# Кристаллизация алкогольоксидазы метилотрофных дрожжей HANSENULA 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 C. 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 анализатах 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 анализатах “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 pH-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.