

УДК 577.151.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ДРОЖЖЕЙ ДИКОГО ТИПА И ЕЕ МУТАНТОВ В РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ЦЕФАЛОСПОРИНА C

Д.Л. Атрошенко^{1,2}, А.А. Пометун^{1,2,3}, С.С. Савин^{1,2}, В.И. Тишков^{1,2,3*}

(¹ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; ²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; ³Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

Окисление цефалоспорина C (CPC) оксидазой D-аминокислот является первой стадией промышленного процесса биокаталитического производства 7-аминоцефалоспориновой кислоты – исходного синтона получения полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков. Нами проведено определение кинетических параметров (каталитической константы и константы Михаэлиса) на основании зависимости начальной скорости реакции от концентрации CPC (метод начальных скоростей) для рекомбинантной оксидазы дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) дикого типа и ее трех мутантных форм с точечными заменами остатка Met на остаток Leu в положениях 104, 156 и 209, а также четверного мутанта TvDAAO RDAF. Показано, что у точечных мутантов введенные замены в первую очередь приводят к уменьшению константы Михаэлиса. Наибольшее увеличение каталитической эффективности $k_{\text{кат}}/K_M$ (39%) наблюдалось для мутанта с заменой Met156Leu. В случае четверного мутанта константа Михаэлиса у фермента с CPC возросла в четыре раза по сравнению с ферментом дикого типа, а каталитическая эффективность практически не изменилась за счет четырехкратного увеличения каталитической константы.

Ключевые слова: Оксидаза D-аминокислот, *Trigonopsis variabilis*, рекомбинантный фермент, мутантные формы, окисление цефалоспорина C, кинетические параметры.

Использованные в статье сокращения: CPC – цефалоспорин C, DAAO – оксидаза D-аминокислот, TvDAAO – оксидаза D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis*, 7-ACA – 7-аминоцефалоспориновая кислота.

Оксидаза D-аминокислот (DAAO, EC 1.4.3.3) широко распространена в природе и играет важную физиологическую роль как в прокариотах, так и в эукариотах [1–3]. Фермент активно используется на практике для получения различных физиологически активных соединений, в том числе и лекарств [2–4]. Самое крупное производство с использованием DAAO – двухферментный биокаталитический процесс получения 7-аминоцефалоспориновой кислоты (7-ACA) из цефалоспорина C (CPC) [5]. DAAO катализирует первую стадию окисления CPC кислородом в α -кетоадипил-7-ACA (KA-7-ACA). Второй продукт реакции – пероксид водорода, который затем неферментативно декарбоксилирует α -кетоадипил-7-ACA с образованием глутарил-7-ACA. На практике используется DAAO из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO), так как среди всех известных оксидаз D-аминокислот этот фермент обладает наиболее высокой активностью при взаимодействии с CPC.

Ранее в нашей лаборатории были получены три точечных мутанта TvDAAO с заменами по остаткам Met на остаток Leu в положениях 104, 156 и 209. Эти замены проводили в целях повышения стабильности фермента против инактивации пероксидом водорода [6]. Был также получен четверной мутант TvDAAO RDAF. В этом мутанте две первые замены на остатки Arg и Asp были сделаны в FAD-связывающем домене, что привело к повышению термостабильности и повышению каталитической эффективности с большим количеством D-аминокислот. Эти две замены были объединены с двумя другими (Phe54Ala [7] и Cys108Phe [8]), позволившими обеспечить улучшение кинетических параметров TvDAAO, а в случае Cys108Phe и термостабильности. Для большей точности и воспроизводимости нами вместо метода интегральной кинетики была разработана методика определения $k_{\text{кат}}$ и K_M на основании зависимости скорости реакции от концентрации цефалоспори-

на *C* (метод «начальных скоростей») для TvDAAO дикого типа и ее мутантов.

Экспериментальная часть

Материалы. В работе использовали следующие реактивы: цефалоспорин *C* ((6R,7R)-3-[(ацетилокси)метил]-7-[[(5R)-5-амино-5-карбокспентаноил]амино]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4,2,0]окто-2-ен-2-карбоксо кислоты), ацетат натрия $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ («ч.д.а.», «Sigma», США), ацетонитрил CH_3CN HPLC grade («Panreac», Испания), гидрофосфат калия $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, соляную кислоту HCl , уксусную кислоту CH_3COOH (все марки «х.ч.»).

Рекомбинантную TvDAAO дикого типа и ее мутанты экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus. Ферменты очищали по методике, включающей ионообменную хроматографию на колонке MonoQ («Pharmacia-Biotech», Швеция) и обессоливание на колонке Sephadex G-25 («Pharmacia-Biotech», Швеция). Мутантные формы TvDAAO получали методом, описанным ранее [6, 7]. Чистота ферментных препаратов составляла не менее 95%. Концентрацию активного фермента определяли спектрофотометрически при длине волны 455 нм, используя коэффициент молярного поглощения $\text{FAD } 10800 \text{ M} \cdot \text{см}^{-1}$.

Методы исследования

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Определение в ходе реакции концентрации компонентов (CPC, промежуточного продукта α -кетoadипил-7-АСА и конечного продукта глутарил-7-АСА) проводили методом ВЭЖХ в изократическом режиме на колонке $4 \times 125 \text{ мм}$ с Диасфер С 18 (5,0 мкм; «ХроМасс», Россия) на хроматографе фирмы «Кнауер». Детекцию аналитического сигнала проводили при длине волны 254 нм. Для ввода пробы использовали петлю на 20 мкл, объем вводимой пробы составлял 25 мкл. В качестве элюента использовали ацетатный буфер (200 мМ; pH 5,2), содержащий 10 об.% ацетонитрила. При построении калибровочной зависимости на колонку наносили 25 мкл раствора цефалоспорина *C* в 0,1 М КФБ (pH 8,0), концентрацию цефалоспорина *C* варьировали от 0,1 до 10 мМ.

Определение кинетических характеристик оксидазы D-аминокислот с цефалоспорином C. Для определения константы Михаэлиса (K_M) и эффективной каталитической константы скорости реакции ($k_{\text{кат}}$) с цефалоспорином *C* в качестве субстрата ферментативную реакцию проводили в

открытой пластиковой пробирке (1,5 мл) при перемешивании (1400 об/мин, 30 °С). Реакционная смесь (общий объем 500 мкл) содержала заданное количество цефалоспорина *C* (от 0,5 до 10 мМ) в 0,1 М КФБ (pH 8,0), насыщенном воздухом. Реакцию запускали добавлением соответствующих количеств фермента дикого типа или мутантных TvDAAO. Чтобы получить более точные данные в условиях наиболее низких и наиболее высоких концентраций, использовали соответственно повышенное (20 мкг/мл) и пониженное (10 мкг/мл) по сравнению с обычным (15 мкг/мл) количество фермента. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы объемом 20 мкл (50 и 10 мкл для низких и высоких концентраций цефалоспорина *C* соответственно) и добавляли к 50 мкл 0,1 М HCl ; 25 мкл полученной смеси использовали для анализа. Изменение концентрации цефалоспорина *C* в реакционной смеси определяли на основании полученных хроматограмм по отношению величины площади пика, отвечающего исходному субстрату, к величине площади пика, полученного при калибровке с использованием заданного количества CPC. Все эксперименты проводили как минимум в трех повторях. Математическую обработку данных проводили методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin Pro 8.5 (США).

Результаты

Метод начальных скоростей определения максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса предполагает определение зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Скорость реакции можно измерять как по образованию продукта реакции, так и по убыли субстрата. В присутствии DAAO в ходе ферментативного окисления CPC образуется первый продукт – α -кетoadипил-7-АСА (КА-7-АСА), который далее неферментативно декарбоксилируется до глутарил-7-АСА вторым продуктом ферментной реакции – пероксидом водорода. На рис. 1 представлена типичная хроматограмма анализа реакционной смеси. В ходе реакции величина пика КА-7-АСА сначала растет, а к концу реакции снижается, в то время как величина пика глутарил-7-АСА (продукта неферментативного декарбокслирования КА-7-АСА), возрастает в ходе реакции постоянно. Более подробно изменение соотношения пиков промежуточного и конечного продуктов показано в работе [9, рис. 2]. Из вышесказанного следует, что определять начальную скорость

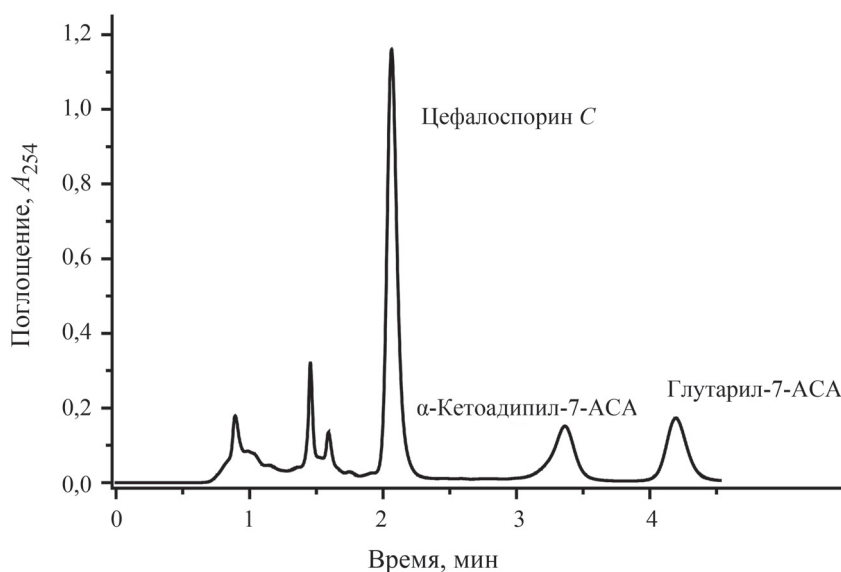


Рис. 1. Типичная хроматограмма реакционной смеси в ходе ферментативного окисления цефалоспорина С с помощью TvDAAO (условия анализа см. в разделе «Экспериментальная часть»)

реакции окисления CPC в присутствии DAAO по образованию продуктов нельзя. Определять этот параметр можно только по скорости убывания субстрата.

Ввиду отсутствия простой методики непрерывного измерения изменения концентрации CPC скорость реакции рассчитывали по зависимости изменения концентрации CPC от времени при определенной концентрации субстрата. Условия разделения CPC и продуктов его окисления были оптимизированы нами ранее [9]. Сначала была проверена линейность зависимости интенсивности сигнала от концентрации CPC. На рис. 2 представлена зависимость площади пика от концентрации CPC в растворе. Эта за-

висимость линейна, поэтому ее можно использовать для определения концентрации субстрата в ходе реакции. На рис. 3 представлена зависимость изменения концентрации CPC от времени в ходе ферментативной реакции. Видно, что на начальной стадии (конверсия до 20%) эта зависимость также линейна и по тангенсу угла наклона можно рассчитать начальную скорость реакции. Зависимость скорости реакции от концентрации CPC как для TvDAAO дикого типа, так и для ее всех мутантных форм, описывалась типичным уравнением Михаэлиса–Ментен. На рис. 4 в качестве примера приведена такая зависимость для мутанта TvDAAO Met156Leu. На основании полученных зависимостей ме-

Значения каталитических параметров TvDAAO дикого типа и ее мутантных форм в реакции окисления цефалоспорина С

Форма TvDAAO	K_M , мМ	$k_{кат}$, с ⁻¹	$k_{кат}/K_M$, (мМ·с) ⁻¹
wild-type	1,4±0,4	26±3	18±5
M104L	1,1±0,2	23±2	21±4
M156L	1,0±0,3	25±3	25±7
M209L	1,0±0,2	18±2	18±4
RDAF	5.6±1.0	105±12	19±4

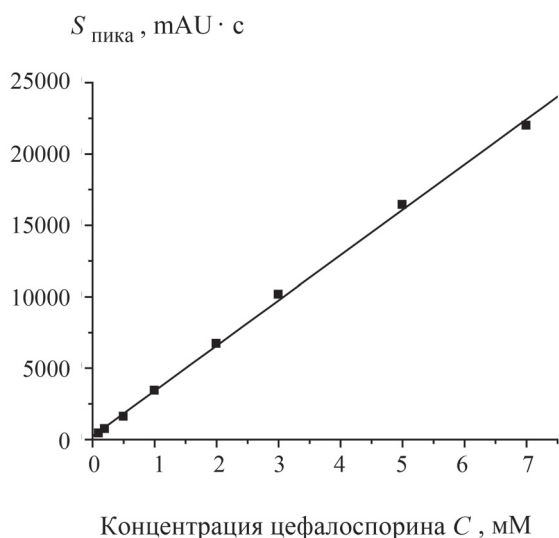


Рис. 2. Зависимость площади пика от концентрации цефалоспорина C в пробе (условия анализа см. в разделе «Экспериментальная часть»)

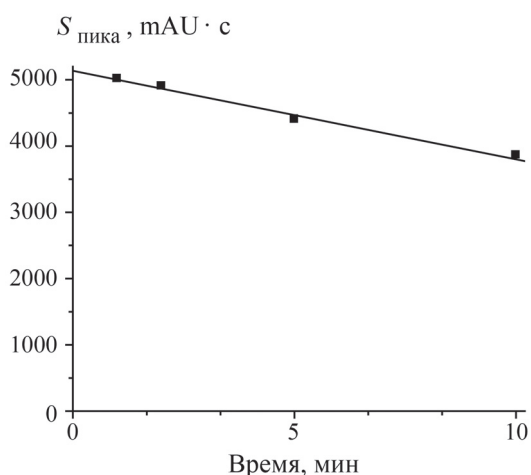


Рис. 3. Изменение концентрации цефалоспорина C от времени в ходе реакции окисления с помощью TvDAAO; концентрация фермента 15 мкг/мл, концентрация цефалоспорина C 1,5 мМ; 0,1 М фосфатный буфер, pH 8,0 (условия анализа см. в разделе «Экспериментальная часть»)

тодом нелинейной регрессии были рассчитаны значения максимальной скорости реакции $V_{\text{макс}}$ и константы Михаэлиса K_M . Величину эффективной каталитической константы $k_{\text{кат}}$ получали делением значения $V_{\text{макс}}$ на концентрацию фермента. Полученные значения каталитических параметров представлены в таблице.

Обсуждение результатов

Для эффективного использования фермента необходимо знать его каталитические параметры.

Ранее нами были определены кинетические параметры окисления цефалоспорина C TvDAAO дикого типа и ее мутанта с заменой Phe258Ala [6]. Для расчета использовали метод интегральной кинетики. Однако этот метод очень чувствителен к условиям проведения реакции, поскольку второй субстрат (кислород) плохо растворим, быстро расходуется в ходе реакции даже при интенсивном перемешивании или активной аэрации. Из вышесказанного следует, что использование метода интегральной кинетики для определения каталитической константы и константы Михаэлиса в реакции окисления CPC с помощью DAAO не представляется удобным и надежным, хотя в мировой практике этот подход применяется чаще всего. В результате разные авторы приводят в литературе разные значения каталитических параметров для одного и того же фермента. В ферментативной кинетике метод начальных скоростей традиционно считается самым точным. Результаты определения кинетических параметров полученных мутантов TvDAAO свидетельствуют, что замена остатков Met на остатки Leu слабо влияет на кинетические параметры. В основном введенные замены приводят к небольшому снижению величины константы Михаэлиса. В случае замены Met209Leu наблюдается небольшое снижение каталитической константы. В результате каталитическая эффективность ($k_{\text{кат}}/K_M$) полученного мутанта такая же, как и у исходного фермента. В случае замены Met156Leu каталитическая константа не меняется и каталитическая эффективность возрастает почти на 40%. Отметим, что эта замена также приводит к увеличению термостабильности TvDAAO [9].

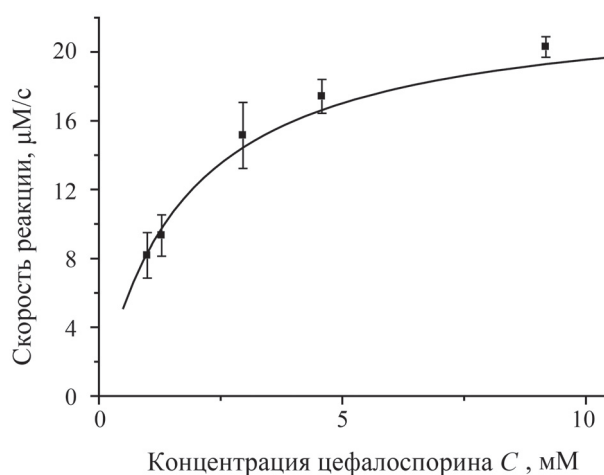


Рис. 4. Зависимость скорости реакции от концентрации цефалоспорина C для мутантной TvDAAO Met156Leu

Гораздо более интересные результаты были получены в случае четверного мутанта TvDAAO RDAF. У этого мутанта каталитическая эффективность также не превышает таковую у фермента дикого типа. Константа Михаэлиса у мутанта в четыре раза выше, чем у TvDAAO дикого типа, однако наиболее важно то, что в четыре раза увеличивается эффективная каталитическая константа. Данный результат следует признать очень хорошим и важным для практического применения, поскольку на практике процесс проводится при концентрации СРС, равной 100 мМ, т.е. в условиях насыщения фермента субстратом. В этом случае скорость реакции не зависит от концентрации СРС, а сам процесс до достижения сте-

пени конверсии 90% протекает в режиме максимальной скорости, когда главную роль играет величина каталитической константы, а не каталитической эффективности. Таким образом, в случае мутанта TvDAAO RDAF скорость процесса будет в четыре раза выше, чем в случае фермента дикого типа. В будущем мы планируем получить еще более эффективный фермент для окисления СРС за счет введения в мутант TvDAAO RDAF замены Met156Leu.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00594).

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pollegioni L., Diederichs K., Molla G., Umhau S., Welte W., Ghisla S., Pilone M.S. // J. Mol. Biol. 2002. Vol. 324. P. 535. DOI:10.1016/S0022-2836(02)01062-8.
2. Tishkov V.I.; Khoronenkova S.V. // Biochemistry (Mosc.) 2005. Vol. 70. N 1. P. 40. DOI:10.1134/S0006297908130105.
3. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // Biochemistry (Mosc.) 2008, Vol. 73. P. 1511. DOI:10.1134/S0006297908130105.
4. Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone M.S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 78. P. 1. DOI:10.1007/s00253-007-1282-4.
5. Barber M.S., Giesecke U., Reichert A., Minas W. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004, Vol. 88. P. 179.
6. Атрошенко Д.Л., Голубев И.В., Савин С.С., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та, Сер. 2. Химия. 2016. Т. 57. № 4. С. 252 [Atroshenko D.L., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2016. Vol. 71. N 4. P. 243]. DOI:10.3103/S0027131416040039.
7. Комарова Н.В., Голубев И.В., Хороненкова С.В., Тишков В.И. // Изв. АН. Сер. Хим. 2012. Т. 61. № 7. С. 1472 [Komarova N.V., Golubev I.V., Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // Rus. Chem. Bull. Internat. Ed. 2012. Vol. 61. N 7. P. 1489]. DOI:10.1007/s11172-012-0193-4.
8. Тишков В.И., Черскова Н.В., Савин С.С., Савина Л.И., Хороненкова С.В. // Пат. РФ RU 2 412 998. Бюл. «Изобретения. Полезные модели». 2011. № 6 [Tishkov V.I., Cherskova N.V., Savin S.S., Khoronenkova S.V. // Russian patent 2 412 998. 18.11.2009. Bulletin of Russian Patents 2011. N 6].
9. Голубев И.В., Комарова Н.В., Скиргелло О.Е., Осипова Т.А., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2014. Т. 55. № 2. С. 93 [Golubev I.V., Komarova N.V., Skirgello O.E., Osipova T.A., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2014. Vol. 69. N 2. P. 68]. DOI:10.3103/S0027131414020035.

Поступила в редакцию 12.03.2019

Получена после доработки 15.03.2019

Принята к публикации 20.03.2019

DETERMINATION OF KINETIC PARAMETERS OF WILD-TYPE AND MUTANT D-AMINO ACID OXIDASE FROM YEAST IN REACTION OF CEPHALOSPORINE C OXIDATION

D.L. Atroshenko^{1,2}, A.A. Pometun^{1,2,3}, S.S. Savin^{1,2}, V.I. Tishkov^{1,2,3*}

(¹Innovations and High Technologies MSU Ltd; ²Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; ³A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

Cephalosporin C (CPC) oxidation by D-amino acid oxidase (DAAO) is the first reaction in industrial biocatalytic process of production of 7-aminocephalosporanic acid which is used as synthon for preparation of different semi-synthetic cephalosporin antibiotics. Using "initial rates" approach we determined kinetic parameters – efficient catalytic constant and Michaelis constant for CPC, for wild-type and mutant DAAO from yeast *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO). Three single-point mutants with changes Met/Leu in positions 104, 156 and 209, as well as for four-points mutant TvDAAO RDAF were studied. It was shown

that substitutions Met/Leu resulted in slight decrease of K_M . Maximal increase of catalytic efficiency k_{cat}/K_M 39% was observed for mutant with amino acid change Met156Leu. In the case of mutant TvDAAO RDAF catalytic efficiency is the same as for wild-type enzyme because both parameters, k_{cat} and K_M increased simultaneously four times.

Key words: D-amino acid oxidase, *Trigonopsis variabilis*, recombinant enzyme, mutant forms, Cephalosporine C oxidation, kinetic parameters.

Сведения об авторах: *Атрошенко Денис Леонидович* – мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (atrdenis@gmail.com); *Пометун Анастасия Александровна* – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ст. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (aapometun@gmail.com); *Савин Святослав Сергеевич* – науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук; *Тишков Владимир Иванович* – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», профессор, докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com).