

Egy optimalizált immobilizálási módszer kifejlesztése a D-aminosav dehidrogenáz (D-AADH) enzim esetében

Development of an optimized immobilization method for D-amino acid dehydrogenase (D-AADH)

ISZLAI András-Ernő*

Drd. BOROS Krisztina, Dr. BENCZE László-Csaba

Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutató Központ, Kémia és Vegyészmérnöki Kar,
Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Arany János utca 11. szám, Kolozsvár, 400028, Románia.

tel. 0264-405300, <https://www.chem.ubbcluj.ro/BIO/CENTRU/>

[*andras.iszlai@stud.ubbcluj.ro](mailto:andras.iszlai@stud.ubbcluj.ro)

ABSTRACT

Aromatic D-amino acids (D-AAs) have gained increasing attention in both industrial and pharmaceutical fields. However, their industrial production is currently limited due to high manufacturing costs. Utilizing engineered D-amino acid dehydrogenase derived from *Ureibacillus thermosphaericus* (U_TD-AADH) as catalyst could offer a cost-effective solution to this problem. D-AADH enzymes catalyze the reductive amination of α -keto acids to D-amino acids, however they require the presence of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH⁺) cofactor, which needs to be regenerated using another enzyme.

To ensure that the biocatalyst can be easily recycled after the completion of the reaction, it is advantageous to immobilize the enzyme on a solid support. One method is site-specific immobilization, which attaches the enzyme to a well-defined point. In this research, several mutant enzymes were created using directed mutagenesis, then immobilized site-specifically, and their efficiency and reusability were evaluated. The catalytic performance of the best-performing mutant was examined in preparative-scale reactions.

Keywords: D-amino acid, site-specific immobilization, D-amino acid dehydrogenase, reductive amination, site-specific mutagenesis.

ÖSSZEFOGLALÓ

A D-aminosavak növekvő fontosságú szerepet töltenek be napjaink vegyipari gyártási folyamataiban, emellett több különböző gyógyszerkészítmény prekursorai is, viszont magas előállítási költségeik miatt ipari gyártásuk egyelőre korlátozott. Az irányított evolúcióval kifejlesztett, *Ureibacillus thermosphaericus*-ből származó D-aminosav dehidrogenáz (U_TD-AADH) katalizátorként való felhasználása egy költséghatékony módszer keretein belül megoldást jelenthet az említett problémára. A D-AADH enzimek az α -ketosavak D-aminosavakká történő redukzív aminálását katalizálják, működésükhöz azonban elengedhetetlen a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH⁺) kofaktor, melynek regenerálása megoldható egy másik enzim segítségével.

Ahhoz, hogy a biokatalizátor a reakció befejezése után könnyen visszanyerhető és újrafelhasználható legyen, érdemes az enzimet szilárd hordozóra rögzíteni. Ennek egy típusa lehet a hely-specifikus immobilizálás, mely egy jól meghatározott pontban rögzíti az enzimet. Kutatásunk során irányított mutagenézis segítségével több mutáns enzimet hoztunk létre melyeket hely-specifikusan rögzítettünk, majd vizsgáltunk ezek hatékonyságát és újrafelhasználhatóságát. A legjobban teljesítő mutáns enzim esetében preparatív léptékű reakciókban vizsgáltuk ennek katalitikus teljesítményét.

Kulcsszavak: D-aminosav, hely-specifikus immobilizálás, D-aminosav dehidrogenáz, redukzív aminálás, hely-specifikus mutagenézis.