

## Кристаллизация алкогольоксидазы метилотрофных дрожжей HANSEULA POLYMORPHA, перспективной для биосенсорных технологий

Бойко К.М., Липкин А.В., Ракитина Т.В., Тихонова Т.В., Тихонов А.В.

*Федеральное государственное учреждение Российский научный центр  
«Курчатовский институт», Учреждение Российской Академии наук  
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН*

Алкогольоксидаза (АО) - (КФ 1.1.3.13) – ключевой фермент метилотрофного обмена метилотрофных дрожжей, катализирует первую реакцию диссимиляционного пути превращения метанола в углекислоту (в присутствии кислорода). Незаменимость АО для метилотрофного роста дрожжей впервые была показана на мутанте *S. boidinii* с дефектом АО. АО выделена в высокоочищенном состоянии из нескольких видов метилотрофных дрожжей (удельная активность очищенного фермента в реакции окисления метанола - от 5 до 50 мкмоль/мин на мг белка). АО является флавопротеином, содержащим ФАД как простетическую группу, связанную с апоферментом нековалентными связями. Нативный белок представляет собой октамер, состоящий из 8-и идентичных субъединиц с суммарной молекулярной массой около 600 кДа. По данным спектров кругового дихроизма вторичная структура АО из разных видов дрожжей практически идентична; кинетические параметры ферментов разного происхождения также близки. Кроме метанола АО окисляет и другие первичные спирты - от этанола до гексанола. Каталитическая активность АО падает с увеличением длины углеродной цепи субстрата.

Интерес к исследованию механизма ферментативной реакции, катализируемой АО, структурных факторов, определяющих специфичность фермента, роли олигомерной структуры в катализе помимо решения фундаментальных проблем биокатализа связан с перспективами использования АО в биотехнологии. Биотехнологический потенциал АО основан на высокой активности фермента, высокой аффинности АО к субстратам, стабильности растворимых и иммобилизованных препаратов АО, а также доступности, как уже отмечалось, в клетках метилотрофно выращенных дрожжей АО составляет до 30 - 40 % клеточного белка. На основе АО созданы биосенсоры для простого, высокоселективного, высокочувствительного и точного определения концентрации низших спиртов (метанол, этанол), а также формальдегида в клинической практике для анализа биологических жидкостей, в судебной практике, в пищевой промышленности (вино-водочное производство). Наиболее перспективными являются амперометрические биосенсоры. Однако при использовании подобных биосенсоров на основе АО в пищевой промышленности для определения содержания этанола в анализах с высоким содержанием спирта (вино, пиво) высокое сродство АО к низшим спиртам оказывается существенным недостатком, поскольку ограничивает линейный интервал зависимости отклика биосенсора от концентрации спирта. Таким образом, определение этанола в этих анализах “on-line” оказывается невозможным и требуется введение дополнительной стадии разбавления анализата, что приводит к увеличению трудозатрат и сопутствующему увеличению стоимости анализа.

Одним из подходов, направленных на получение фермента с более низким сродством к субстрату, является подход, основанный на совместном использовании метода рентгеноструктурного анализа и методов биоинженерии. Данный подход позволяет направленно модифицировать остатки активного центра фермента, определяющие сродство к субстратам, не затрагивая участков молекулы фермента, влияющих на стабильность. Обязательным условием реализации данного подхода является получение пространственной структуры исследуемого фермента.

Предварительные анализы показали, что АО из *H. polymorpha* отличается от аналогичных ферментов других метилотрофных дрожжей более широким диапазоном рН-оптимума: от 7 до 11, а также более высоким температурным оптимумом каталитической активности, что делает его весьма перспективным для использования в качестве биосенсора.

Кристаллизация фермента является наиболее сложным и непредсказуемым этапом подготовки объекта к рентгеноструктурному анализу. В настоящей работе был проведен широкий скрининг условий кристаллизации фермента как в обычных условиях, так и в условиях микрогравитации. В результате были получены несколько различных условий, в которых наблюдался рост кристаллов. Полученные условия были оптимизированы для получения кристаллов большего размера. В результате были получены кристаллы в форме параллелепипеда с желтоватым оттенком, обусловленным присутствием связанным с белком молекул ФАД. Кристаллы имеют размеры порядка 500 мкм и внешне выглядят пригодными для рентгеноструктурного анализа.

Работа выполнена при поддержке гранта № 02.512.11.2297 Федерального Агентства по Науке и Инновациям.