

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.151.

**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТРАНСАМИНАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ *AMINOBACTERIUM COLOMBIENSE* ДЛЯ (R)-СЕЛЕКТИВНОГО АМИНИРОВАНИЯ  $\alpha$ -КЕТОКИСЛОТ**

Софья Александровна Шилова<sup>1</sup>, Татьяна Владимировна Ракитина<sup>2</sup>, Владимир Олегович Попов<sup>3</sup>, Екатерина Юрьевна Безсуднова<sup>4</sup>

<sup>1-4</sup> Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

**Авторы, ответственные за переписку:** Софья Александровна Шилова, zavyalovasonya@yandex.ru; Екатерина Юрьевна Безсуднова, eubez@yandex.ru

**Аннотация.** Трансаминаза D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense* (AmicoTA) опробована в качестве биокатализатора (R)-селективного аминирования 2-оксобутирата, 2-оксовалерата и 2-оксо-4-фенилбутирата в целях получения неприродных D-аминокислот – D-гомоаланина, D-норвалина и D-гомофенилаланина. Для увеличения выхода продукта D-аминокислоты разработана трехферментная система, включающая трансаминазу AmicoTA, (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназу и глюкозодегидрогеназу, которая позволяет эффективно сместить равновесие реакции трансаминирования в сторону продуктов. Предложенная система работает как при нейтральных, так и при слабощелочных значениях pH. Обнаружено, что при высокой концентрации субстрата (500 мМ) происходит ингибирование AmicoTA продуктами системы. В результате оптимизации условий (R)-селективного аминирования достигнуты следующие выходы целевых продуктов: 435 мМ D-гомоаланина, 320 мМ D-норвалина и 47,5 мМ D-гомофенилаланина, энантиомерный избыток D-аминокислот превысил 99,5%.

**Ключевые слова:** биокатализ, (R)-селективное аминирование, трехферментная система, трансаминазы D-аминокислот

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-85-98

**Список сокращений:** AmicoTA – трансаминаза D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense*, DAAT – трансаминаза D-аминокислот, PLP – пиридоксаль-5'-фосфат, ГГДГ – (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназа, ГДГ – глюкозодегидрогеназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

**Финансирование.** Работы по клонированию, экспрессии, характеристике трансаминазы и анализу трехферментной системы выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №19-14-00164). Работы по анализу стабильности гидроксиглутаратдегидрогеназы и глюкозодегидрогеназы выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

**Для цитирования:** Шилова С.А., Ракитина Т.В., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Перспективы применения трансаминазы D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense* для (R)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 2. С. 85–98.

## ORIGINAL ARTICLE

**PROSPECTS OF APPLICATION OF D-AMINO ACID TRANSAMINASE FROM *AMINOBACTERIUM COLOMBIENSE* FOR (R)-SELECTIVE AMINATION OF  $\alpha$ -KETOACIDS****Sofia A. Shilova<sup>1</sup>, Tatiana V. Rakitina<sup>2</sup>, Vladimir O. Popov<sup>3</sup>, Ekaterina Yu. Bezsudnova<sup>4</sup>**<sup>1-4</sup> Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation<sup>2</sup> National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia**Corresponding authors:** Sofia A. Shilova, zavyalovasonya@yandex.ru, Ekaterina Yu. Bezsudnova, eubez@yandex.ru

**Abstract.** D-amino acid transaminase from *Aminobacterium colombiense* was applied for (R)-selective amination of 2-oxobutyrate, 2-oxovalerate and 2-oxo-4-phenylbutyrate to produce unnatural D-amino acids – D-homoalanine, D-norvaline and D-homophenylalanine. To increase the product yield of D-amino acids, a one-pot three-enzyme system was developed. The system included transaminase from *A. colombiense*, (R)-2-hydroxyglutarate dehydrogenase and glucose dehydrogenase and effectively shifted the equilibrium of transamination reaction toward the products. The system functioned in both neutral and slightly alkaline pH. We found that at high substrate concentrations (500 mM) transaminase from *A. colombiense* was inhibited by the products accumulated in the system. The optimization of operational conditions of the three-enzyme system led to the following yields of the target products: 435 mM D-homoalanine, 320 mM D-norvaline and 47,5 mM D-homophenylalanine; the enantiomeric excess of produced D-amino acids exceeded 99,5%.

**Keywords:** biocatalysis, (R)-selective amination, three-enzyme system, D-amino acid transaminases

**Abbreviations:** AmicoTA – D-amino acid transaminase from *Aminobacterium colombiense*, DAAT – D-amino acid aminotransferase, PLP – pyridoxal-5'-phosphate, HGDH – (R)-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, GDH – glucose dehydrogenase, LDH – lactate dehydrogenase

**Financial support:** cloning, expression, the transaminase characterization, and three-enzyme system analysis was supported by the Russian Science Foundation (grant №19-14-00164). Stability analysis of hydroxyglutarate dehydrogenase and glucose dehydrogenase was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

**For citation:** Shilova S.S., Rakitina T.V., Popov V.O., Bezsudnova E.Y. Prospects of application of D-amino acid transaminase from *Aminobacterium colombiense* for the (R)-selective amination of  $\alpha$ -ketoacids // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 2. P. 85–98.

(R)-селективное аминирование  $\alpha$ -кетокислот – эффективный путь синтеза оптически чистых D-аминокислот, которые в живых организмах вовлечены во многие физиологические процессы: участвуют в работе центральной нервной системы, выступают маркерами различных патологий и являются структурными блоками молекул с противомикробной и противоопухолевой активностью

[1, 2]. Биологическая активность D-аминокислот открывает перспективы их применения в области медицины и фармацевтики, поэтому разработка высокопроизводительных путей их синтеза представляет собой актуальную задачу фарминдустрии и химической промышленности. Одно из важнейших требований к лекарственным препаратам – оптическая чистота [3]. С проблемой

получения оптически чистых продуктов наиболее эффективно справляются биокатализаторы-ферменты [4, 5], которые отличаются высокой специфичностью и стереоселективностью, а также способностью работать в мягких условиях, что значительно снижает экологическую нагрузку производственного процесса [5].

Трансаминазы D-аминокислот (D-amino acid aminotransferase, DAAT, КФ 2.6.1) относятся к пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимым двух-субстратным ферментам, которые катализируют стереоселективный перенос аминогруппы с D-аминокислоты на  $\alpha$ -кетокислоту с образованием новых D-аминокислоты и  $\alpha$ -кетокислоты (переаминирование). DAAT являются перспективными ферментами для разработки на их основе биокатализаторов (R)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот. *In vivo* одной из важнейших катализируемых DAAT реакций является синтез D-глутамата для клеточной стенки бактерий путем переаминирования между D-аланином и  $\alpha$ -кетоглутаратом. *In vitro* для многих DAAT описана активность с D-аминокислотами и  $\alpha$ -кетокислотами с алифатическими, ароматическими и отрицательно заряженными боковыми группами [6–8]. Широкая субстратная специфичность делает DAAT перспективными объектами для разработки на их основе биокатализаторов синтеза различных D-аминокислот [7, 9, 10]. Однако в случае применения трансаминаз возникают принципиальные сложности: ингибирование субстратом или продуктом (чаще кетокислотой) и термодинамическое равновесие реакции переаминирования между аминокислотой и кетокислотой, для смещения которого в сторону продукта (новой аминокислоты) требуются избытки субстрата аминокислоты или вывод продукта кетокислоты из реакции [7, 11–13].

DAAT из мезофильной бактерии *Aminobacterium colombiense* (AmicoTA) имеет широкую субстратную специфичность, активна в температурном диапазоне 30–60 °С в нейтральных и слабощелочных рН. В настоящей работе проведена оценка эффективности применения AmicoTA для (R)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот с D-глутаматом как донором аминогруппы. Для смещения равновесия катализируемой AmicoTA реакции разработана трехферментная система, включающая AmicoTA, NAD-зависимую (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназу (ГДГ) и NAD-зависимую глюкозодегидрогеназу (ГДГ) для регенерации NADH-формы ко-

фермента. Разработанная схема опробована для синтеза D-гомоаланина, D-норвалина и D-гомофенилаланина при нейтральных и слабощелочных значениях рН. Проанализировано влияние концентрации кофактора PLP на выходы продуктов реакций и концентрации субстратов и продуктов на выходы продуктов реакций, а также на активность и стабильность ферментов системы.

### Экспериментальная часть

**Клонирование, экспрессия и выделение AmicoTA и ГДГ.** Ген Amico\_1844, кодирующий AmicoTA, был взят из базы данных NCBI и оптимизирован для экспрессии в бактериальных клетках *E. coli* с помощью онлайн-сервера Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>). На 5'- и 3'-концы последовательности добавляли сайты эндонуклеаз рестрикции NdeI и HindIII соответственно. Синтетический ген (ООО «АТГ Сервис Ген», Россия) в составе модифицированного вектора pET-21d [14] трансформировали в клетки *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS. Клетки растили в среде LB/ампициллин при 37 °С до  $A_{600} = 0,6–0,8$ , затем индуцировали экспрессию гена 0,2 мМ ИПТГ и инкубировали при 30 °С в течение 18 ч. Далее клетки центрифугировали и ресуспендировали в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 8,0), содержащем 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,5 М мочевины, 10% глицерина, 100 мкМ PLP и 1 мМ фенолметилсульфонилфторида, а затем разрушали ультразвуком. Клеточный экстракт центрифугировали при 18 500 g в течение 45 мин и наносили супернатант на колонку HisTrap HP («Cytiva», США), уравновешенную 50 мМ К-фосфатным буфером (рН 8,0), содержащим 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 0,1% тритона X-100 и 1 мМ фенолметилсульфонилфторида. Рекомбинантную AmicoTA с His<sub>6</sub>-тагом на N-конце элюировали линейным градиентом имидазола (20–500 мМ) в том же буфере без фенолметилсульфонилфторида и Тритона X-100. Собранную фракцию AmicoTA инкубировали с 300 мкМ PLP при 25 °С в течение 1 ч, концентрировали и переводили в 50 мМ К-фосфатный буфер (рН 8,0), содержащий 100 мМ NaCl и 100 мкМ PLP, с помощью центрифужных концентраторов Amicon Ultra-15 («Millipore», США) и хранили в 50%-м глицерине при –20 °С. Рекомбинантную ГДГ из *Acidaminococcus fermentas* получали аналогично AmicoTA. Чистоту белковых препаратов анализировали с помощью

электрофореза в денатурирующих условиях в 12%-м ПААГ. Концентрацию AmisoTA и ГГДГ определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм, используя рассчитанные коэффициенты экстинкции 0,615 и 0,573 мл·мг<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> для AmisoTA и ГГДГ соответственно (<https://web.expasy.org/protparam/>).

**Получение холоформы и апоформы AmisoTA.** Холоформу AmisoTA получали инкубацией 10 мг/мл AmisoTA с 600 мкМ PLP и 5 мМ α-кетоглутарата в течение 1 ч при 25 °С с последующим обессоливанием препарата на колонке HiTrap («Cytiva», США), уравновешенной 50 мМ CHES-буфером (pH 9,0). Апоформу AmisoTA получали инкубацией холоформы с 500 мМ D-аланина в течение 1 ч при 25 °С с последующим обессоливанием препарата на колонке HiTrap, уравновешенной 50 мМ CHES буфером (pH 9,0).

**Определение специфичности AmisoTA к D-аминокислотам.** Специфичность AmisoTA к D-аминокислотам определяли по активности холоформы AmisoTA в полуреакциях в следующих условиях: 1 мг/мл (30 мкМ) холоформы AmisoTA, 4 мМ D-аминокислоты (D-глутамат, D-аланин, D-аспартат, D-лейцин, D-фенилаланин, D-орнитин), 50 мМ CHES-буфер (pH 9,0), 40 °С. Активность определяли по снижению концентрации холоформы в присутствии D-аминокислоты. За скоростью полуреакции следили спектрофотометрически по убыли оптической плотности при длине волны 408 нм, соответствующей максимуму поглощения холоформы фермента, на спектрофотометре «SPECTROstar Omega» («BMG LABTECH», Германия). Константу скорости полуреакции ( $k_{\text{набл.}}$ ) определяли обработкой экспериментальных значений по уравнению

$$A_t = A_\infty + \Delta A \exp(-k_{\text{набл.}} t),$$

где  $A_t$  – поглощение в момент времени  $t$ ,  $\Delta A$  – разность поглощений при  $t = 0$  и  $t = \infty$ ,  $A_\infty$  – поглощение при  $t = \infty$ .

**Определение активности AmisoTA в реакции трансаминирования.** Активность AmisoTA в реакциях трансаминирования между D-аланином и α-кетоглутаратом, между D-глутаматом и различными α-кетокислотами в 50 мМ CHES-буфере (pH 9,0) или в 100 мМ К фосфатном буфере (pH 7,5), при 30–60 °С оценивали по скорости накопления продуктов реакций – пирувата и α-кетоглутарата соответственно. Накопление пирувата или α-кетоглутарата контролировали по сопряженной ферментативной реакции вос-

становления пирувата лактадегидрогеназой из мышц кролика («Roche», США) (ЛДГ-метод) или восстановления α-кетоглутарата (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназой из *A. fermentas* (ГГДГ-метод) соответственно, в присутствии кофермента NADH. Превращение пирувата и α-кетоглутарата в сопряженной реакции соответствовало убыли NADH, которую регистрировали с помощью спектрофотометра «SPECTROstar Omega» («BMG Laboratories») при длине волны 340 нм ( $\epsilon_{340}(\text{NADH}) = 6,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ). Скорость реакции определяли по тангенсу угла наклона начального линейного участка убыли оптической плотности при 340 нм от времени. За единицу ферментативной активности U принимали количество (мкмоль) образованного пирувата (ЛДГ-метод) или α-кетоглутарата (ГГДГ-метод) в 1 мин. Для реакции трансаминирования между D-аланином и α-кетоглутаратом стандартная реакционная смесь содержала 50 мМ D-аланина, 5 мМ α-кетоглутарата, 60 мкМ PLP, 330 мкМ NADH, 4 U/мл (0,01 мг/мл) ЛДГ и 0,005 мг/мл AmisoTA. Для реакции трансаминирования между D-глутаматом и различными α-кетокислотами стандартная реакционная смесь содержала 10 мМ D-глутамата, 5 мМ α-кетокислоты, 180 мкМ PLP, 330 мкМ NADH, 4 U/мл (0,0002 мг/мл) ГГДГ, 0,05–0,2 мг/мл AmisoTA. Реакции запускали D-аминокислотой после инкубации реакционной смеси в течение 10 мин. При концентрации 2-оксобутирата и 2-оксвалерата 500 мМ определение активности ГГДГ-методом проводили при длине волны 370 и 377 нм соответственно ( $\epsilon_{370}(\text{NADH}) = 2,4 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ,  $\epsilon_{377}(\text{NADH}) = 1,4 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ), так как при 340 нм вклад от поглощения кетокислот в большой концентрации становится значительным. За время проведения эксперимента (30–40 мин) ЛДГ и ГГДГ не инактивировались при 30–60 °С.

**Определение оптимальных значений pH и температуры реакции трансаминирования, катализируемой AmisoTA.** Зависимость активности AmisoTA от pH определяли для реакций трансаминирования между D-аланином и α-кетоглутаратом, D-глутаматом и пируватом в стандартных условиях (описаны выше) при 30 °С в буферах 25 мМ К-фосфат/25 мМ Tris-HCl (pH 6–9), 50 мМ CHES (pH 9–10). Зависимость активности AmisoTA от температуры определяли для реакции между D-аланином и α-кетоглутаратом в стандартных условиях в

50 мМ К-фосфатном буфере (рН 8,0) в температурном диапазоне 30–60 °С ЛДГ-методом. ЛДГ не инактивируется в указанном температурном диапазоне за время проведения эксперимента (30–40 мин).

**Анализ термостабильности холоформы AmicoTA.** Термостабильность холоформы AmicoTA оценивали по времени полуинактивации при инкубации в следующих условиях: 1,5 мг/мл холоформы в присутствии 100 мкМ PLP выдерживали в 50 мМ CHES-буфере (рН 9,0) при 50 и 60 °С в течение 40 ч. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты и определяли активность AmicoTA в реакции трансаминирования между D-аланином и  $\alpha$ -кетоглутаратом в стандартных условиях при 60 °С.

**Анализ операционной стабильности AmicoTA, ГГДГ и ГДГ.** Операционную стабильность AmicoTA, ГГДГ и ГДГ оценивали по остаточной активности при инкубации фермента в течение 24 ч в реакции (R)-селективного аминирования 2-оксвалерата. Фермент, 4 мг/мл AmicoTA, или 180 U/мл (0,01 мг/мл) ГГДГ, или 30 U/мл (0,6 мг/мл) ГДГ, выдерживали в 100 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,5) в присутствии 500 мМ D-глутамата, 500 мМ 2-оксвалерата, 100 мкМ PLP, 1 мМ NADH и 1 М D-глюкозы при 30 °С в течение 24 ч. Отбирали аликвоты и определяли в них остаточную активность ферментов. Активность AmicoTA определяли в стандартных условиях реакции трансаминирования между D-аланином и  $\alpha$ -кетоглутаратом в 50 мМ CHES-буфере (рН 9,0) при 60 °С. Значение активности ГГДГ определяли в реакции восстановления  $\alpha$ -кетоглутарата в присутствии NADH (1 мМ  $\alpha$ -кетоглутарата, 0,33 мМ NADH, 0,0001 мг/мл ГГДГ), активность ГДГ определяли в реакции окисления D-глюкозы в присутствии  $\text{NAD}^+$  (1 мМ D-глюкозы, 1 мМ  $\text{NAD}^+$ , 0,02 мг/мл ГДГ) в 100 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,5) при 30 °С. Убыль и накопление NADH определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности при 340 нм с использованием спектрофотометра «SPECTROstar Omega». Скорость реакции определяли по тангенсу угла наклона начального линейного участка убыли/роста оптической плотности при 340 нм от времени.

**Проведение (R)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот.** Ферментативное аминирование  $\alpha$ -кетокислот проводили в 100 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,5) (условия 1) и 100 мМ CHES-

буфере (рН 9,0) (условия 2) в двух концентрационных диапазонах реагентов. Начальные условия первого диапазона концентраций: 100 мМ D-глутамата, 50 мМ  $\alpha$ -кетокислоты, 100 мкМ PLP, 4 мг/мл AmicoTA (не больше 1 U/мл), 1 мМ NADH, 150 мМ D-глюкозы, 180 U/мл (0,01 мг/мл) ГГДГ, 30 U/мл (0,6 мг/мл) ГДГ. Начальные условия второго диапазона концентрации: 500 мМ D-глутамата, 500 мМ  $\alpha$ -кетокислоты (в случае 2-оксо-4-фенилбутирата в систему добавляли 20% ДМСО), 1 М D-глюкозы, 180 U/мл (0,01 мг/мл) ГГДГ, 30 U/мл (0,6 мг/мл) ГДГ. Здесь также варьировали концентрацию кофактора PLP – 100, 200 и 500 мкМ.

**Определение выходов продуктов реакций трансаминирования.** Выход продуктов реакций D-глутамат + 2-оксобутират, D-глутамат + 2-оксвалерат и D-глутамат + 2-оксо-4-фенилбутират оценивали по убыли кетосубстратов в реакционной смеси методом ВЭЖХ («AKTA Purifier, Cytiva», США) с УФ-ВИД-детектором на колонке с обращенной фазой C-18 (Zorbax Eclipse XDB-C18, 5 мкм, 4,6×150 мм, «Agilent», США) при 25 °С. Через определенные промежутки времени низкомолекулярную фракцию реакционной смеси отделяли от белковой с помощью центрифужных концентраторов «Amicon-Ultra-0,5» («Millipore», США), разбавляли в 10 раз элюентом и 20 мкл препарата наносили на колонку. В качестве элюента использовали 20 мМ Na-фосфатный буфер (рН 2,2) с добавлением 5% метанола для определения выхода 2-оксобутирата и 2-оксвалерата (условия 1), и 20 мМ Na-фосфатный буфер (рН 3,0) с добавлением 30% метанола (условия 2) для определения выхода 2-оксо-4-фенилбутирата. Анализируемые  $\alpha$ -кетокислоты детектировали спектрофотометрически при 210 нм. Объемы удерживания приведены в табл. 1.

**Определение энантиомерных избытков продуктов реакций трансаминирования.** Энантиомерные избытки продуктов реакции трансаминирования (D-гомоаланин, D-норвалин и D-гомофенилаланин) определяли методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой C-18. Аминоподпродукты и оставшийся D-глутамат в ходе реакций предварительно модифицировали 1-фтор-2,4-динитрофенил-5-L-аланинамидом (Marfey's reagent, «Sigma», США) [15]. Полученные диастереомеры разделяли на колонке со скоростью потока 1 мл/мин в режиме градиента: 10–70% буфера Б за 20 мин для разделения диастереомеров гомоаланина (условия 3), 20–

## Объемы удерживания соединений в ходе ВЭЖХ

Соединение		Условия ВЭЖХ	Объем удерживания, мл	
Определение выходов продуктов реакций трансаминирования				
2-Оксобутират		условия 1	3,7	
2-Оксовалерат			8,6	
2-Оксо-4-фенилбутират		условия 2	8,7	
Определение энантиомерного избытка продуктов D-аминокислот				
После модификации 1-фтор-2,4-динитрофенил- 5-L-аланинамидом (Marfey's reagent)	D-Глутамат		условия 3	
			условия 4	
	L-Гомоаланин		условия 3	19,2
	D-Гомоаланин			21,8
	L-Норвалин		условия 4	16,0
	D-Норвалин			18,6
	L-Гомофенилаланин			20,2
	D-Гомофенилаланин			26,6

70% буфера Б за 15 мин для разделения диастереомеров норвалина и гомофенилаланина (условия 4). В качестве буфера А использовали 0,1%-ю 3-фторуксусную кислоту (ТФУ) («Sigma», США) в воде, в качестве буфера Б применяли 0,1%-ю ТФУ в метаноле. Модифицированные аминокислоты в ходе ВЭЖХ детектировали спектрофотометрически при 340 нм. Объемы удерживания приведены в табл. 1.

## Результаты и их обсуждение

Активность AmicoTA в полуреакциях с D-аминокислотами представлена в табл. 2. Специфическим аминокислотным донором AmicoTA является D-глутамат. Активность с D-аспаратом и алифатическими D-аланином и D-лейцином значительно ниже. D-фенилаланин и D-орнитин наименее специфические аминокислотные доноры для AmicoTA. По результатам анализа полуреакций D-глутамат и D-аланин отобраны в качестве аминокислотных доноров для катализируемого AmicoTA (R)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот.

Подбор условий реакции трансаминирования показал, что AmicoTA катализирует полную реакцию трансаминирования между D-глутаматом и пируватом и D-аланином и  $\alpha$ -кетоглутаратом в температурном диапазоне 30–60 °С и диапазоне pH 7–9. Кроме того, AmicoTA является термостабильным ферментом: время по-

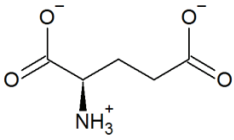
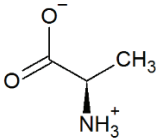
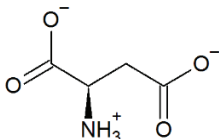
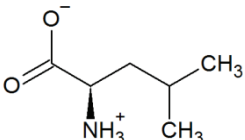
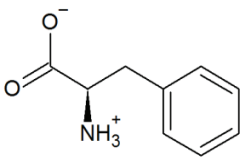
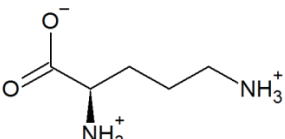
луинактивации холоформы AmicoTA в 50 мМ CHES-буфере (pH 9,0) в присутствии 100 мкМ PLP при 60 и 50 °С составляют 10 и 40 ч соответственно.

Для катализируемого AmicoTA (R)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот были опробованы две трехферментные системы (схема 1). Для смещения равновесия трансаминированной реакции с аминокислотным донором D-глутаматом система I включала (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназу (ГГДГ) из *A. fermentas* [16], которая восстанавливала кетопроduct  $\alpha$ -кетоглутарат до (R)-2-гидроксиглутарата. Для смещения равновесия трансаминированной реакции с аминокислотным донором D-аланином система II включала лактатдегидрогеназу (ЛДГ) из мышц кролика, которая восстанавливала кетопроduct пируват до L-молочной кислоты. Так как обе дегидрогеназы являются NAD-зависимыми ферментами, то для регенерации NAD в системы добавляли глюкозодегидрогеназу (ГДГ) из *Pseudomonas sp.* [16, 17], которая восстанавливала NAD<sup>+</sup> до NADH в результате окисления D-глюкозы.

Таким образом, для (R)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот различной природы были составлены две трехферментные системы, включающие реакцию трансаминирования, выведение продукта-кетокислоты и регенерацию кофермента NADH (схема 1).

Т а б л и ц а 2

**Константы скорости полуреакций холоформы AmicoTA с D-аминокислотами. Условия проведения полуреакций: 1 мг/мл (30 мкМ) холоформы AmicoTA, 4 мМ D аминокислоты, 50 мМ CHES буфер (рН 9,0), 40 °С**

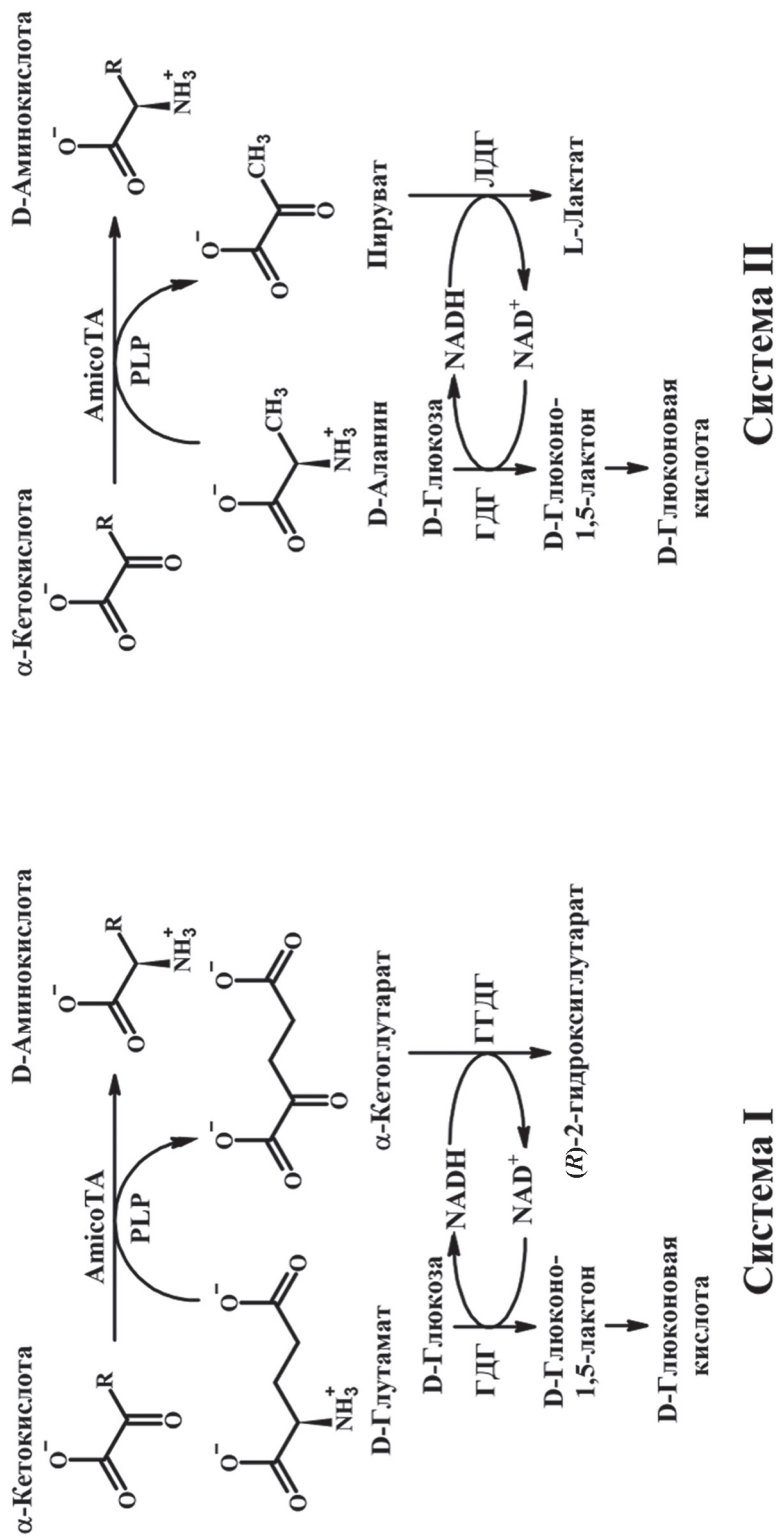
D-аминокислота	Формула D-аминокислоты	$10^3 \cdot k_{\text{набл}} \cdot \text{с}^{-1}$
D-Глутамат		690 ± 30
D-Аланин		18 ± 1
D-Аспаргат		2,7 ± 0,1
D-Лейцин		1,3 ± 0,1
D-Фенилаланин		0,59 ± 0,03
D-Орнитин		0,60 ± 0,04

В ходе анализа активности AmicoTA в реакциях трансаминирования с аминодонорами D-аланином и D-глутаматом обнаружилось, что ЛДГ активна не только с пируватом, но и с различными гидрофобными кетокислотами, тогда как ГДГ специфична исключительно к  $\alpha$ -кетоглутарату и, следовательно, не выводит  $\alpha$ -кетокислоту из реакции трансаминирования.

Поэтому дальнейшие исследования проводили с трехферментной системой I с D-глутаматом в качестве донора аминогруппы в реакции трансаминирования (схема 1, система I).

Наибольшую активность в реакциях трансаминирования с D-глутаматом AmicoTA проявляла с пируватом, 2-оксобутиратом, 2-оксо-4-фенилбутиратом и 2-оксвалератом (табл. 3).

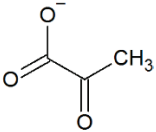
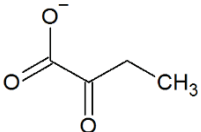
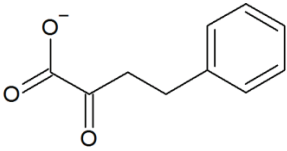
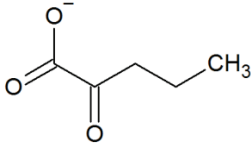
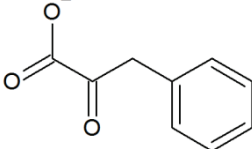
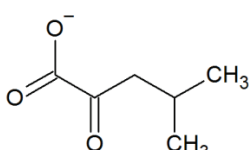
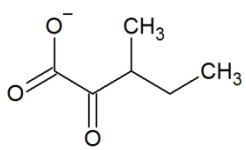
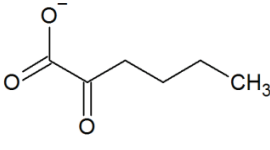
Схема

Трехферментные системы I и II для (*R*)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот

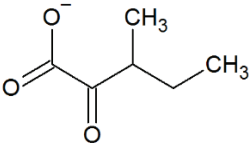
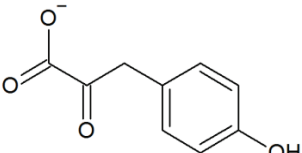


Т а б л и ц а 3

**Удельная активность AmisoTA в реакциях трансминирования между 10 мМ D-глутамата и 5 мМ α-кетокислоты. Условия определения активности: 100 мМ К-фосфатный буфер (pH 7,5), 50 °С**

α-Кетокислота	Формула α-кетокислоты	Соответствующая D-аминокислота	Активность, мU/мг
Пируват		D-аланин	226 ± 4
2-Оксобутират		D-гомоаланин	118 ± 5
2-Оксо-4-фенилбутират		D-гомофенилаланин	45 ± 1
2-Оксовалерат		D-норвалин	14 ± 1
Фенилпируват		D-фенилаланин	7,7 ± 0,2
4-Метил-2-оксовалерат		D-лейцин	4,7 ± 0,6
3-Метил-2-оксобутират		D-валин	3,1 ± 0,3
2-Оксогексаноат		D-норлейцин	2,61 ± 0,02

Окончание табл. 3

$\alpha$ -Кетокислота	Формула $\alpha$ -кетокислоты	Соответствующая D-аминокислота	Активность, мU/мг
3-Метил-2-оксвалерат		D-изолейцин	1,9 ± 0,05
4-Гидрокси-фенилпируват		D-тирозин	1,6 ± 0,1

Активность AmicoTA уменьшалась с увеличением объема боковой группы и с добавлением заместителя к C $\beta$ - и C $\gamma$ -атому боковой группы  $\alpha$ -кетокислоты. Интересно, что активность AmicoTA с 2-оксо-4-фенилбутиратом была выше, чем с фенилпируватом, что, вероятно, обусловлено структурными особенностями активного центра фермента.

Разработанную трехферментную систему для (*R*)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот (схема 1, система I) было решено опробовать на субстратах – 2-оксобутират, 2-оксвалерат и 2-оксо-4-фенилбутират, для синтеза неприродных аминокислот – D-гомоаланина, D-норвалина и D-гомофенилаланина. Для начала были выбраны следующие условия (*R*)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот: 100 мМ D-глутамата, 50 мМ  $\alpha$ -кетокислоты, 100 мкМ PLP, 4 мг/мл AmicoTA (не больше 1 U/мл), 180 U/мл ГГДГ, 1 мМ NADH, 30 U/мл ГДГ и 150 мМ D-глюкозы, 100 мМ К-фосфатный буфер (pH 7,5), 30 °С [18]. Температура 30 °С была выбрана для предотвращения быстрой инактивации всех ферментов в системе. (При понижении температуры реакции трансаминирования между D-аланином и  $\alpha$ -кетоглутаратом с 50 до 30 °С удельная активность AmicoTA снижалась в два раза). Для систем с 2-оксобутиратом и 2-оксвалератом проверили также влияние pH на скорость накопления D-гомоаланина и D-норвалина. Реакции проводили в 100 мМ К-фосфатном буфере (pH 7,5) и в 100 мМ CHES-буфере (pH 9,0).

Выход продукта реакции D-глутамат + 2-оксобутират через 24 ч составил 100% при значениях pH как 7,5, так и 9,0 (табл. 4), тогда как выход продукта реакции D-глутамат +

+ 2-оксвалерат через 24 ч при pH 7,5 составил 100%, а при pH 9,0 – 86% (табл. 4). При pH 9,0 трехферментная система синтеза 2-оксвалерата работает менее эффективно, однако через следующие 24 ч выход продукта данной реакции все же достиг 100%. Реакцию D-глутамата с 2-оксо-4-фенилбутиратом проводили только при pH 7,5. Через 66 ч выход продукта составил 95% (табл. 4).

На следующем этапе была увеличена концентрация исходных субстратов (D-глутамата и соответствующей  $\alpha$ -кетокислоты) до 500 мМ, а D-глюкозы до 1 М. Концентрацию других реагентов не меняли. Реакции проводили при 30 °С. Реакцию D-глутамат + 2-оксо-4-фенилбутират проводили при pH 7,5 в присутствии 20% ДМСО из-за низкой растворимости 2-оксо-4-фенилбутирата. Через 24 ч выход продукта D-гомофенилаланина составил 5% и более не увеличивался (табл. 4). Также в реакционной смеси наблюдалась агрегация белков. Вероятно, высокая концентрация субстратов или ДМСО привели к денатурации ферментов в системе. Для реакций D-глутамат + 2-оксобутират/2-оксвалерат через 24 ч выходы продуктов достигли больших значений: выход D-гомоаланина составил 65 и 60%, а выход D-норвалина – 40 и 33% при pH 7,5 и 9,0 соответственно (табл. 4). Для повышения выхода продукта при pH 7,5 повысили концентрацию PLP в реакционной среде от 100 до 500 мкМ. Действительно, было достигнуто некоторое увеличение выхода D-гомоаланина и D-норвалина (табл. 4), однако 100%-го выхода продуктов не удалось достичь. Таким образом, при высокой концентрации субстратов трехферментная система

Т а б л и ц а 4

**(R)-селективное аминирование  $\alpha$ -кетокислот: условия проведения синтеза и выходы продуктов реакций**

[D-Глутамат], мМ	[ $\alpha$ -Кетокислота], мМ	[PLP], мкМ	pH	Время, ч	Выход продукта, %	Полученная D-аминокислота, мМ
2-Оксобутират						D-Гомоаланин
100	50	100	7,5	24	100	50
			9,0		100	50
500	500		7,5		65	325
			9,0		60	300
		200	75	375		
		500	7,5		87	435
2-Оксовалерат						D-Норвалин
100	50	100	7,5	24	100	50
			9,0		68	34
500	500		7,5		40	200
			9,0		33	165
		200	58	290		
		500	7,5		64	320
2-Оксо-4-фенилбутират						D-Гомофенилаланин
100	50	100	7,5	60	95	47,5
500*	500*			24	5	25

\*В систему добавляли 20% ДМСО.

оказалась менее эффективной для синтеза как D-гомоаланина, так и D-норвалина. Одной из причин могло быть закисление реакционной среды в результате накопления D-глюконовой кислоты (продукта окисления D-глюкозы, схема 1). Возможно также ингибирование субстратами и продуктами реакции.

Для каждой системы был определен энантиомерный избыток продукта D-аминокислоты. Реакционную смесь депротеинизировали с помощью центрифужных концентраторов и аминокислоты соединения реакционной смеси модифицировали 1-фтор-2,4-динитрофенил-5-L-аланинамидом (Marfey's reagent). Модифицированные энантиомеры аминокислот разделяли с помощью ВЭЖХ. В результате анализа определено, что энантиомерные избытки D-гомоаланина, D-норвалина и D-гомофенилаланина составили 99,9; 99,5 и 99,5% соответственно.

Высокая концентрация субстратов или продуктов реакции могла повлиять как на активность, так и на стабильность любого из трех

ферментов системы. Для каждого фермента была проанализирована операционная стабильность в условиях (R)-селективного аминирования 2-оксовалерата. AmisoTA, ГГДГ и ГДГ инкубировали в течение 24 ч в 100 мМ К-фосфатном буфере (pH 7,5) в присутствии 500 мМ D-глутамата, 500 мМ 2-оксовалерата, 100 мкМ PLP и 1 М D-глюкозы при 30 °С. В этих условиях активность AmisoTA не изменилась, ГГДГ уменьшилась на 40%, а ГДГ – на 20%. Таким образом, инактивация трехферментной системы в присутствии субстратов в высокой концентрации в течение 24 ч не связана с полной инактивацией какого-либо из ферментов в условиях (R)-селективного аминирования.

Далее был проведен анализ влияния высокой концентрации субстратов и продуктов на активность AmisoTA в полных реакциях D-глутамат + 2-оксобутират и D-глутамат + 2-оксовалерат. При повышении концентрации 2-оксобутирата и 2-оксовалерата в реакционной смеси до 500 мМ активность AmisoTA опреде-

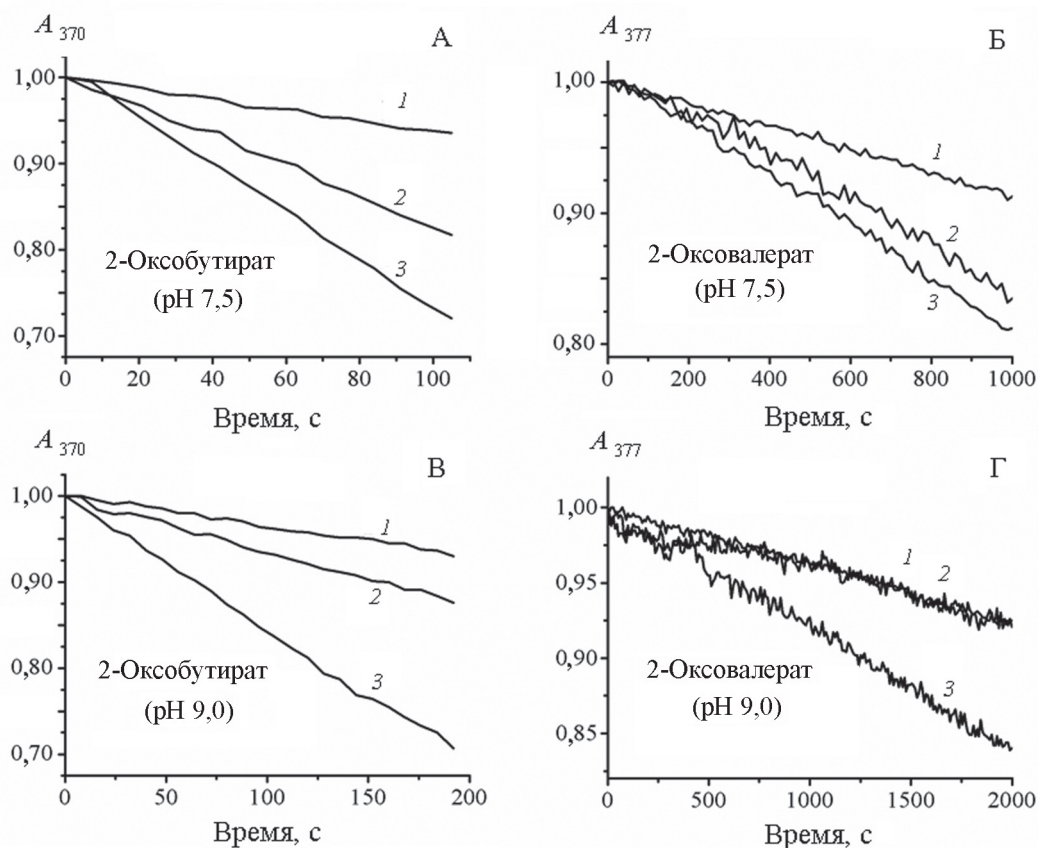


Рис. 1. Кинетические кривые реакций D-глутамат + 2-оксобутират (А, В) и D-глутамат + 2-оксовалерат (Б, Г), катализируемых AmisоTA, при 30 °С в 100 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,5) (А, Б) и в 100 мМ CHES-буфере (рН 9,0) (В, Г), при разных значениях концентрации субстратов (1 – 100 мМ D-глутамат и 50 мМ  $\alpha$ -кетокислоты, 2 – 100 мМ D-глутамат и 500 мМ  $\alpha$ -кетокислоты, 3 – 500 мМ D-глутамат и 500 мМ  $\alpha$ -кетокислоты)

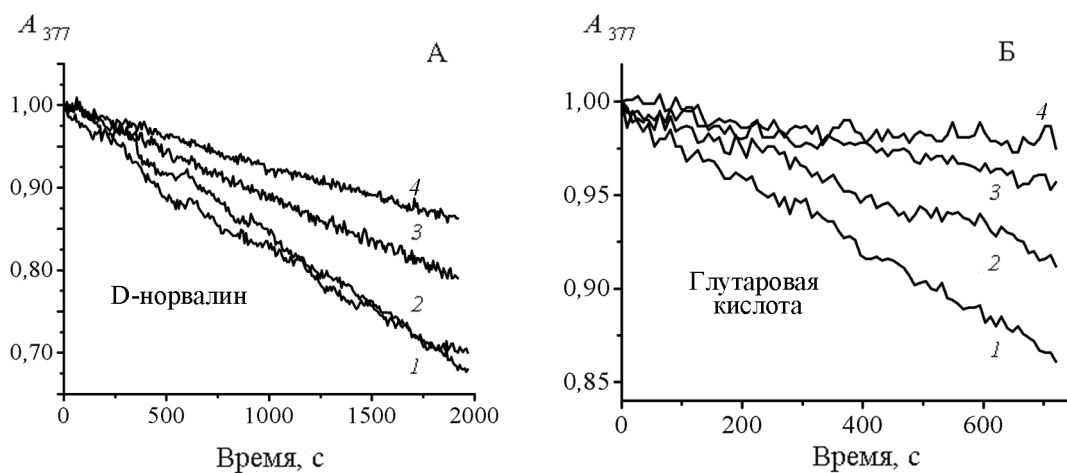


Рис. 2. Кинетические кривые реакции D-глутамат + 2-оксовалерат, катализируемой AmisоTA, при 30 °С в 100 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,5) при разных значениях концентрации продукта D-норвалина (А) и глутаровой кислоты (Б) (1 – 0 мМ, 2 – 50 мМ, 3 – 200 мМ, 4 – 500 мМ D-норвалина/глутаровой кислоты)

ляли ГДГ-методом при длине волны 370 и 377 нм соответственно из-за значительного вклада в поглощение при длине волны 340 нм этих субстратов. Субстраты с высокой концентрацией не ингибировали AmicoTA (рис. 1), тогда как высокая концентрация продуктов реакции D-глутамат + 2-оксвалерат способствовала ингибированию AmicoTA (рис. 2). D-Норвалин ингибировал AmicoTA при концентрации от 200 мМ, тогда как глутаровая кислота (аналог продукта трехферментной системы R-2-гидроксиглутарата) ингибировала AmicoTA уже при концентрации 50 мМ, а при 500 мМ ингибировала активность AmicoTA на 90%. Можно заключить, что ингибирование AmicoTA продуктами реакции стало одной из причин снижения выходов продуктов при высоких значениях концентрации субстратов.

Таким образом, в результате проделанной работы трансминаза D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense* (AmicoTA) опробована в качестве биокатализатора (R)-селективного аминирования  $\alpha$ -кетокислот. Дана оценка эффективности трехферментной системы, включающей AmicoTA, которая катализирует реакцию трансминирования между D-глутаматом и  $\alpha$ -кетокислотой, и

вспомогательные ферменты (глюкозодегидрогеназу и (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназу) для смещения равновесия и регенерации кофермента NADH. Разработанная система была опробована с  $\alpha$ -кетокислотами 2-оксобутиратом, 2-оксвалератом и 2-оксо-4-фенилбутиратом для синтеза неприродных аминокислот – D-гомоаланина, D-норвалина и D-гомофенилаланина. В результате каскада реакций в трехферментной системе при концентрациях субстратов 100 мМ D-глутамата и 50 мМ  $\alpha$ -кетокислоты выходы продуктов D-гомоаланина и D-норвалина составили 100% как при нейтральных, так и при слабощелочных pH, выход D-гомофенилаланина составил 95% при нейтральных значениях pH. Однако при повышении концентрации субстратов до 500 мМ наблюдалось снижение выходов целевых D-аминокислот, вероятно, в результате ингибирования AmicoTA продуктами реакций, инактивации вспомогательных ферментов и закисления среды. В результате оптимизации условий проведения (R)-селективного аминирования удалось получить 435 мМ D-гомоаланина, 320 мМ D-норвалина и 47,5 мМ D-гомофенилаланина. Энантиомерный избыток продуктов D-аминокислот составил более 99,5%.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grishin D.V., Zhdanov D.D., Pokrovskaya M.V., Sokolov N. N. // All life. 2020. Vol. 13. N. 1. P. 11–22 (DOI: 10.1080/21553769.2019.1622596).
2. Martínez-Rodríguez S., Martínez-Gómez A.I., Rodríguez-Vico F., Clemente-Jiménez J.M., Las Heras-Vázquez F.J. // Chem. Biodivers. 2010. Vol. 7. N. 6. P. 1531–1548 (DOI: 10.1002/cbdv.200900245).
3. Nguyen L.A., He H., Pham-Huy C. // Int. J. Biomed. Sci. 2006. Vol. 2. N. 2. P. 85–100.
4. Bornscheuer U.T., Huisman G.W., Kazlauskas R.J., Lutz S., Moore J.C., Robins K. // Nature. 2012. Vol. 485. N. 7397. P. 185–194 (DOI: 10.1038/nature11117).
5. Sheldon R. A., Woodley J. M. // Chem. Rev. 2018. Vol. 118. N. 2. P. 801–838 (DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00203).
6. Bakunova A.K., Nikolaeva A.Y., Rakitina T.V., Isaikina T.Y., Khrenova M.G., Boyko K.M., Popov V.O., Bezudnova E.Y. // Molecules. 2021. Vol. 26. N. 16. P. 5053 (DOI: 10.3390/molecules26165053).
7. Zhou H., Meng L., Yin X., Xu G., Wu J., Wu M., Yang L. // Eur. J. Org. Chem. 2019. Vol. N. 38. P. 6470–6477 (DOI: 10.1002/EJOC.201900828).
8. Kobayashi J., Shimizu Y., Mutaguchi Y., Doi K., Ohshima T. // J. Mol. Catal., B Enzym. 2013. Vol. 94. P. 15–22 (DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.04.013).
9. Nakajima N., Tanizawa K., Tanaka H., Soda K. // J. Biotech. 1988. Vol. 8. N. 3. P. 243–248 (DOI: 10.1016/0168-1656(88)90006-5).
10. Galkin A., Kulakova L., Yamamoto H., Tanizawa K., Tanaka H., Esaki N., Soda K. // J. Ferment. Bioeng. 1997. Vol. 83. N. 3. P. 299–300 (DOI: 10.1016/S0922-338X(97)80997-X).
11. Slabu I., Galman J.L., Lloyd R.C., Turner N.J. // ACS Catal. 2017. Vol. 7. N. 12. P. 8263–8284 (DOI: 10.1021/acscatal.7b02686).
12. Guo F., Berglund P. // Green Chem. 2017. V. 19. N. 2. P. 333–360 (DOI: 10.1039/c6gc02328b).
13. Dold S.M., Syltatk C., Rudat J. Transaminases and their applications. Green Biocatal (29). New Jersey, 2016. P. 715–746 (DOI: 10.1002/9781118828083.ch29).
14. Boyko K., Rakitina T., Korzhenevskiy D., Vlaskina A., Agapova Y., Kamashev D., Kleymenov S., Popov V. // Sci Rep. 2016. N. 6. P. 36366 (DOI: 10.1038/srep36366).
15. Pavkov-Keller T., Strohmeier G., Diepold M., Peeters W., Smeets N., Schurmann M., Gruber K., Schwab H., Steir K. // Sci. Rep. 2016. N. 6. P. 38183 (DOI: 10.1038/srep38183).
16. Yu X., Bresser J., Schall I., Djurdjevic I., Buckel W., Wang X., Engel P. // Anal. Biochem. 2012. Vol. 431. N. 2. P. 127–131 (DOI: 10.1016/j.ab.2012.09.009).
17. Wang X., Saba T., Yiu H. P., Howe R. F., Anderson J.A., Shi J. // Chem. 2017. Vol. 2. N. 5. P. 621–654 (DOI: 10.1016/j.chempr.2017.04.009).
18. Schätzle S., Steffen-Munsberg F., Thontowi A., Höhne M., Robins K., Bornscheuer U. T. // Adv. Synth. Catal. 2011. Vol. 353. N. 13. P. 2439–2445 (DOI: 10.1002/adsc.201100435).

**Информация об авторах**

Шилова Софья Александровна – мл. науч. сотр. лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (zavyalovasonya@yandex.ru);

Ракитина Татьяна Владимировна – вед. инженер Курчатовского комплекса НБИКС – природоподобных технологий, ст. науч. сотр. лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, канд. хим. наук (taniarakitina@yahoo.com);

Попов Владимир Олегович – академик РАН, науч. руководитель Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», зав. лабораторией инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, докт. хим. наук, профессор (vpopov@inbi.ras.ru);

Безсуднова Екатерина Юрьевна – ст. науч. сотр. лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, докт. хим. наук (eubez@yandex.ru).

**Вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 28.11.2022;  
одобрена после рецензирования 01.12.2022;  
принята к публикации 05.12.2022.