

УДК 577.151

Стабилизация трансаминаз в водно-органических средах пиридоксаль-5'-фосфатом на примере трансаминазы из *Desulfomonile tiedjei*

Ю. В. Рудина¹, А. К. Бакунова¹, В. О. Попов^{1,2}, Е. Ю. Безсуднова^{1*}¹Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071 Россия²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

*E-mail: eubez@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 16.09.2025

Принята к печати 28.01.2026

DOI: 10.32607/actanaturae.27820

РЕФЕРАТ Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые трансаминазы являются высокоэффективными биокатализаторами стереоселективного синтеза хиральных аминов – ключевых «строительных блоков» в фармацевтическом и химическом производствах. Фундаментальные исследования ферментативного трансаминирования включают классические работы Александра Браунштейна, открывшего реакцию переаминирования, Дэвида Метцлера, исследовавшего спектральные свойства пиридоксальных ферментов, Эсмонда Снелла, изучавшего кинетику PLP-зависимых ферментов, и других российских и зарубежных ученых. Практическое применение PLP-зависимых трансаминаз ограничивается не только неблагоприятным равновесием реакции трансаминирования и узкой субстратной специфичностью, но и стабильностью трансаминаз в технологических условиях. Стабильность трансаминаз – это не только стабильность белковой глобулы, но и способность трансаминаз удерживать кофактор PLP, диссоциация которого приводит к инактивации фермента и остановке синтеза. Современные биокаталитические процессы разрабатываются преимущественно для водно-органических сред, чтобы повысить растворимость гидрофобных субстратов до концентраций в сотни г/л. В этих условиях стабильность трансаминаз, как и других ферментов, снижается. В контексте этих задач нами изучена эффективность связывания PLP в активном центре как фактора стабилизации холофермента трансаминазы из *Desulfomonile tiedjei* в разных водно-органических средах. Проанализирована стабильность и каталитическая активность трансаминазы в присутствии метанола, диметилсульфоксида и цирена (до 20% v/v) как в режиме инкубации, так и в реакционных условиях. Особое внимание уделено анализу влияния аминокислотной замены T199Q в области связывания кофактора на устойчивость фермента к действию органических растворителей. Проведенные исследования вносят вклад в решение прикладной задачи стабилизации трансаминаз в водно-органических средах. Полученные результаты углубляют понимание молекулярных основ стабильности PLP-зависимых ферментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА трансаминазы, ферментативный катализ, стабильность, органические растворители.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДМСО – диметилсульфоксид; PLP – пиридоксаль-5'-фосфат; PMP – пиридоксамин-5'-фосфат; ТА – трансаминаза; DestiTA – трансаминаза из *Desulfomonile tiedjei*; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; WT – дикий тип.

ВВЕДЕНИЕ

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые трансаминазы [EC 2.6.1.X] катализируют стереоселективный перенос аминокислоты/амина на альфа-кетокислоту/кетон с образованием новой аминокислоты/амина и новой кетокислоты/кетона [1–3]. Ферментативное трансаминирование – это реакция последовательного двойного замещения с промежу-

точным переносом аминокислоты на кофактор PLP в результате деаминирования субстрата аминокислоты, что приводит к образованию пиридоксамин-5'-фосфата (PMP), который и служит донором аминокислоты во второй полуреакции – аминировании второго субстрата кетокислоты. Трансаминазы изучают уже более 80 лет. Основопологающими в данной области являются работы Александра Браунштейна,

открывшего реакцию переаминирования, Дэвида Метцлера, исследовавшего спектральные свойства пиридоксальных ферментов и равновесие отдельных стадий реакции трансаминирования, Эсмонда Снелла, изучавшего кинетику PLP-зависимых ферментов, и других российских и зарубежных ученых [3–6]. В 2010 году впервые было предложено использовать трансаминазы для стереоселективного аминирования кетосоединений в промышленных масштабах [7]. К настоящему времени имеется ряд внедренных биотехнологических схем с применением трансаминаз и постоянно предлагаются новые [8–14]. Для создания биокатализаторов на основе трансаминаз необходимо решить задачи повышения их специфичности к целевому субстрату, смещения равновесия реакции трансаминирования в сторону продуктов, стабилизации фермента в условиях синтеза [10, 14, 15]. Проблема стабильности – это не столько термическая стабильность биокатализатора, сколько стабилизация активной конформации биокатализатора в рабочих условиях [16, 17]. В случае трансаминаз это, в первую очередь, задача стабилизации холофермента в водно-органических средах, так как органический растворитель (до 50%) добавляют для повышения растворимости субстрата – кетосоединения [7, 10]. Кроме того, у трансаминаз наблюдается выход кофактора из активного центра, что приводит к инактивации фермента [17–19]. Наиболее простой и эффективный способ повышения стабильности холофермента – это добавление в реакционную среду избытка кофактора PLP [7, 10, 19]. Однако такой подход не решает проблемы выхода кофактора в форме пиридоксамин-5'-фосфата (промежуточная форма кофактора после присоединения аминогруппы от субстрата аминокислоты, PMP) [1]. Здесь стабилизация в реакционных условиях возможна как путем повышения концентрации второго субстрата (кетосоединения или акцептора аминогруппы), так и введением замен в области связывания кофактора [17, 19].

Ранее мы охарактеризовали трансаминазу из граммотрицательной бактерии *Desulfomonile tiedjei* (DestiTA). DestiTA эффективно катализирует

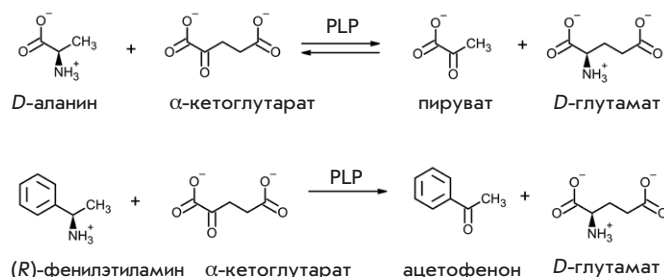


Рис. 1. Схемы реакций трансаминирования

перенос аминогруппы с *D*-аминокислоты и (*R*)-фенилэтиламина на α -кетоглутарат и другие кетокислоты (рис. 1) [20]. Также DestiTA эффективно работает в трехферментной системе стереоселективного аминирования α -кетокислот с образованием *D*-аминокислот с 99% выходом и энантиомерным избытком больше 99% (рис. 2) [20].

В то же время отмечена нестабильность холофермента DestiTA, другими словами, в рабочем буфере преобладает апофермент, и для эффективной работы фермента необходимо вводить избыток PLP в реакционную смесь. Для стабилизации холофермента заменили отдельные аминокислотные остатки (а.о.) во второй координационной сфере сайта связывания PLP в активном центре DestiTA. Наиболее эффективной оказалась замена T199Q, которая сделала возможным образование водородной связи между Gln199 и консервативным Glu194, координирующим N1 атом молекулы PLP (рис. 3). Замена T199Q привела к снижению константы диссоциации холофермента в 5 раз (от 11 ± 1 мкМ у фермента WT до 2.2 ± 0.4 мкМ у варианта с заменой T199Q) и небольшому увеличению *V*_{max} реакции трансаминирования между *D*-аланином и α -кетоглутаратом [20]. Температура полуперехода термической денатурации холофермента T199Q повысилась на 1°C, однако снизилась на 5°C у апофермента. Мы продолжили исследование эффекта замены T199Q на функционирование DestiTA и проанализировали стабильность и эффективность работы холофермента в водно-органических растворах.

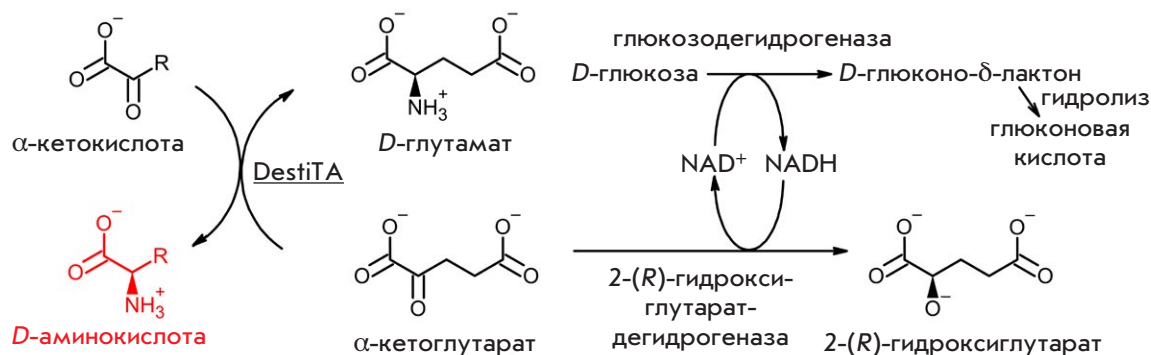


Рис. 2. Трехферментная система синтеза *D*-аминокислот. Красным цветом выделен продукт синтеза

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение рекомбинантной DestiTA и ее варианта T199Q

Очищенные активные рекомбинантные препараты DestiTA WT и ее варианта T199Q получали как описано ранее [20]. Чистоту и гомогенность препарата контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Концентрацию DestiTA определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм.

Стандартная реакция

Стандартную реакцию трансаминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат проводили в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8,0, при 40°C. Концентрации *D*-аланина и α -кетоглутарата составляли 25 и 10 мМ соответственно, в присутствии 30 мкМ PLP, 330 мкМ NADH и 2 U/мл лактатдегидрогеназы (ЛДГ) кролика (Sigma, США). Реакцию инициировали внесением аликвоты препарата DestiTA (0,004 мг/мл) после нагревания реакционной смеси до 40°C. За ходом реакции следили по сопряженной ферментативной реакции, катализируемой ЛДГ, в которой образующийся в ходе реакции трансаминирования пируват служит субстратом. ЛДГ катализировала превращение пирувата в лактат при участии NADH. За окислением NADH следили при длине волны 340 нм ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). Измерения проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 0,5 см на спектрофотометре Evolution 300 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, США). Удельная активность DestiTA представлена в U/мг фермента, где 1 U соответствует превращению 1 мкмоль субстрата в мин.

Определение C_{50} (PLP) для DestiTA WT и варианта T199Q

Изучали связывание PLP в кинетическом режиме в реакционной смеси с ЛДГ, аналогичной описанной выше, однако концентрации субстратов составляли 100 мМ *D*-аланина и 10 мМ α -кетоглутарата. Концентрации PLP варьировали от 0 до 30 мкМ. Реакцию инициировали внесением апоформы DestiTA до концентрации 0,01 мг/мл (0,3 мкМ).

Определение кинетических параметров полуреакции DestiTA с *D*-валином

Взаимодействие холофермента (PLP-формы) DestiTA (0,72 мг/мл (20 мкМ)) с *D*-валином (0–50 мМ) анализировали спектрофотометрически с использованием планшетного спектрофотометра SPECTROstar Omega. За ходом полуреакции следили при длине волны 410 нм в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8,0, 40°C.

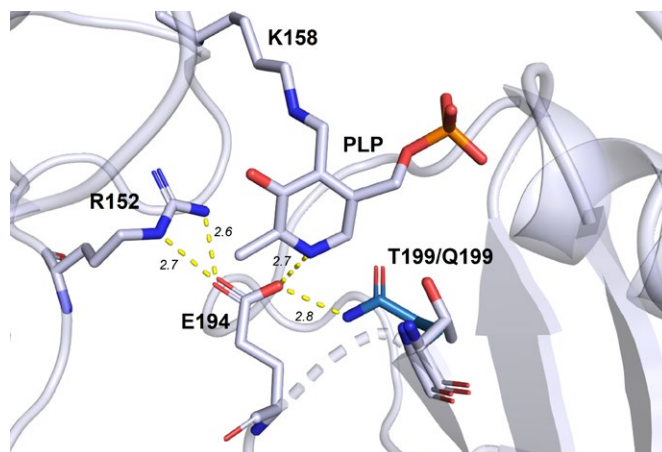


Рис. 3. Связывание кофактора в активном центре модели DestiTA. Показана аминокислотная замена T199Q, потенциально приводящая к образованию водородной связи Q199/NE2–E194/OE2. Расстояния указаны в ангстремах

В условиях избытка субстрата полуреакцию рассматривали как реакцию первого порядка. Наблюдаемую константу скорости полуреакции k_{obs} определяли аппроксимацией уравнением (1) зависимости интенсивности поглощения от времени:

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty) \times \exp(-k_{\text{obs}} t), \quad (1)$$

где A_t – значение интенсивности поглощения в момент времени t , A_0 – значение интенсивности поглощения в начальный момент времени, A_∞ – предельное значение интенсивности поглощения.

Кинетические параметры полуреакций рассчитывали по уравнению (2):

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{max}} [S]}{K_d + [S]} + k_r, \quad (2)$$

где $[S]$ – концентрация субстрата, k_{max} – максимальная константа скорости полуреакции, K_d – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, k_r – константа скорости, отражающая вклад обратной реакции, k_{max}/K_d – константа специфичности.

Влияние органических растворителей на удельную активность ферментов в реакции трансаминирования

Влияние растворителей на активность DestiTA анализировали в стандартной трансаминазной реакции *D*-аланин + α -кетоглутарат. К реакционной смеси для этого добавляли 10–20% (*v/v*) ДМСО, метанола или цирена.

Ввиду высокой оптической плотности цирена при 340 нм и денатурации ЛДГ в присутствии 20%

(*v/v*) метанола, для определения ферментативной активности из реакционной смеси через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, реакцию останавливали нагреванием до 98°C в течение 5 мин. Затем определяли концентрацию образовавшегося пирувата в аликвоте с помощью ЛДГ при 25°C в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8.0, используя линейный калибровочный график – зависимость активности ЛДГ от концентрации пирувата.

Определение наблюдаемой константы скорости диссоциации холофермента DestiTA при инкубации в буфере и в реакционных условиях с субстратами с добавлением органических растворителей

Скорость диссоциации холофермента DestiTA определяли спектрофотометрически по снижению поглощения на длине волны 430 нм, что соответствует убыли холоформы DestiTA, коэффициент экстинкции – 0.2 мг⁻¹см⁻¹мл. Для этого 0.2–0.6 мг/мл DestiTA выдерживали в 50 мМ К-фосфатном буфере без субстратов и в присутствии 100 мМ *D*-аланина и 10 мМ α-кетоглутарата при 40°C. Для оценки влияния органических растворителей к реакционным смесям добавляли 10–20% (*v/v*) ДМСО, метанола или цирена. За образованием осадков следили при λ = 500–550 нм. Наблюдаемую константу скорости диссоциации холофермента рассчитывали, используя для обработки экспериментальных кривых уравнение (3) и программу Origin 8.0 (Origin Lab, США):

$$k_{\text{diss}}^{\text{app}} = - \frac{1}{[\text{ТА}] \times \varepsilon} \times \frac{dA}{dT}, \quad (3)$$

где $k_{\text{diss}}^{\text{app}}$ – искомая константа скорости диссоциации, [ТА] – концентрация трансаминазы, ε – коэффициент экстинкции холоформы при 430 нм, dA/dT – тангенс угла наклона экспериментальной кривой.

Определение температуры полуперехода термической денатурации DestiTA WT и T199Q

Дифференциальную сканирующую флуориметрию для определения температуры полуперехода ($T_{0.5}$) термической денатурации апофермента и холофермента DestiTA проводили в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8.0. Апофермент получали инкубированием препарата DestiTA с 2 мМ фенилгидразином в течение 20 мин при комнатной температуре с последующим переводом в буфер с помощью колонки Desalting (Cytiva, США). Холофермент получали инкубированием фермента с 300 мкМ PLP в течение 1 ч при комнатной температуре. В полученные препараты холофермента в финальной концентрации 0.07 мг/мл (2 мкМ) добавляли краситель

25×ProteOrange Protein Gel Stain (Lumiprobe, США). Влияние органических растворителей анализировали, добавляя 10–20% (*v/v*) метанола, ДМСО и цирена в пробы. Измерения проводили с помощью системы CFX96 RT-PCR (Bio-Rad, США) в режиме повышения температуры с шагом 0.2°C с последующим уравниванием образцов в течение 10 с в диапазоне температур от 25 до 90°C на длинах волн возбуждения 515–530 нм и эмиссии 560–580 нм соответственно. Для каждого образца получены по три экспериментальные кривые. Данные обрабатывали сначала в программе CFX Manage software (Bio-Rad) и далее в OriginPro 8.0. Значение температуры полуперехода термической денатурации ($T_{0.5}$) определяли по максимуму первой производной функции зависимости флуоресценции от температуры.

Анализ операционной стабильности DestiTA WT и T199Q в присутствии органических растворителей

Операционную стабильность DestiTA анализировали путем инкубации фермента в концентрации 0.2 мг/мл в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8.0, с добавлением 50 мМ *D*-глутамата, 50 мМ 3-метил-2-оксобутирата, 300 мкМ PLP, 10–20% (*v/v*) ДМСО или 10% (*v/v*) метанола при 40°C. Для измерения активности DestiTA отбирали аликвоты образцов непосредственно после их подготовки, а также через 1, 2 и 5 дней инкубации. Активность измеряли в стандартной реакции с *D*-аланином и α-кетоглутаратом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность холофермента DestiTA в реакционных условиях: эффект замены T199Q

Ранее путем сравнительного анализа свойств DestiTA WT и варианта T199Q показали снижение константы диссоциации холофермента DestiTA с введением замены T199Q, которая, по результатам моделирования, создает дополнительную водородную связь Q199-E194 в области связывания кофактора [20]. В данной работе мы продолжили анализ стабильности холофермента WT и T199Q, но уже в реакционных условиях. Для этого оценили эффективность образования в реакционных условиях холофермента из апофермента DestiTA и свободного PLP по параметру $C_{50}(\text{PLP})$ (рис. 4), значения которого у WT и варианта составили 0.29 ± 0.07 и 0.8 ± 0.1 мкМ соответственно. Получается, что замена T199Q в реакционных условиях дестабилизирует холофермент. Чтобы прояснить этот вопрос, мы уточнили связывание субстрата ферментом дикого типа и вариантом по первой полуреакции деаминирования [1] в отсутствие второго

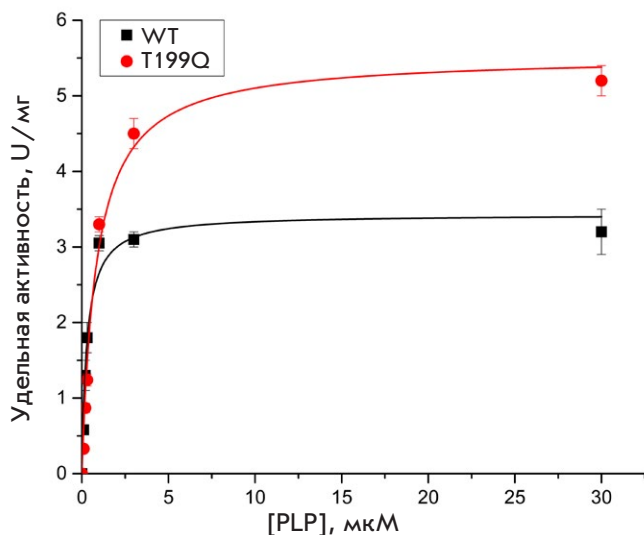


Рис. 4. Зависимость удельной активности DestiTA WT и варианта T199Q от концентрации PLP в реакции трансаминирования между 100 мМ *D*-аланином и 10 мМ α -кетоглутаратом (насыщающие концентрации) в 50 мМ К-фосфатном буфере, рН 8.0, 40°C

субстрата. Кинетические параметры полуреакции с *D*-валином холофермента WT и варианта T199Q составили $k_{\max} = 0.068 \pm 0.004 \text{ с}^{-1}$ и $K_D = 0.5 \pm 0.1 \text{ мМ}$ и $k_{\max} = 0.019 \pm 0.001 \text{ с}^{-1}$ и $K_D = 10 \pm 2 \text{ мМ}$ соответственно. Очевидно, что замена в сайте связывания кофактора PLP ухудшила эффективность связывания субстрата, что не в последнюю очередь влияет на параметр $C_{50}(\text{PLP})$ и кинетическую стабильность DestiTA.

Активность DestiTA в водно-органических средах

Для изучения стабильности DestiTA в водно-органических средах были выбраны ДМСО и метанол, широко применяемые в биокаталитических процессах с использованием трансаминаз [8–10]. Выбор обусловлен различиями в ключевых физико-химических свойствах ДМСО и метанола: гидрофобности ($\log P = -1.35$ для ДМСО и -0.74 для метанола), дипольном моменте (3.96 Д для ДМСО против 1.70 Д для метанола) и характере взаимодействия с водой. Метанол выступает как донор водородных связей, в то время как ДМСО является акцептором, что позволяет комплексно оценить влияние разных типов растворителей на стабильность фермента. Также был опробован растворитель цирен (Cylene; $\log P = -1.52$; 0.93 Д; акцептор водородной связи), который активно продвигается на рынке как биоразлагаемая, немутагенная и нетоксичная альтернатива традиционным дипольным апротонным растворителям ДМСО, *N,N*-диметилформамиду (ДМФА), диоксану и тетрагидрофурану (ТГФ) [21, 22]. Влияние

органических растворителей на работу фермента оценивали по удельной активности DestiTA в реакции трансаминирования с субстратами *D*-аланином и α -кетоглутаратом (рис. 1) в 50 мМ К-фосфатном буфере, рН 8.0, при 40°C (табл. 1). Показали положительный эффект замены T199Q на активность DestiTA в ДМСО, в то время как в 10–20% цирене вариант оказался менее активным.

Влияние добавок органических растворителей на стабильность DestiTA продолжили изучать как в буфере, так и в реакционных условиях, то есть в присутствии субстратов.

Термодинамическая и кинетическая стабильность DestiTA в водно-органических средах. Эффект замены T199Q

Термодинамическая стабильность холофермента с введением замены T199Q увеличилась не только в одном буфере [20], но и в буфере с добавлением органических растворителей (табл. 2). Для анализа температурной стабильности DestiTA методом дифференциальной сканирующей флуориметрии определяли температуру полуперехода ($T_{0.5}$) термической денатурации фермента. В этом эксперименте цирен оказывал существенный дестабилизирующий эффект на DestiTA, снижая $T_{0.5}$ более чем на 20°C, в то время как эффекты метанола и ДМСО были менее разрушительными. Качественно схожие эффекты растворителей наблюдались ранее для удельной активности DestiTA (табл. 1). Нужно отметить, что наблюдаемые эффекты определяются не только способностью растворителей к образованию водородных связей, но и другими свойствами: гидрофобностью растворителей, величиной дипольного момента (параметр μ) и т.д.

Кинетическую стабильность DestiTA WT и варианта T199Q определяли по скорости выхода кофактора из активного центра, приводящего к инактивации

Таблица 1. Удельная активность WT DestiTA и ее варианта T199Q в реакции трансаминирования между *D*-аланином и α -кетоглутаратом (ненасыщающие концентрации) в 50 мМ К-фосфатном буфере, рН 8.0, при 40°C

Органический растворитель, %	Удельная активность, U/мг	
	WT	T199Q
нет	3.4 ± 0.2	2.8 ± 0.3
Метанол	10	3.7 ± 0.1
	20	2.3 ± 0.3
ДМСО	10	2.7 ± 0.1
	20	2.1 ± 0.2
Цирен	10	2.4 ± 0.3
	20	2.0 ± 0.2
		Нет активности

Таблица 2. Влияние органических растворителей на температуру полуперехода ($T_{0.5}$) DestiTA WT и T199Q в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8.0, с добавлением органических растворителей

Органический растворитель, %	$T_{0.5}$, °C	
	WT	T199Q
нет	64.4 ± 0.2	65.7 ± 0.1
Метанол, 10	59.9 ± 0.3	61.2 ± 0.4
Метанол, 20	49.5 ± 0.6	53.0 ± 0.2
ДМСО, 20	57.7 ± 0.5	58.1 ± 0.2
Цирен, 20	40.6 ± 0.8	42.7 ± 0.8

фермента, за которой можно наблюдать по изменению спектра холофермента (рис. 5). Эксперимент проводили как в буфере, так и в условиях реакции, то есть в присутствии двух субстратов, D-аланина и α-кетоглутарата, что определило присутствие кофактора как в форме PLP, так и в промежуточной форме РМР. Наблюдаемая константа скорости диссоциации холофермента (k_{diss}^{app}) в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8.0 в отсутствие субстратов оказалась сопоставимой у DestiTA WT и варианта и составила $(12.2 \pm 0.4) \times 10^{-3}$ и $(20 \pm 4) \times 10^{-3}$ мин⁻¹ при 40°C соответственно. Наблюдаемая константа скорости диссоциации (k_{diss}^{app}) кофактора в условиях реакции оказалась практически на порядок выше у варианта T199Q, то есть в реакционных условиях кинетическая стабильность DestiTA с заменой T199Q ниже, чем у WT (табл. 3).

Если температуру полуперехода при термической денатурации можно с осторожностью рассматривать как меру термодинамической стабильности белка (только для обратимо денатурирующих белков, у DestiTA наблюдается агрегация в ходе нагревания), то константа диссоциации холофермента – это объективный параметр термодинамической стабильности холофермента, и, очевидно, холофермент варианта стабильнее, чем холофермент WT. Однако кинетическая стабильность, которая характеризуется k_{diss}^{app} и определяет скорость инактивации, у варианта ниже. Возможно, изменение эффективности связывания субстрата при введении аминокислотных замен в активный холофермент (см. раздел выше) также вносит поправку в величину кинетической стабильности. В случае DestiTA исходный WT оказывается стабильнее варианта, особенно в условиях реакции. Здесь может сказываться снижение стабильности апоформы варианта T199Q, которая накапливается в ходе реакции, особенно в условиях без добавления свободного PLP [19].

Что касается эффектов органических растворителей, то ДМСО в реакционных условиях в присутствии субстратов стабилизирует холофермент WT,

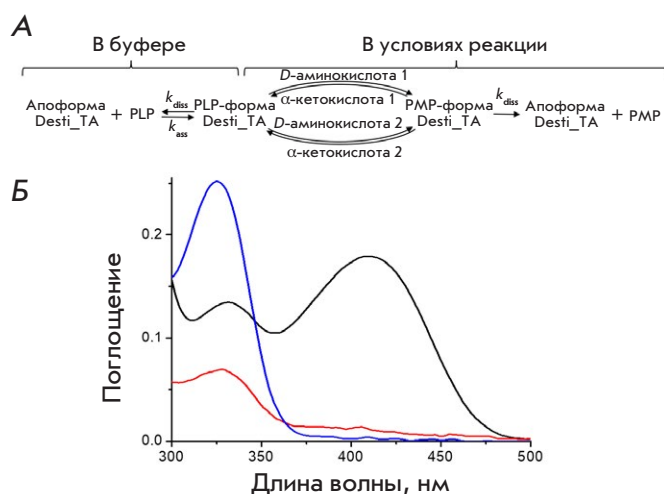


Рис. 5. Схема инактивации DestiTA в буфере и в условиях реакции (А). Спектры поглощения РМР- (черный) и РМР-формы (синий) холофермента и апофермента (красный) (Б). Спектры нормированы на поглощение при 280 нм

Таблица 3. Диссоциация холофермента в реакционных условиях (насыщающие концентрации субстратов) с добавлением органических растворителей в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8.0, при 40°C

Органический растворитель, %	$k_{diss}^{app} \times 10^3$, мин ⁻¹	
	WT	T199Q
Нет	12.8 ± 0.3	100 ± 20
Метанол	10	27 ± 1
	20	осадки
ДМСО	10	12.7 ± 0.4
	20	7.1 ± 0.4
Цирен	10	осадки

но не оказывает значимого влияния на вариант с заменой T199Q. При этом удельная активность WT в ДМСО снижается (табл. 1). Здесь можно предположить, что органический растворитель попадает в активный центр фермента и влияет на скорость элементарных стадий [23, 24].

Операционная стабильность DestiTA в водно-органических растворах. Эффект замены T199Q

Операционная стабильность биокатализатора – это важный фактор эффективности работы фермента в конкретных реакционных условиях. Операционная стабильность определяется по остаточной активности фермента в реакционных условиях, то есть в присутствии субстратов, избытка РМР и прочих добавок [18]. Последнее принципиально отличает данный эксперимент от анализа кинетической стабильности, который проводится с холоферментом без избытка РМР.

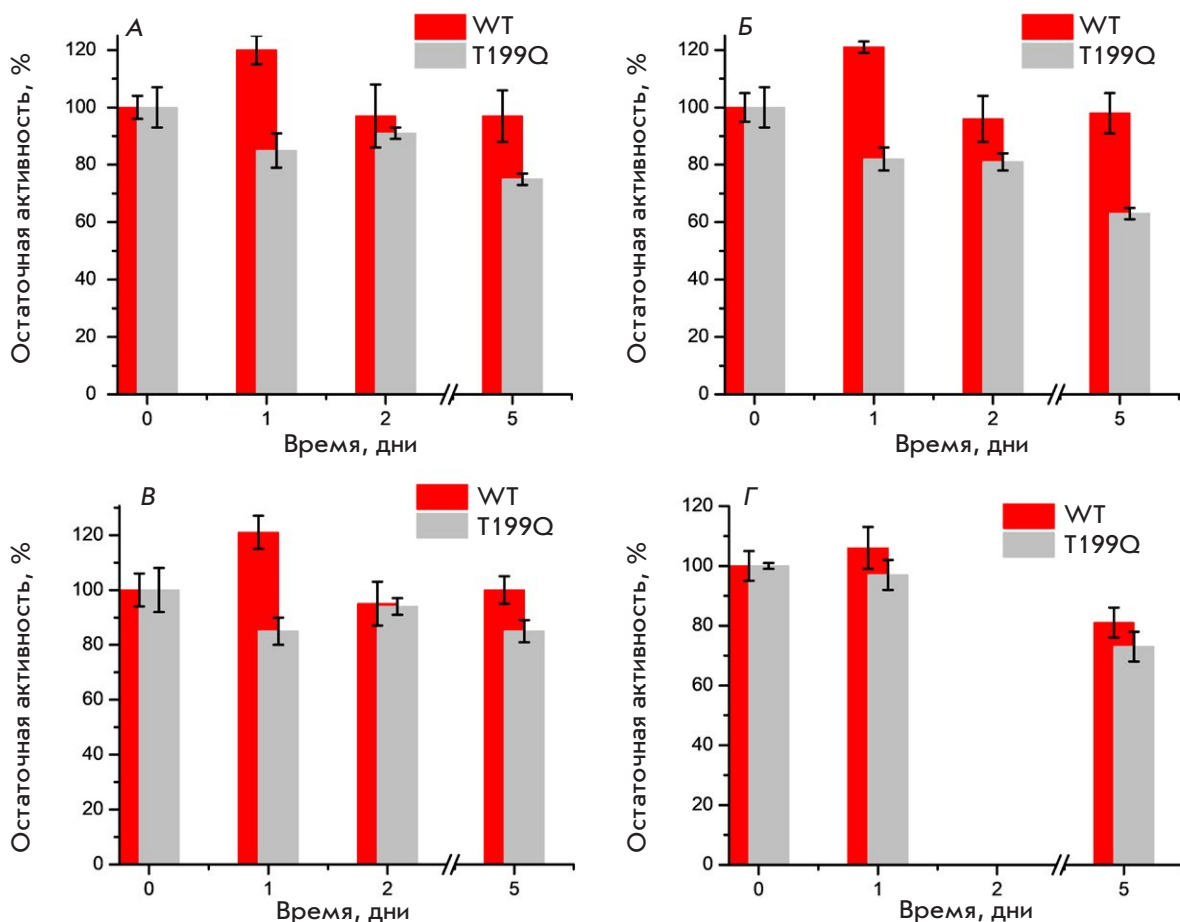


Рис. 6. Остаточная активность DestiTA (0.2 мг/мл) WT и T199Q при выдерживании в 50 мМ К-фосфатном буфере, рН 8.0, с добавлением 50 мМ D-глутамата, 50 мМ 3-метил-2-оксобутирата, 300 мкМ PLP, а также с добавлением 10% (v/v) ДМСО (А), 20% (v/v) ДМСО (Б), 10% (v/v) метанола (В) и без органических растворителей (Г). У WT 100% удельной активности соответствует 3.4 ± 0.2 U/мг и 2.8 ± 0.2 U/мг – у T199Q

Операционная стабильность DestiTA представлена на рис. 6. Интересно, что избыток PLP эффективно стабилизирует фермент дикого типа (WT) и в меньшей степени вариант T199Q. Воспроизводятся эффекты растворителей на величину константы скорости диссоциации холофермента (табл. 3). Видимо, добавление свободного PLP не исправляет кинетическую нестабильность варианта. Очевидно также и то, что избыток PLP значительно стабилизирует активную форму фермента, поддерживая его работу в течение нескольких суток. В аналогичных условиях, но без избытка PLP, времена полуинактивации холофермента WT и варианта T199Q составляют около 50 и 7 мин соответственно (табл. 3).

Таким образом, как показали результаты экспериментов, стабильность DestiTA убывает в линейке растворителей ДМСО > метанол > цирен. Введение замены T199Q приводит к небольшому повышению термостабильности DestiTA как в буфере, так и в водно-органических растворах, далее к стабилизации холофермента в буфере, но не в услови-

ях реакции независимо от добавления органического растворителя. Кинетическая стабильность – это комплексный параметр, который включает как минимум стабильность холофермента и апофермента, эффективность связывания субстрата и эффективность связывания кофактора. И некоторое (в пределах одного порядка) повышение эффективности связывания PLP не дает возможности однозначно предсказать изменение кинетической или операционной стабильности трансаминазы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многолетнюю историю изучения PLP-зависимых ферментов, ключевым вызовом в современном ферментативном катализе остается создание на основе трансаминаз стабильных биокатализаторов для промышленного применения. Связывание PLP в активном центре трансаминаз, в частности DestiTA, определяет не только каталитические свойства ферментов, но и их стабильность. Изменение сайта связывания PLP оказывает комплексное воздействие

на самые разные параметры фермента, а именно, каталитическую эффективность, термостабильность, операционную стабильность, устойчивость в водно-органических растворах. В этом контексте DestiTA как умеренно термостабильный фермент оказывается стабильным в буферах с долей органического растворителя до 20%. Замена аминокислотного остатка T199Q приводит к повышению термостабильности и сохранению активности фермента в реакции D-аланин + α -кетоглутарат в водно-органических средах, однако снижает его кинетическую и операционную стабильность. Введение аминокислотной замены T199Q стабилизирует холофермент, но деста-

билизирует апофермент DestiTA и снижает каталитическую эффективность полуреакции деаминирования D-аминокислоты. Можно заключить, что для стабилизации DestiTA в биотехнологических процессах предпочтительнее повышение стабильности белковой глобулы (апофермента), так как стабильность холофермента достигается повышением концентрации PLP в реакторе. Проведенные исследования в очередной раз подтвердили эффективность стабилизации трансаминаз избытком свободного PLP. ●

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 23-74-30004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem.* 2004;73(1):383-415. doi: 10.1146/annurev-biochem.73.011303.074021
- Braunstein AE. Amino group transfer. In: P.D. B, ed. *The Enzymes*. 3d ed. London: Acad. Press; 1973:379-481. doi: 10.1016/S1874-6047(08)60122-5
- Metzler DE, Ikawa M, Snell EE. A general mechanism for vitamin B6-catalyzed reactions. *J Am Chem Soc.* 1954;76(3):648-652. doi: 10.1021/ja01632a004
- Metzler CM, Metzler DE. Quantitative description of absorption spectra of a pyridoxal phosphate-dependent enzyme using lognormal distribution curves. *Anal Biochem.* 1987;166(2):313-327. doi: 10.1016/0003-2697(87)90580-X
- Braunshstein AE, Shemiakin MM. Theory on amino acid metabolism processes catalyzed by pyridoxine enzymes. *Biokhimiya.* 1953;18(4):393-411. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13219089>.
- Borisov VV, Borisova SN, Kachalova GS, et al. Three-dimensional structure at 5 Å resolution of cytosolic aspartate transaminase from chicken heart. *J Mol Biol.* 1978;125(3):275-292. doi: 10.1016/0022-2836(78)90403-5
- Savile CK, Janey JM, Mundorff EC, et al. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science (80-)*. 2010;329(5989):305-309. doi: 10.1126/science.1188934
- Guo F, Berglund P. Transaminase biocatalysis: optimization and application. *Green Chem.* 2017;19(2):333-360. doi: 10.1039/c6gc02328b
- Limanto J, Ashley ER, Yin J, et al. A highly efficient asymmetric synthesis of vernakalant. *Org Lett.* 2014;16(10):2716-2719. doi: 10.1021/ol501002a
- Slabu I, Galman JL, Lloyd RC, Turner NJ. Discovery, Engineering, and synthetic application of transaminase biocatalysts. *ACS Catal.* 2017;7(12):8263-8284. doi: 10.1021/acscatal.7b02686
- Yi D, Bayer T, Badenhorst CPS, et al. Recent trends in biocatalysis. *Chem Soc Rev.* 2021;50(14):8003-8049. doi: 10.1039/D0CS01575J
- Desai AA. Sitagliptin manufacture: a compelling tale of green chemistry, process intensification, and industrial asymmetric catalysis. *Angew Chemie Int Ed.* 2011;50(9):1974-1976. doi: 10.1002/anie.201007051
- O'Connell A, Haarr MB, Ryan J, et al. Transaminase-triggered cascades for the synthesis and dynamic kinetic resolution of chiral N-heterocycles. *Angew Chemie Int Ed.* 2025;64(21). doi: 10.1002/anie.202422584
- Ao Y, Pei S, Xiang C, et al. Structure- and data-driven protein engineering of transaminases for improving activity and stereoselectivity. *Angew Chemie Int Ed.* 2023;62(23). doi: 10.1002/anie.202301660
- Ferrandi EE, Monti D. Amine transaminases in chiral amines synthesis: recent advances and challenges. *World J Microbiol Biotechnol.* 2018;34(1):13. doi: 10.1007/s11274-017-2395-2
- Wu S, Snajdrova R, Moore JC, Baldenius K, Bornscheuer UT. Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2021;60(1):88-119. doi: 10.1002/anie.202006648
- Padrosa DR, Alaux R, Smith P, Dreveny I, López-Gallego F, Paradisi F. Enhancing PLP-binding capacity of class-III ω -transaminase by single residue substitution. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7(October):1-13. doi: 10.3389/fbioe.2019.00282
- Börner T, Rämisch S, Reddem ER, et al. Explaining operational instability of amine transaminases: substrate-induced inactivation mechanism and influence of quaternary structure on enzyme-cofactor intermediate stability. *ACS Catal.* 2017;7(2):1259-1269. doi: 10.1021/acscatal.6b02100
- Bakunova AK, Isaikina TY, Popov VO, Bezudnova EY. Asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic and aromatic D-amino acids catalyzed by transaminase from *Halicomonobacter hydrossis*. *Catalysts.* 2022;12(12):1551. doi: 10.3390/catal12121551
- Bakunova AK, Rudina I V., Popov VO, Bezudnova EY. Contribution of second-shell residues to PLP-dependent transaminase catalysis: a case study of D-amino acid transaminase from *Desulfomonile tiedjei*. *Int J Mol Sci.* 2025;26(17):8536. doi: 10.3390/ijms26178536
- Sherwood J, De bruyn M, Constantinou A, et al. Dihydrolevoglucosenone (Cyrene) as a bio-based alternative for dipolar aprotic solvents. *Chem Commun.* 2014;50(68):9650-9652. doi: 10.1039/C4CC04133J
- Domínguez de María P. Biocatalysis and green solvents: trends, needs, and opportunities. In: *Biocatalysis in Green Solvents*. Elsevier; 2022:511-527. doi: 10.1016/B978-0-323-91306-5.00013-3
- Polizzi KM, Bommarius AS, Broering JM, Chaparro-Riggers JF. Stability of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol.* 2007;11(2):220-225. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.01.685
- Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, Prokop Z, Chaloupkova R, Damborsky J. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. *ACS Catal.* 2013;3(12):2823-2836. doi: 10.1021/cs400684x