

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 577.15.01

**ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА: ОТ РЕГЕНЕРАЦИИ NAD(P)H
ДО МИШЕНИ В БИОПЛЕНКАХ ПАТОГЕНОВ, КОМПОНЕНТА
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ГИБРИДНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ
И ФИКСАЦИИ CO₂ ИЗ АТМОСФЕРЫ**

**Владимир Иванович Тишков¹⁻³, Анастасия Александровна Пометун^{1,3},
Святослав Сергеевич Савин¹**

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет

² ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»

³ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Автор, ответственный за переписку: Владимир Иванович Тишков, tishkovvi@my.msu.ru, vitishkov@gmail.com

Аннотация. NAD(P)⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, FDH) катализирует простую с точки зрения химии и биологии реакцию окисления формиат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD(P)⁺ до NAD(P)H. Исследования в области наук о живом показали, что эта реакция играет исключительно важную роль в самых разных организмах. Области и виды практического применения FDH также непрерывно расширяются. В обзоре представлен анализ основных этапов развития знаний о роли формиатдегидрогеназы в живых системах, а также показаны достижения по созданию высокоэффективных катализаторов на основе FDH и новые области их практического применения. Показана важность правильного выбора исходного фермента для создания с минимальными затратами биокатализатора с заданными свойствами. Проанализированы перспективы применения FDH для фиксации CO₂ из атмосферы.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа, физиологическая роль, основные свойства, каталитический механизм, белковая инженерия, практическое применение, гибридные биокатализаторы, фиксация CO₂

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-4-289-311

Сокращения: FDH – формиатдегидрогеназа.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания.

Для цитирования: Тишков В.И., Пометун А.А., Савин С.С. Формиатдегидрогеназа: от регенерации NAD(P)H до мишени в биопленках патогенов, компонента высокоэффективных гибридных биокатализаторов и фиксации CO₂ из атмосферы // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2023. Т. 64. № 4. С. 289–311.

SCIENTIFIC REVIEW

FORMATE DEHYDROGENASE: FROM NAD(P)H REGENERATION TO THE TARGET IN PATHOGENS BIOFILMS, A COMPONENT OF HIGHLY EFFICIENT HYBRID BIOCATALYSTS AND CO₂ FIXATION FROM THE ATMOSPHERE**Vladimir I. Tishkov¹⁻³, Anastasia A. Pometun^{1,3}, Svyatoslav S. Savin¹**¹ Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation² Innovations and High Technologies MSU Ltd., Moscow, Russian Federation³ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation**Corresponding author:** Vladimir I. Tishkov, tishkovvi@my.msu.ru, vitishkov@gmail.com

Abstract. NAD(P)⁺-dependent formate dehydrogenase (EC 1.2.1.2, FDH) catalyzes the simple from chemical and biological point of view reaction of formate ion oxidation to carbon dioxide with corresponding reduction of NAD(P)⁺ to NAD(P)H. Advances in the life sciences have shown that this reaction plays an extremely important role in a wide variety of organisms. The areas and types of practical applications of FDH are also permanently expanding. In this review we considered the main stages in the development of understanding and knowledge about the role of formate dehydrogenase in living systems. Achievements in creation of highly efficient catalysts based on FDH for classic biotechnology as well as for new areas are also considered. The importance of appropriate choice of the initial FDH for the creation of a biocatalyst with the required and prescribed properties with minimal costs is shown. The prospects for the use of FDH for the fixation of CO₂ are discussed.

Keywords: formate dehydrogenase, main properties, catalytic mechanism, physiological role, practical applications, protein engineering, hybrid biocatalysts, CO₂ fixation

List of abbreviations: FDH – formate dehydrogenase.

Financial Support. The work was carried out within the framework of the state task.

For citation: Tishkov V.I., Pometun A.A., Savin S.S. Formate Dehydrogenase: from NAD(P)H Regeneration to the Target in Pathogens Biofilms, a Component of Highly Efficient Hybrid Biocatalysts and CO₂ Fixation From the Atmosphere // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2023. T. 64. № 4. P. 289–311.

Обзор посвящен светлой памяти Ильи Васильевича Березина, воспитавшего целое поколение специалистов мирового уровня по бикатализу, учителя одного из авторов статьи.

Введение

Корректная постановка задачи и правильный выбор объекта исследования являются основными факторами, определяющими успех будущих исследований. Планирование работ и постановка задачи могут носить как краткосрочный (от нескольких до 10–15 лет), так и долговременный характер. Однако периодически происходит смена объектов исследования, встречаются

случаи, когда в результате получения дополнительных знаний открываются новые перспективы исследования выбранного объекта, причем направление работ может сместиться в совершенно другую область.

Наглядным примером такой эволюции изменения и расширения направлений исследования является форматдегидрогеназа. К форматдегидрогеназам относятся ферменты, которые окисляют формат-ион до углекислого газа

путем отщепления от субстрата гидрид-иона. В качестве акцептора восстановительного эквивалента могут выступать совершенно разные кофакторы и коферменты. Поэтому в справочнике по классификации ферментов можно найти формиадегидрогеназы с разными классификационными номерами – 1.1.5.6, 1.2.1.2, 1.2.1.43, 1.17.1.9 и др. Эти формиадегидрогеназы отличаются друг от друга как по олигомерному составу, так и по наличию (или отсутствию) кофакторов и простетических групп. Формиадегидрогеназы с кофакторами в активном центре (молибдопептин, железосерные кластеры, селен, PQQ) являются гетероолигомерами, их белковая глобула может состоять из 6–8 различных субъединиц. На открытом воздухе в присутствии кислорода такие формиадегидрогеназы нестабильны и быстро инактивируются. Поэтому ферменты этого типа пока не нашли применения на практике. Кроме того, их участие в жизнедеятельности клетки ограничено довольно специфическими реакциями, которые в силу использования разнообразных кофакторов сильно различаются в разных организмах. Повышенный интерес к таким формиадегидрогеназам возник в последние 10 лет в связи с начавшимся бумом работ по фиксации атмосферного CO₂. В настоящем обзоре они будут немного рассмотрены в соответствующем разделе, однако основное внимание будет уделено самому простому по составу и структуре ферменту с КФ 1.2.1.2, который в семействе формиадегидрогеназ занимает отдельное и очень важное место. Именно формиадегидрогеназу такого типа в дальнейшем мы будем обозначать как FDH. FDH является гомодимером, не содержит ни простетических групп, ни ионов металлов.

Впервые NAD⁺-зависимая формиадегидрогеназная активность была показана на бобах фасоли *Phaseolus vulgaris* еще в 1921 г. [1]. Однако очень низкое содержание FDH в бобах (позднее было показано, что фермент находится в митохондриях растений) и отсутствие в то время эффективных методов выделения и очистки не позволили начать систематические исследования растительных FDH. Первые исследования по изучению физиологической роли FDH в растениях были выполнены только тридцать лет спустя, в 1951 г. [2]. Последующее развитие методов генетической инженерии позволило получать растительные FDH в достаточных количествах. Подробно с

историей исследования FDH растений можно ознакомиться в обзоре [3].

Исследование формиадегидрогеназ микроорганизмов стартовало в начале 60-х годов прошлого столетия. Самой первой была выделена формиадегидрогеназа из метанолутилизирующих бактерий *Pseudomonas oxalaticus* (РохФДГ). В 1964 г. РохФДГ была использована для разработки ферментативного метода определения микроколичеств формиата [4]. К сожалению, этот фермент проявил низкую стабильность. Более того, присутствие формиата увеличивало скорость инактивации РохФДГ [5]. Последующие исследования этого фермента показали, что РохФДГ относится к формиадегидрогеназам с простетическими группами, для которых быстрая инактивация в присутствии кислорода воздуха является отличительной чертой. Результаты исследования свойств РохФДГ привели к тому, что в начале 70-х годов прошлого века у большинства членов мирового научного сообщества сформировалось мнение, что все бактериальные формиадегидрогеназы отличаются низкой стабильностью. В то же время результаты экспериментов с экстрактами метилотрофных дрожжей показали, что в них формиадегидрогеназная активность сохраняется длительное время. В результате исследованиями Европы, США и Японии в качестве источников индивидуальных FDH были выбраны метанолутилизирующие дрожжи *Candida boidinii* [6], *Pichia pastoris* [7], *Ogataea parapolymorpha* (*Hansenula polymorpha*) и др. Наибольшее распространение получила формиадегидрогеназа из дрожжей *C. boidinii* (СбоFDH), поскольку СбоFDH была использована в процессе получения *mpem*-L-лейцина, реализованного фирмой «Evonik» (бывшая «Degussa») в середине 90-х годов прошлого века [8]. Наряду с формиадегидрогеназой из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH, см. ниже) СбоFDH стала «золотым стандартом» для проведения исследований с участием формиадегидрогеназ в разных областях науки и практики.

В 1974 г. на химическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова была создана кафедра химической энзимологии. Первым заведующим кафедры стал ее основатель, член-корреспондент АН СССР, профессор, доктор химических наук Илья Васильевич Березин, 100-летний юбилей со дня рождения которого будет отмечаться в августе 2023 г. В период организации и становления нового подразделения в начале

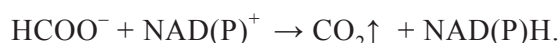
70-х годов на кафедре химической энзимологии было инициировано много новых, перспективных и в ряде случаев прорывных проектов в области биокатализа. Среди них был проект по исследованию и применению формиатдегидрогеназ. Для выбора источника фермента был проведен скрининг метанолутилизирующих бактерий и дрожжей из коллекции метилотрофных микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. По результатам тестирования для выделения и исследования индивидуальных ферментов были выбраны бактерии *Pseudomonas* sp.101 (прежние названия *Bacterium* sp.1, *Achromobacter parvulus*) (PseFDH) [9] и дрожжи *Candida methylica* (CmeFDH) [10]. В дальнейшем после сравнения свойств PseFDH и CmeFDH выбор был сделан в пользу фермента из бактерий. Как уже отмечалось выше, PseFDH и CboFDH стали основными формиатдегидрогеназами, на которых проводили различные эксперименты по исследованию и применению FDH. В плане фундаментальных исследований наиболее изученным ферментом является PseFDH. Основные свойства PseFDH и CboFDH дикого типа представлены в табл. 1. Обсуждение того или иного параметра будет проводиться по мере изложения материала обзора. Однако уже здесь следует отметить, что наличие метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 в коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ оказалось большой удачей. За прошедшие

50 лет было найдено и охарактеризовано много новых формиатдегидрогеназ, однако даже исходная PseFDH (фермент дикого типа, wt-PseFDH) до сих пор остается непревзойденной по термостабильности среди выделенных и охарактеризованных формиатдегидрогеназ. Близкую по величине термостабильность при повышенной температуре (60–65 °С) демонстрирует клонированная в нашей лаборатории формиатдегидрогеназа из патогенов *Staphylococcus aureus* (SauFDH) [11], однако за счет более высокой энтальпии активации ΔH^\ddagger процесса термоинактивации PseFDH при снижении температуры становится гораздо более стабильной, чем SauFDH [12].

Знание свойств исследуемого объекта – необходимое условие для корректного понимания и оценки важности получаемых результатов, а также для понимания логики развития исследований. Рассмотрим некоторые основные характеристики формиатдегидрогеназы.

Особенности кинетического и каталитического механизмов FDH

С точки зрения химии формиатдегидрогеназа катализирует простую реакцию – окисление формиат-иона до CO₂ при сопряженном восстановлении NAD(P)⁺ в NAD(P)H:



Реакция протекает в тройном комплексе [FDH – NAD(P)⁺ – формиат]. Образование этого

Таблица 1

Основные характеристики формиатдегидрогеназ из дрожжей *C. boidinii* и бактерий *Pseudomonas* sp. 101

| Параметр | <i>C. boidinii</i> FDH | <i>Pseudomonas</i> sp. 101 FDH |
|---|------------------------|---|
| Удельная активность (30 °С) | 6,5 ед./мг | 10 ед./мг |
| K_M формиат, мМ | 6 | 6 |
| K_M NAD ⁺ , мкМ | 45 | 55 |
| Стабильность при 57 °С, $\tau_{1/2}$ | 20 мин | 72 ч |
| Стабильность при +4 °С, $\tau_{1/2}$ | 2 недели | > 1 года |
| Условия хранения | –20 °С, 50% глицерин | +4 °С; 0,1 М фосфатный буфер; рН 7,0; 10 мМ ЭДТА; 1,4 М (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| Предпочтение NAD ⁺ /NADP ⁺ , $(k_{\text{кат.}}/K_M)^{\text{NAD}^+}/(k_{\text{кат.}}/K_M)^{\text{NADP}^+}$ | 300 000 | 2400 |
| Устойчивость к органическим растворителям | низкая | очень высокая |
| Устойчивость к протеазам | умеренная | очень высокая |

комплекса может происходить как по упорядоченному, так и по неупорядоченному кинетическому механизму (Bi-Bi ordered и Bi-Bi random kinetic mechanisms соответственно). Первый тип кинетического механизма реализуется в случае эукариотических FDH, а второй – у ферментов из бактерий. В отдельных экспериментах было показано, что истинным продуктом реакции является именно диоксид углерода [13]. Последующая гидратация CO_2 с образованием бикарбонат-иона приводит к тому, что равновесие реакции сдвинуто в сторону образования восстановленного кофермента. Этот момент в механизме формиатдегидрогеназной реакции будет обсужден далее при анализе перспектив использования FDH для фиксации углекислого газа.

Химическая часть реакции (остальные стадии – связывание субстратов и отщепление продуктов реакции) протекает в одну стадию по механизму прямого переноса гидрид-иона от формиата к C_4 -атому никотинамидного кольца NAD(P)^+ [14]. Данные по первичному дейтериевому кинетическому изотопному эффекту свидетельствуют, что лимитирующей стадией ферментативной реакции является именно стадия переноса гидрид-иона [14, 15]. В случае бактериальной PseFDH величина первичного дейтериевого кинетического эффекта составляет $3,0 \pm 0,1$ и в пределах ошибки эксперимента не зависит от pH [14]. В случае FDH из дрожжей *C. boidinii* и *C. methylica* величина этого эффекта меньше – всего 2,2 [16, 17]. Величина дейтериевого кинетического эффекта для FDH значительно меньше теоретического (7,0), что связано с несимметричностью переходного состояния. Увеличение значения эффекта у CboFDH при использовании аналогов NAD^+ с худшим потенциалом восстановления указывает на то, что у дрожжевых FDH переходное состояние наступает раньше, чем у PseFDH, однако такое предположение не согласуется с тем фактом, что каталитическая константа у бактериальных формиатдегидрогеназ на 60–70% выше, чем у дрожжевых ферментов. В случае PseFDH вывод о том, что лимитирующей стадией всей реакции является перенос гидрид-иона в тройном комплексе был подтвержден результатами исследования кинетики реакции в предстационарном режиме [14]. Было показано, что величина константы скорости стадии химического превращения как минимум в 15–20 раз меньше, чем константы скорости диссоциации формиата или NAD^+ из тройного комплекса [14].

Формиатдегидрогеназа FDH по сравнению с другими хорошо известными дегидрогеназами (алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа и др.) является «медленным» ферментом. Удельная активность бактериальных и дрожжевых FDH при 30 °C обычно составляет 10,0 и 6,3 ед. активности на 1 мг белка (табл. 1). В 2020 г. появились статьи, в которых описано клонирование и получение препаратов рекомбинантных FDH из бактерий *Rhodococcus jostii* (RjoFDH) [18] и патогенов *Staphylococcus aureus* [11] с удельной активностью 20 ед. на 1 мг белка.

Отличительной особенностью формиатдегидрогеназной реакции является отсутствие появления (восстановление кофермента NAD(P)^+) или потребления (окисление NAD(P)H) протона, т.е. в каталитическом механизме фермента нет необходимости в участии остатков, осуществляющих кислотно-основной катализ. В результате активность FDH не зависит от pH и остается постоянной во всем диапазоне pH-стабильности фермента (от 5 до 11) [19]. FDH является членом большого суперсемейства D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот [20] (например, к этому суперсемейству относится такой фермент, как D-лактатдегидрогеназа). У всех дегидрогеназ этого семейства для осуществления процесса выделения/захвата протона имеется классическая система переноса протона (proton relay system), состоящая из имидазола остатка гистидина и карбоксильной группы остатка глутаминовой кислоты (оба остатка в этом суперсемействе являются консервативными) [21]. Природа нашла очень простое и изящное решение – в формиатдегидрогеназе система переноса протона выключена за счет замены консервативного остатка Glu на остаток Gln. В PseFDH консервативный остаток Gln313 участвует в связывании формиат-иона, и обратная замена Gln313Glu привела к тому, что при pH > 7,0 pH-оптимум связывания формиата снизился на 2 ед. pH (с 10,0 до 8,0) [22].

Препаративное получение формиатдегидрогеназ

Получение CboFDH и PseFDH из природных штаммов. Практическое применение ферментов невозможно без разработки процессов эффективного и достаточно дешевого процесса получения биокатализатора. В случае FDH высокое содержание фермента (10% и более от общего растворимого белка) удается получить

при росте метилотрофных дрожжей на метаноле. В случае дрожжей *C. boidinii* был разработан непрерывный процесс культивирования в культуре клеток высокой плотности на среде с 1%-м метанолом [23]. При культивировании в 200-литровом ферментере в течение 10 дней выход CboFDH составил 4 млн ед. активности (2000 ед. с 1 л среды в день). Для выделения фермента использовали двустадийную методику очистки путем экстракции в водной двухфазной системе (полиэтиленгликоль/ K_2HPO_4). Этот метод не требует наличия хроматографических стадий и позволяет получить технический препарат CboFDH с удельной активностью 1,2 ед. на 1 мг белка, что соответствует примерно 20%-й чистоте.

В случае природного штамма *Pseudomonas* sp. 101 для получения высокого выхода PseFDH специальные исследования по оптимизации условий культивирования не проводились. В ходе разработки процесса получения NADH из NAD^+ с помощью иммобилизованной PseFDH в 1988–1989 гг. в НПО «Фермент» (Вильнюс, Литовская ССР) было наработано препаративное количество этого фермента из штамма *Pseudomonas* sp.101. Культивирование проводили в 100-литровом ферментере на среде с 0,5% метанола в течение 5 дней. Выход PseFDH по активности составил 450 тыс. ед. (900 ед. с 1 л среды за 1 день). Методика выделения представляла собой простое фракционирование сульфатом аммония:

1) осаждение части примесных белков в растворе $(NH_4)_2SO_4$ в концентрации 35% от насыщения;

2) высаживание PseFDH в растворе $(NH_4)_2SO_4$ в концентрации 80% от насыщения.

На второй стадии удалялись все нуклеиновые кислоты, большая часть олигосахаридов и липидов. Удельная активность полученных препаратов фермента составляла 2,0–2,5 ед. активности на 1 мг белка (около 20% чистоты). Отличительной особенностью этой методики является высокий выход по активности (90% и более) очищенной PseFDH. В случае использования двухфазной системы для очистки рекомбинантной PseFDH выход по активности составил 75% [24], хотя содержание рекомбинантного фермента в биомассе клеток *E. coli* было в 4 раза выше, чем в природном штамме *Pseudomonas* sp.101. В случае выделения CboFDH из исходного штамма и рекомбинантного фермента с помощью экстракции в двухфазных системах

выход фермента по активности, по сравнению с PseFDH, еще ниже.

Получение CboFDH и PseFDH с помощью технологий рекомбинантных ДНК. В самом начале 90-х годов XX столетия был клонирован ген PseFDH [25, 26], что позволило создать новую систему получения рекомбинантного фермента на основе клеток *E. coli* в качестве штамма-продуцента. Эта система более высокопродуктивна, поскольку клетки *E. coli* растут намного быстрее, чем природный штамм *Pseudomonas* sp.101. Созданная система экспрессии позволяет достигать содержания целевого фермента 40% и более от общего количества растворимых белков клетки. Культивирование клеток *E. coli* более экологично, поскольку позволяет избежать использования метанола как источника углерода, а в качестве компонентов среды применяют дешевые соединения, такие как глюкоза или глицерин. Кроме того, для клеток *E. coli* хорошо разработаны подходы их культивирования в режиме культуры клеток высокой плотности (high density culture).

Все вышесказанное справедливо и для экспрессии в клетках *E. coli* гена CboFDH, который был клонирован позже [27]. Однако стратегии культивирования и экспрессии генов PseFDH и CboFDH разные. Это обусловлено различной устойчивостью этих ферментов к протеазам *E. coli*. Хорошо известен тот факт, что при гетерологической экспрессии после индукции количество целевого белка сначала возрастает, но через 5–6 ч начинает быстро снижаться из-за расщепления протеазами клетки-хозяина. В этом случае стратегия культивирования заключается в длительном культивировании штамма-продуцента для наработки биомассы с последующей индукцией и дополнительным культивированием в течение 5–6 ч после индукции. Именно такая стратегия и была использована для препаративного получения рекомбинантной CboFDH [28]. Клетки *E. coli* с плазмидой, содержащей ген CboFDH, культивировали в течение 36–41 ч при 30 °C до поглощения $A_{600} = 96$ ед., затем давали индукцию ИПТГ и культивировали еще 6 ч. Выход фермента составлял до 60 тыс. ед. с 1 л среды, продуктивность процесса – 1600 ед./л за 1 ч, удельная активность в бесклеточном экстракте равнялась 0,8–1,0 ед./мг или 12,5–15,5% от растворимых белков клетки. Авторы отмечают, что параметры экспрессии были одинаковы как для CboFDH дикого типа, так и для ее различных мутантных форм [28].

Иная стратегия культивирования была реализована при получении рекомбинантной PseFDH. Это связано с тем, что указанный фермент проявляет исключительную устойчивость к воздействию различных протеаз. Например, при инкубировании с трипсином в соотношении 1:1 (концентрация каждого белка 20 мг/мл) в течение ночи при 25 °С PseFDH теряла не более 3–4% исходной активности, в то время как активность трипсина после такой инкубации полностью отсутствовала. Отсутствие дегградации PseFDH дикого типа и ее различных мутантов (включая NADP⁺-специфичный фермент) в клетках *E. coli* в процессе культивирования штамма-продуцента минимум в течение 72 ч было показано с помощью аналитического электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, а также с помощью аналитического капиллярного электрофореза [29]. Оптимизация была проведена в два этапа. Результаты первого этапа представлены в работе [30]. В 2002 г. была проведена вторая большая ферментация штамма *E. coli* – суперпродуцента мутантной PseFDH GAV, в которой за счет замен A198G и C255A была повышена температурная и химическая стабильность [30]. Культивирование проводили в 400-литровом ферментере с рабочим объемом среды 250 л при 30 °С в течение 17 ч в отсутствие антибиотиков. Индукцию биосинтеза PseFDH GAV осуществляли лактозой уже через 4,5 ч после начала культивирования, когда поглощение среды A_{600} составило 2,1 ед. поглощения. Через 17 ч после начала культивирования концентрация клеток в среде и активность фермента составили 36 г/л и 35 000 ед./л соответственно (продуктивность 2000 ед./л за 1 ч при уровне экспрессии 40% и более от всех растворимых белков *E. coli*). Суммарно было получено около 10 млн ед. PseFDH GAV.

Для выделения рекомбинантных CboFDH и PseFDH можно использовать те же методы и подходы, что и при их выделении из природных штаммов. В случае мутантных PseFDH с повышенной температурной стабильностью многочисленные варианты которых были получены в нашей лаборатории [21, 31–33], в процесс очистки вводится дополнительная стадия термообработки суспензии клеток после разрушения (20–25 минут при 60–63 °С). Результаты аналитического электрофореза в ПААГ в присутствии DDS-Na свидетельствуют об очень высокой эффективности стадии

термообработки – чистота препаратов фермента возрастает с 40 до 80% и более. Поэтому для получения технических препаратов высокоочищенной PseFDH достаточно фракционирования сульфатом аммония. В случае необходимости гомогенные препараты PseFDH могут быть получены с помощью гидрофобной хроматографии на носителе с фенильными группами. Для получения высокоочищенных препаратов рекомбинантной CboFDH была разработана методика аффинной сорбции в псевдосжиженном слое носителя (pseudo-affinity expanded bed adsorption) [34].

Особенности хранения препаратов CboFDH и PseFDH

Основной причиной инактивации белков и ферментов при их хранении в растворе является не низкая термостабильность, а инактивация за счет присутствия в образце фермента протеаз даже в микроколичестве. В качестве примера можно привести термостабильные ДНК-полимеразы, которые используются для проведения полимеразной цепной реакции. Эти ферменты хорошо выдерживают многократные нагревы до 93–98 °С (стадия денатурации ДНК), тем не менее, их хранят в 50%-м глицерине при –20 °С. Из-за невысокой сопротивляемости к инактивации примесными протеазами препараты CboFDH также хранят в 40–50%-м глицерине при –20 °С. Для небольшого количества CboFDH, используемой в наборах для определения формиата, также получают лиофилизированные препараты, которые растворяют перед использованием. Такие препараты после растворения хранятся при +4 °С не более 2 недель. При работе с CboFDH следует помнить, что при концентрации выше 3–4 мг/мл фермент склонен выпадать в осадок, в котором необратимо денатурируется. Как правило, проблема решается простым добавлением в раствор хлорида натрия в концентрации до 1 М.

Высокие термостабильность и устойчивость PseFDH к инактивации протеазами позволяют хранить препараты этого фермента при +4 °С в течение нескольких лет. Фермент также не теряет активности в течение длительного времени при комнатной температуре. При транспортировке PseFDH не требует охлаждения и фермент может доставляться потребителю обыкновенной почтой даже в летнее время. Обычно препараты PseFDH хранятся в фосфатном буфере в

присутствии 10 мМ ЭДТА и 1,4 М сульфата аммония (35% от насыщения). ЭДТА связывает в комплекс ионы переходных металлов, которые могут катализировать окисление сульфгидрильных групп существенных остатков Cys (см. ниже). Добавление сульфата аммония приводит к снижению концентрации растворенного кислорода (а также к защите остатков Cys), предотвращает инактивацию фермента за счет бактериального заражения. Замена в PseFDH существенных для активности остатков Cys145 и Cys255 на остатки соответственно Ser или Ala и Ala позволила получить препараты мутантной PseFDH, которые хранятся при +4 °С уже более 18 лет без потери активности.

Использование FDH для метаболической инженерии рекомбинантных штаммов

В метилотрофных микроорганизмах при их росте на метаноле FDH снабжает клетку энергией в виде NADH. Совершенно очевидно, что, если в клетке осуществить экспрессию FDH, а в культуральную среду добавить формиат, то такая клетка за счет синтеза дополнительного NADH будет иметь несомненные преимущества по сравнению с такой же клеткой, не содержащей формиатдегидрогеназы. Дополнительное снабжение клетки энергией в виде NADH с помощью FDH имеет явные преимущества. Во-первых, формиат-ион легко проникает в клетку, во-вторых, продуктом реакции является углекислый газ, который легко выводится из клетки и, в-третьих, формиат-ион является ингибитором клеточного дыхания, что обеспечивает дополнительное селективное давление для сохранения в ходе культивирования только тех клеток, в которых имеется FDH. В литературе

можно найти много работ по метаболической инженерии рекомбинантных штаммов с использованием FDH [35–51].

В нашей лаборатории мы тоже использовали добавление формиата в среду для культивирования. Результаты экспериментов представлены в табл. 2. Полученные данные наглядно демонстрируют, что этот подход позволяет кардинально повысить эффективность культивирования – суммарное добавление формиата натрия в количестве 8 г/л повышает выход биомассы с 38 до 55 г/л (почти на 50%).

Ген PseFDH был использован в экспериментах по метаболической инженерии для создания штамма *E. coli*, эффективно растущего на метаноле [52, 53].

Инженерия основных свойств формиатдегидрогеназ

Для эффективного применения фермента на практике, как правило, проводится оптимизация его свойств в двух направлениях:

- 1) улучшение каталитических свойств (повышение активности и уменьшение K_M);
- 2) повышение температурной и операционной стабильности фермента.

В литературе можно найти много статей по улучшению свойств с помощью как методов генетической инженерии, так и методов иммобилизации. Имеются также несколько обзоров, суммирующие результаты таких экспериментов [3, 21, 30, 31]. Поэтому мы не будем останавливаться на подробностях, а отметим наиболее существенные моменты.

Улучшение каталитических свойств. Большинство FDH имеют очень близкие значения K_M по NAD^+ и формиату (табл. 3). Сразу

Т а б л и ц а 2

Влияние добавления формиата натрия в культуральную среду при культивирования штамма *E. coli* BL21(DE3), трансформированного и не трансформированного плазмидой с геном PseFDH

| Штамм <i>E. coli</i> | Добавление формиата, 4 × 0,03 М (2 г/л) | Выход биомассы, г/л |
|--------------------------------|---|---------------------|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | – | 30 |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | + | <0,5 |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pFDH8 | – | 38 |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pFDH8 | + | 55 |

П р и м е ч а н и е. Среда 2YT (16 г дрожжевого экстракта; 10 г бактотриптона; 5 г NaCl; 1,5 г NaH_2PO_4 ; 3,5 г K_2HPO_4) + 1% глицерин. Культивирование 24 ч при 30 °С. Индукция лактозой через 4 ч после начала культивирования, добавление формиата натрия до 2 г/л через 8, 12, 16 и 20 ч после начала культивирования.

Т а б л и ц а 3

Каталитические параметры некоторых рекомбинантных формиатдегидрогеназ дикого типа и их мутантных форм (0,1 М фосфатный буфер; pH 7,0; 30 °С)

| Фермент | $k_{\text{кат.}}, \text{с}^{-1}$ | $K_{\text{M}}^{\text{NAD}^+}, \text{мкМ}$ | $K_{\text{M}}^{\text{form}}, \text{мМ}$ | $k_{\text{кат.}}/K_{\text{M}}^{\text{NAD}^+}, \text{мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ | $k_{\text{кат.}}/K_{\text{M}}^{\text{form}}, \text{мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ |
|------------------------|----------------------------------|---|---|---|---|
| PseFDH wt [31] | 7,3 | 65 | 6,5 | 0,11 | 1,12 |
| PseFDH GAV [31] | 7,3 | 35,2 | 6,0 | 0,21 | 1,22 |
| PseFDH Sm4s [30] | 7,3 | 41,4 | 13,2 | 0,18 | 2,28 |
| PseFDH SM44A M3 [33] | 7,6 | 22 | 1,2 | 0,34 | 6,33 |
| CboFDH wt [27, 28] | 4,2 | 45 | 5,9 | 0,09 | 0,71 |
| CboFDH C23S [27, 28] | 3,7 | 44 | 6 | 0,08 | 0,62 |
| CboFDH C23S/F285S [28] | 6,1 | 73 | 14 | 0,08 | 0,44 |
| CboFDH C23S/F285Y [28] | 3,7 | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. |
| OraFDH wt [55, 56] | 4,5 | 12,7 | 1,6 | 0,30 | 2,8 |
| SceFDH wt [73] | 6,5 | 36 | 5,5 | 0,18 | 1,18 |
| AthFDH wt [31] | 3,8 | 50 | 2,8 | 0,08 | 1,36 |
| SoyFDH wt [57, 58] | 2,9 | 13,3 | 1,5 | 0,22 | 1,93 |
| SoyFDH F290A [57, 58] | 3,8 | 8,6 | 1,1 | 0,44 | 3,45 |
| SoyFDH F290E [57, 58] | 4,7 | 13,7 | 2,9 | 0,34 | 1,62 |
| SoyFDH F290D [57, 58] | 5,1 | 12,8 | 5,0 | 0,40 | 1,02 |
| SauFDH wt [60] | 20 | 252 | 130 | 0,08 | 0,15 |
| SauFDH wt* [60] | 27 | 143 | нд | 0,19 | нд |
| SauFDH F194V | 16 | 57 | 67 | 0,28 | 0,24 |
| SauFDH F194V* | 17 | 31 | 50 | 0,55 | 0,34 |
| RjoFDH wt (22 °С) [18] | 14** | 98 | 7.2 | 0,10 | 2,0 |

П р и м е ч а н и е. н.д. – нет данных.

*Комплексный буфер 0,1 М NaPB–цитрат–Tris–Gly.

**Значение $k_{\text{кат.}}$ рассчитано на основании величины удельной активности 19,9 ед./мг белка [18].

отметим, что мы представили каталитические параметры для наиболее важных FDH или ферментов, которые наглядно демонстрируют отличительные особенности FDH из разных источников. Среди природных ферментов наиболее низкие значения K_{M} имеют некоторые ферменты из растений. Особо отметим FDH из бобов сои *Glycine max* (SoyFDH), которая среди природных формиатдегидрогеназ имеет самые низкие значения константы Михаэлиса по обоим субстратам. Однако растительные FDH с «хорошими» K_{M} (как природные, так и полученные с помощью технологии рекомбинантных ДНК) имеют заметно меньшее значение каталитической константы

по сравнению с дрожжевыми и особенно с бактериальными ферментами. Среди приведенных в табл. 3 формиатдегидрогеназ следует обратить внимание на фермент из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1. В работе [54] описано клонирование гена и получение препарата OraFDH с 6 остатками His на С-конце (OraFDH_H6C). Такая конструкция оказалась неудачной, поскольку клонированная в нашей лаборатории OraFDH без дополнительных остатков His имела значение $k_{\text{кат.}}$ равно 4,5 с^{-1} по сравнению с 2,3 с^{-1} у OraFDH_H6C, а значение K_{M} по NAD^+ было почти в 7 раз меньше (12,7 и 83 мкМ для OraFDH и OraFDH_H6C соответственно) [55, 56]. Срав-

нимые с OpaFDH значения K_M имеет SoyFDH, однако у нее меньшая величина $k_{кат.}$, которая равна $2,9 \text{ с}^{-1}$ (табл. 3).

Были проведены различные эксперименты по улучшению каталитических свойств FDH. Для этого использовали как подход, основанный на рациональном дизайне, так и получение улучшенных мутантов с помощью направленной эволюции. В результате анализа трехмерных структур FDH из разных источников нами было обнаружено структурно эквивалентное положение остатка, который несмотря на то, что был расположен на поверхности кофермент-связывающего домена, был гидрофобным (Phe или Tyr) [30]. В PseFDH, CboFDH, OpaFDH и SoyFDH это соответственно остатки Phe311, Phe285, Tyr286 и Phe290. Оказалось, что замена в этом положении влияет как на каталитические параметры, так и на термостабильность. Наилучшие результаты были получены в случае SoyFDH [57, 58]. Показано, что замены F290D и F290E не влияют на величину K_M по NAD^+ , но повышают значения $k_{кат.}$ с $2,9$ до $5,1$ и $4,7 \text{ с}^{-1}$ соответственно. Замена в SoyFDH F290S уменьшала значение K_M по коферменту на 30% ($9,8 \text{ мкМ}$) и повышала $k_{кат.}$ на 40% ($4,1 \text{ с}^{-1}$). Наибольшее увеличение $k_{кат.}$ (с $3,7$ до $6,1 \text{ с}^{-1}$) было достигнуто у мутанта CboFDH C23S/F285S, полученного с помощью метода направленной эволюции [28]. Однако такие замены приводили к тому, что K_M по NAD^+ по сравнению с исходной CboFDH возросла с 45 до 74 мкМ . Тем не менее, даже бактериальные FDH дикого типа имеют более высокое значение $k_{кат.}$, чем лучшие варианты формиатдегидрогеназ из эукариот (табл. 3). Поэтому эксперименты по рациональному дизайну PseFDH были направлены на улучшение значений K_M . Улучшение этого параметра по обоим субстратам было достигнуто сначала за счет замены A198G [59]. Дальнейшее улучшение параметров было получено после второй замены C145A [33]. В результате многоточечный мутант PseFDH SM4A M3 с этими двумя заменами (остальные мутации повышали термостабильность, см. ниже) имеет величину $k_{кат.}$, равную $7,6 \text{ с}^{-1}$, а значения K_M по NAD^+ и формиату составляют 22 мкМ и $1,2 \text{ мМ}$ соответственно [33].

На сегодняшний момент вариант мутантной PseFDH SM4A M3 является наиболее эффективным биокатализатором среди описанных в литературе формиатдегидрогеназ [33]. Тем не менее, увеличения с помощью белковой инженерии удельной активности известных FDH выше

$10\text{--}11 \text{ ед./мг}$ белка достичь не удалось. В 2020 г. появилась публикация о новой FDH с удельной активностью $19,9 \text{ ед./мг}$ белка [18]. Это формиатдегидрогеназа из бактерий *Rhodococcus jostii* (RjoFDH) [18]. Вышеуказанное значение удельной активности RjoFDH ($19,9 \text{ ед./мг}$ белка) было получено при $22 \text{ }^\circ\text{C}$, т.е. при температуре $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (наиболее часто такая температура используется при определении активности большинства FDH). Следует ожидать, что удельная активность RjoFDH будет выше на $40\text{--}60\%$ (расчет основан на данных по изменению активности от температуры для PseFDH). RjoFDH имеет довольно высокое значение K_M по коферменту – 98 мкМ , что намного хуже наилучших значений ($8\text{--}22 \text{ мкМ}$, табл. 3). В результате каталитическая эффективность RjoFDH по NAD^+ фактически находится на одном уровне с другими формиатдегидрогеназами (табл. 3). Поскольку на практике для регенерации NADH принято использовать концентрацию кофермента в области K_M , то в случае RjoFDH рабочая концентрация кофермента должна быть в $5\text{--}10$ раз выше, чем у FDH с $K_M = 10\text{--}20 \text{ мкМ}$. Несомненно, с научной точки зрения очень интересно выяснить причины более высокой активности RjoFDH по сравнению с большинством FDH. RjoFDH по аминокислотной последовательности с другими наиболее известными бактериальными FDH (в том числе и с PseFDH) имеет гомологию $84\text{--}86\%$ [18], а последовательности консервативных участков активного центра полностью идентичны таковым у PseFDH (рис. 1). К сожалению, новых публикаций по свойствам RjoFDH за $2,5$ года не появилось.

Последовательность FDH из *Staphylococcus aureus* (SauFDH) была собрана нами из отдельных фрагментов, которые были в базах данных более 20 лет назад. Фермент привлек наше внимание тем, что имел очень низкую гомологию по первичной структуре (всего 40%) с другими бактериальными FDH [31] (рис. 1). Эволюционно SauFDH среди бактериальных формиатдегидрогеназ представляет совершенно отдельную ветвь (рис. 2). Из рис. 2 хорошо видно, что отделение SauFDH от других FDH произошло на самой ранней стадии эволюции. Высказывается предположение, что SauFDH могла произойти совершенно от другого предшественника и поэтому у нее по сравнению с остальными бактериальными формиатдегидрогеназами вдвое более высокая удельная активность и намного худшие (в $10\text{--}20$ раз) значения константы Михаэлиса по обоим суб-

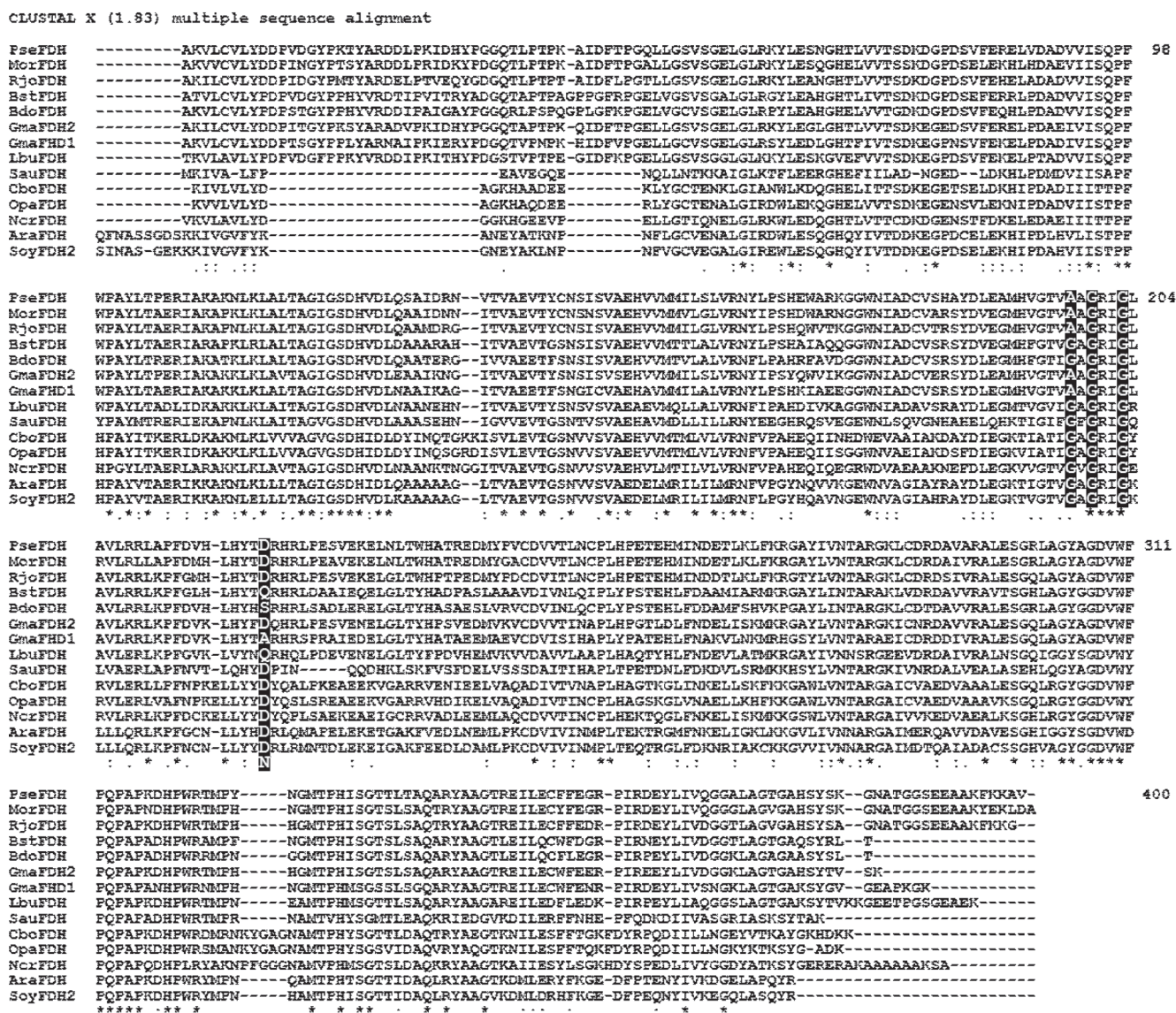


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей фермента дегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp.101, *Moraxella* sp.C1, *Rhodococcus jostii*, *Burkholderia stabilis* 15516, *Burkholderia dolosa* PC543, *Granulicella mallensis* MP5ACTX8, *Lactobacillus buchneri*, *Staphylococcus aureus*, дрожжей *Candida boidinii*, *Ogataea parapolymorpha* DL1, низших грибов *Neurospora crassa* и высших растений *Arabidopsis thaliana*, соя *Glycine max*)

стратам (табл. 3). Было показано, что подбор состава буфера может повысить величину $k_{кат}$ с 20 до 27 с⁻¹ и снизить значение K_M по NAD⁺ с 220 до 143 мкМ [60]. Нами была определена структура остатка (PDB 6ТТВ), и на основе анализа полученной структуры были выбраны наиболее перспективные положения для аминокислотных замен. В результате были получены различные мутанты PseFDH, которые имели вдвое меньшие значения K_M по формату (57 вместо 130 мМ) и в 7 раз более низкое значение K_M по NAD⁺ (31 мкМ).

Повышение температурной и операционной стабильности

Основной причиной инактивации FDH являются окисление остатков Cys. В каждой субъединице CboFDH имеется по два остатка в положениях 23 и 262. Оба остатка расположены вне активного центра. Двойная замена C23S/C262A позволила снизить скорость инактивации фермента ионами Cu²⁺ при 25 °C в 5 раз [27, 28]. В то же время эти замены снизили термостабильность мутантной CboFDH. Температура, при которой фермент терял 50%

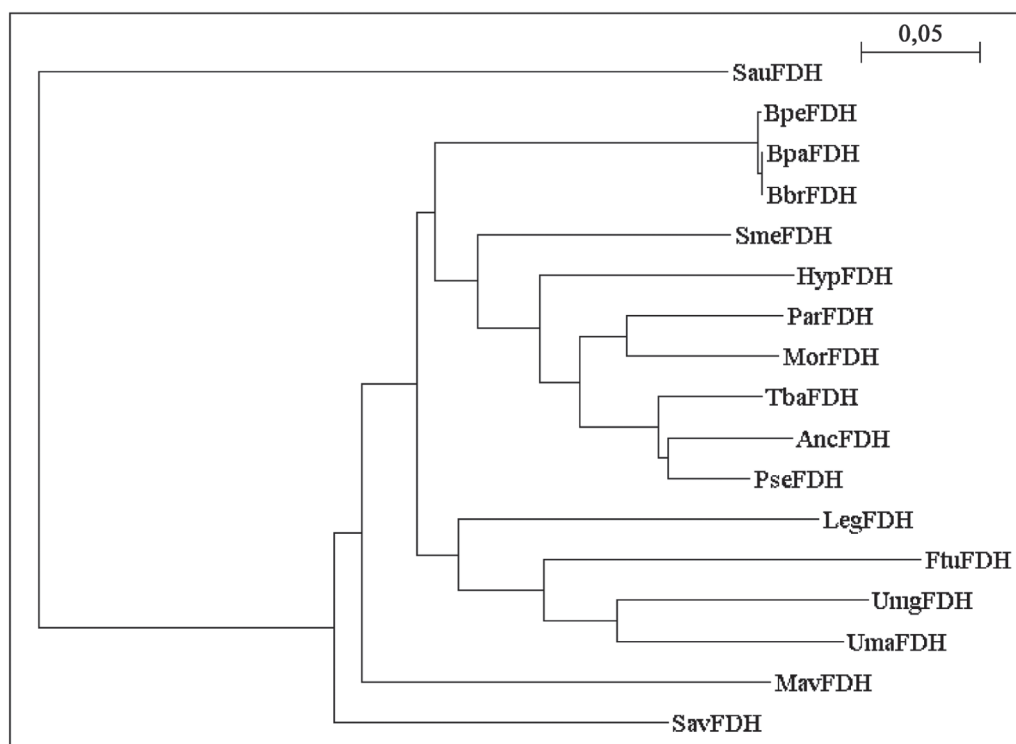


Рис. 2. Эволюционное дерево некоторых бактериальных форматдегидрогеназ: *Staphylococcus aureus*, *Bordetella pertussis* strain Tohama I, *Bordetella parapertussis* strain 12822, *Bordetella bronchiseptica* RB50, *Sinorhizobium meliloti*, *Hyphomicrobium* strain JT-17, *Paracoccus denitrificans* PD1222, *Moraxella* sp.C1, *Thiobacillus* sp. KNK65MA, *Ancylobacter aquaticus* *Pseudomonas* sp.101, *Legionella pneumophila* str. Lens, *Francisella tularensis* subsp. novicida U112, Uncultured marine gamma proteobacterium EBAC20E09, Uncultured marine alpha proteobacterium HOT2C01, *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis str. k10, *Streptomyces avermitis*

активности, за 20 мин снизилась с 57 до 48 °С, причем замена C23S давала в дестабилизацию немного больший вклад, чем замена C262QA (температура снижалась на 5 и 4 градуса соответственно). Для компенсации потери термостабильности в результате замены остатков Cys с помощью метода направленной эволюции были найдены дополнительные замены. Подробное описание влияния отдельных замен на термостабильность CboFDH приведено в работе [28], а количественный анализ сделан в работе [31]. Отметим интересный факт – замена замена в CboFDH F285S увеличивала каталитическую активность, но не влияла на термостабильность, а замена F285Y увеличивала термостабильность, но не влияла на каталитические параметры.

В бактериальных FDH число остатков Cys на субъединицу может достигать 7. Анализ структур апо- и холоформ PseFDH показал, что в кофермент-и формиат-связывающем доменах находятся остатки Cys255 и Cys145 соответственно. Остаток Cys255 в несколько раз более реакционноспособен, чем остаток Cys145.

Поэтому инактивация PseFDH при нормальных условиях происходит в первую очередь именно за счет модификации или окисления сульфгидрильной группы остатка Cys255. В случае FDH из *Mycobacterium vaccae* N10 (MycFDH, отличается от PseFDH всего двумя аминокислотами) для стабилизации фермента была сделана замена C255V [61]. Японские авторы клонировали ген FDH из бактерий *Thiobacillus* sp. KNK65MA (TbaFDH), в которой в этом положении также находится остаток Val [62]. TbaFDH имеет низкую термостабильность – фермент начинает быстро инактивироваться при температуре 40 °С и выше. Это может быть частично связано с наличием в положении 255 остатка, отличного от остатка Cys. Нами было показано, что только замена C255A не влияет на каталитические свойства PseFDH [63, 64], однако константа скорости термоинактивации такого мутанта в 4 раза больше по сравнению с таковой для PseFDH дикого типа.

В работе [63] было также показано, что после замены остатка Cys255, хотя и с меньшей скоростью, но все же происходит полная инактивация PseFDH при инкубации с реагентом Элмана

5,5'-дителибис(2-нитробензоатом), специфично модифицирующим именно SH-группу остатка Cys. Замена C145S позволила полностью исключить инактивацию MucFDH [61] и PseFDH [30], не влияя на каталитические параметры и термостабильность этих ферментов. Позднее в PseFDH была сделана замена C145A, которая не влияла на активность, но уменьшала K_M фермента по формиату в два раза и приводила к дополнительному снижению термостабильности [33]. Для восстановления термостабильности мутантной PseFDH C145A/C255A в фермент были введены дополнительные замены. На данный момент можно констатировать, что финальный вариант мутанта PseFDH SM4A M3 [33] является оптимальным для применения на практике.

Формиатдегидрогеназы в патогенах и растениях являются ферментами стресса. Их биосинтез резко возрастает при негативных воздействиях на клетку. Как правило, стрессовые условия сопровождаются появлением активных форм кислорода в виде пероксида водорода и супероксид-радикала. Поэтому FDH из патогенов и растений имеют минимальное (или совсем не имеют) число остатков Cys [3, 31]. Нами было показано, что бактериальная SauFDH и растительная SoyFDH дикого типа устойчивы к действию пероксида водорода даже немного лучше, чем PseFDH с заменами C14S/C255A [65].

Коферментная специфичность формиатдегидрогеназ

В течение многих лет все выделенные и охарактеризованные FDH были высокоспецифичны к NAD^+ . Только в 2010 г. была описана первая $NADP^+$ -специфичная FDH из бактерий *Burkholderia stabilis* 15516 [66]. Вторым ферментом такого типа был описан в работе [67] в 2011 г. В 2015 и 2018 гг. были охарактеризованы еще три $NADP^+$ -зависимых фермента из бактерий *Granulicella mallensis* MP5ACTX8 (GmaFDH1) [68], *Burkholderia dolosa* PC543 (BdoFDH) [69], *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929 [70]. Вторым ген GmaFDH2 был клонирован в 2020 г. [71]. Мы не будем подробно останавливаться на этих ферментах, поскольку обзор по свойствам природных $NADP^+$ -специфичных FDH был опубликован в 2021 г. [72]. Там можно найти достаточно подробную информацию об экспериментах по белковой инженерии для изменения коферментной специфичности FDH от NAD^+ к

$NADP^+$. Отметим ключевые моменты, которые не нашли отражения в указанном обзоре.

Для количественной оценки специфичности фермента к NAD^+ по отношению к $NADP^+$ используют величину предпочтения кофермента (CP, coenzyme preference), которая представляет собой отношение величины $k_{\text{кат.}}/K_M$ для NAD^+ к такой же величине для $NADP^+$

$$CP = (k_{\text{кат.}}/K_M)^{NAD^+} / (k_{\text{кат.}}/K_M)^{NADP^+}$$

Оказалось, что в зависимости от источника величина CP может отличаться на порядки. Самую низкую коферментную специфичность имеют бактериальные формиатдегидрогеназы. Например, в случае PseFDH значение CP равно 2400 [73]. В случае CboFDH значение CP возрастает более чем в 100 раз ($CP_{\text{CboFDH}} = 300\,000$). Среди изученных FDH наиболее специфичной к NAD^+ является формиатдегидрогеназа из пекарских дрожжей SceFDH, для которой величина CP составляет более 3×10^9 [73]. В случае растительных формиатдегидрогеназ AraFDH и SoyFDH значение CP ближе к таковому для PseFDH (5×10^{-5} и $8,7 \times 10^{-4}$ для AraFDH и SoyFDH соответственно), однако константа связывания $NADP^+$ у растительных ферментов в 20–100 раз лучше, чем у PseFDH дикого типа (>200, 10 и 1 мМ у PseFDH, AraFDH SoyFDH соответственно) [74]. Анализ выравнивания последовательностей FDH в области кофермент-связывающего домена (рис. 1) позволяет сделать вывод, что такая разница в величинах CP между бактериальными и растительными FDH, с одной стороны, и ферментами из дрожжей, с другой стороны, обусловлена разным расстоянием между последним остатком Gly в характеристической последовательности (A/G)xGxxG (“fingerprntint region”, остатки 198–203 в PseFDH) и консервативным остатком Asp, отвечающего за специфичность FDH к NAD^+ (D221 в PseFDH). У дрожжевых FDH это расстояние на один остаток больше (рис. 1).

Первая FDH с измененной коферментной специфичностью от NAD^+ к $NADP^+$ была получена в нашей лаборатории в 1993 г. [75]. В 1996 и 1997 гг. были проведены первые эксперименты, которые показали высокую эффективность мутантной PseFDH T5M9 для регенерации NADPH в реакции получения хирального спирта [76] и в реакции Байера–Виллигера [77]. В 2002 и 2008 гг. были получены $NADP^+$ -специфичные SceFDH [73] и CboFDH [78].

Существенный прогресс в этой области был достигнут в 2013 г., когда получили мутантную MucFDH с кинетическими параметрами для

NADP^+ , сравнимыми с таковыми для NAD^+ у фермента дикого типа [79]. Фактически можно выделить в этой мутантной MusFDH две основные аминокислотные замены – D221Q и A198G, причем последняя является, по мнению авторов, определяющей для достижения высокой эффективности с NADP^+ . То, что для достижения максимального эффекта изменения коферментной специфичности нужна замена Asp/Glu, было показано еще в 2008 г. в экспериментах по инженерии коферментной специфичности CboFDH [78]. Вторая замена A198G в исходной мутантной MusFDH с улучшенной химической стабильностью [61] также оказала положительный эффект. В дальнейшем введение именно этих двух замен стало негласным стандартом для получения NADP^+ -зависимых FDH, однако в случае второй замены это не соответствует действительности, поскольку в качестве исходной авторы использовали MusFDH с заменой C255V [61]. В наших экспериментах высокоэффективная NADP^+ -специфичная мутантная PseFDH была получена на основе фермента, содержащего замену C255A. В этом случае оказалось, что для получения фермента с NADP^+ , обладающего высокими каталитическими характеристиками, достаточно замены D221Q [31, 59], а замена A198G не только не нужна, но даже приводит к ухудшению K_M мутантного фермента по формиату с 35 до 140 мМ. Отметим, что все вводимые нами замены предварительно проверялись с помощью компьютерного моделирования. Сравнение наших модельных структур с экспериментальными структурами NADP^+ -специфичной GmaFDH показало их практически полное совпадение.

Хотелось бы обратить внимание на то, что до сих пор в литературе отсутствует описание экспериментов по расширению pH-оптимума связывания NADP^+ . В случае FDH дикого типа значение K_M по NAD^+ практически постоянно в диапазоне pH 5,5–9,0 [19]. У мутантных NADP^+ -специфичных PseFDH с различными заменами в положении 221 независимо от наличия в них замены A198G значение K_M по NAD^+ также постоянно в диапазоне pH 6,0–9,0, в то время как в случае NADP^+ этот показатель начинает возрастать при pH > 7,5 [31]. Подробно результаты и достижения в области изменения коферментной специфичности FDH будут обсуждены в другом обзоре.

Регенерация NAD(P)H с помощью FDH в процессах тонкого органического синтеза

NAD(P)^+ -зависимые оксидоредуктазы катализируют реакции с образованием хиральных

соединений с очень высокой стереоселективностью. Например, алкогольдегидрогеназа делает всего одну стереохимическую ошибку на 7 млрд (!!!) каталитических циклов [80]. Такой хорошо известный фермент, как лактатдегидрогеназа, немного менее точен – одна ошибка на 7 млн каталитических циклов. Но и этого с огромным запасом хватает, чтобы выполнять требования FDA по оптической чистоте лекарственных препаратов с хиральными центрами. Внедрение на практике процессов хирального синтеза с использованием оксидоредуктаз долго оставалось нереализованным из-за высокой стоимости восстановленного кофермента (особенно NADPH). Идея регенерации образующихся окисленных форм NAD(P)^+ была высказана в пионерской статье [81]. В то же время была опубликована первая статья по получению L-лактата с системой регенерации NADH с помощью формиатдегидрогеназы [82]. Впоследствии было предложено несколько других ферментов для регенерации NADH , однако FDH до сих пор востребована и широко используется на практике в этих целях. Отметим, что процесс получения *трет*-L-лейцина с системой регенерации NADH с помощью CboFDH, запущенный фирмой «Degussa» («Evonik») в 1995 г. [8], до сих пор остается самым крупномасштабным процессом хирального синтеза с использованием отдельных ферментов.

Число опубликованных обзоров по использованию формиатдегидрогеназы и других ферментов в процессах тонкого органического синтеза для осуществления регенерации NAD(P)H исчисляется уже сотнями. FDH используется как индивидуальный биокатализатор, а также коэкспрессируется в клетке со всеми участниками процесса. Таких «основных» ферментов может быть и два, и три, и четыре, и более. Рассмотрение и обсуждение даже одного направления потребует много времени и места. Поэтому просто отметим несколько важных моментов, которые дают формиатдегидрогеназе неоспоримое преимущество.

1. У FDH широкий pH-оптимум активности и стабильности, постоянное значение каталитической константы и константы Михаэлиса по NAD^+ и формиату в диапазоне pH 5,5–10 [19], чего нельзя сказать, например, о глюкозодегидрогеназе и фосфитдегидрогеназе.

2. Равновесие формиатдегидрогеназной реакции сдвинуто в сторону образования NAD(P)H и CO_2 , в результате чего осуществляется термодинамическое давление на общее равновесие системы и позволяет проводить сильно равно-

весные для основной реакции процессы в нужном направлении с выходом целевого продукта до 100%

3. Формиат-ион практически не ингибирует другие ферменты. В настоящее время описан только один такой случай [83].

4. При использовании целых клеток в качестве биокатализаторов экспрессия гена FDH позволяет обеспечить клетке дополнительную энергию, а ингибирование формиатом клеточного дыхания в отсутствие фермента дает дополнительное селективное давление и поддерживает в системе только активные клетки, осуществляющие процесс.

5. Формиат-ион является дешевым субстратом. Его количество, необходимое для обеспечения одного восстановительного эквивалента, по массе в два и три раза меньше, чем в случае фосфита и глюкозы. В случае формиата в системе легко обеспечить его концентрацию до 5 М, в то время как 1 М раствор глюкозы представляет собой вязкий сироп с концентрацией 20%.

6. При использовании в качестве субстрата формиата аммония удаление субстрата и продукта реакции карбоната аммония может быть выполнена легко, быстро и дешево, чего нельзя сказать о глюкозе, глюконовой кислоте, фосфите и фосфате.

7. FDH (как и фосфатдегидрогеназа) является медленным ферментом, Однако это дает преимущество в обеспечении длительной работы биокатализатора. Инактивация даже одной молекулы фермента с высокой активностью сразу скажется на общей величине активности катализатора. С другой стороны, создание высокоэффективной системы экспрессии (40–45% от общего растворимого белка клетки) позволяет получать FDH с себестоимостью 0,01 евроцента за единицу активности и даже менее. Высокая химическая и температурная стабильность позволяет значительно снизить норму потребления катализатора на 1 кг продукта. Наш опыт проведения процессов показал, что лимитирующим фактором всегда была стабильность основного фермента, но не PseFDH. Кроме того, исключительно высокая стабильность PseFDH даже на границе раздела фаз вода – растворитель позволяет легко и эффективно использовать этот фермент в двухфазных системах получения соединений, которые очень плохо растворимы в воде.

Биоаналитическое применение FDH

Формиатдегидрогеназа проявляет абсолютную специфичность к формиат-иону и очень

слабо (часто совсем) не ингибируется большинством биологически активных молекул. Это свойство было использовано фирмой «Boehringer Mannheim» еще более 40 лет назад для разработки и выпуска набора по определению формиата в сложных биологических образцах (в первую очередь, жидких). Однако гораздо более важным и интересным является использование FDH для определения NAD^+ . Соотношение в клетке коферментов NAD^+/NADH и $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ определяет состояние организма. Нарушение соотношения окисленных и восстановленных коферментов может являться признаком начала заболевания. Полученная в нашей лаборатории OraFDH очень хорошо подходит для определения содержания только NAD^+ на фоне NADH , NADP^+ и NADPH . Нами был разработан такой метод определения NAD^+ по флуоресценции образующегося в результате формиатдегидрогеназной реакции восстановленного NADH [84]. Метод не уступал другим методикам по чувствительности и превосходил их по селективности. Он был успешно опробован на экстрактах мозга крыс [84], а потом его применили для определения NAD^+ в крови у пациентов разного возраста в норме, а также при нейро- и кардиозаболеваниях [85]. Результаты достоверно подтвердили связь между концентрацией окисленного кофермента и развитием вышеупомянутых заболеваний.

Формиатдегидрогеназа – новая и перспективная мишень для борьбы с биопленками патогенов

Развитие высокопродуктивных методов геномного секвенирования позволило быстро и эффективно секвенировать геномы различных патогенных микроорганизмов. Аннотация геномов показала, что практически все патогены содержат в своем геноме ген формиатдегидрогеназы. Данные транскриптомного анализа на *Staphylococcus aureus* показали, что при переходе клеток *S. aureus* от планктона к биопленкам уровень биосинтеза SauFDH возрастает более чем в 20 раз [86]. Кроме того, содержание мРНК SauFDH в клетке в этом случае занимает третье место среди всех мРНК [86]. Такое высокое содержание мРНК SauFDH связано с тем, что этот фермент отвечает за снабжение всей клетки энергией в виде NADH , т.е. его присутствие и активность критически важны для выживания патогена в биопленках. Борьба с биопленками *S. aureus* является исключительно важной и актуальной задачей. Во-первых, до сих пор нет метода борьбы с биопленками *S. aureus* в ме-

дицинском оборудовании. Используют щелочные растворы окислителей, что, естественно, сказывается на состоянии шлангов и клапанов оборудования. В настоящее время для решения этой проблемы в США ежегодно тратится более трех миллиардов долларов. Во-вторых, частое заражение *S. aureus* пациентов после операций по трансплантологии. Согласно статистке, каждая 25-я операция по хирургическому лечению суставов сопровождается заражением и в 40% случаев патогенами являются стафилококки. Хорошо известно, что при росте патогенов в виде биопленок традиционные антимикробные препараты работают очень плохо или совсем не эффективны. Это связано с тем, что в биопленках кардинально меняется и сильно замедляется метаболизм. Поэтому наличие критически важного фермента, синтез которого сильно активируется именно в биопленках, позволяет выбрать SauFDH в качестве мишени.

В настоящее время ген SauFDH клонирован и экспрессирован нами в клетках *E. coli* [11]. Была создана высокоэффективная система экспрессии рекомбинантной SauFDH, позволяющая получать даже в качалочных колбах 1 г целевого фермента с 1 л среды. Для компьютерного поиска ингибиторов SauFDH были получены кристаллы апо- и холоформ с разрешением, достаточным для массового скрининга различных соединений с помощью докинга. Фермент был получен в гомогенном состоянии и подробно исследован на активность и стабильность. Нами также были оптимизированы процессы культивирования для получения препаратов SauFDH изотопно меченных дейтерием, ^{13}C и ^{15}N как по отдельности, так и одновременно с эффективностью мечения до 99%. В лаборатории профессора В.И. Польшакова (МГУ имени М.В. Ломоносова) были собраны различные типы спектров ЯМР и проведена их аннотация для определения структуры фермента. Был проведен докинг более 1,5 млн соединений и отобраны кандидатные молекулы, которые в настоящее время проверяются на ингибирующую активность и связывание с ферментом. Было обнаружено, что связывание потенциальных ингибиторов происходит в двух разных центрах.

Важность присутствия в патогенах формиатдегидрогеназы как потенциальной мишени для терапии осознается многими исследователями. Например, часть аминокислотной последовательности FDH из *Francisella tularensis* была предложена в качестве антигена для создания вакцины против туляремии.

Формиатдегидрогеназа как инструмент для создания растений с повышенной устойчивостью к внешним воздействиям

Основная физиологическая роль FDH – снабжение организма энергией в виде NAD(P)H, который необходим клетке для нормального функционирования в норме и особенно для компенсации стрессовых воздействий. В растениях FDH локализована в митохондриях и, как в случае патогенных микроорганизмов, при стрессовых воздействиях уровень фермента достигает 10% от всех митохондриальных белков [87]. Негативные воздействия могут быть самыми разнообразными – от засухи и радиации до атаки патогенными бактериями и грибами. И во всех случаях в ответ происходит резкое увеличение биосинтеза FDH. Подробно о роли FDH в растениях можно прочитать в обзоре [3]. Отметим, что получение в нашей лаборатории мутантных форм FDH из сои *Glycine max* с более высокими значениями каталитической константы и более высокой стабильностью открывает новые возможности для создания растений, более устойчивых к внешним негативным воздействиям. Замена в геноме сои генов природных FDH на гены мутантных ферментов позволит в случае стресса повысить (при использовании стандартных ресурсов клетки на синтез FDH) уровень формиатдегидрогеназной активности на 50% и более, что несомненно даст растениям значительные дополнительные ресурсы для выживания.

Гибридные биокатализаторы с регенерацией NAD(P)H на основе формиатдегидрогеназы

Каким бы активным ни был фермент, у него имеется потолок эффективности, выше которого подняться уже невозможно. Однако следует помнить, что перед тем как произойдет собственно катализ, должен образоваться фермент-субстратный комплекс, а для этого субстраты должны попасть в активный центр, т.е. необходим транспорт субстратов из внешней среды внутрь активного центра. Если в процессе участвуют два фермента и более, а продукт первой реакции является субстратом для второго фермента, то при правильной организации транспорта продукта 1 / субстрата 2 от активного центра фермента 1 до активного центра фермента 2 вероятность увеличения эффективности катализа становится очень высокой. Наиболее простой способ повысить скорость переноса продуктов/субстратов от одного фермента к другому – сблизить и правильно сориентировать активные центры

ферментов, катализирующих сопряженные реакции. Еще во времена развития технологий получения иммобилизованных ферментов неоднократно отмечали факт увеличения эффективности мультиферментного процесса при совместной иммобилизации биокатализаторов на поверхности одной частицы. Развитие методов генетической инженерии позволило создавать гибридные катализаторы, в которых два и более ферментов находятся в одной полипептидной цепи. FDH активно используется для регенерации NAD(P)H в процессах тонкого органического синтеза, т.е. она является частью сопряженного процесса. Поэтому, начиная с 2010 г., стали появляться работы по получению химерных катализаторов, в которых ферменты сопряжены друг с другом за счет нахождения в одной полипептидной цепи [88–99].

При создании гибридных катализаторов необходимо решить как минимум две задачи:

- 1) определить порядок: какой фермент будет в полипептидной цепи первым, а какой вторым;
- 2) выбрать оптимальный тип и длину полилинкера, которым в полипептидной цепи будут связаны ферменты.

При использовании для очистки таких гибридных катализаторов металло-хелатной хроматографии за счет введения на N- или C-конец химерного белка последовательности из 6 остатков His приходится решать и третью задачу – опеределить расположение этой последовательности (His-tag).

Каждая из задач является одинаково важной и ошибка при решении даже одной из этих задач не позволит получить высокоэффективный катализатор. Решение двух первых задач должно обеспечить правильную, наиболее оптимальную взаимную ориентацию активных центров. При решении третьей задачи необходимо ввести His-tag так, чтобы эта последовательность не влияла отрицательно на свойства того фермента, к которому His-tag добавляется.

Рассмотрим решение всех трех задач на примере получения гибридного биокатализатора, в который входят мутантная NADP⁺-специфичная PseFDH и монооксигеназа CYP102A1 BM3 из *Bacillus megaterium* (P450 BM3) [100]. Работа выполнялась совместно с немецкими коллегами из Университета Дюссельдорфа имени Г. Гейне (проф. V. Urlaher), которые являются признанными экспертами в области исследования и применения цитохромов P450. P450 BM3 является

трехдоменной монооксигеназой, в которой каждый домен проявляет свою определенную каталитическую активность, т.е. это уже природный гибридный белок из трех ферментов, объединенных в единую полипептидную цепь длиной в 1200 аминокислотных остатков. Этот фермент активно используется на практике, и для проявления активности ему необходим NADPH. Одна субъединица PseFDH состоит из 400 аминокислотных остатков (рис. 1). Таким образом, финальный химерный катализатор должен был иметь длину как минимум в 1600 остатков. Для выбора оптимальной ориентации в цепи было решено провести моделирование структуры двух возможных вариантов гибридного белка. Однако в базе трехмерных структур белков PDB полная структура P450 BM3 отсутствует, есть только две частичные структуры: в одной находится FAD-содержащий домен, а во второй – два домена с FMN и гемом в активных центрах. Поэтому на первом этапе было построена полноразмерная модельная структура трехдоменного P450 BM3 [101]. На следующем этапе были смоделированы структуры химерного катализатора в ориентации FDH-P450 и наоборот. Данные моделирования показали, что в первой структуре ориентация активных центров PseFDH и NADP⁺-связывающего домена P450 BM3 более предпочтительна, чем в конструкции P450-FDH. В качестве полилинкера был использован гибкий полипептид из остатков Gly и Ser (общая длина 16 остатков). Затем надо было решить, где будет находиться His-tag. Выше мы уже приводили данные, что введение His-tag на C-конец OraFDH приводит к уменьшению величины $k_{\text{кат}}$ на 40% и ухудшению K_M по NAD⁺ почти в 7 раз [54]. Для решения этой задачи были получены конструкции с His-tag на N-конец PseFDH дикого типа и двух вариантов мутантных NADP⁺-специфичного фермента [102]. Оказалось, что во всех трех случаях наличие последовательности His₆ на N-конец PseFDH не влияет ни на каталитические свойства, ни на термостабильность [102].

На финальной стадии для проверки результатов моделирования полноразмерного химерного катализатора были получены генетические конструкции, кодирующие оба варианта в последовательностях His₆-FDH-P450 (FB) и His₆-P450-FDH (BF), причем в каждом случае мутантная NADP⁺-специфичная PseFDH была двух типов. Оба варианта были успешно экспрессированы в клетках *E. coli* в активной и раство-

римой формах, а сами белки были очищены с помощью металло-хелатной хроматографии. Исследование каталитических свойств полученных химер показало, что вариант FDH-P450 был эффективнее варианта P450-FDH, т.е. данные эксперимента полностью подтвердили результаты моделирования. Было показано, что в зависимости от субстрата гибридный катализатор FDH-P450 был до 40 раз более эффективным, чем просто смесь отдельных ферментов. Было также установлено, что в обоих вариантах химерных катализаторов каждый фермент полностью сохраняет свои каталитические свойства. Варьирование типа линкера показало, что замена гибкого полилинкера на жесткий из остатков Pго не оказывала заметного влияния на эффективность. Таким образом, нам удалось получить гибридный катализатор с длиной полипептидной цепи в 1600 остатков, который содержал фактически четыре отдельных каталитических домена. Это одна из самых больших конструкций, полученных для гибридных катализаторов.

Еще одним интересным и важным аспектом при создании «слитых» (fusion) катализаторов, содержащих FDH, является необходимость учитывать факт очень прочного межсубъединичного контакта в FDH. Например, PseFDH не диссоциирует на субъединицы даже в 8 М мочевины. Таким образом, уже изначально необходимо предполагать образование как минимум димера, состоящего из двух полипептидных цепей. Поскольку P450 BM3 также способен образовывать димеры, то при попытке определения олигомерного состава полученных катализаторов оказалось, что они представляют собой тетрамеры, октамеры и более крупные частицы, т.е. эти химерные катализаторы имели молекулярную массу 640, 1280 кД и больше. Абсолютное большинство дегидрогеназ являются олигомерами, и факт образования крупных олигомеров актуален для большинства работ. В самой первой работе по получению химерного фермента на основе MusFDH (очень прочный димер) с кеторедуктазой (тетрамер, диссоциирует на димеры) были зафиксированы димеры, тетрамеры и октамеры. Авторы показали, что FDH сохраняет активность только в ориентации FDH-KR [88]. При обратном порядке ферментов в полипептидной цепи MusFDH была полностью неактивна. Следует также отметить, что примерно половина работ по созданию химерных катализаторов не привела к увеличению каталитической эффективности по сравнению со смесью отдельных ферментов.

В нашей лаборатории совместно с итальянскими коллегами из Милана (проф. F. Secundo) также были получены гибридные ферменты, содержащие NADP⁺-специфичную PseFDH и фенолацетонмонооксигеназу из *Thermobifida fusca* (PAMO), которая является мономером. Оказалось, что оптимальной является также конструкция His₆-FDH-PAMO и гибридный катализатор находится только в форме димера. При изучении влияния введения His-tag на N-конец PAMO оказалось, что введение последовательности His₆ в это положение приводит к увеличению уровня экспрессии в 3–4 раза и повышению термостабильности в 2 раза [103].

Фиксация атмосферного CO₂ с помощью формиатдегидрогеназы

Разработка высокоэффективных процессов фиксации CO₂ из атмосферы является одним из самых известных направлений современной «зеленой» химии. Однако представляется весьма вероятным, что эта проблема слишком раскрычена и не так серьезна и опасна, как ее представляют в СМИ. В истории нашей планеты были периоды, когда содержание углекислого газа в атмосфере был не менее чем в 2 раза больше нынешнего и средняя температура также была на несколько градусов выше, чем сейчас. Однако это не мешало расти на планете хвойным лесам, перед которыми тайга является бледной тенью, а по планете бродило (а в океанах плавало) множество существ в несколько метров ростом и весом более 10 т. Климатические колебания являются естественным процессом и происходят постоянно. Еще недавно всю обсуждали проблему обмеления Каспийского моря и предлагали повернуть сибирские реки на юг. А сейчас уровень Каспия неуклонно повышается и существенная часть побережья, доступная еще 20 лет назад, постепенно уходит под воду. Здесь также можно вспомнить о парадоксе поколений. В начале XX в. первый лауреат Нобелевской премии по химии Сванте Аррениус, основатель науки о круговороте углерода в природе, предлагал повысить температуру на Земле за счет дополнительного сжигания леса и нефти, а в начале XXI в. его прапраправнучка Грета Тунберг борется за совершенно противоположное.

Тем не менее, проблема высокоэффективной фиксации CO₂ сама по себе является интересной научной задачей и результаты ее решения могут быть использованы в промышленности.

Биокатализ характеризуется высокой селективностью и эффективностью. Поэтому совсем не удивительно, что для решения проблемы фиксации углекислого газа стали использовать ферменты, которые участвуют в круговороте CO_2 в природе. Одним из таких ферментов является формиатдегидрогеназа. Первая работа по фиксации CO_2 с помощью формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas oxalaticus* была опубликована еще в 1976 г. [104]. Как уже отмечалось в начале обзора, равновесие реакции окисления формиата до CO_2 сдвинуто как раз в сторону образования последнего. Для проведения обратного процесса надо решить две проблемы:

- 1) найти способ активации достаточно стабильной и инертной молекулы;
- 2) найти достаточно дешевый источник энергии для восстановления CO_2 .

В разделе «Введение» уже было сказано, что, семейство формиатдегидрогеназ очень разнообразно и среди них имеются ферменты с различными простетическими группами в активном центре (молибдоптерины, производные вольфрама, железо-серные кластеры и просто остатки селеноцистеина (такая формиатдегидрогеназа есть в *E. coli*)). Все вышеуказанные формиатдегидрогеназы должны гораздо легче и быстрее активировать молекулу CO_2 , чем FDH, рассмотренные в настоящем обзоре. В 2022 г. было описано клонирование и изучение свойств изофермента NADP^+ -специфичной формиатдегидрогеназы FDH3 из архей *Thermococcus onnurineus* [105]. Эта формиатдегидрогеназа является гетеротетрамером, содержащим в отдельных субъединицах ион вольфрама, железосерные кластеры и другие простетические группы. TopFDH3 имеет самую высокую каталитическую эффективность в реакции окисления формиата ($5281 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) с NADP^+ в качестве акцептора. Активность этого фермента в обратной реакции восстановления CO_2 составляет 1 ед./мг, что также существенно выше, чем у формиатдегидрогеназ типа FDH. Тем не менее, большинство исследователей почему-то предпочитают использовать именно эти ферменты, и число публикаций по фиксации углекислого газа с использованием FDH составляет десятки (если не сотни) в год. Для понимания проблемы можно найти множество обзоров на эту тему (некоторые обзоры, наиболее интересные, с нашей точки зрения, представлены здесь) [106–121]. В качестве источников энергии некоторые авторы предлагают использовать элект-

ричество, однако для фиксации углекислого газа в заявляемых объемах электричества надо очень много, а оно в современных условиях совсем не дешево, и почему-то мало кто вспоминает, что для этого нужна вода, а проблема чистых источников воды в ближайшем будущем должна стать даже более важной, чем энергетическая. С нашей точки зрения, в качестве источника энергии более правильно использовать солнечную энергию, а ее преобразование осуществлять с помощью специальных фотоактивных частиц. Еще менее обсуждаемой проблемой является создание условий для быстрого взаимопревращения CO_2 в бикарбонат и обратно. В обычных условиях установление равновесия занимает до 15–20 с, что неприемлемо для конверсии тысяч и десятков тысяч тонн CO_2 . В этом плане совершенно уместным является введение в систему фермента карбоангидразы, которая и катализирует установление равновесия в нашем организме при дыхании. Вторым источником энергии в дополнение к солнечному свету может стать биогенный метан, который образуется в большом количестве в результате жизнедеятельности животных.

В заключение этого раздела хотелось бы напомнить о давно проверенном процессе фотосинтеза, который используется природой миллионы лет. В Бразилии уже много лет на транспорте используют топливо, в котором не менее 80% биоэтанола, получаемого из сахарного тростника. В стране на законодательном уровне категорически запрещено для перегонки использовать нефть и газ, а также электричество. Проблема элементарно решается выращиванием эвкалиптов, которые в условиях Бразилии за два года вырастают до 5–7 м высотой.

Формиатдегидрогеназы в неводных средах

В настоящем обзоре мы не обсуждали способность формиатдегидрогеназ к регенерации NAD(P)H в неводных средах, хотя это очень интересная и перспективная область, поскольку многие соединения, оказывающие сильный биологический эффект, очень плохо растворимы в воде. Это было хорошо видно при поиске и предварительном тестировании перспективных ингибиторов SauFDH. Поэтому исследование FDH в неводных средах должно получить большое развитие. Отдельно стоит отметить использование в качестве растворителей ионные жидкости, которые хорошо смешиваются с водой и способны растворять неполярные соединения. К сожалению, в настоящее время данных по

этой теме крайне мало. Тем не менее, предварительные эксперименты показали, что в гомогенных смесях вода – органический растворитель в случае PseFDH в несколько раз уменьшается константа Михаэлис по формиату, а активность возрастает на 20–25% [122]. Также были получены предварительные данные о том, что в ионных жидкостях различные FDH ведут себя иначе, чем в воде [123].

Заключение

В настоящем обзоре мы попытались продемонстрировать, как развитие науки и техники приводит к тому, что один и тот же объект, став вроде бы привычным и традиционным, находит все новые и новые области применения. И здесь особо хочется отметить интуицию и по-

нимание тенденций развития науки и общества сотрудников кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, которые еще 50 лет назад выбрали формиатдегидрогеназу в качестве объекта исследований. С нашей точки зрения, активное развитие получают области по исследованию и применению формиатдегидрогеназ для борьбы с патогенами, повышению потенциала сопротивляемости и выживаемости растений без их генной модификации и использования дополнительных препаратов. Несмотря на несколько скептический тон в разделе по фиксации CO₂ из воздуха с помощью формиатдегидрогеназ, работы в этой области обязательно будут развиваться, но конечная цель этих работ может стать несколько иной, чем просто снижение содержания CO₂ в атмосфере.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Thunberg T. // Arch. Physiol. Biochem. 1921. Vol. 18. P. 601.
- Davison, D.C. // Biochem. J. 1951. Vol. 49. P. 520.
- Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2011. Vol. 3. N 4 (11). P. 38 (DOI: <https://doi.org/10.32607/20758251-2011-3-4-38-54>).
- Johnson P.A., Jones-Mortimer M.C., Quayle J.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1964. Vol. 89. P. 351 (DOI: 10.1016/0926-6569(64)90225-1).
- Höpner, T., Trautwein, A. // Z. Naturforsch. B. 1972. Vol. 27. N. 9. P. 1075 (Doi: 10.1515/znb-1972-0923).
- Schute H., Flossdorf J., Sahn H., Kula M.R. // Eur. J. Biochem. 1976. Vol. 62. P. 151 (DOI: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb10108.x).
- Hou C.T., Patel R.N., Laskin A.I., Barnabe N. // Arch. Biochem. Biophys. 1982. Vol. 216. P. 296 (DOI: 10.1016/0003-9861(82)90214-4).
- Bommarius A.S., Schwarm M., Stingl K., Kottenhahn M., Huthmacher K., Drauz K. // Tetrahedron-Asymmetry. 1995. Vol. 6. P. 2851.
- Egorov A.M., Avilova T.V., Dikov M.M., Popov V.O., Rodionov Y.V., Berezin I.V. // Eur. J. Biochem. 1979. Vol. 99. P. 569.
- Avilova T.V., Egorova O.A., Ioanesyan L.S., Egorov A.M. // Eur. J. Biochem. 1985. Vol. 152. P. 657 (DOI: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb09245.x).
- Pometun A.A., Boyko K.M., Yurchenko T.S., Nikolaeva A.Yu., Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov V.I. // Biochemistry (Moscow). 2020. Vol. 85. N 6. P. 689 (DOI: 10.1134/S0006297920060061).
- Pometun A.A., Kleymenov S.Yu., Zarubina S.A., Kargov I.S., Parshin P.D., Sadykhov E.G., Savin S.S., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. Vol. 73. N 2. P. 80 (DOI: 10.3103/S002713141802013X).
- Tishkov V.I., Popov V.O., Egorov A.M. // Bioorg. Khimia. USSR. 1982. Vol. 8. N 10. P. 1327 (Rus).
- Tishkov V.I., Kulikov N.S., Egorov A.M. // Bioorg. Khimia (USSR). 1982. Vol. 8. N 1. P. 80 (Rus).
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // Biochimie. 1989. Vol. 71. P. 551.
- Blanchard J.S., Cleland W.W. // Biochemistry. 1980. Vol. 19. P. 3543 (DOI: 10.1021/bi00556a020).
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // Biochemistry (Moscow). 1989. Vol. 54. P. 299 (Rus).
- Boldt A., Ansorge-Schumacher M.B. // Adv. Synth. Catal. 2020. Vol. 362. P. 4109.
- Mesentzev A.V., Lamzin V.S., Tishkov V.I., Ustinnikova T.B., Popov V.O. // Biochem. J. 1997. Vol. 321. N 2. P. 475 (DOI: 10.1042/bj3210475).
- Vinals C., Depiereux E., Feytmans E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. Vol. 192. P. 182.
- Tishkov V.I., Popov V.O. // Biochemistry (Moscow). 2004. Vol. 69. N 11. P. 1252 (DOI: 10.1007/s10541-005-0071-x).
- Tishkov V.I., Matorin A.D., Rojkova A.M., Fedorchuk V.V., Savitsky A.P., Dementieva L.A., Lamzin V.S., Mesentzev A.V., Popov V.O. // FEBS Letters, 1996. Vol. 390. N1. P. 104 (DOI: 10.1016/0014-5793(96)00641-2).
- Weuster-Botz D., Paschold H., Striegel B., Gieren H., Kula M.-R., Wandrey C. // Chem. Eng. Technol. 1994. Vol. 17. P. 131.
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Fedorchuk V.V., Savitsky P.A., Rojkova A.M., Gieren H., Kula M.-R. // Biotechnol. Bioeng. 1999. Vol. 64. N 2. P. 187 (DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990720)64:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-0).
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // Dokl. USSR Acad. Sci. 1991. Vol. 317. N 3. P. 745. PMID: 1954846.
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Tsy-

- gankov Y.D., Egorov A.M. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1993. Vol. 18. P. 201 (DOI: 10.1111/j.1470-8744.1993.tb00266.x).
27. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. P. 1280 (DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01123.x).
28. Felber S., 2001. Optimierung der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse. Ph.D. Thesis. Heinrich-Heine University of Duesseldorf. URL: <http://diss.ub.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/file?dissid=78>.
29. Klyushnichenko V., Tishkov V., Kula M.-R. // *J. Biotechnol.* 1997. Vol. 58. N 3. P. 187.
30. Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Klyemenov S.Yu., Savin S.S. // *Biochemistry (Moscow)*. 2015. Vol. 80. N 13. P. 1690 (DOI: 10.1134/S000629791513005).
31. Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. Vol. 23. N 2–3. P. 89 (DOI: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003).
32. Pometun A.A., Parshin P. D., Galanicheva N.P., Shaposhnikov L.A., Atroshenko D.L., Pometun E.V., Burmakin V.V., Klyemenov S.Yu., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Acta Naturae*. 2022. Vol. 14. N 1 (52). P. 82 (DOI: 10.32607/actanaturae.11665).
33. Pometun A.A., Shirokova A.A., Galanicheva N.P., Shaposhnikov L.A., Atroshenko D.L., Pometun E.V., Tishkov V.I., Savin S.S. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2023. Vol. 78. N 1. P. 20 (DOI: 10.3103/S0027131423010042).
34. Reichert U., Knieps E., Slusarczyk H., Kula M.R., Thommes J. // *J. Biochem. Biophys. Meth.* 2001. Vol. 49. P. 533-552 (DOI: S0165022X01002184 [pii];10.1016/s0165-022x(01)00218-4).
35. Akinterinwa O., Khankal R., Cirino P.C. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008. Vol. 19. P. 461.
36. Jaroensuk J., Intasian P., Kiattisewee C., Munkajohnpon P., Chunthaboon P., Buttranon S., Trisrivirat D., Wongnate T., Maenpuen S., Tinikul R., Chaiyen P. // *J. Biol. Chem.* 2019. Vol. 294. P. 11536.
37. Balzer G.J., Thakker C., Bennett G.N., San K.Y. // *Metab. Eng.* 2013. Vol. 20. P. 1.
38. Berrios-Rivera S.J., Bennett G.N., San K.Y. // *Metab. Eng.* 2002. Vol. 4. P. 230.
39. Berrios-Rivera S.J., Bennett G.N., San K.Y. // *Metab. Eng.* 2002. Vol. 4. P. 217.
40. Eixelsberger T., Woodley J.M., Nidetzky B., Kratzer R. // *Biotechnol. Bioeng.* 2013. Vol. 110. P. 2311.
41. Kaup B., Bringer-Meyer S., Sahm H. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. Vol. 64. P. 333.
42. Klatte S., Lorenz E., Wendisch V.F. // *Bioengineered*. 2014. Vol. 5. P. 56.
43. Litsanov B., Brocker M., Bott M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. Vol. 78. P. 3325.
44. Ma Z., Shentu X., Bian Y., Yu X. // *J. Basic Microbiol.* 2013. Vol. 53. P. 348.
45. Nielsen D.R., Leonard E., Yoon S.H., Tseng H.C., Yuan C., Prather K.L. // *Metab. Eng.* 2009. Vol. 11. P. 262.
46. Schroer K., Peter L.K., Stefan H.F., Glieder A., Pscheidt B. // *Metab. Eng.* 2010. Vol. 12. P. 8.
47. Sung C., Jung E., Choi K.Y., Bae J.H., Kim M., Kim J., Kim E.J., Kim P.I., Kim B.G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99. P. 6667.
48. Tran K.T., Maeda T., Wood T.K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 98. P. 4757.
49. Turlin J., Dronsella B., De Maria A., Lindner S.N., Nikel P.I. // *Metab. Eng.* 2022. Vol. 74. P. 191.
50. Yang T., Rao Z., Hu G., Zhang X., Liu M., Dai Y., Xu M., Xu Z., Yang S.T. // *Biotechnol. Biofuels*. 2015. Vol. 8. Art. 129.
51. Zhu Y., Li H., Liu P., Yang J., Zhang X., Sun Y. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 42. P. 661.
52. Kim S., Lindner S.N., Aslan S., Yishai O., Wenk S., Schann K., Bar-Even A. // *Nat. Chem. Biol.* 2020. Vol. 16. P. 538.
53. Keller P., Reiter M.A., Kiefer P., Gassler T., Hemmerle L., Christen P., Noor E., Vorholt J.A. // *Nat. Commun.* 2022. Vol. 13. Art. 5243.
54. Yu S.H., Zhu L.J., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W.M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 98. P. 1621.
55. Zarubina S., Pometun A., Klyemenov S., Savin S., Tishkov V. // *FEBS Open Bio*. 2018. Vol. 8. S1. P. 186 (DOI: 10.1002/2211-5463.12453).
56. Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Shelomov M.D., Kovalevski R.P., Boiko K.M., Eldarov M.A., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Savin S.S. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2018. Vol. 73. N 2. P. 1–6 (DOI: 10.3103/S0027131418020153).
57. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Savin S.S., Klyemenov S.Yu., Tishkov V.I. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2012. Vol. 25. N 11. P. 781 (DOI: 10.1093/protein/gzs084).
58. Kargov I.S., Klyemenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I., Alekseeva A.A. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2015. Vol. 28. N 6. P. 171 (DOI: 10.1093/protein/gzv007).
59. Alekseeva A.A., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Sadykhov E.G., Matorin A.D., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Acta Naturae*. 2015. Vol. 7. N 1 (24). P. 60.
60. Iurchenko T.S., Bolotova S.B., Loginova A.A., Pometun E.V., Savin S.S., Pometun A.A., Tishkov V.I. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2022. Vol. 77. N 6. P. 330 (DOI: 10.3103/S002713142206007461).
61. Yamamoto H., Mitsuhashi K., Kimoto N., Kobayashi Y., Esaki N. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. Vol. 67. N 1. P. 33.
62. Nanba H., Takaoka Y., Hasegawa J. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003. Vol. 67. P. 2145.
63. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Egorova O.A., Sheluho D.V., Kulakova L.B., Dementieva L.A., Egorov A.M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. Vol. 192. N 2. P. 976 (DOI: 10.1006/bbrc.1993.1511).
64. Odintseva E.R., Popova A.S., Rojkova A.M., Tishkov V.I. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2002. Vol. 43. N 6. P. 356 (Rus).
65. Savin S.S., Tishkov V.I. // *Acta Naturae*. 2010. Vol. 2. № 1 (4). P. 97 (DOI: 10.32607/20758251-2010-2-1-97-101).
66. Hatrongjit R., Packdibamrung K. // *Enz. Microb. Technol.* 2010. Vol. 46. P. 557.
67. Ding H.T., Liu D.F., Li Z.L., Du Y.Q., Xu X.H., Zhao Y.H. // *J. Appl. Microbiol.* 2011. Vol. 111. P. 1075 (DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05124.x).

68. Fogal S., Beneventi E., Cendron L., Bergantino E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99. P. 9541-9554 (DOI: 10.1007/s00253-015-6695-x).
69. Ipdagtas S., Celik A., Ertan F., Binay B. // *Eng. Life Sci.* 2018. Vol. 18. P. 893.
70. Alpdagtas S., Yucel S., Kapkac H. A., Liu S., Binay B. // *Biotechnol. Lett.* 2018. Vol. 40. P. 1135 (DOI: 10.1007/s10529-018-2568-6).
71. Robescu M.S., Rubini R., Beneventi E., Tavanti M., Lonigro C., Zito F., Filippini F., Cendron L., Bergantino E. // *Chem. Cat. Chem.* 2020. Vol. 12. P. 2478.
72. Alpdagtas S., Binay B. // *Biocatalysis Biotransformation.* 2021. Vol. 39. P. 260.
73. Serov A.E., Popova A.S., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // *Biochem. J.* 2002. Vol. 367. Pt. 3. P. 841.
74. Sadykhov E.G., Serov A.E., Yasnyi I.E., Voinova N.S., Alexeeva A.A., Petrov A.S., Tishkov V.I. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2006. Vol. 47. N 1. P. 20.
75. Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. Recombinant NAD⁺-dependent formate dehydrogenase: new properties for biotechnology application. Materials of Intern.Conference "Enzyme Engineering XII", Deu Ville, France 1993.
76. Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula M.-R., Tishkov V.I., Egorov A.M., Wandrey C., Kragl U. // *Tetrahedron Lett.* 1996. Vol. 37. N 9. P. 1377.
77. Rissom S., Schwarz-Linek U., Vogel M., Tishkov V.I., Kragl U. // *Tetrahedron: Assymetry.* 1997. Vol. 8. N 15. P. 2523.
78. Andreadeli A., Platis D., Tishkov V., Popov V., Labrou N.E. // *FEBS Journal.* 2008. Vol. 275. N 15. P. 3859.
79. Hoelsch K., Suhrer I., Heusel M., Weuster-Botz D. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97. P. 2473.
80. Weinhold E.G., Glasfeld A., Ellington A.D., Benner S.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 88. P. 8420.
81. Wichmann R., Wandrey C., Buckmann A. F., Kula M.R. // *Biotechnol. Bioeng.* 1981. Vol. XXIII. N 12. P. 2789.
82. Shaked Z., Whitesides G. M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1980. Vol. 102. N 23. P. 7104.
83. Neuhauser W., Steininger M., Haltrich D., Kulbe K.D., Nidetzky B. // *Biotechnol. Bioeng.* 1998. Vol. 60. P. 277.
84. Artiukhov A.V., Pometun A.A., Zubanova S.A., Tishkov V.I., Bunik V.I. // *Anal. Biochem.* 2020. Vol. 603. Art. 113797 (DOI: 10.1016/j.ab.2020.113797).
85. Balashova N.V., Zavileyskiy L., Artiukhov A., Shaposhnikov L.A., Sidorova O.P., Tishkov V.I., Tramonti A., Pometun A.A., Bunik V.I. // *Front. Medic.* 2022. Vol. 9. P. 886485.
86. Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., Gotz, F. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. Vol. 71. P. 2663.
87. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Darpas A., Sallantin M., Huet J.-C., Pernollet J.-C., Remy R. // *Plant Physiol.* 1992. Vol. 98. P. 273.
88. Holsch K., Weuster-Botz D. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2010. Vol. 56. P. 131 (DOI: 10.1042/BA20100143).
89. Calam E., Gonzalez-Roca E., Fernandez M.R., Dequin S., Pares X., Virgili A., Biosca J.A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. Vol. 82. P. 1706 (DOI: 10.1128/AEM.03717-15).
90. Corrado M.L., Knaus T., Mutti F.G. // *Chem. Bio. Chem.* 2018. Vol. 19. P. 679 (DOI: 10.1002/cbic.201700653).
91. Jiang W., Fang B.S. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016. 43. P. 577.
92. Jiang W., Yang R., Lin P., Hong W., Fang B. // *J. Biotechnol.* 2019. Vol. 292. P. 50 (DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.12.017).
93. Marchini V., Benitez-Mateos A.I., Hutter S.L., Paradisi F. // *Chem. Bio. Chem.* 2022. Vol. 23. Art. e202200428 (DOI: 10.1002/cbic.202200428).
94. Marchini V., Benitez-Mateos A.I., Roura Padrosa D., Paradisi F. // *Front. Catal.* 2021. Vol. 1. Art. 790461 (DOI: 10.3389/fctls.2021.790461).
95. Ngo A.C.R., Schultes F.P.J., Maier A., Hade-wig S.N.H., Tischler D. // *ChemBioChem.* 2022 Vol. 23. Art. e202100643 (DOI: 10.1002/cbic.202100643).
96. Ozbakir H.F., Garcia K.E., Banta S. // *Protein. Eng. Des. Sel.* 2018. Vol. 31. P. 103 (DOI: 10.1093/protein/gzy005).
97. Suhrer I., Haslbeck M., Castiglione K. // *Process Biochemistry.* 2014. Vol. 49. P. 1527 (DOI:10.1016/j.procbio.2014.06.001).
98. Zhang Y., Wang Y., Wang S., Fang B. // *Eng. Life Sci.* 2017. Vol. 17. P. 989.
99. Zhu Y., Jiang Z., Chen J., Xu J., Wang L., Qi B. // *J. Bio-based Mat. Bioen.* 2017. Vol. 11. N 4. P. 372.
100. Kokorin A., Parshin P. D., Bakkes P.J., Pometun A.A., Tishkov V.I., Urlacher V.B. // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11. Art. 21706 (DOI: 10.1038/s41598-021-00957-5 [pii]).
101. Krivitskaya A.V., Pometun A.A., Parshin P.D., Khrenova M.G., Urlacher V.B., Tishkov V.I. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2020. Vol. 75. N 3. P. 162 (DOI: 10.3103/S0027131420030074).
102. Pometun A.A., Parshin P.D., Galanicheva N.P., Uporov I.V., Atroshenko D.L., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2020. Vol. 75. N 4. P. 250 (DOI: 10.3103/S0027131420040057).
103. Parshin P.D., Pometun A.A., Martysuk U.A., Kley-menov S.Yu., Atroshenko D.L., Pometun E.V., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow).* 2020. Vol. 85. N 5. P. 575 (DOI: 10.1134/S0006297920050065).
104. Ruschig U., Muller U., Willnow P., Hopner T. // *Eur. J. Biochem.* 1976. Vol. 70. P. 325 (DOI: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb11021.x).
105. Yang J., Lee S.H., Ryu Y., Lee H.S., Kang S.G. // *Front. Microbiol.* 2022. Vol. 13. Art 844735.
106. Alissandratos A., Easton C.J. // *Beilstein. J. Org. Chem.* 2015. Vol. 11. P. 2370 (DOI: 10.3762/bjoc.11.259).
107. Alissandratos A., Kim H.K., Easton C.J. // *Bioengineered.* 2013. Vol. 4. P. 348 (DOI: 10.4161/bioe.25360).
108. Alissandratos A., Kim H.K., Easton C.J. // *Biore-sour. Technol.* 2014. Vol. 164. P. 7 (DOI:10.1016/j.biortech.2014.04.064).
109. Aresta M., Dibenedetto A., Angelini A. // *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2013 Vol. 371. Art. 20120111 (DOI: 10.1098/rsta.2012.0111).
110. Aresta M., Dibenedetto A., Angelini A. // *Chem. Rev.* 2014. Vol. 114. P. 1709 (DOI: 10.1021/cr4002758).
111. Cakar M.M., Ruupunen J., Mangas-Sanchez J., Birmingham W.R., Yildirim D., Turunen O., Turner N.J., Valjakka J., Binay B. // *Biotechnol. Lett.* 2020. Vol. 42. P. 2251 (DOI:10.1007/s10529-020-02937-7 [pii]).

112. Chen Y., Li P., Noh H., Kung C.W., Buru C.T., Wang X., Zhang X., Farha O.K. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019. Vol. 58. P. 7682 (DOI: 10.1002/anie.201901981).
113. Choe H., Ha J.M., Joo J.C., Kim H., Yoon H.J., Kim S., Son S.H., Gengan R.M., Jeon S.T., Chang R., Jung K.D., Kim Y.H., Lee H.H. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2015. Vol. 71. P. 313 (DOI: 10.1107/S1399004714025474).
114. Guo Q., Gakhar L., Wickersham K., Francis K., Vardikilshtain A., Major D.T., Cheatum C.M., Kohan A. // *Biochemistry.* 2016. Vol. 55. P. 2760 (DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00181).
115. Ihara M., Kawano Y., Urano M., Okabe A. // *PLoS. One.* 2013. Vol. 8. Art. e71581.
116. Miller M., Robinson W.E., Oliveira A.R., Heidary N., Kornienko N., Warnan J., Pereira I.A.C., Reisner E. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019. Vol. 58. P. 4601 (DOI: 10.1002/anie.201814419).
117. Nielsen, C.F., Lange L., Meyer A.S. // *Biotechnol. Adv.* 2019. Vol. 37. Art. 107408 (DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.06.007).
118. North M., Abrantes P., Remiezowicz E., Bardow A., Dodson J., Manning T., Albo J., Reed D., Harris D., Ingram I., Cowan A., Moss M., Carrera G.V., Foote A., Fraga E., Styring P., Bogaerts A., Centi G., Navarrete A., Comerford J., Dowson G., Coogan A., Butterworth T., Lamb K., Aresta M., Janaky C., Heyn R., Webb W., van R.G., Meine N., Meynen V., Michez R., Churina D., Dossunov K., Du X., Spooren J., Herskowitz M., Michiels K., Capacchione C. // *Faraday Discuss.* 2015. Vol. 183. P. 261 (DOI: 10.1039/c5fd90080h).
119. Schlager S., Dibenedetto A., Aresta M., Apaydin D.H., Dumitru L.M., Neugebauer H., Sariciftci N.S. // *Energy Technol. Weinheim.* 2017. Vol. 5. P. 812 (DOI: 10.1002/ente.201600610;ENTE201600610).
120. Sokol K.P., Robinson W.E., Oliveira A.R., Warnan J., Nowaczyk M.M., Ruff A., Pereira I.A.C., Reisner E. // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. Vol. 140. P. 16418 (DOI: 10.1021/jacs.8b10247).
121. Zhang L., Liu Y., Zhao R., Zhang C., Jiang W., Gu Y. // *mBio.* 2020. Vol. 11 (DOI: 10.1128/mBio.00650-20).
122. Demchenko A.P., Rusyn O.I., Egorov A.M., Tishkov V.I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. Vol. 1039. P. 290.
123. D'Oronzo E., Secundo F., Minofar B., Kulik N., Pometun A.A., Tishkov V.I. // *Chem. Cat. Chem.* 2018. Vol. 10. N 15. P. 3247 (DOI: 10.1002/cctc.201800145).

Информация об авторах

Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, гл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, генеральный директор ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук, профессор (tishkovvi@my.msu.ru, vitishkov@gmail.com);

Пометун Анастасия Александровна – зав лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (aapometun@gmail.com);

Савин Святослав Сергеевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (savinslava@gmail.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 25.04.2023;
одобрена после рецензирования 30.04.2023;
принята к публикации 14.05.2023.