**Стабилизация трансаминазы из *Blastococcus saxobsidens* методом сайт-направленного мутагенеза**

***Петрова Е.С.1, Шилова С.А.1,2, Попов В.О.2,3, Безсуднова Е.Ю.2***

*Студент, 6 курс специалитета*

*1Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*2Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*

*3Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*Биологический факультет, Москва, Россия*

*E-mail: lispetrova@gmail.com*

Трансаминазы D-аминокислот (D-amino acid aminotransferase, DAAT, КФ 2.6.1.21) – это пиридоксаль-5’-фосфат (PLP)-зависимые ферменты, катализирующие стереоселективный и обратимый перенос аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту с образованием новых амино и кетопродуктов [1]. Трансаминазы представляют интерес для биотехнологии как биокатализаторы стереоселективного аминирования. Среди известных DAAT выделяют неканонические трансаминазы, которые активны как с D-аминокислотами, так и с первичными (*R*)-аминами. К таким ферментам относится недавно охарактеризованная трансаминаза из *Blastococcus saxobsiden* (Blasa) [2].

Blasa катализирует деаминирование D-аминокислот и первичных (*R*)-аминов, аминирование альфа-кетокислот, но не аминирует кетоны. Температурный оптимум Blasa в реакциях с D-аминокислотами составляет 40 °С, в реакциях с (*R*)-аминами – 30 °С. Однако, Blasa нестабильна в рабочих условиях: наблюдается утечка кофактора, которая сопровождается образованием апоформы и ее агрегацией. Для повышения стабильности Blasa на основе расчетов энергетического выигрыша в программе FireProt [3] были побраны двойные и тройные аминокислотные замены, заполняющие гидрофобные полости (A133V/T209L/P213S, BlasaM3) и образующие солевые мостики на поверхности белковой глобулы (A198R/G146R, BlasaM1). Далее варианты BlasaM1 и BlasaМ3 были созданы методом сайт-направленного мутагенеза и получены в рекомбинантной форме.

Анализ термической денатурации BlasaWT и её вариантов методом кругового дихроизма при длине волны 210 нм показал изменение вида спектра плавления КД для варианта BlasaM1 и BlasaM3. Проанализирована термостабильность ферментов в 50 мМ K-фосфатном буфере, pH 8.0 при 30 и 40 °С без добавления кофактора и в присутствии избытка PLP. Добавление свободного кофактора улучшает стабильность исследуемых ферментов при 40 °С, а период полуинактивации BlasaM3 при той же температуре увеличился в 3 раза по сравнению с BlasaWT.

*Работа поддержана грантом* РНФ № 19-14-00164.

**Литература**

1. Bezsudnova E. Y., Popov V. O., Boyko K. M. Structural insight into the substrate specificity of PLP fold type IV transaminases // Applied Microbiology and Biotechnology volume. 2020. Vol. 104. P. 2343–2357.
2. Shilova S.A., et al. Expanded Substrate Specificity in D-Amino Acid Transaminases: A Case Study of Transaminase from Blastococcus saxobsidens // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24. P. 16194-16194.
3. Musil M. et al. FireProt: web server for automated design of thermostable proteins // Nucleic Acids Research. 2017. Vol. 45 (W1). P. W393–W399.