

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-95

**ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ О-АЦЕТИЛГОМОСЕРИНСУЛЬФИДРИЛАЗЫ
В БАКТЕРИЯХ *ESCHERICHIA COLI******HETEROLOGOUS EXPRESSION OF O-ACETYLHOMOSERINE
SULFHYDRYLASE IN *ESCHERICHIA COLI***

А. А. Привалова, Т. В. Выборная, Д. М. Бубнов, А. А. Степанова, А. А. Хозов, С. В. Молев, С. П. Синеокий

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

A. A. Privalova, T. V. Vybornaya, D. M. Bubnov, A. A. Stepanova, A. A. Khozov, S. V. Molev, S. P. Sineoky

National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow

✉ melisskaasia123@yandex.ru

Аннотация

В работе представлены результаты экспрессии в клетках *E. coli* трех гетерологичных О-ацетилгомосеринсульфидрилаз из *P. aeruginosa*, *C. violaceum*, *P. putida*, катализирующих финальную реакцию пути синтеза L-метионина. Продемонстрирована успешная биотрансформация О-ацетилгомосерина в L-метионин *in vitro*, опосредованная ферментом MetY и бактерий *P. putida*.

Abstract

The work presents the results of expression in *E. coli* cells of three heterologous O-acetylhomoserine sulfhydrylases from *P. aeruginosa*, *C. violaceum*, *P. putida* catalyzing the final reaction of the L-methionine synthesis pathway. We demonstrated the successful biotransformation of O-acetylhomoserine into L-methionine *in vitro*, mediated by the MetY enzyme and *P. putida*.

Настоящая работа посвящена разработке технологии биосинтеза L-метионина. Незаменимая аминокислота L-метионин играет ключевую роль в процессе синтеза белков, помогая поддерживать их стабильность и функциональность, используется для балансировки кормов в промышленном птицеводстве и свиноводстве, для подкормки дойных коров, а в последнее время — и в рыбоводстве. Применение синтетического DL-метионина в органическом животноводстве запрещено, поэтому биотехнологическое получение L-метионина является сегодня актуальной задачей [1].

В настоящий момент L-метионин получают двумя способами: путем химического и микробиологического синтеза. Биотехнологический способ синтеза, а именно путем культивирования таких микроорганизмов, как *Escherichia coli* и *Corynebacterium glutamicum* [2], имеет ряд значительных преимуществ перед химическим. В научной литературе показана эффективность использования двухстадийного подхода микробиологического синтеза L-метионина. Этот подход подразумевает на первой стадии биосинтез предшественника L-метионина, О-ацетилгомосерина, и его конверсию в L-метионин с помощью О-ацетилгомосеринсульфидриказы на второй стадии [3].

Целью представленной работы является гетерологичная экспрессия О-ацетилгомосеринсульфидриказы в бактериях *E. coli* и проведение реакции синтеза L-метионина из О-ацетилгомосерина с помощью этого фермента.

В работе экспрессированы гены О-ацетилгомосеринсульфидриказ *metZ Pseudomonas aeruginosa*, *metY P. putida* и *metZ Chromobacterium violaceum* в бактериях *E. coli* и охарактеризована ферментативная активность продуктов этих генов. По результатам измерения ферментативной активности наиболее перспективным оказались ферменты MetY *P. putida* и MetZ *C. violaceum*. Для этих ферментов определены температурные и pH-оптимумы и подобраны условия для длительного хранения. Установлено, что О-ацетилгомосерин-сульфидриказа, полученная из *P. Putida*, обладает более высокой ферментативной активностью по сравнению *C. violaceum*, 44 ± 2 (55 °C и pH 7,5) против $12 \pm$ ед/мг общего белка (45 °C и pH 7,0), соответственно.

Для фермента MetY из *P. putida* была исследована устойчивость к ингибированию L-метионином. При увеличении содержания L-метионина 50 г/л фермент сохраняет активность на уровне 12 %, что позволяет считать возможным разработать технологию конверсии, при которой L-метионин синтезируется в концентрации 50 г/л и выше.

* Исследование выполнено в рамках Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» и при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (№ 075-15- 2019-1659).

Заключительным этапом работы была успешно продемонстрирована биотрансформация *in vitro* О-ацетилгомосерина в L-метионин в присутствии метантиола, опосредованная ферментом MetY и бактерий *Pseudomonas putida*. Конверсия трансформации составила 40 % масс.

Ожидается, что благодаря отечественной разработке технология синтеза L-метионина в обозримом будущем станет конкурентоспособной по сравнению с химическим синтезом аминокислоты и с мощностью, достаточной для импортозамещения на российском рынке.

Литература

1. Лившиц В. А., Бубнов Д. М., Шустикова Т. Е. и др. Перспективы получения L-метионина с использованием биотехнологических методов на основе *Escherichia coli* и *Corynebacterium glutamicum*. Ч. 1. Применение, методы получения L-метионина и регуляция его биосинтеза у бактерий // Биотехнология. 2023. Т. 39, № 4. С. 3–28.
2. Shiozaki T., Inoue G. Process for producing methionine // Patent Application US20070055078 A1, C07C 323/25, publ. 2007.
3. Kim S., Cho K., Shin Y. et al. Microorganism producing L-methionine precursor and method of producing L-methionine and organic acid from the L-methionine precursor // Patent Appl. WO2008013432 A1, C12P 13/12, publ. 2008.