

НОВЫЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ В РЕАКЦИЯХ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ И БАЙЕРА-ВИЛЛИГЕРА

Тишков В.И.^{а,б,в}, Паршин П.^{а,б}, Савин С.С.^{а,б}, Урлахер В.^г, Пометун А.А.^{а,б,в}

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет,
119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3,
e-mail: vitishkov@gmail.com

^бООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559 Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96.

^вФИЦ Биотехнологии РАН, 117234 Москва, Ленинский просп., 33, корп.2.

^гУниверситет им. Г. Гейне, 40225 Дюссельдорф, Университетская ул. 1-26

Реакции гидроксирования и Байера-Виллигера активно используются в фармацевтической промышленности и тонком органическом синтезе. Как правило, такие реакции проводятся с помощью ферментов - цитохром Р450 оксидоредуктаз (СУР450) и монооксигеназ (МО). Использование этих ферментов позволяет получить целевые продукты с выходом до 99-100% и в виде только одного оптического изомера с ee 98-99% и выше. Кроме органических субстратов для проведения обеих реакций необходимы кислород и восстановленная форма кофермента NADPH. Последний является очень дорогим соединением (более 10 000 Евро за кг) и для снижения стоимости процесса используется вторая ферментативная реакция – восстановление образующегося в основной реакции NADP⁺ обратно до NADPH. Наиболее эффективным вторым ферментом является мутантная NADP⁺-специфичная формиатдегидро-геназа (ФДГ). Для получения новых высокоэффективных вариантов NADP⁺-специфичных ФДГ были определены трехмерные структуры двух ферментов из бактерий и дрожжей и на основании анализа полученных структур проведены эксперименты методом направленного мутагенеза. Ферменты используют или в очищенной форме в виде пар СУР450-ФДГ и МО-ФДГ, или попарно ко-экспрессируют в клетках E.coli. Однако вследствие невысокой удельной активности СУР450 и МО общая производительность невысока. Для повышения эффективности процесса получены генетические конструкции, экспрессирующие гибридные белки, содержащие в одной полипептидной цепи последовательности ФДГ- СУР450, СУР450-ФДГ (по два варианта каждой) и ФДГ-МО (с двумя вариантами ФДГ) Все гибридные ферменты были получены в активной форме, выделены, очищены, охарактеризованы и протестированы в ряде реакций. Показано, что сближение активных центров двух ферментов в гибридном белке приводит к увеличению общей каталитической эффективности всего процесса в несколько раз.

Работа поддержана грантами РФФИ 17-04-01469, 17-04-01662, 18-34-20098, РФФИ и Правительства Москвы 19-34-70036 и РНФ 18-74-00146.