

ПРИМЕНЕНИЕ КАРБОКСИЛАТРЕДУКТАЗ И АМИНОТРАНСФЕРАЗ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА 6-АМИНОКАПРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ГЕКСАМЕТИЛЕНДИАМИНА ИЗ АДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Т.П. Федорчук

Институт фундаментальных проблем биологии, Пущино, Россия
University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Полимерные материалы стали частью повседневной жизни, без которых сложно представить технологический прогресс. Промышленное производство полимерных прекурсоров напрямую зависит от производных нефтяной промышленности, что обуславливает увеличение негативного антропогенного воздействия на окружающую среду. Поэтому появился социальный и экологический спрос на разработку новых методов и подходов для производства пластика с использованием «более зеленых» технологий. Возникший недавно прогресс в области генной инженерии позволяет создавать разнообразные искусственные метаболические пути, манипулировать получившимися потоками метаболитов в сторону желаемого продукта, с использованием возобновляемого сырья, а также корректировать уже известные ферменты до желательных активностей и создавать новые на базе уже имеющихся.

Одним из наиболее широко используемых полимеров является нейлон, мономерный состав которого представлен адипиновой (АК), 6-аминокапроновой (6-АКК) кислотами и 1,6-гексаметилендиамином (ГМД). Из-за уже собранного для производства адипиновой кислоты *in vivo* метаболического шикиматного пути в *Saccharomyces cerevisiae* (Raj et al. 2018) необходимы дальнейшие разработки для активации карбоновой группы *in vitro*.

В данной работе рассматривается двухкаскадная биоконверсия адипиновой кислоты с образованием 6-АК из АК на первом этапе (каскад 1) и ГМД из 6-АК – на втором (каскад 2). Для повышения эффективности трансформации адипиновой кислоты были использованы регенерирующие кофакторы системы для АТФ, НАДН, НАДФН, Glu, Ala и систему, которая инактивирует пирофосфат, образующийся в ходе реакции.

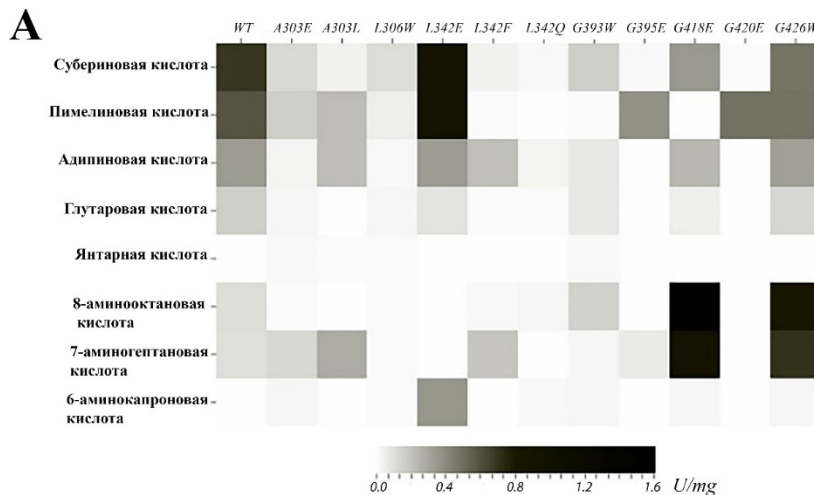
Редукция карбоксильной группы: карбоксилатредуктаза. В последнее время все больше внимания привлекают карбоксилатредуктазы как биокатализаторы для трансформации органических кислот в различные химические вещества (Finnigan et al., 2017; Napora-Wijata et al., 2014). При наличии АТФ и НАДФ, карбоксилатредуктазы катализируют восстановление карбоновых кислот до альдегидов.

Недавно уже была проведена огромная работа по изучению активности карбоксилатредуктаз с различными субстратами. В частности, на основании работ, проведенных группой Khusnutdinova et al. (2017) была установлена наиболее активная для первой каскадной реакции карбоксилатредуктаза – MAB4714 из *Mycobacteria abscessus*. К сожалению, активность данной карбоксилатредуктазы для второй каскадной реакции превращения 6-АКК в ГМД была очень маленькая (0.006 U/mg). Поэтому, на основании данных о кристаллической структуре аденилатного домена гомолога данной карбоксилатредуктазы (Gahlth et al., 2017) для вероятного увеличения активности MAB4714 с 6-АКК в качестве субстрата, было произведено более чем 20 аминокислотных замен в полости активного центра аденилатного домена MAB4714. Эти мутантные формы были экспрессированы в *Escherichia coli* и одиннадцать из них были успешно выделены и охарактеризованы с алифатическими субстратами (Рис. 1А).

Было показано, что только одна замена лизина (L) в позиции 342 на глутаминовую кислоту (E) приводила к увеличению активности фермента MAB4714 с 6-АК, который использовали в качестве субстрата (Рис. 1Б), то есть только появление отрицательного заряда в этой области являлось основополагающим для производства ГМД из 6-АК.

Перенос аминокислотной группы: аминотрансфераза. Аминотрансферазы (трансаминазы) – ферменты из группы трансфераз, катализирующие перенос аминокислот от аминокислот на кетокислоты без образования свободного аммиака. Разрабатываемая биоконверсия адипиновой кислоты к 1,6-гексаметилендиамину через 6-аминокапроновую кислоту включает получение нескольких альдегидных интермедиатов (адипиновый полуальдегид, адипальдегид и 6-аминогексанааль), которые служат в качестве субстратов для трансаминаз.

В силу того, что полуальдегид адипиновой кислоты коммерчески недоступен, в дальнейшей работе мы использовали адипальдегид в качестве субстрата для скрининга аминотрансфераз. Для этого скрининга мы отобрали 31 бактериальную ω -аминотрансферазу из семейства Pfam PF00202 (класс III) и PF00155 (классы I и II), которые, после клонирования их в *E.coli* были получены в растворимой фракции (Рис. 2А). Пять наиболее активных ферментов были охарактеризованы и, в дальнейшем, использовались для биотрансформации (Рис. 2Б).



Б

Субстрат	Карбоксилат редуктаза	K_m , mM	k_{cat} , s ⁻¹	k_{cat}/K_m , M ⁻¹ s ⁻¹
Адипиновая кислота	WT	23.5±2.8	2.2±0.1	91.9±25.1
	L342E	56.6±5.0	2.7±0.1	48.1±18.0
6-аминокапроновая кислота	WT	183.3±28.3	0.8±0.1	4.2±2.4
	L342E	70.1±14.5	2.6±0.2	37.1±10.1

Рисунок 1. Характеристики МАВ4714 дикого типа (WT) и мутантов (их название сформировано из названия аминокислоты, ее порядкового номера в первичной структуре аминокислот и ее замене). А – скрининг WT и полученных мутантов с различными алифатическими субстратами (heatmap). Концентрация каждого из субстратов – 10 мМ; Б – кинетические характеристики WT и L342E с адипиновой и 6-аминокапроновой кислотами

проявляет высокую активность и связь с АМФ, АДФ и поли-Ф (Nocsek et al., 2018). Для регенерации НАДН (Рис. 3Б) в этой работе была использована форматдегидрогеназа дикого типа (FDH) из *Pseudomonas sp.* strain 101 (Uniprot ID P33160), которая восстанавливает НАД⁺ до НАДН, используя формат в качестве восстановителя и образует CO₂ (Tishkov et al., 1993). Для регенерации НАДФН в данную FDH были добавлены две мутации (D222Q и H224N) с образованием мутантной формы (FDH(mut)) (Рис. 3Д), которая отдавала предпочтение в восстановлении НАДФ⁺ до НАДФН (Khusnutdinova et al., 2017). Аминотрансферазы, которые исследовались в данной работе использовали либо аланин, либо глутамат в качестве источников аммонийной группы, продуцируя пируват, в случае аланин-зависимой АТ или α -кетоглутарат, если в качестве донора выступал глутамат (Рис. 2Б). Для регенерации аланина была использована аланин дегидрогеназа (DH A) BSU31930 из *Bacillus subtilis* (Uniprot ID Q08352), которая осуществляла реакцию в присутствии аммония и НАДФН (Рис. 3Е). В свою очередь, для регенерации глутамата из α -кетоглутарата использовали глутамат дегидрогеназу (DH G) GDH1 из *Saccharomyces cerevisiae* (Uniprot ID P07262) также в присутствии аммония, но уже НАДН в качестве кофактора (Рис. 3В). Наконец, недавно было показано, что в ходе работы карбоксилатредуктаз, образуется пирофосфат, который может крайне негативно влиять на ферментативную активность белков, участвующих в реакции. Для устранения этого влияния в среду реакции была добавлена очищенная неорганическая пирофосфатаза PPase из *E. coli* (Рис. 3Г) (Kunjapur et al., 2016).

Все пять отобранных аминотрансфераз были протестированы в системе по биоконверсии АК в 6-АКК и ГМД (данные не показаны), оказалось, что наиболее активным в данной системе ферментом является SAV2585, который и использовался в дальнейшей работе.

Системы регенерации кофакторов и утилизации пирофосфата. Основная стратегия для снижения высоких затрат на работу, зависящих от кофакторов ферментов *in vitro*, является использование систем регенерации кофакторов (Hummel, Groger, 2014; Vrtis et al., 2002; Wang et al., 2017; Khusnutdinova et al., 2017) (Рис. 3).

Регенерация АТФ (Рис. 3А) основана на деятельности полифосфаткиназы семейства 2 (PPK2) CHU0107 из *Cytophaga hutchinsoni* (Uniprot ID Q11V81), которая катализирует (поли-Ф) – зависимое фосфорилирование АМФ до АТФ через ADP и

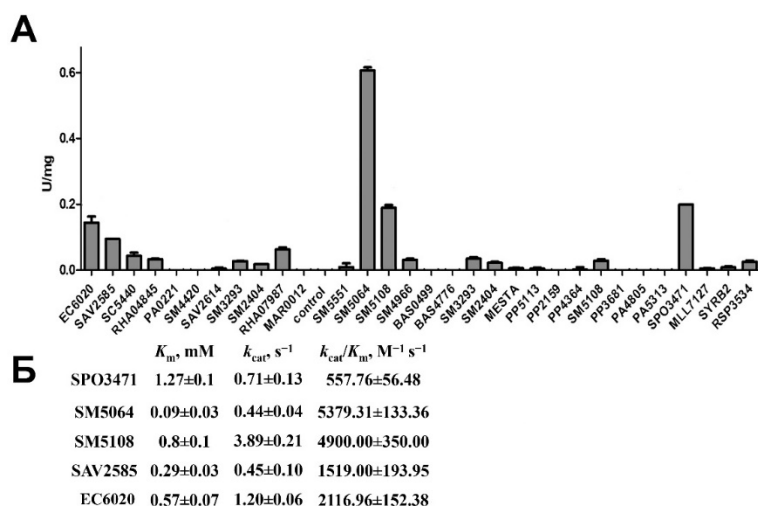


Рисунок 2. Характеристика аминотрансфераз. А – скрининг аминотрансфераз с адипальдегидом в концентрации 10 mM; Б – кинетические характеристики пяти наиболее активных ферментов с выбранным субстратом

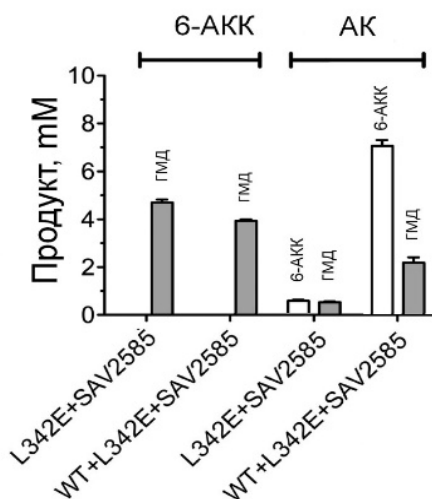


Рисунок 3. Системы регенерации кофакторов, используемые в данной работе: А – PPK2, полифосфаткиназа 2; Б – FDH, формиат дегидрогеназа; В – DH G, глутамат дегидрогеназа; Г – PPase, пирофосфатаза Д – FDH mut, мутант D222Q / H224N формиатдегидрогеназы; Е – DH A, аланин дегидрогеназа. Для экспериментальных деталей смотри материалы

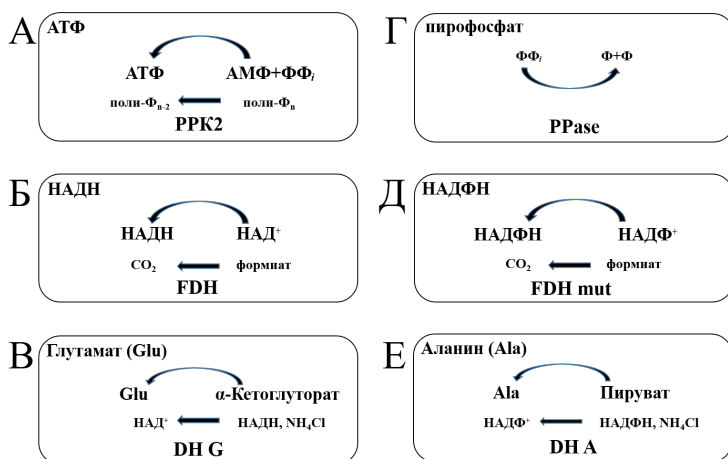


Рисунок 4. Биотрансформация in vitro адипиновой кислоты (АК) и 6-аминокапроновой кислоты (6-АКК) очищенными МАВ4714 (WT) и L342E и аминотрансферазой SAV2585 в присутствии систем регенерации кофакторов и утилизации пирофосфата (Fedorchuk et al., 2020)

Биотрансформация АК в 6-АКК и ГМД с помощью МАВ4714 WT и L342E in vitro. На основе кинетических параметров карбоксилатредуктаз группы МАВ4714 дикого типа и мутантов (Рис. 1А, Б), мутантный белок L342E был выбран для дальнейшей биотрансформации 6-АКК в ГМД, который вместе с аминотрансферазой SAV2585 показали до 50 % преобразования 6-АКК в ГМД по сравнению с 1,5 %, наблюдаемым для дикого типа (Рис. 4).

Как и ожидалось, добавление дикого типа MAB4714 к L342E не привело к улучшению в трансформации 6-АКК в ГМД, что, по всей вероятности связано с низким сродством WT с 6-АКК. Из-за перераспределения заряда в полости активного центра L342E производил небольшое количество как 6-АКК, так и ГМД, когда в качестве субстрата выступает АК. На основании этих результатов была выдвинута гипотеза о том, что преобразование АК в ГМД может быть улучшено с помощью комбинации белков MAB4714 дикого типа и L342E, потому что фермент дикого типа более активен в биотрансформации АК в 6-АКК (Каскад 1), тогда как белок L342E более эффективен в образовании ГМД из 6-АКК (Каскад-2). Использование АК в качестве субстрата одновременно с белками MAB4714 дикого типа и L342E привело к 30 % преобразованию в ГМД и 60–70 % в 6-АКК, что указывало на более чем двукратное увеличение эффективности, по сравнению с MAB4714 дикого типа.

Таким образом, очевидно, что наше исследование дало понимание молекулярных механизмов субстратной селективности дикарбоновых кислот и проиллюстрировало пригодность карбоксилатредуктаз и аминотрансфераз для двухкаскадного восстановления / аминирования субстрата.

ЛИТЕРАТУРА

- Fedorchuk, T., Khusnutdinova, A., Evdokimova, E., Flick, R., Di Leo, R., Stogios, P., Savchenko, A., Yakunin, A., One-Pot Biocatalytic Transformation of Adipic Acid to 6-Aminocaproic Acid and 1,6 – Hexamethylenediamine Using Carboxylic Acid Reductases and Transaminases. *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 1038–1048.
- Finnigan, W.; Thomas, A.; Cromar, H.; Gough, B.; Snajdrova, R.; Adams, J.P.; Littlechild, J.A.; Harmer, N.J. Characterization of Carboxylic Acid Reductases as Enzymes in the Toolbox for Synthetic Chemistry. *ChemCatChem* 2017, 9, 1005–1017.
- Gahlloth, D.; Dunstan, M.S.; Quaglia, D.; Klumbys, E.; Lockhart-Cairns, M.P.; Hill, A.M.; Derrington, S.R.; Scrutton, N.S.; Turner, N.J.; Leys, D. Structures of carboxylic acid reductase reveal domain dynamics underlying catalysis. *Nat. Chem. Biol.* 2017, 13, 975–981.
- Hummel, W.; Groger, H. Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems. *J. Biotechnol.* 2014, 191, 22–31.
- Khusnutdinova, A.N.; Flick, R.; Popovic, A.; Brown, G.; Tchigvintsev, A.; Nocek, B.; Correia, K.; Joo, J.C.; Mahadevan, R.; Yakunin, A.F. Exploring Bacterial Carboxylate Reductases for the Reduction of Bifunctional Carboxylic Acids. *Biotechnol. J.* 2017, 12(11), 1600751.
- Kunjapur, A.M.; Cervantes, B.; Prather, K.L.J. Coupling carboxylic acid reductase to inorganic pyrophosphatase enhances cell-free in vitro aldehyde biosynthesis. *Biochem. Eng. J.* 2016, 109, 19–27.
- Napora-Wijata, K.; Strohmeier, G.A.; Winkler, M. Biocatalytic reduction of carboxylic acids. *Biotechnol. J.* 2014, 9, 822–843.
- Nocek, B.P.; Khusnutdinova, A.N.; Ruszkowski, M.; Flick, R.; Burda, M.; Batyrova, K.; Brown, G.; Mucha, A.; Joachimiak, A.; Berlicki, L.; Yakunin, A.F. Structural insights into substrate selectivity and activity of bacterial polyphosphate kinases. *ACS Catal.* 2018, 8, 10746–10760.
- Raj, K.; Partow, S.; Correia, K.; Khusnutdinova, A.N.; Yakunin, A.F.; Mahadevan, R. Biocatalytic production of adipic acid from glucose using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng. Commun.* 2018, 6, 28–32.
- Tishkov, V.I.; Galkin, A.G.; Marchenko, G.N.; Egorova, O.A.; Sheluho, D.V.; Kulakova, L.B.; Dementieva, L.A.; Egorov, A.M. Catalytic properties and stability of a *Pseudomonas* sp.101 formate dehydrogenase mutants containing Cys-255-Ser and Cys-255-Met replacements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 192, 976–81.
- Vrtis, J.M.; White, A.K.; Metcalf, W.W.; van der Donk, W.A. Phosphite dehydrogenase: a versatile cofactor-regeneration enzyme. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2002, 41, 3257–9.
- Wang, X.; Saba, T.; Yiu, H.H.P.; Howe, R.F.; Anderson, J.A.; Shi, J. Cofactor NAD(P)H regeneration inspired by heterologous pathways. *Chem.* 2017, 2, 621–654.