

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ДВУХФАЗНЫХ СИСТЕМ

С.А. Зарубина^{1,2}, В.В. Федорчук^{1,3}, С.С. Савин^{1,2}, В.И Тишков^{1,2,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»

³Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН, ФИЦ Биотехнологии РАН

Москва, Россия

zarubina.sophia@gmail.com

Формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) применяется в качестве биокатализатора регенерации NAD(P)H в процессах синтеза оптически активных и лекарственных соединений. Одним из таких ферментов является ФДГ из дрожжей *Candida boidinii* (СбоФДГ). Этот фермент используется в промышленном процессе получения L-tert-лейцина, который вплоть до настоящего времени является самым крупномасштабным процессом хирального синтеза с помощью очищенных ферментов [1]. Профессором М.-Р. Кулой и соавт. [2] был разработан метод двухстадийной очистки СбоФДГ в двухфазных системах на основе вода–полиэтиленгликоль–соль. На первом этапе фермент экстрагируется в верхнюю органическую фазу. После установления равновесия между фазами верхняя отделяется и создается новая система за счет добавления дополнительных количеств соли и воды. Фермент на второй стадии переходит в водную фазу и отделяется от органической.

В нашей лаборатории была клонирована ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseФДГ). Были получены различные мутанты этого фермента и показано, что PseФДГ превосходит СбоФДГ как по каталитической активности, так и по стабильности [3]. Также была показана возможность проведения очистки PseФДГ в двухфазных системах. Целью данной работы является многопараметрическая оптимизация состава двухфазных систем для достижения максимальной степени очистки и высокого выхода рекомбинантной PseФДГ. Особенностью нашего процесса является введение стадии термообработки суспензии разрушенных клеток перед созданием первой системы. Показано, что стадия термообработки увеличивает чистоту препарата и положительно влияет на эффективность распределения компонентов бесклеточного экстракта в двухфазных системах. Также проведены оптимизации состава (концентрации компонентов и pH среды) первой и второй систем. В результате после использования такой системы был получен препарат ФДГ 80% чистоты (очистка более чем в два раза) с выходом 80%.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-34-01320 мол_а).

1. Wichmann, R., Wandrey, C., Buckmann, A. F., and Kula, M. R. (1981) *Biotechnol. Bioeng.*, v.23, p.2789-2802.
2. Hummel, W., and Kula, M. R. (1989) *Eur. J. Biochem.*, v.184, p.1-13.
3. Tishkov, V.I., and Popov, V.O. (2006) *Biomol. Eng.*, v.23, p.89-110.