

УДК 577.15.1

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МНОГОТОЧЕЧНЫХ МУТАНТОВ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ С УЛУЧШЕННЫМИ СТАБИЛЬНОСТЬЮ И АКТИВНОСТЬЮ

Д.Л. Атрошенко^{1,2}, С.А. Зарубина^{1,2}, М.Д. Шеломов¹, И.В. Голубев^{1,2},
С.С. Савин^{1,2}, В.И. Тишков^{1,2,3*}

(¹кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; ²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; ³Институт биохимии им. А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

Оксидаза D-аминокислот (DAAO) – FAD-содержащая оксидоредуктаза, способная стереоспецифично окислять D-аминокислоты с образованием α -кетокислот, иона аммония и пероксида водорода. Наиболее важным биотехнологическим процессом с использованием DAAO является получение 7-аминоцефалоспориновой кислоты (7-АЦК) из цефалоспорина C. Из 7-АЦК затем получают цефалоспориновые антибиотики различных поколений. Ранее нами были получены мутантные DAAO из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) с точечными аминокислотными заменами, обладающие повышенной термостабильностью или улучшенными каталитическими свойствами в реакции окисления цефалоспорина C. В данной работе получены две новые мутантные TvDAAO с заменой двух и четырех аминокислотных остатков. Каталитические константы для этих мутантных TvDAAO в реакции окисления цефалоспорина C в 1,8 и 4 раза выше, чем соответствующее значение для фермента дикого типа. Объединение замен привело к увеличению температурной стабильности в 2–3 раза для обеих мутантных форм.

Ключевые слова: оксидаза D-аминокислот, цефалоспорин C, направленный мутагенез, рациональный дизайн, кинетические свойства, стабильность.

Ферменты – это природные биокатализаторы, которые широко применяются в тонком органическом синтезе и фармацевтической промышленности. Тем не менее, несмотря на преимущества ферментов перед обычными катализаторами, их использование в промышленности остается ограниченным по причине недостаточной (а часто просто низкой) стабильности и высокой стоимости получения.

Оксидаза D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO, КФ 1.4.3.3) применяется в разных биотехнологических процессах, из которых самым крупнотоннажным является биоферментный процесс (второй фермент глутарилацилаза) получения 7-аминоцефалоспориновой кислоты (7-АЦК) из цефалоспорина C [1–3]. Из этой кислоты производится более половины всех полусинтетических антибиотиков цефалоспоринового ряда [4]. Среди всех исследованных оксидаз D-аминокислот TvDAAO имеет наилучшие каталитические параметры в реакции окисления цефалоспорина C и обладает наиболее высокой температурной стабильностью [1, 2].

Ранее было показано, что мутантные формы TvDAAO с точечными заменами Phe54Tyr и

Phe54Ser [5], а также заменой S108F привели к улучшению каталитических параметров в реакции окисления цефалоспорина C по сравнению с ферментом дикого типа. Кроме того, мутантные формы TvDAAO с двойной заменой Glu32Arg/Phe33Asp и TvDAAO с точечной заменой Met156Leu обладают лучшей температурной стабильностью по сравнению с ферментом дикого типа [6]. Поэтому в данной работе было решено провести объединение мутаций в целях дальнейшего улучшения каталитических параметров в реакции окисления цефалоспорина C и повышения температурной стабильности фермента.

Экспериментальная часть

Получение плазмид, содержащих гены мутантных tvdaao

Для получения плазмиды с геном *tvdaao*, кодирующим аминокислотные замены Phe54Ser/M156L (далее для удобства будет обозначаться как TvDAAO M1), проведено объединение фрагментов генов с точечными заменами. Для этого использовали плазмиды, содержащие гены *tvdaao*, кодирующие единичные замены Phe54Ser и Met156Leu. Данные плазмиды были обработаны

рестриктазами NcoI и EcoRI, сайты рестрикции которых расположены соответственно в начале гена и в положении, соответствующем аминокислотным остаткам 81–82. Таким образом, была вырезана часть гена, содержащая замену Phe54Ser, и получен вектор, содержащий замену Met156Leu с делетированным участком NcoI–EcoRI. Фрагменты вектора и вставки были выделены, очищены, а затем было проведено их лигирование.

Плазмиды с геном *tvdaao*, кодирующим четыре замены E32R/F33D/F54Y/C108F (далее для удобства будет обозначаться как TvDAAO M2), получали введением с помощью ПЦР нуклеотидных замен, обеспечивающих двойную аминокислотную замену Glu32Arg/Phe32Asp в плазмиду, которая содержала в гене *tvdaao* две другие мутации, Phe54Tyr/Cys108Phe.

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Для введения целевых мутаций E32R/F33D в ген *tvdaao* с помощью ПЦР использовали прямой праймер на начало (For) и обратный праймер (Rev) на конец участка гена, а также прямой (Mfor) и обратный (Mrev) праймеры, несущие требуемые нуклеотидные замены в гене *tvdaao*. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Реакционная смесь содержала 2,5 мкл 10-кратного буфера для Pfu-ДНК-полимеразы (200 мМ Трис-НСl (рН 8,8 при 25°C), 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ КСl, 1 об.% Тритон X-100, 20 мМ MgSO₄), а также 2,5 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, концентрация каждого компонента 2,5 мМ); 1 мкл ДНК-матрицы (~10 нг/мкл); по 2 мкл праймеров For и Mrev (или Mfor и Rev) с концентрацией 10 пмоль/мл («Синтол», Россия); 0,5 мкл Pfu-ДНК-полимеразы (2,5 Ед/мкл, «Fermentas») и деионизованную воду. Общий объем смеси составлял 25 мкл.

Для введения двойной замены Glu32Arg/Phe32Asp на первом этапе проводили две полимеразные цепные реакции (ПЦР) с использованием пар праймеров For/Mrev (фрагмент 1) и Mfor/Rev (фрагмент 2). Полученные фрагменты 1 и 2 очищали из 1%-го агарозного геля. Затем проводили

третью, объединяющую, ПЦР с праймерами For и Rev, где в качестве ДНК-матрицы использовали полученные ранее фрагменты 1 и 2. Продукт третьей ПЦР очищали аналогично фрагментам 1 и 2 и обрабатывали определенными эндонуклеазами рестрикции. Затем полученный ПЦР-фрагмент снова очищали и лигировали с обработанной теми же эндонуклеазами рестрикции плазмидой pDAAO2. Реакционной смесью после лигирования трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5 α . Для контроля введения требуемых мутаций проводили секвенирование плазмидной ДНК в центре коллективного пользования «Геном».

Культивирование рекомбинантных штаммов *E. coli* – продуцентов мутантных TvDAAO и получение очищенных препаратов ферментов

Экспрессию TvDAAO и ее мутантов проводили в клетках *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus/pLysS согласно методике [5]. Для получения штамма-продуцента компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS трансформировали соответствующей плазмидой, несущей ген *daao* и высевали на чашки Петри с агаризованной средой и антибиотиками – хлорамфениколом (25 мкг/мл) и канамицином (30 мкг/мл). Для приготовления посевного материала с чашки отбирали единичную колонию и культивировали в течение ночи на среде 2YT в присутствии глюкозы (5 г/л), канамицина (30 мкг/мл) и хлорамфеникола (25 мкг/мл) при 37 °C и 180 об/мин. Утром клетки пересеивали на свежую среду (разбавление 1:100) и культивировали при 30 °C и 120 об/мин до достижения величины поглощения $A_{600} \approx 1,0$ ($\lambda = 600$ нм). Посевной материал вносили в колбы для культивирования в количестве 10% от общего объема среды, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 5 г/л глюкозы. Культивирование проводили в конических колбах с отбойниками объемом 1 л (объем среды составлял не более 15% от объема колбы) при 30 °C и 90 об/мин до достижения поглощения клеток $A_{600} \approx 1,0$, затем осуществляли индукцию экспрессии фермента добавлением в среду ИПТГ до концентрации

Таблица 1

Олигонуклеотидные праймеры, использованные для введения двойной замены Glu32Arg/Phe32Asp

Праймер	Олигонуклеотид
Mfor	5'-A ATT GTG TCC AGG GAT ACG CCC GGT GAT CTT AGT ATC-3'
Mrev	5'-GGC GTA TCC CTG GAC ACA ATT GTA ACC TCA TGT CC-3'
T7_For	5'-GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3'
Rev_4	5'-GGA AGA GAG TTT CGA ACA AGG ACG AC-3'

0,1 мМ. После индукции клетки культивировали в течение 24 ч при 22 °С и 90 об/мин. По окончании культивирования колбы охлаждали во льду, затем клетки осаждали на центрифуге «Eppendorf 5804R» (6000 об/мин, 5 мин, +4 °С). Полученный осадок ресуспендировали в 20 мМ буфере Трис-НСl (рН 8,0) в соотношении по массе 1:4 и помещали на холод (–20 °С).

Для выделения фермента суспензию клеток разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора «Branson Sonifier 250» (Германия) при постоянном охлаждении. Осадок удаляли центрифугированием на центрифуге «Eppendorf 5804R» (13 000 об/мин, 30 мин, +4 °С). Полученный бесклеточный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Вторая стадия очистки фермента включала ионообменную хроматографию на колонке MonoQ HR 10/10 с использованием прибора «FPLC» фирмы «Pharmacia Biotech» (Швеция). Раствор фермента наносили на колонку в 20 мМ Трис-НСl (рН 8,0). Десорбцию фермента проводили в линейном градиенте 0–1 М NaCl, 20 мМ Трис-НСl (рН 8,0) со скоростью 2,0 мл/мин, контролируя активность ДААО в собранных фракциях. Заключительной стадией очистки стала гель-фильтрация на колонке 1×10 см с носителем Sephadex G-25 («Pharmacia», Швеция) в 0,1 М КФБ (рН 8,0). Чистоту препаратов фермента на всех стадиях определяли с помощью белкового электрофореза в денатурирующих условиях.

Определение концентрации ферментов и их активности

Концентрацию активного белка рассчитывали по концентрации связанного с ферментом окисленного FAD, измеряя поглощение ($\lambda = 455$ нм) на спектрофотометре «UV-1800» («Shimadzu», Германия). Активность TvDAAO и ее мутантов определяли согласно [7]. В кювету спектрофотометра (рабочий объем 1 мл, оптический путь 1 см) добавляли 50 мМ КФБ (рН 8,0), предварительно насыщенного воздухом; 100 мМ раствора D-Met в 50 мМ КФБ до объема 970 мкл; 20 мкл раствора АБТС (16 мг/мл) в воде и 10 мкл раствора пероксидазы в 50 мМ КФБ (1 мг/мл). После термостатирования кюветы в течение 10 мин в нее добавляли пробу фермента соответствующей концентрации (30 мкл). Определение активности проводили при 30 °С по накоплению продукта окисления АБТС на длине волны 414 нм ($\epsilon_{414} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на спектрофотометре «UV-1800» («Shimadzu», Германия).

Изучение температурной стабильности ДААО

Температурную стабильность ДААО изучали в 0,1 М КФБ (рН 8,0) в диапазоне 52–62 °С с шагом 2 °С. Для эксперимента готовились серии из пластиковых пробирок объемом 0,5 мл, содержащих 100 мкл фермента. Пробирки помещали в предварительно нагретый до нужной температуры водный термостат (точность термостатирования $\pm 0,1$ °С). Через определенные промежутки времени пробирки вынимали, охлаждали в течение 1–2 мин во льду и измеряли активность, как описано выше. Интервал между отбором проб подбирали таким образом, чтобы за время эксперимента активность фермента уменьшилась до 10–15% от исходной величины. Для определения констант инактивации строили зависимость остаточной активности от времени.

Определение каталитических параметров в реакции окисления цефалоспорина С

Реакцию окисления цефалоспорина С проводили в открытых пластиковых пробирках объемом 1,5 мл при перемешивании (1400 об/мин, 30 °С). Общий объем смеси составлял 500 мкл. Реакционная смесь содержала заданное количество цефалоспорина С в 0,1 М КФБ (рН 8,0), насыщенном кислородом. Реакцию запускали добавлением TvDAAO. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы объемом 50 мкл, останавливали реакцию, добавляя 50 мкл 0,1 М НСl, и анализировали состав проб с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Kromasil C18 (125 мм × 4,0 мкм; «ХроМасс», Россия) [8]. В качестве элюента использовали CH_3COONa (200 мМ), ацетонитрил (5 об.%), рН 5,3.

Содержание цефалоспорина С в реакционной смеси определяли на основании полученных хроматограмм по величине площади пика, отвечающего исходному субстрату. Для определения начальной скорости каталитической реакции использовали точки в линейном по времени диапазоне изменения концентрации цефалоспорина С. Концентрацию фермента TvDAAO подбирали таким образом, чтобы обеспечить скорость реакции в интервале от 0,1 до 1,0 мМ/мин.

Величины k_{cat} и K_{M} рассчитывали с помощью уравнения Михаэлиса–Ментен на основании полученных значений начальной скорости реакции при разных значениях начальной концентрации цефалоспорина С.

Результаты и их обсуждение

Получение мутантных TvDAAO

Как уже было указано в разделе «Экспериментальная часть», плазмиды с геном *tvdaao*, кодирующим двойную замену Phe54Ser/M156L (TvDAAO M1) были получены объединением фрагментов генов с точечными заменами. В случае мутанта с четырьмя аминокислотными заменами (TvDAAO M2) двойную мутацию Glu32Arg/Phe32Asp вводили с помощью ПЦР в плазмиду с двойной мутацией Phe54Tyr/Cys108Phe. Для каждого из мутантов были выделены по две плазмиды, и фрагменты с мутантными генами *tvdaao* были секвенированы по обеим цепям в ЦПК «Геном». Секвенирование показало, что все плазмиды содержали только необходимые замены.

Для экспрессии мутантных TvDAAO клетки *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus /pLysS были трансформированы полученными плазмидами. Все ферменты синтезировали в активной и растворимой формах.

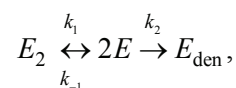
Результаты очистки представлены в табл. 2, где показано, что удельная активность мутантных TvDAAO с D-Met уменьшилась по сравнению с таковой для TvDAAO дикого типа. Такое уменьшение удельной активности оказалось результатом снижения удельной активности с D-Met для TvDAAO с заменами Phe54Ser и Phe54Tyr [5]. Данные аналитического электрофореза в ПААГ в присутствии SDS-Na (рис. 1) свидетельствуют, что все ферменты имели чистоту не менее 95%. После получения высокоочищенных препаратов мутантных TvDAAO нами была изуче-

на температурная стабильность и определены кинетические параметры в реакции окисления цефалоспорина C.

Изучение температурной стабильности

Температурную стабильность полученных мутантов изучали по кинетике термоинактивации при разных значениях температуры (конкретный диапазон температуры определялся стабильностью исследуемого фермента). На рис. 2 представлены зависимости остаточной активности от времени для полученных многоточечных мутантных TvDAAO и фермента дикого типа (10 мкг/мл) при 56 °С. Объединение замен привело к повышению температурной стабильности. В случае TvDAAO M2 эффект стабилизации оказался выше, чем для TvDAAO M1. Повышенная температурная стабильность TvDAAO M1 и TvDAAO M2, по сравнению с таковой для фермента дикого типа, объясняется повышением термостабильности за счет замен Met156Leu и Glu32Arg/Phe33Asp/Cys108Phe в мутантах TvDAAO M1 [6] и TvDAAO M2 соответственно. Аналогичные зависимости наблюдаются для всего диапазона исследуемых значений температуры.

Ранее было показано, что для рекомбинантной TvDAAO дикого типа при концентрации ниже 40 мкг/мл в диапазоне температуры 50–60 °С реализуется диссоциативный механизм термоинактивации [9].



где E_2 – активный димер, E – неактивный мономер, E_{den} – денатурированный мономер. Данный меха-

Таблица 2

Результаты очистки мутантных ферментов и TvDAAO дикого типа

Параметр	Форма фермента		
	TvDAAO M1	TvDAAO M2	wt-TvDAAO
Выход после стадии анионообменной хроматографии, %	66	100	88
Выход после стадии гель-фильтрации, %	100	86	100
Общий выход после очистки, %	66	86	88
Общий выход белка после очистки, мг	180	120	170
Чистота препарата по результатам SDS-ПААГ, %	>95	>95	>95
Отношение A_{280}/A_{455}	8,2	9,4	8,3
Удельная активность с D-Met, ед/мг	43	57	139

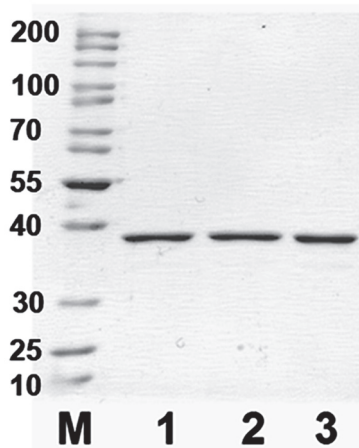


Рис. 1. Аналитический электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия препаратов мутантных TvDAAO M1 (1), TvDAAO M2 (2) и фермента дикого типа (3). М – маркер, молекулярной массы (кДа)

низм называется диссоциативным. Он был подробно проанализирован О.М. Полтораком и соавт. [10]. В случае протекания инактивации фермента по диссоциативному механизму зависимости остаточной активности от времени описываются двойной экспонентой типа

$$y = A \cdot \exp(-k_1 \cdot x) + B \cdot \exp(-k_2 \cdot x).$$

Данные по кинетике термоинактивации полученных мутантов свидетельствуют, что они тоже инактивируются по диссоциативному механизму.

Нами были определены значения констант k_1 , k_2 и K_{dis} (k_{-1}/k_1) для TvDAAO M1 и TvDAAO M2

(табл. 3). Из табл. 3 видно, что значения констант скорости инактивации k_1 и k_2 для мутантных ферментов в среднем в 2–3 раза ниже, чем соответствующие значения для TvDAAO дикого типа. Однако в случае TvDAAO M1 наблюдается увеличение константы диссоциации, чем и обусловлена более низкая температурная стабильность TvDAAO M1 по сравнению с TvDAAO M2.

Определение каталитических параметров TvDAAO M1 и TvDAAO M2 в реакции окисления цефалоспорины С

Как уже отмечалось выше, окисление цефалоспорины С с помощью TvDAAO является частью биферментного биокаталитического процесса получения 7-АЦК. Получение мутантных TvDAAO с улучшенными кинетическими параметрами в этой реакции является одной из актуальных задач по белковой инженерии фермента. Мы определили кинетические параметры мутантных TvDAAO и TvDAAO дикого типа в реакции окисления цефалоспорины С методом стационарной кинетики (табл. 4). Из табл. 4 видно, что объединение замен привело к значительному увеличению каталитических констант по сравнению с ферментом дикого типа. Для TvDAAO M1 и TvDAAO M2 каталитические константы увеличились примерно в 2 и 4 раза соответственно. В случае мутанта TvDAAO M1 наблюдается уменьшение константы Михаэлиса примерно в 1,8 раза, в то время как объединение замен в мутанте TvDAAO M2 не повлияло на этот параметр. Значения катали-

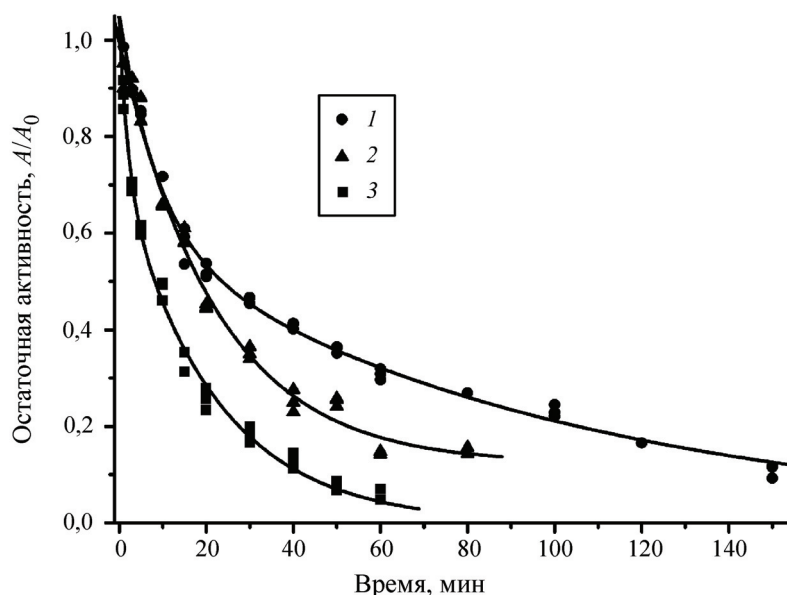


Рис. 2. Зависимость остаточной активности от времени для мутантных TvDAAO M2 (1), TvDAAO M1 (2), и фермента дикого типа wt-TvDAAO (3) при 56°C (0,1 М КФБ; pH 8,0; концентрация ферментов 10 мкг/мл)

Т а б л и ц а 3

Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации TvDAAO дикого типа и ее мутантов*

Форма TvDAAO	Параметр**	Температура, °С					
		52	54	56	58	60	62
wt-TvDAAO	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	1,27	1,34	6,0	9,3	14,6	н.о.
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	3,67	9,2	11,6	21,5	40,5	н.о.
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	3,13	5,6	7,1	10,8	19,4	н.о.
TvDAAO M1	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	н.о.	8,1	8,8	3,5	30	40
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	н.о.	3,3	4,9	18,3	20	36
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	н.о.	1,51	2,4	2,4	8,6	27
TvDAAO M2	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	0,33	0,76	2,55	7,1	7,5	н.о.
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	2,00	3,12	5,07	7,1	14,6	18,7
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	1,37	2,08	2,64	3,39	9,0	16,9

* Ошибка эксперимента составляла не более 15%; ** Серым фоном и полужирным шрифтом выделены значения констант, величины которых понизились по сравнению с таковыми для wt-TvDAAO. н.о. – не определяли.

Т а б л и ц а 4

Каталитические параметры окисления цефалоспорина C для мутантов TvDAAO M1, TvDAAO M2 и фермента дикого типа wt-TvDAAO

Форма TvDAAO	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	Каталитическая эффективность $k_{cat}/K_M, c^{-1}mM^{-1}$
wt-TvDAAO	27±2	3,9±0,5	6,9±1,2
TvDAAO M1	55±5	2,2±0,8	25±9
TvDAAO M2	100±20	3,5±2,0	29±17

тической эффективности k_{cat}/K_M для мутантов TvDAAO M1 и TvDAAO M2 увеличились в 3,5–4 раза (табл. 4). Полученные значения каталитических констант находятся в хорошем согласии с соответствующими значениями для мутантов TvDAAO F54S [5] и TvDAAO F54Y/C108F.

Таким образом, были получены две мутантные формы TvDAAO M1 и vDAAO M2 с двойной Phe54Ser/M156L и четверной Glu32Arg/Phe32Asp/Phe54Tyr/Cys108Phe аминокислотными заменами соответственно. Объединение единичных замен в многоточечные мутанты привело к увеличению температурной стабильности ферментов. Периоды полуинактивации для TvDAAO M1 и TvDAAO M2 при 56 °С увеличились примерно в 2–3 раза по

сравнению с ферментом дикого типа. Значения констант скорости k_1 и k_2 для первой и второй стадий диссоциативной инактивации в случае TvDAAO M1 и TvDAAO M2 уменьшились примерно в 2–3 раза, по сравнению с таковыми для TvDAAO дикого типа (табл. 3).

Объединение положительных замен привело к получению мутантов не только с повышенной термостабильностью, но и с улучшенными кинетическими параметрами в реакции окисления цефалоспорина C (табл. 4). Двухнаправленное улучшение свойств мутантных TvDAAO M1 и TvDAAO M2 делает их перспективными в целях разработки на их основе биокатализаторов для процесса получения 7-АЦК из цефалоспорина C.

Данная работа выполнена при поддержке программы «У.М.Н.И.К.» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проекты № 10239ГУ2/2015 и № 10708ГУ2/2015) и Российского научного фонда (проект № 16-14-00043).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khoronenkova S.V., Tishkov V.I.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2008. Vol. 73. N 13. P. 1511.
2. *Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Piloni M.S.* // *Appl. Microbiol. Biot.* 2008. Vol. 78. N 1. P. 1.
3. *Pollegioni L., Molla G.* // *Trends. Biotechnol.* 2011. Vol. 29. N 6. P. 276.
4. *Barber M.S., Giesecke U., Reichert A., Minas W.* // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2004. Vol. 88. P. 179.
5. *Комарова Н.В., Голубев И.В., Хороненкова С.В., Тишков В.И.* // *Изв. АН. Сер. Химическая*. 2012. Т. 61. № 7. С. 1472. (*Komarova N.V., Golubev I.V., Khoronenkova S.V., Tishkov V.I.* // *Russ. Chem. Bull.* 2012. Vol. 61. N 7. P. 1489).
6. *Атрошенко Д.Л., Голубев И.В., Савин С.С., Тишков В.И.* // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2016. Т. 57. № 4. С. 252 (*Atroshenko D.L., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I.* // *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 2016. Vol. 71. N 4. P. 243).
7. *Савин С.С., Чернышев И.В., Тишков В.И., Хороненкова С.В.* // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2006. Т. 47. № 1. С. 25 [*Savin S.S., Chernyshov I.V., Tishkov V.I., Khoronenkova S.V.* // *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 2006. Vol. 61. N 1. P. 13].
8. *Голубев И.В., Комарова Н.В., Скиргелло О.Е., Осипова Т.А., Тишков В.И.* // *Вестн. Моск. ун-та, Сер. 2. Химия*. 2014. Т. 55. № 2. С. 93 [*Golubev I.V., Komarova N.V., Skirgello O.E., Osipova T.A., Tishkov V.I.* // *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 2014. Vol. 69. N 2. P. 68].
9. *Тишков В.И., Хороненкова С.В.* // *Биохимия*. 2005. Т. 70. № 1. С. 51 (*Tishkov V.I., Khoronenkova S.V.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. Vol. 70. N 1. P. 40).
10. *Полторак О.М., Чухрай Е.С., Торшин И.Ю.* // *Биохимия*. 1998. Т. 63. С. 360 (*Poltorak O.M., Chukhray E.S., Torshin I.Y.* // *Biochemistry (Moscow)*. 1998. Vol. 63. N 3. P. 303).

Поступила в редакцию 21.05.17

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MULTI-POINTS MUTANTS OF THE YEAST D-AMINO ACID OXIDASE WITH IMPROVED STABILITY AND ACTIVITY

D.L. Atroshenko^{1,2}, S.A. Zarubina^{1,2}, M.D. Shelomov¹, I.V. Golubev^{1,2}, S.S. Savin^{1,2}, V.I. Tishkov^{1,2,3*}

¹Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; ²Innovations and High Technologies MSU Ltd; ³A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences; *e-mail: vitishkov@gmail.com

D-amino acid oxidase (DAAO) is a FAD-containing oxidoreductase which stereospecifically oxidizes D-amino acids producing α -keto-acids, ammonium ion and hydrogen peroxide. The most important application of DAAO is Cephalosporin C oxidation in biocatalytic process of preparation of 7-amino cephalosporanic acid. Recently single-point mutants of DAAO from yeast *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) with increased thermal stability or (and) improved activity with Cephalosporin C have been prepared in our laboratory. In present work some positive amino changes were combined to produce mutant TvDAAOs with two and four amino changes (TvDAAO M1 and TvDAAO M2, respectively). As result catalytic constants increased about 1,8 and 4-fold in comparison with wild-type enzyme. Thermal stability of mutant TvDAAOs were 2-3-fold higher compared to wt-TvDAAO.

Key words: D-amino acid oxidase, Cephalosporin C, site-directed mutagenesis, rational design, kinetic properties, thermal stability.

Сведения об авторах: *Атрошенко Денис Леонидович* – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; *Зарубина София Александровна* – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; *Шеломов Михаил Дмитриевич* – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; *Голубев Игорь Владимирович* – науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; *Савин Святослав Сергеевич* – науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук; *Тишков Владимир Иванович* – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com).