върху глюканзахараза URE 13-300 беше два пъти по-висок – 52% за разлика от 17% по-висока ензимна активност върху мутантния ензим. Изследването на повишена концентрация на калциеви йони разкри, че при най-високата тествана концентрация – 25 mM, изходната глюканзахараза достига 78% повишение на активността, в сравнение с контролната реакция без наличие на Ca^{2+} йони. За сравнение, при измерената активност на мутантния ензим

U13M1 беше отчетено повишение с близо 30% при концентрация от 20 mM Ca²⁺ за разлика от съответната контролна реакция. Беше проведено изследване на ензимната активност на двата варианта на глюканзахараза URE 13-300 и с няколко метални йони Mg²⁺, Fe²⁺, Ba²⁺, Mn²⁺. Беше доказано, че имат положително влияние върху изходната глюканзахараза, но всички показват инхибиторен ефект върху мутантния вариант (Таблица 5). Вземайки предвид всички получени резултати за ензимната активност в присъствие на метални йони, включването на единична точкова мутация G449K намалява ефекта на активиране на металните йони върху ензима U13M1.

Таблица 1. Влияние на нарастващата концентрация на Ca²⁺ йони върху ензимната активност на U13M1.

CaCl ₂ , mM	Относителна активност, %	
	URE 13-300	U13M1
Контрола	100	100
5	152	117
10	142	123
15	156	127
20	176	133
25	178	110

Таблица 2. Влияние на различни метални йони върху ензимната активност на U13M1.

Метални йони, 5 mM	Относителна активност, %	
	URE 13-300	U13M1
Контрола	100	100
CaCl₂	152	117
MgCl₂	110	54
FeSO₄	154	44
BaCl₂	128	32
MnSO₄	120	22

4.6. Заключение

Глюканзахаразите с два каталитични домена са интересен обект за едноточкови мутации. Извършеното аминокиселинно заместване в глюканзахараза URE 13-300, се намира в домен В на каталитичен домен 1 на глюканзахараза URE 13-300. Аминикиселината глицин на 449-та позиция, беше заменена с лизин (Фиг. 9). Ефектът от това заместване засегна кинетичните параметри на ензима.

Полученият мутантен ензим U13M1 притежава забележителна промяна в кинетичните параметри в сравнение с изходния тип глюканзахараза URE 13-300. Стойностите на K_m за мутантен ензим U13M1 бяха почти 7 пъти по-високи от тези на изходната глюканзахараза, като същевременно се запазва идентичната максимална скорост. Намаленият афинитет към субстрата, който наблюдавахме, може да се дължи на промяна във формата на свързващия сайт в мутантния ензим. В съответствие с нашите резултати, мутантни форми на глюканзахараза GTF180-ΔN показват повишен K_m за захароза. Оптимумът на рН на U13M1 се измества с една единица по-високо от изходния тип ензим – до 6.5. Според предишни констатации се съобщава, че оптималното рН на различни глюканзахарази е между рН 4.7 и 7.4, но често между рН

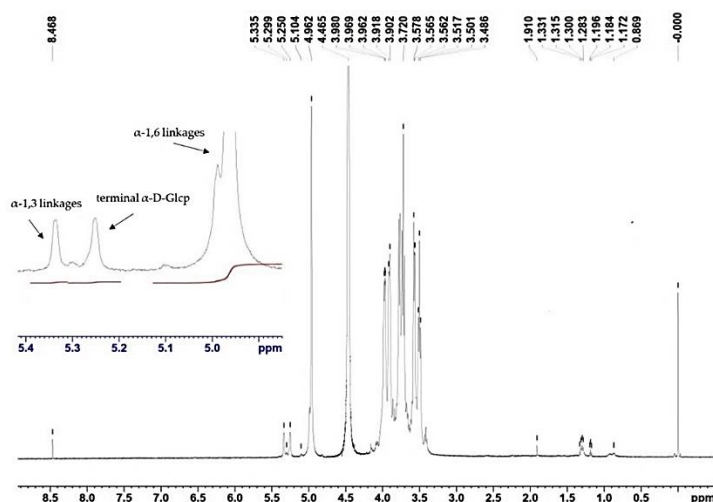
5.0 и 6.0 (Miao, M. *et al.*, 2017). Предполага се също, че по-неутрално рН може да бъде необходимо в различни реакционни среди на ензимната реакция, тъй като може да доведе до подобрен синтез на глюкан, както и промяна на неговата структура. Температурният оптимум на повечето глюканзахарази е между 30 °С и 40 °С (Kang, H.K. *et al.*, 2009). След аминокиселинното заместване с лизин, температурният оптимум на U13M1 се измества при 20°C. В съответствие с нашите резултати, декстранзахаразата от *L. mesenteroides* 0326 има температурен оптимум от 25 °С, а неговият двойно мутантен вариант P473S/P856S запазва почти максимална активност при 20 °С.

От наличната информация в литературата е известно, че такива разлики в оптималните условия между изходния и мутантен ензим не са докладвани преди това. Освен това, ензимната активност на U13M1 е чувствително по-малко инхибирана от повишаването на концентрациите на захароза. Глюканзахараза URE 13-300 се активира от Ca²⁺ и други метални йони, подобно на други глюканзахарази. Тази способност обаче се премахва от мутацията. Причината за това може да се крие във факта, че мястото на мутация е в близост до мястото на свързване на Ca²⁺ йони.

5. Изследване структурата на α -глюкан и олигозахариди, синтезирани от мутантна глюканзахараза U13M1

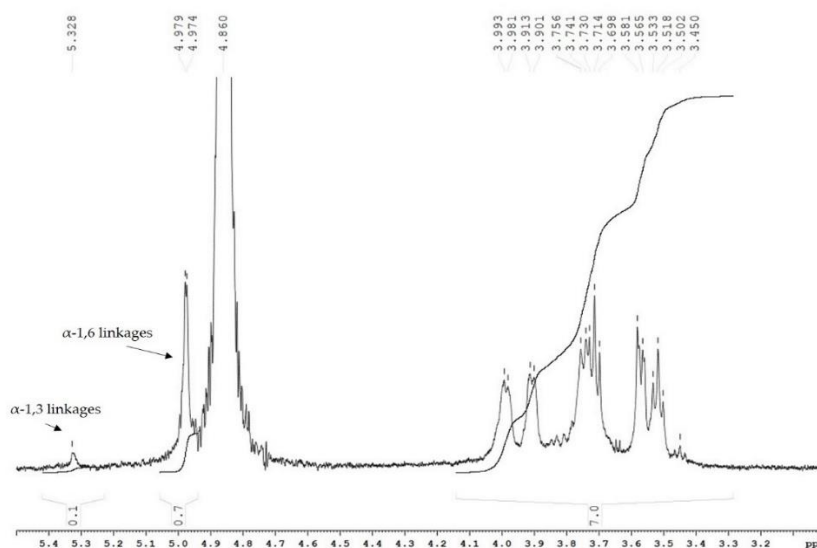
5.1. Анализ на структурата на U13M1 глюкан чрез ЯМР спектроскопия

Полимерът, синтезиран от ензима от глюканзахараза URE 13-300, се състои от 67.2% α -(1→6) връзки и 16.2% α -(1→3) връзки в основната верига, както и 8.3% на 3,6-ди-О-заместени α -D-Glcp остатъци в точките на разклоняване (Пиев, I. *et al.*, 2021). Резултатите от ядрено-магнитен резонанс (ЯМР), получени от ¹H спектрите на двата α -глюкана, показаха, че съотношението между α -(1→6) и α -(1→3) връзките е променено в следствие на включената мутация. ¹H NMR спектрите на полизахарида U13M1 разкриват два аномерни протона с химически отмествания при 4.96 ppm, представляващи 90.6 % α -(1→6) връзки и 5.33 ppm, съответстващи на 4.2 % α -(1→3) връзки (Фиг. 18). Тези резултати показват силно намалено количество α -(1→3) връзки, присъстващи в U13M1 полимерната структура. Наблюдава се също различим сигнал в основата от 4.96 ppm, което показва малко количество 3,6-ди-О-заместени α -D-Glcp остатъци, макар и не като отделен сигнал.

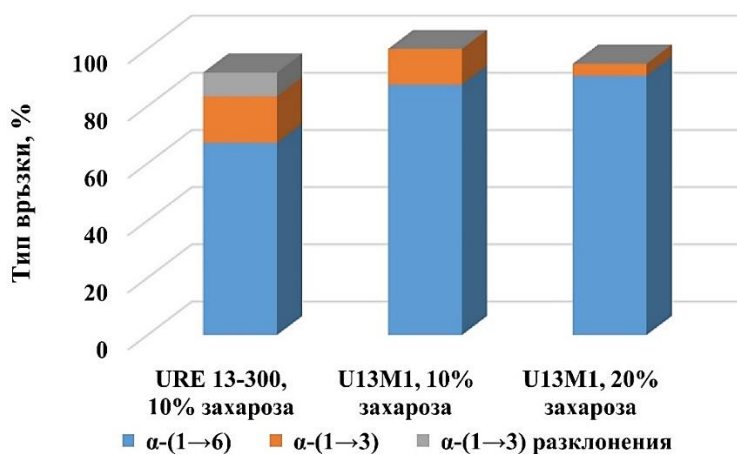


Фигура 18. ЯМР анализ на полизахарид, синтезиран от глюканзахараза U13M1 с 20% захароза.

Освен синтеза на полизахарид с оптималната субстратна концентрация на захароза за мутанта U13M1, бяха проведени и реакции с 10% захароза. ¹H NMR анализът на полимера, синтезиран при 292 mM начална концентрация на захароза, е представена на фиг. 19. При ЯМР анализа бяха регистрирани два пика при δ H-1~4.97 ppm, отговарящ на 87.5% α -(1 \rightarrow 6) връзки и δ H-1~5.32 ppm, съответстващ на наличието на 12.5% α -(1 \rightarrow 3) връзки. Разликите между типа връзки, налични в изходния полимер и модифицираните варианти, синтезирани от мутантна глюканзахараза U13M1 са представени на фиг. 20.



Фигура 19. ЯМР анализ на полизахарид, синтезиран от мутантна глюканзахараза U13M1 с 10% захароза.



Фигура 20. Сравнение между количественото разпределение на връзките в оригиналния глюкан, синтезиран от глюканзахараза URE 13-300 и модифицирания глюкан, синтезиран от мутантна глюканзахараза U13M1.

Мутантната глюканзахараза U13M1 синтезира α -глюкан с 23% увеличение на съдържанието на α -(1 \rightarrow 6) връзки и съответно намаляване на α -(1 \rightarrow 3) връзки в главната верига, а също и в разклоненията. ¹H NMR спектрите на полизахарида не показват ясен сигнал, откривайки 3,6-ди-О-заместени α -D-Glcp остатъци, но те не липсват напълно, тъй като се наблюдават в основата на сигнала 4.96 ppm. Промяната в съотношението между α -(1 \rightarrow 6) и α -(1 \rightarrow 3) връзки съответства на резултатите, получени от Funane *et al.*

(2000). Единичното заместване на T350 или S445 с лизин в глюканзахараза DSRS (съответстващо на K344 и G449 в GS URE 13-300) довежда до мутантни варианти, синтезиращи водоразтворими глюкани с повишен процент на α -(1 \rightarrow 6) връзки – от 70% за родителската декстранзахараза до 84% и 86%, съответно при всеки от мутантните варианти. И двата остатъка са разположени далеч от каталитичната триада, но тяхната двойна мутация води до увеличаване на α -(1 \rightarrow 3) връзки и дори придобива способността да включва 4% α -(1 \rightarrow 2) точки на разклонение.

Глюканзахараза GTF180- Δ N от *Lb. reuteri* 180 синтезира α -глюкан с 69% α -(1 \rightarrow 6) и 31% α -(1 \rightarrow 3) връзки – в главната верига и в точките на разклоняване, което съответства на вида и съотношението на връзките, присъстващи в полимера, синтезиран от изходният ензим URE 13-300. Известно е, че две позиции в глюканзахараза GTF180- Δ N – L938 и L940 участват в оформянето на местата за свързване на акцепторния субстрат. Заместването на L938 с аланин, серин и лизин (L938A/L938S/L938K) довежда до повишено количество на α -(1 \rightarrow 6) връзки от 67% в изходния тип съответно до 78%, 76% и 90% (Meng, X. *et al.*, 2015). Освен това, при въвеждането на аминокиселини с ароматна странична верига, способността за формиране на α -(1 \rightarrow 3) връзки намаля значително при замяна с фенилаланин (93%), а изчезва напълно при аминокиселинна замяна с триптофан. За сравнение, резултатите от настоящото изследване показваха, че заместването на малкия остатък глицин с много по-обемен лизин G449 (съответстващ на G936 в GTF180- Δ N) води до значителна промяна на съотношението между α -(1 \rightarrow 6) и α -(1 \rightarrow 3) връзки. Възможна причина за тази модификация е, че лизинът може да попречи на способността за включване на α -(1 \rightarrow 3) връзки в главната верига и/или в разклоненията. Степента на разклоняване в модифицирания глюкан от U13M1 беше силно нарушена поради въведената мутация. Независимо от това, полимерът запази неразтворимите характеристики на полизахарида, синтезиран от глюканзахараза URE 13-300.

5.2. Изследване реологичните свойства на модифицирания глюкан

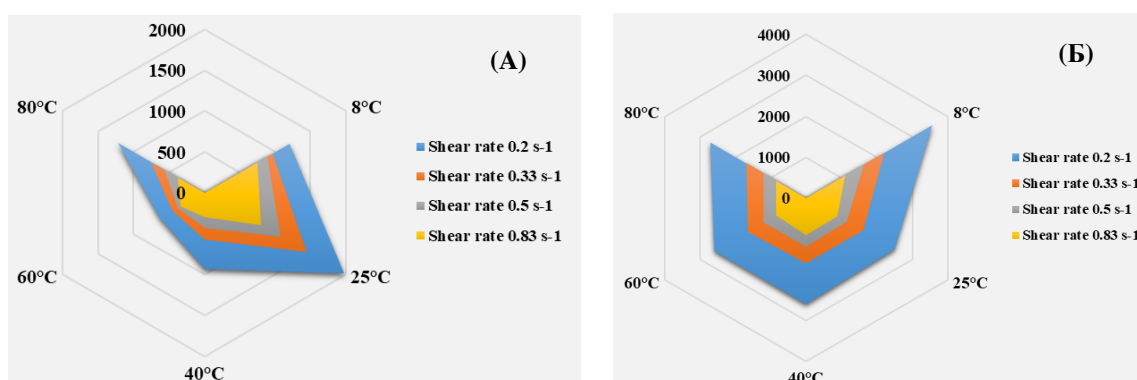
Поведението на набъбване във вода и на двата глюкана, получени при ензимните реакции с изходната глюканзахараза URE 13-300 и мутантния вариант U13M1 беше определено. Капацитетът за задържане на вода на U13M1 глюкан беше изчислен на 1125% (\pm 7.6), представляващо близо 2 пъти повишение, спрямо глюкана, синтезиран от глюканзахараза URE 13-300, а именно 715% (\pm 6.0). Неразтворимият полизахарид, синтезиран от U13M1, образува по-равномерна суспензия, която не беше под формата на хидрогел. Високата способност за задържане на вода обикновено е придружена от висока разтворимост във вода поради абсорбционната структура на полимера, причинена от образуването на водородни връзки. За разлика от получените резултати в настоящата работа, водоразтворимите екзоползахариди от *Lactococcus lactis* KC117496 и *Lb. kefiranofaciens* ZW3 имат стойности на капацитет за задържане на вода съответно 117% и 496% (Ahmed, Z. *et al.*, 2013; Saravanan, C. *et al.*, 2016).

За да се изследват реологичните свойства на полимера U13M1, беше оценен неговият вискозитет при нарастващи скорости на срязване и при различни температури при рН на пробата 6.6 и концентрацията на полимера 6% (Фиг. 21). Получените резултати показват, че модифицираният полимер проявява поведение на изтъняване при срязване (намаляване на привидния вискозитет с увеличаване на скоростите на срязване), като това при DSRS Δ 4N или някои други докладвани по-рано декстриани (Irague, R. *et al.*, 2012). По-високият динамичен вискозитет беше регистриран при най-ниската температура. Установена беше зависимост на вискозитета на водните разтвори на изследвания полизахарид от температурата.

Динамичният вискозитет на оригиналния глюкан, показва най-висока отчетена стойност от 1980 mPa.s при температура 25 °C и скорост на срязване 0.2 s⁻¹. Установеният вискозитет прогресивно намалява с увеличаване на скоростта на срязване, достигайки най-ниската си стойност – 750 mPa.s. Това доказва поведението на неразтворимия глюкан при срязване като ненютонов полизахарид. Повишаването на температурите води до редукция на вискозитета до 623 mPa.s при 60 °C и последващо покачване при 80 °C два пъти – 1220 mPa.s при една и съща скорост на срязване.

За разлика от резултатите, получени с нативния глюкан, модифицираният неразтворим глюкан, синтезиран от мутантна глюканзахараза U13M1, показва малко по-висок динамичен вискозитет, отчетен при 25 °C. Разликата е по-изразена при температура 8 °C – 3550 mPa.s при скорост на срязване 0.2 s⁻¹. Въпреки по-ниския вискозитет при по-високи температури, се отбелязва, че няма значителна разлика между 25 °C и 80 °C. Когато концентрацията на модифицирания неразтворим глюкан се намали два пъти, на динамичният вискозитет беше редуциран около четири пъти – от 2500 mPa.s, спрямо 577 mPa.s.

При оценката на получените резултати от реологичния анализ можем да заключим, че има съществена промяна към по-висок динамичен вискозитет на модифицирания полизахарид като резултат от едноточковата мутация, водеща до промяна в неговата структура. Това е предпоставка за по-нататъшното изследване на неразтворими глюкани с по-висок вискозитет и тяхното приложение в хранителната индустрия и като протектор на пробиотични МКБ.



Фигура 21. Влияние на температурата върху вискозитета на изходния глюкан (А) и модифицирания глюкан (Б).

5.3. Ензимен синтез на олигозахариди, синтезирани от глюканзахараза U13M1

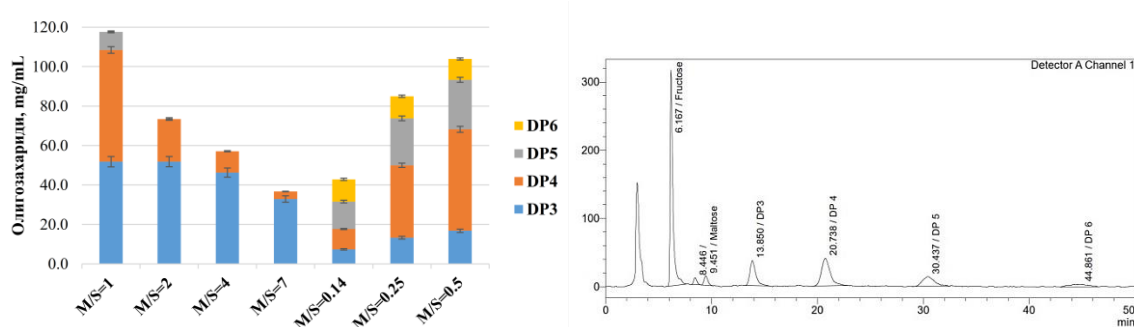
5.3.1. Влияние на различни акцептори върху синтеза на олигозахариди от глюканзахараза U13M1

С цел определяне на влиянието на сайт-насочения мутагенез върху олигозахаридния синтез, бяха проведени серия от реакции за трансгликозилиране в присъствие на малтоза, рафиноза и лактоза като акцептори. Типът на олигозахаридите според степента им на полимеризация, зависи от количеството на акцептора спрямо донорния субстрат. Използвани бяха следните съотношения за акцептори малтоза и рафиноза: акцептор:захароза = 0.14/ 0.25/ 0.5/ 1/ 2/ 4 и 7. За акцептор лактоза бяха използвани съотношенията 0.5; 1 и 2.

Реакции в присъствие на малтоза. Най-висок олигозахариден добив беше отчетен при съотношение акцептор: донорен субстрат $M/Z=1$ – близо 118 mg/mL и съотношение $M/Z=0.5$ – 103.9 mg/mL. Най-нисък добив на олигозахариди - 36.7 mg/mL се отчете при реакцията с най-голям излишък на малтоза – $M/Z=7$. Разпределението на олигозахаридите спрямо степента им на полимеризация зависи от съотношението на акцептора малтоза спрямо донора на глюкозни остатъци захароза. Чрез акцепторните реакции с малтоза се синтезираха олигозахариди с DP от 3 до 6.

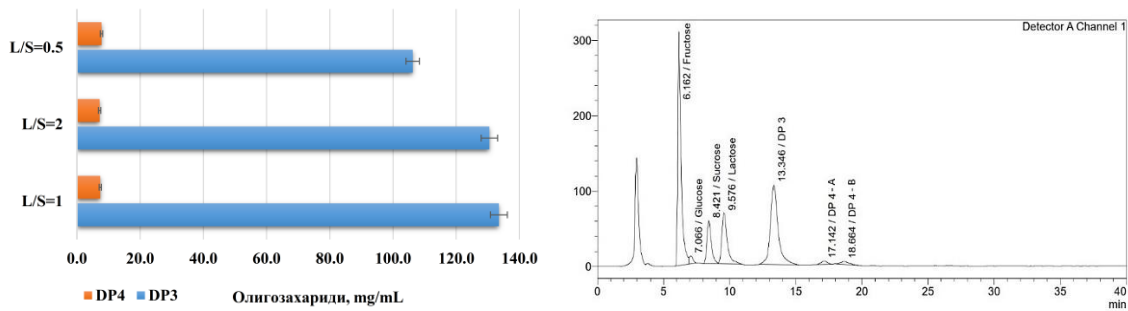
Във всички реакции преобладават олигозахаридите с DP 3 и 4. Олигозахариди с DP 3 бяха преобладаващи при съотношения $M/Z=7$ и $M/Z=4$, тъй като освен тях, се синтезират само олигозахариди със DP 4. В реакциите с излишък на захароза, най-голям добив беше отчетен при съотношение $M/Z=0.14$. Добивът на олигозахариди със DP 3 е най-голям при съотношение $M/Z=1$ и 2 – около 50 mg/mL. Най-висок добив на олигозахариди със DP 4 се постигна при съотношение акцептор: донор $M/Z=1$ – 56.6 mg/mL, а като преобладаващ олигозахарид при съотношение $M/Z=0.5$.

Във всички анализирани реакции, олигозахаридите със степен на полимеризация 5 и 6 бяха отчетени като най-малката фракция. Олигозахаридите със DP 5 се синтезират в най-висока концентрация при $M/Z=0.5$ – 25.1 mg/mL. Най-слабо представени остават олигозахаридите със DP 6 – 11.3 mg/mL в реакциите с $M/Z=0.14$ (Фиг. 22).



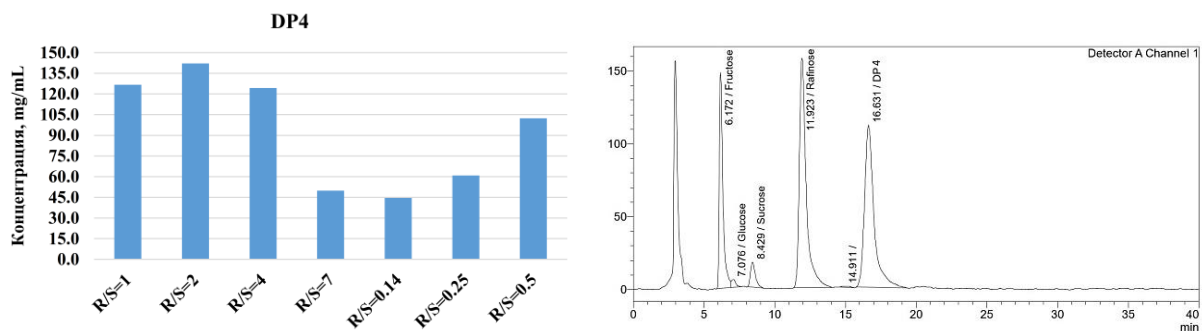
Фигура 22. Разпределение на олигозахаридите, синтезирани от мутантна глюканзахараза U13M1 в присъствие на малтоза като акцептор. Хроматограма от HPLC анализ на продуктите при съотношение $M/Z=0.5$.

Реакции в присъствие на лактоза. При проведените реакции с акцептор лактоза се синтезираха преобладаващо олигозахариди с DP 3, т.е. е бил добавен само по един глюкозен остатък към молекулата на лактозата. Освен тях се синтезираха и малка фракция олигозахариди с DP 4 – около 7 mg/mL във всяка от проведените реакции. Най-голям общ добив на олигозахариди се отчете при еквивалентно съотношение между акцептор и донор – 140.9 mg/mL. Разпределението на олигозахаридите според съотношението на акцептор и донор е представено на фиг. 23. При получените олигозахариди със DP 4 се наблюдаваха два различни пика, което доказва тяхната различна структурна организация.



Фигура 23. Разпределение на олигозахаридите, синтезирани от мутантна глюканзахараза U13M1 в присъствие на лактоза като акцептор. Хроматограма от HPLC анализ на продуктите при съотношение $L/S=0.5$.

Реакции в присъствие на рафиноза. При проведените реакции с рафиноза се синтезираха единствено олигозахариди със степен на полимеризация 4, т.е. те съдържат само един глюкозен остатък, свързан с акцепторната молекула. Най-висок добив на олигозахариди беше постигнат при съотношение рафиноза: захароза = 2 (Фиг. 24). Най-ниски добиви на олигозахариди бяха получени при съотношения, в които захарозата е в излишък (0.14; 0.25; 0.5). Продуктите на реакцията в съотношение $R/S=7$ са със съизмерима концентрация с предходно споменатите. При тях, голяма част от рафинозата остава неусвоена, поради изчерпването на свободната глюкоза в средата. Други автори също докладват гликозилиране на рафинозата. Декстранзахараза DSR-S произвежда само GOS със DP 4, а Cote и колеги съобщават за синтез на тетразахариди и незначително количество пентазахариди от алтернанзахараза (Cote, G.L. et al., 2009).



Фигура 24. Разпределение на олигозахаридите, синтезирани от мутантна глюканзахараза U13M1 в присъствие на рафиноза като акцептор. Хроматограма от HPLC анализ на продуктите при съотношение $R/S=2$.

5.3.2. Сравнение между олигозахаридите, синтезирани от изходна глюканзахараза URE 13-300 и от мутант U13M1

Акцепторни реакции в присъствие на малтоза. При проведените реакции с малтоза се получават олигозахаридни продукти със степен на полимеризация от 3 до 6, в сравнение с получените от изходната глюканзахараза, където се синтезират и олигозахариди със DP 7. Също така, и при двата варианта най-висока концентрация на синтезирани олигозахариди се отчита при съотношение акцептор:донор 1. При същото съотношение, глюканзахараза URE 13-300 синтезира GOS със DP от 3 до 6, но мутантният ензим синтезира главно GOS с DP 3 и 4, както и DP 5 в ниска концентрация - 9.2 mg/mL. Тенденцията при намаляване количеството на малтозата да се синтезират олигозахариди с нарастваща дължина остава също непроменена.

При сравнение на олигозахаридите, синтезирани от двата ензима става ясно, че в следствие на мутацията е намалена (DP 6) или загубена (DP 7) възможността за синтез на олигозахариди с по-висока степен на полимеризация. Освен това се наблюдава и цялостно намаляне в добива на тотално количество олигозахариди.

Акцепторни реакции в присъствие на лактоза. Сравнявайки продуктите от акцепторните реакции с лактоза, също се намират отчетливи разлики. Общият олигозахариден добив, синтезиран от мутанта U13M1 е по-висок с близо 15% от олигозахаридите, получени от изходната глюканзахараза. И при двата ензима се синтезират малки фракции от олигозахариди с DP 4, но количеството, синтезирано от мутантния ензим е по-ниско и почти еднакво в трите изследвани съотношения. Последващи анализи на структурата на споменатите олигозахариди може да даде светлина как се е променила тя вследствие на мутацията.

Акцепторни реакции в присъствие на рафиноза. Получените олигозахариди с акцептор рафиноза са със степен на полимеризация 4 и при двата ензима, т.е. само един глюкозен остатък е бил добавен към молекулата на рафинозата. Най-висок добив при U13M1 се достига при два пъти по-висока концентрация на рафиноза ($P/3=2$), за разлика от получените GOS от изходната глюканзахараза, където този резултат е постигнат при съотношение $P/3=1$. Мутант U13M1 синтезира с 22% повече олигозахариди от рафиноза.

5.4. Заключение

В резултат на извършената едноточкова мутация при CD1 на глюканзахараза URE 13-300, беше получен мутантен ензим със значителна промяна в оптималните стойности на рН и температура, както и променен субстратен афинитет без промяна на максималната скорост на реакцията. Ние предполагаме, че тези изменения в свойствата на ензима биха могли да хвърлят светлина върху възможните променени условия за трансферазната реакция с използването на специфични акцептори. Наблюдаваният намален каталитичен потенциал на мутантния ензим в дефинираните условия на реакцията би могъл да се компенсира при допълнително оптимизиране параметрите на реакцията. Освен това, при използване на 20% захароза (оптималната субстратна концентрация за мутантния ензим) полизахаридът, синтезиран от мутантния ензим U13M1 показва намалено съотношение на α -(1 \rightarrow 3)/ α -(1 \rightarrow 6) гликозидни връзки с около 30% в главната верига в сравнение с изходния тип глюкан. От своя страна, модулираната структура влияе върху специфичните физикохимични свойства на полимера и неговото приложение като носител на биологично активни вещества. По този начин се доказва на практика, че една привидно малка замяна на една аминокиселина в определен участък от структурата на ензима може да доведе до съществена промяна в структурата на продукта на ензимната реакция, в случая полизахарид. В допълнение се наблюдава повишено количество на α -(1 \rightarrow 3) гликозидните връзки в полимера, когато той се синтезира в присъствие на 10% захароза. Този ефект е нужно да бъде допълнително проучен. Полимерът U13M1 е запазил свойството на неразтворимост във вода, което е интересно в светлината на повишеното количество на α -(1 \rightarrow 6) връзките в неговата структура. Тази успешна мутация на глюканзахараза URE 13-300 в цялост, без скъсяване дължината на гена, е необходима база за изучаване на взаимодействието между двата каталитични домена, действащи съответно като декстранзахараза и разклоняваща захараза. При по-пълно разбиране на механизма на синтез на полимер и олигозахариди, могат да бъдат проектирани нови полимери с подобрени физични свойства и приложения, както и олиоглюкани с модулирана дължина и добив на таргетни олигозахаридни фракции.

ИЗВОДИ

1. При оптимизиране условията на секреция на глюканзахараза URE 13-300 в рекомбинантен щам *E. coli* BL21 URE 13-300 се установи максимална продукция на ензима от 4.4 U/mg при продължителност на ферментацията 24 часа след добавяне на 1 mmol/L индуктор IPTG.
2. При провеждане на акцепторни реакции при използване на малтоза като акцептор в съотношение $M/3=0.5$ в присъствието на 20% органични разтворители (ДМСО, n-хексан и октанол) се установи, че глюканзахараза URE 13-300 успешно синтезира олигозахариди със степен на полимеризация от 3 до 6, в следните количества: DP 3 – от 18.5 до 21.7 mg/mL; DP 4 – от 28.2 до 30.2 mg/mL; DP 5 – от 17.5 до 18.5 mg/mL; DP 6 – от 6.8 до 8.3 mg/mL.
3. В резултат на биоинформатичния анализ се разработиха праймери със следната последователност:
ForG449K
5'CATTAGTAGTGAGTCTAAAAAACAGATCATTTGCAAGGTGGTGCCTC3'
RevG449K
5'GAGCGCACCCSTTGCAAATGATCTGTTTTTTAGACTCACTACTAATG3'
и замяна на аминокиселината глицин в позиция 449 с лизин в каталитичен домен 1.
4. В резултат на проведения сайт-насочен мутагенез се получи мутант с променена 3D структура в каталитичен домен 1, изразяваща се в конформационно изменение в близост до участъка, свързващ акцепторните молекули с ензима.
5. Доказа се, че замяната на глицин на 449-то място с лизин променя свойствата на ензима: температурният оптимум бе изместен от 30°C към 20 °C, рН оптимум – от 5.3 към 6.5. Ензимът притежава най-висока активност при двойно по-висока концентрация на захароза – от 292 към 600 mM.
6. Установи се, че мутантният ензим е с променени кинетични параметри: $k_m = 0.33$ M захароза, $V_{max} = 2.6$ U/mg и $k_i = 1.6$ M захароза спрямо изходния ензим.
7. Доказа се, че модифицираният глюкан, синтезиран от мутантна глюканзахараза U13M1 е с променена структура като притежава близо 70% по-малко количество α -(1→3) гликозидни връзки. Модифицираният глюкан запазва неразтворимостта си във водни разтвори и показва променени реологични свойства на динамичния вискозитет.
8. Синтезираните от глюканзахараза U13M1 олигозахариди при използването на малтоза като акцептор запазват разпределението си по степен на полимеризация DP 3 – 16.2%; DP 4 – 49.5%; DP 5 – 24.2%; DP 6 – 10.2% (съотношение $M/3=0.5$). Най-добър добив на олигозахариди от 117.6 mg/mL се постигна при съотношение $M/3=1$.

ПРИНОСИ

1. Доказа се за първи път, че глюканзахараза URE 13-300 може да синтезира ефективно олигозахариди с акцептор малтоза във водно-органична среда с до 20% диметил сулфоксид, n-хексан и октанол, както и в присъствие на 5% етанол.
2. По метода на сайт-насочения мутагенез за първи път се осъществи мутация на глюканзахараза URE 13-300 при замяна на глицин на 449-та позиция с лизин.
3. За първи път се осъществи сайт-насочен мутагенез на глюканзахараза, съдържаща два каталитични домена без да бъде редуцирана дължината на гена, което се демонстрира с повлияване на цялостната 3D структура на протеина и неговите каталитични свойства.
4. Доказа се възможността за получаване на мутантна глюканзахараза (U13M1), която не се инхибира в присъствие на двойно по-висока начална концентрация на захароза (600 mM).
5. Доказа се потенциала на едноточковите мутации в глюканзахараза с два каталитични домена да доведат до синтез на модифициран α -глюкан с променена структура която повлиява физикохимичните и реологични свойства на неговите водни разтвори.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Angelova, S.**, Vasileva, T., Bivolarski, V., Iliev, I. (2023) Impact of G449 Single-Point Mutation on Glucansucrase URE 13-300 Enzyme Properties and Polysaccharide Structure. *Catalysts*, 13: 1455. <https://doi.org/10.3390/catal13121455> (Q2)
2. **Angelova, S.**, Vasileva, T., Bivolarski, V., Iliev, I. Altered rheological properties of insoluble α -glucan, synthesized by mutant glucansucrase U13M1. *Acta Microbiol. Bulg.*, приета за публикуване в издание 39(4) за 2023г. (Q4)
3. Peshkov, A., **Angelova, S.**, Avesque, C., Iliev, I., Dimcheva, D. Determination of kinetic parameters of catalase of different origin immobilized on water-insoluble glucan synthesized by recombinant glycosyltransferase URE13-300. *Ecol. Balk.*, приета за публикуване в издание 15(2) за 2023г. (Q4)

ЛИТЕРАТУРА

Пълният литературен обзор, както и списък с цитираните литературни източници може да бъде намерен в дисертационния труд.