

Abstrakt

Chirálné amíny zohrávajú dôležitú úlohu v priemysle chuťových a vonných látok, pretože dve enantioméne formy molekuly môžu vykazovať výrazne odlišné sensorické vlastnosti vrátane vnímania chuti a arómy. Mnohé chuťové a vonné zlúčeniny interagujú s biologickými receptormi stereoselektívnym spôsobom, čo znamená, že jeden enantiomér môže poskytovať žiaduci chuťový alebo aromatický profil, zatiaľ čo druhý je menej účinný alebo dokonca vytvára nežiaduce tóny. Z tohto dôvodu sú selektívna syntéza a purifikácia chirálnych amínov nevyhnutné pre výrobu vysokokvalitných aromatických zložiek s konzistentnými sensorickými vlastnosťami. Príklady siahajú od amfetamínu podobných derivátov fenetylamínu cez mentylamín až po 1-aminoindán, zatiaľ čo ďalšie chirálne amíny, ako sú 2-fenylglycinol, pyrrolidínové prekurzory a linalylamín, slúžia ako prekurzory komplexnejších aromatických zlúčenín. Rastúci dopyt po prírodných a udržateľných produktoch chuťových a vonných látok zároveň zvyšuje záujem o efektívnu asymetrickú syntézu a biokatalytické metódy prípravy enantioméne čistých amínov využívaných v potravinárskych a nápojových aplikáciách. Dôležité je tiež poznamenať, že chirálne amíny sú prekurzormi mnohých farmaceutických látok.

Amíndehydogenázy (AmDHs) sú NAD(P)H-dependentné oxidoreduktázy katalyzujúce reduktívnu amináciu karbonylových zlúčenín na amíny. V porovnaní s často používanými transaminázami poskytujú AmDHs viaceré praktické výhody. Zatiaľ čo transaminázy vyžadujú organický aminový donor a transaminačné systémy závislé od pyridoxalfosfátu, AmDHs katalyzujú priamu reduktívnu amináciu s využitím lacného amoniaku ako zdroja dusíka. To zjednodušuje stechiometriu reakcie, zlepšuje atómovú ekonomiku a znižuje tvorbu vedľajších produktov. Vďaka tomu, ako aj ich výbornej stereoselektivitě v kombinácii s environmentálne priaznivými reakčnými podmienkami, predstavujú AmDHs atraktívne biokatalyzátory pre farmaceutický, 'fine chemical' a priemysel chutových a vonných látok. Napriek tomu bol doteraz opísaný len obmedzený počet prirodzene sa vyskytujúcich AmDHs aktívnych voči krátkoreťazcovým alifatickým a hydroxyfunkcionalizovaným substrátom.

Cieľom tejto práce je identifikovať a charakterizovať nové AmDHs so substrátovou špecificitou relevantnou pre priemyselné aplikácie. Na usmernenie výberu a hodnotenia enzýmov bol navrhnutý panel substrátov pozostávajúci z 15 štruktúrne rozmanitých aldehydov, ketónov, hydroxyaldehydov a hydroxyketónov. Komplexný literárny prehľad zahŕňajúci 120 vedeckých publikácií viedol k vytvoreniu kurátorskej databázy obsahujúcej informácie o 218 enzýmoch a variantoch AmDH, vrátane substrátového spektra, katalytickej aktivity, preferencie kofaktora a reakčných podmienok.

Na základe rozmanitej substrátovej špecificity bolo na fylogenetickú analýzu pomocou platformy iTOL vybraných 53 enzýmov. Desiat' reprezentatívnych enzýmov s odlišnou fylogenetickou distribúciou a substrátovou preferenciou bolo následne analyzovaných pomocou homológnych vyhľadávaní vo verejne dostupných genómových databázach. Pre vybraných kandidátov bola následne vykonaná štruktúrna analýza zahŕňajúca molekulové dokovanie, simulácie molekulovej dynamiky a analýzu pomocou nástroja SmarTSzyme s

cieľom identifikovať štruktúrne determinanty ovplyvňujúce substrátovú špecificitu a navrhnúť potenciálne prospešné mutácie.

Kombinovaný bioinformatický workflow umožnil identifikáciu viacerých perspektívnych kandidátov AmDH vhodných pre heterológnu expresiu a experimentálnu validáciu. Predložený prístup poskytuje efektívnu stratégiu pre objavovanie a inžinierstvo nových AmDHs s potenciálnym využitím v udržateľnej syntéze chirálnych amínov a aminoalkoholov.