

УДК 577.151.03

ПОЛУЧЕНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В ПОСТГЕНОМНУЮ ЭПОХУ**В.И. Тишков^{1,2}, А.А. Пометун^{1,2}, Д.Л. Атрошенко^{1,2}, П.Д. Паришин¹, С.С. Савин^{1,2}**¹ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*² *Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Ферменты – это высокоэффективные природные катализаторы. Благодаря высокой регио- и стереоселективности они очень широко применяются в тонком органическом синтезе и фармацевтической промышленности. Однако высокая селективность часто является «слабым» местом, поскольку в ходе эволюции ферменты были оптимизированы по природные молекулы и поэтому они могут быть малоэффективными с синтетическими аналогами, которые часто и используются в качестве лекарственных препаратов. Другими важными факторами, ограничивающими применение биокатализа на практике, являются высокая стоимость получения, невысокая температурная и операционная стабильность, несовпадение оптимальных условий проведения процесса с оптимальными условиями функционирования самого фермента. Развитие методов рекомбинантных ДНК и белковой инженерии позволило снизить себестоимость получения и повысить стабильность, однако применение этих методов для изменения каталитических свойств и особенно селективности оказалось очень трудозатратным и часто не давало требуемого результата.

Появление методов высокоэффективного секвенирования позволило определить последовательности геномов тысяч организмов, особенно бактерий и архей. Современные секвенаторы за один цикл работы (несколько дней) позволяют секвенировать десятки геномов микроорганизмов. Развитие методов биоинформационного анализа и компьютерного моделирования дает возможность предсказания каталитических свойств и селективности ферментов. Основываясь на результатах биоинформационного анализа можно выбрать источник, в геноме которого имеется ген фермента со свойствами, которые наиболее близки к желаемым. В результате такого подхода (genome mining) были клонированы тысячи генов разных ферментов. В данном докладе будут представлены наши собственные данные по использованию данного подхода. В результате были получены новые формиаатдегидрогеназы (FDH) и оксидазы D-аминокислот (DAAO) с повышенной каталитической эффективностью и стабильностью. В случае DAAO были клонированы ферменты нового типа, которые ранее не были описаны.

Несмотря на очень высокую каталитическую эффективность, ферменты имеют свои для этих параметров предельные значения. Поэтому нельзя постоянно улучшать свойства отдельного биокатализатора. Если в процессе используется не один а два (или более) фермента, катализирующих сопряженные реакции эффективность биокатализа может быть повышена за счет получения гибридных молекул, в которых в одной полипептидной цепи находятся последовательности обоих ферментов (слитые белки, fusion enzymes). В этом случае путь молекул (продукта первой реакции и одновременно субстрата второй) от одного активного центра до другого резко сокращается. Нами с использованием данного подхода были получены два типа таких гибридных биокатализатора на основе в качестве первого фермента цитохрома P450 BM3 или фенилацетонмонооксигеназы (РАМО), а вторым ферментом была формиаатдегидрогеназа, которая обеспечивала регенерацию восстановленного NADPH, необходимого для осуществления первой реакции. Было проведено компьютерное моделирование структур таких гибридных белков с разной последовательностью расположения ферментов (например, P450BM3-FDH и наоборот). Были получены генно-инженерные конструкции, позволяющие экспрессировать эти гибридные ферменты в активной форме, получены варианты с разным полилинкером. Гибридные биокатализаторы были получены в очищенном виде и были изучены их каталитические свойства. Было показано, что такие гибриды в зависимости от типа субстрата обеспечивают ускорение процесса от 2 до 10 раз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 20-04-00915а), РФФИ и Правительства Москвы в рамках научных проектов № 21-34-70040 мол_а_мос и 21-34-70046 мол_а_мос, Российского научного фонда (грант 18-74-0014), Грантов Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук (МД-349.2021.1.4 и МК-6239.2021.1.4), Фонда имени Александра фон Гумбольдта (стипендии В.И.Т., А.А.П.) и Германской службы академических обменов DAAD (стипендия П.Д.П.)

Секция 6. Инженерные аспекты биотехнологии
