Предварительная характеристика перспективных для биотехнологии оксидоредуктаз из геномов термофильных архей

Безсуднова Е.Ю., Слуцкая Э.С., Стеханова Т.Н., Попов В.О.

Учреждение Российской Академии Наук Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН

Оксидоредуктазы являются перспективными объектами биотехнологического применения: они высокоселективны и способны превращать инертные субстраты. Однако прогресс в области биотехнологического применения оксидоредуктаз сдерживается необходимостью введения акцепторов/доноров и кофакторов в реакционные смеси, а также необходимостью тщательного подбора условий реакции для протекания окислительно-восстановительного процесса в нужном направлении. Огромный потенциал имеют оксидоредуктазы для применения в медицинской диагностике и разработке новых лекарственных препаратов (дегидрогеназы и оксидазы), в биоремедиации окружающей среды (оксидазы и оксигеназы, дегалогеназы и гидроксилазы), а также в стереоселективном химическом синтезе (алкогольдегидрогеназы и дегидрогеназы аминокислот).

В рамках проводимых исследований нами охарактеризованы супероксиддисмутаза (СОД) из гипертермофильной археи Acidilobus saccharovorans (ген 0498), лейциндегидрогеназа (LeuDH) из термофильной археи Geoglobus sp. (ген 02156) и альдегиддегидрогеназа (AlDH) из термофильной археи Pyrobacullum sp. (ген 01147). Показано, что СОД относится к классу Fe-зависимых супероксиддисмутаз. Встраивание иона Fe(II) в активный центр СОД в анаэробных условиях приводит к росту активности и значительному повышению термостабильности фермента. Активность Fe(II)-активированного СОД составляет 1700 ед/мг при определении ксантиноксидазным методом [1] и превышает активность исходного препарата в 100 раз. После 66ч инкубации Fe(II)-активированного СОД при 80°С сохраняется 50% активности фермента. Время полуинактивации фермента при 90˚С и 95˚С составляет 10 часов и 2 часа, соответственно.

LeuDH и AlDH являются НАД(Н)-зависимыми дегидрогеназами, причем LeuDH строго специфична к НАД, а AlDH строго специфична к НАДФ. Оба фермента термостабильны: максимальная активность в реакции окисления субстрата для LeuDH наблюдается при 80ºС, а для AlDH при 85ºС. При 80ºС время полуинактивации LeuDH составляет 2,5 ч., однако интересно, что в первые 30 мин наблюдается термоактивация, которая приводит к повышению активности фермента на 25%. По-видимому, наблюдаемое повышение скорости ферментативной реакции – термоактивация фермента- есть следствие конформационных изменений в активном центре фермента или в белковой глобуле целиком. Термоактивация свойственна термофильным ферментам и является следствием адаптации белка к высоким температурам. Прогревание AlDH при 75ºС приводит к активации фермента на 25%. Однако фермент нестабилен и дальнейшее прогревание приводит к падению активности на 50% через 30 мин.

Проведенный анализ субстратной специфичности обеих НАД-зависимых дегидрогеназ показал, что лейцин и его производные –изолейцин и норлейцин- являются субстратами LeuDH. Реакцию окислительного деаминирования проводили в 0,2 М Gly-буфере, pH 10,5 с добавлением 0,32 М KCl, 1,1 мМ НАД и 18 мМ субстрата. Реакцию инициировали добавлением 5-30 мкг фермента в 1 мл реакционной смеси. Каталитические константы ферментативного превращения для каждого субстрата составили, соответственно: 0,03*104 с-1, 0,13*104 с-1, 0,11*104 с-1. Минимальное значение Km показано для субстрата изолейцина и составляет (1.88±0.4) мМ. Характеристику субстратной специфичности AlDH в реакции окисления альдегидов проводили при температуре 65˚С в 0.1 М фосфатном буфере pH 8.5, 0.1М NaCl. В 1 мл рабочего буфера добавляли 0.2мМ НАДФ и 5-10 мМ альдегида (пропиональ, глицеральдегид, изобутиральдегид, пирувальдегид и хлобензальдегид). Наиболее активным в реакции окисления оказался изобутиральдегид: каталитическая константа и константа Михаэлиса для реакции окисления изобутиральдегида AlDH составили 2,0*104 с-1 и (0.028 ± 0.007) мМ, соответственно. В настоящее время продолжается характеристика фермента с целью оценки биотехнологического потенциала данных объектов.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 02.740.11.0765).

Список литературы

1.Malstrom, B., Andreasson, L., and Reinhammer, B. in The Enzymes. Byer, P., editor. XIIB, Academic Press, New York, 533 (1975).