

Биогбридные технологии в действии: использование живых микроорганизмов в органическом синтезе

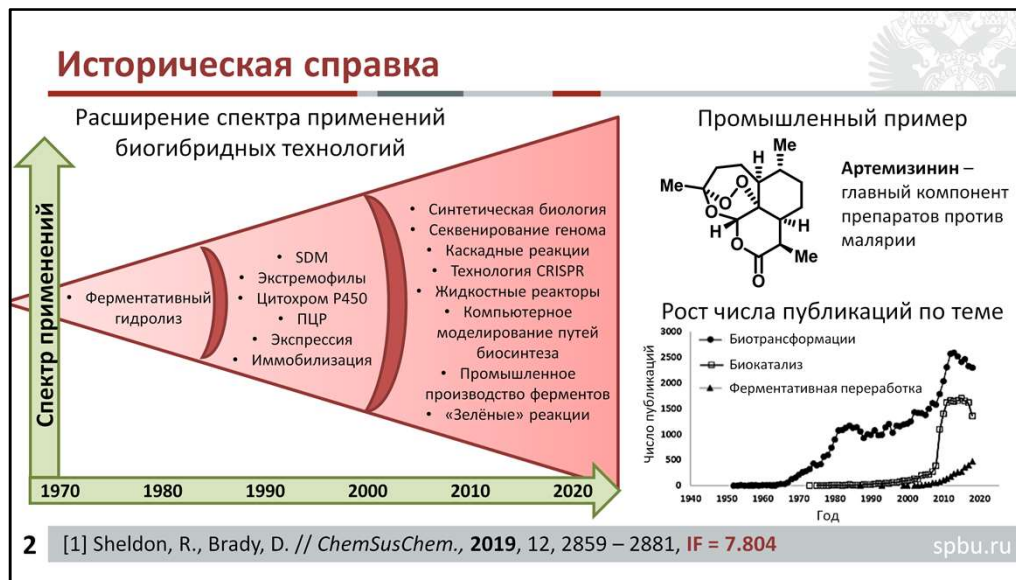
Команда №13

Москвичев Д.О.¹, Богданова П.Д.², Голубев А.А.¹

¹ *Кафедра органической химии*

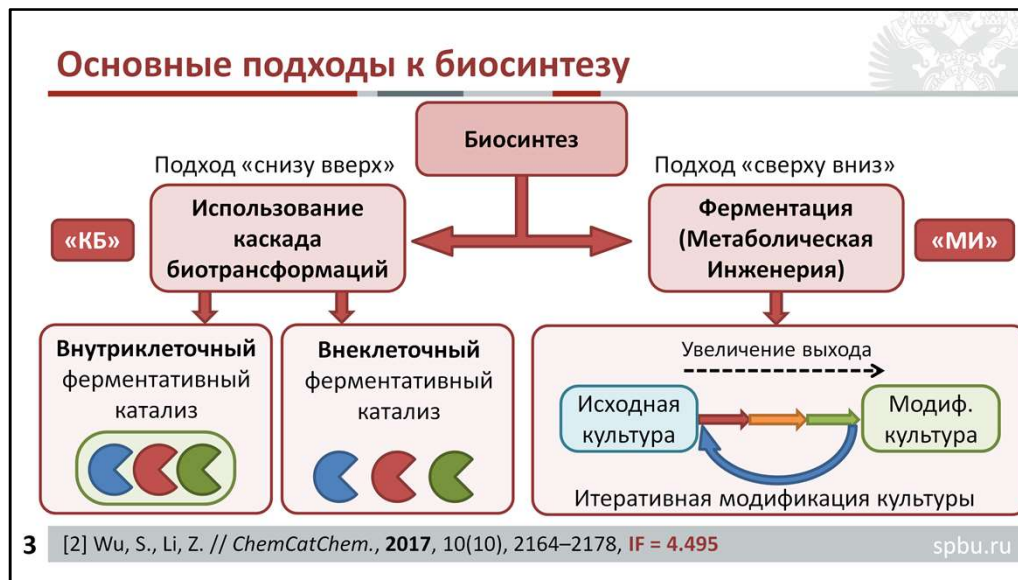
² *Кафедра аналитической химии*

Добрый день, сегодня наша команда представляет доклад на тему «**Биогбридные технологии в действии:
использование живых микроорганизмов в органическом синтезе**»



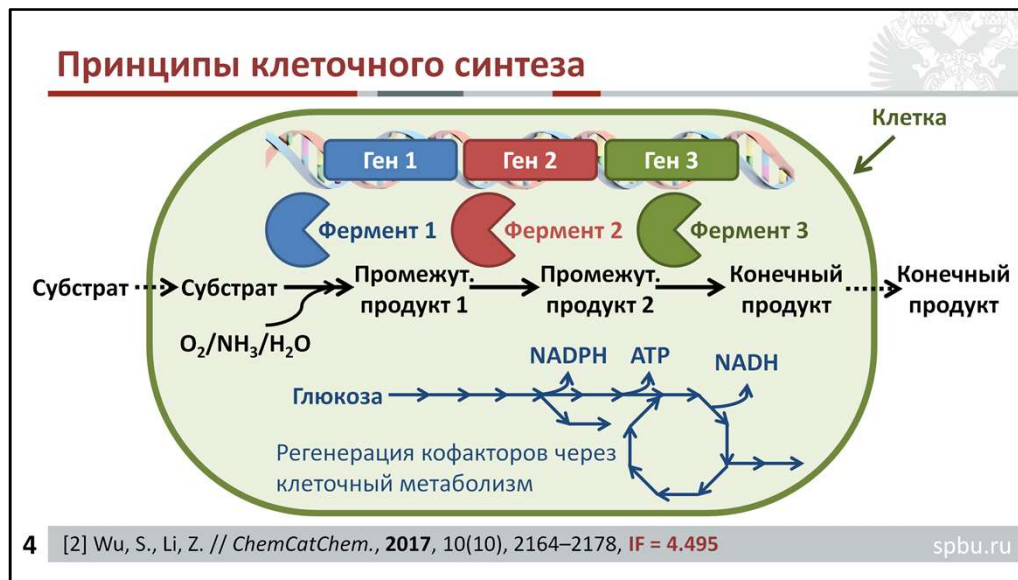
Начать хотелось бы с некоторой исторической справки о применении биогбридных технологий. Использование живых микроорганизмов в органическом синтезе тесно связано с ферментативным катализом. Бурное развитие данного направления началось в семидесятых годах прошлого столетия и продолжается по сей день. На рисунке слева изображено увеличение диапазона применений биогбридных технологий и их развитие во времени. Использование живых организмов в органическом синтезе прошло путь от отдельных видов ферментативного катализа до широкого спектра биогбридных подходов и стало неотъемлемой частью современной науки и промышленности. В качестве примера фармацевтического соединения, получаемого с помощью биосинтеза, можно привести артемизинин – главный компонент препаратов против малярии.

Актуальность данного научного направления можно подтвердить ростом числа публикаций по смежным темам с течением времени, проиллюстрированном на графике справа.



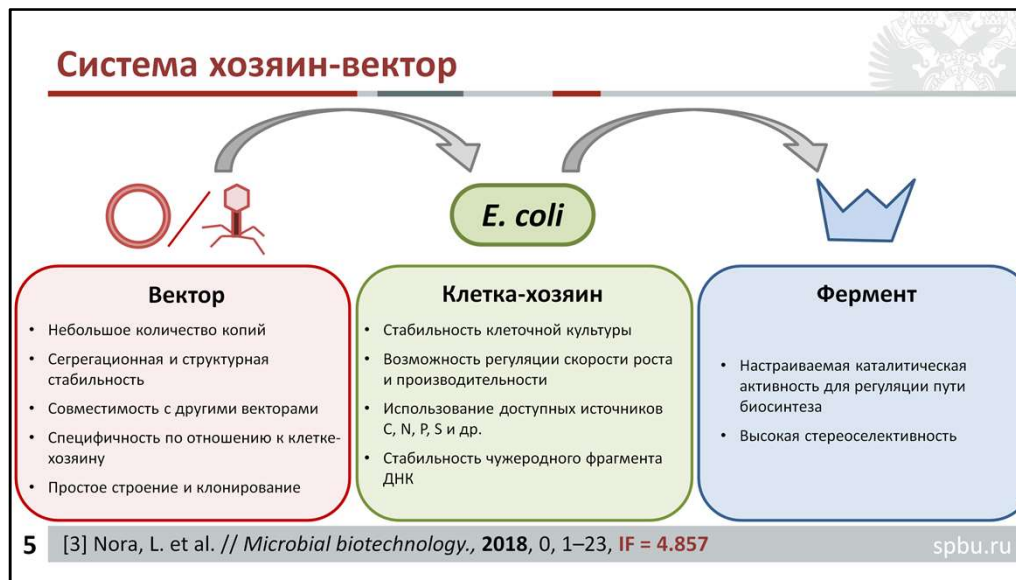
Существует два основных подхода к использованию микроорганизмов в органическом синтезе: использование каскадных биотрансформаций и ферментация, называемая также метаболической инженерией. Здесь и далее на слайдах они будут обозначаться соответствующими аббревиатурами («КБ» и «МИ»). Эти подходы тесно связаны друг с другом и во многом очень похожи, однако между ними существуют некоторые существенные отличия.

Каскадная биотрансформация отличается от ферментации в двух аспектах: 1) биокаталитический каскад часто проектируется и строится за счет объединения простых реакций в сложную цепь последовательных превращений (подход снизу вверх) и в значительной степени не связан с клеточным метаболизмом, за исключением регенерации кофакторов. В свою очередь ферментация основана на уже существующем клеточном метаболизме (подход сверху вниз).; 2) субстрат в каскадной биотрансформации предназначен только для синтеза продукта, тогда как субстрат в метаболической инженерии предназначен и для синтеза продукта, и для выращивания клеток (источник углерода).

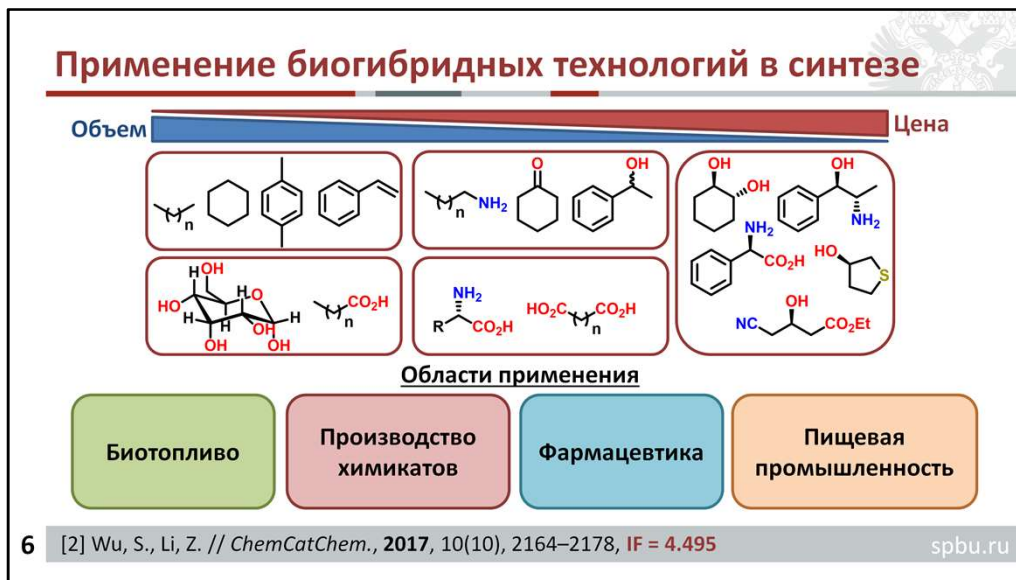


Тем не менее, для этих подходов одинаковым остаётся основной принцип синтеза, а именно получение целевого продукта посредством действия на исходное соединение некоторого биологического объекта (фермента, каскада ферментов или микроорганизма). На данном слайде этот принцип продемонстрирован на примере внутриклеточного каскада биотрансформаций. Субстрат подвергается последовательному действию нескольких ферментов внутри клетки, в результате чего получается конечный продукт.

Каскадная биотрансформация может быть осуществлена с использованием различных форм катализаторов, включая очищенные ферменты, иммобилизованные ферменты, целые клетки или их смесь. У разных подходов к биосинтезу существуют свои преимущества. Комбинирование и последовательное добавление нескольких индивидуальных катализаторов обеспечивает максимальную гибкость и временное управление каскадом. При этом один специально разработанный цельноклеточный биокатализатор с полным набором ферментов может быть наиболее экономичным и высокоэффективным.

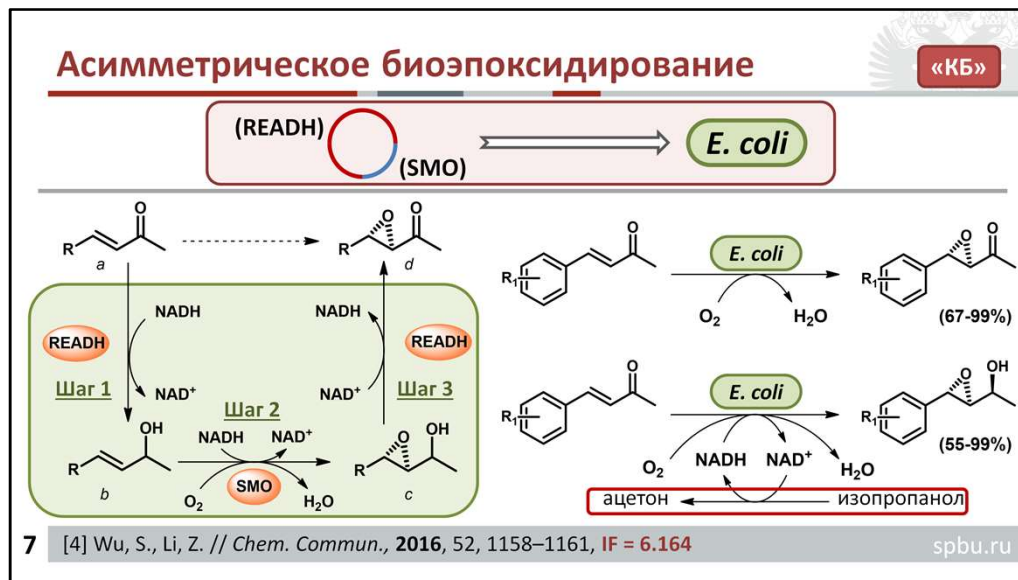


Серьезным недостатком микробиологического синтеза является отсутствие стандартизированных составных частей для создания цельной системы. Однако существует базовый принцип ее построения. Чужеродный фрагмент ДНК внедряется в клетку-хозяина с помощью вектора. Вектором называют нуклеиновую кислоту, как правило представленную плазмидой или гибридом плазмиды с вирусом. Экспрессия чужеродного гена приводит к образованию фермента с заданной каталитической активностью. При этом к культуре клетки-хозяина предъявляется требование быть стабильной в течение многих периодов культивирования и минимально инактивировать чужеродные гены. Поскольку желаемое химическое вещество или промежуточное соединение может быть токсичным для клетки, также необходима возможность регуляции всего пути биосинтеза. И наконец, клетка должна расти на доступных и недорогих источниках углерода, азота и других элементов. Требованиями к векторам являются: малое количество копий для снижения метаболической нагрузки, совместимость с другими векторами, стабильность, специфичное взаимодействие с клеткой-хозяином и наиболее простое строение и процесс клонирования. Для построения многоступенчатого синтетического пути получаемые ферменты должны обладать строго определенной каталитической активностью.



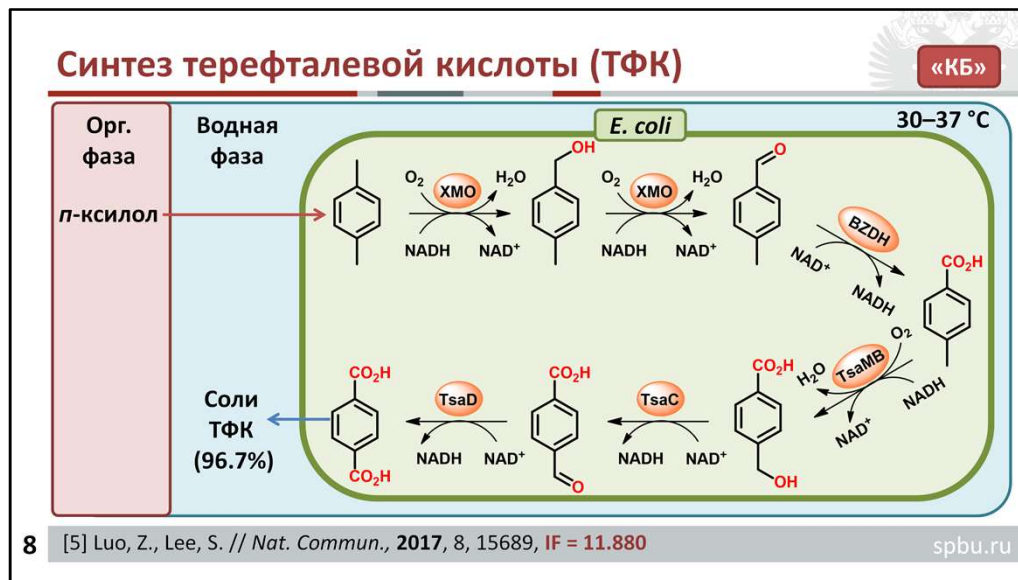
Важно, чтобы использование микроорганизмов приносило дополнительную выгоду в синтезе целевых соединений. Основные нефтехимические продукты (углеводороды и простые ароматические соединения) и биохимические продукты (глюкоза и жирные кислоты) служат оптимальными субстратами, поскольку они являются доступным промышленным сырьем. Некоторые широко распространённые химические соединения (например, простые спирты, кетоны) и биохимические вещества (например, природные аминокислоты, терпены) могут быть либо продуктами, либо субстратами для синтеза посредством микроорганизмов, так как имеют умеренную цену. Тонкие химикаты, особенно энантиомерно чистые хиральные соединения, имеют высокую себестоимость при классическом синтезе, поэтому их биохимическое получение зачастую более выгодно. Использование биогибридных технологий даёт прекрасную возможность непосредственно преобразовывать дешёвые субстраты в ценные продукты.

Таким образом, микроорганизмы находят широкое применение во многих областях, например, в производстве биотоплива, фармацевтике, пищевой и химической промышленности.



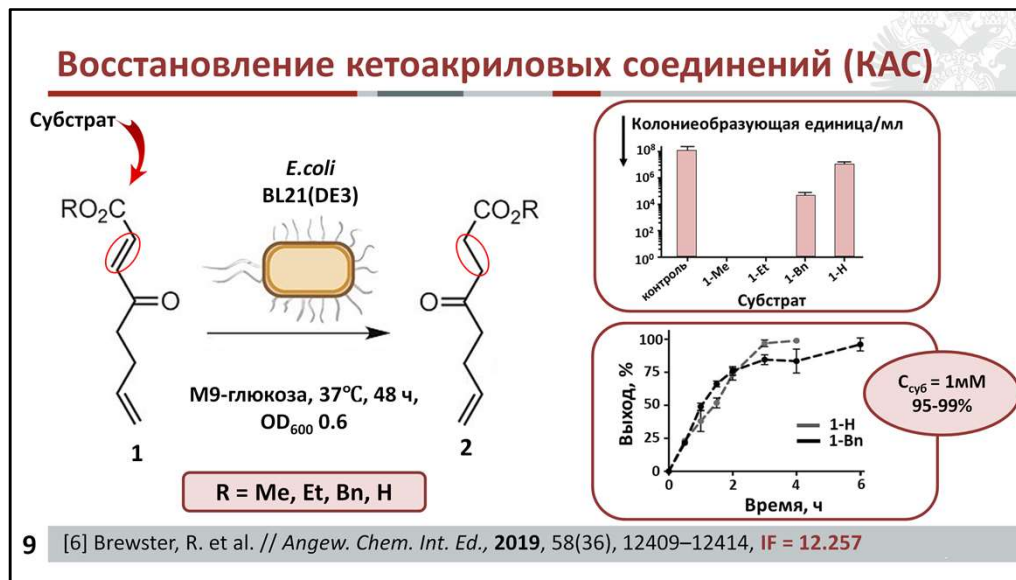
Перейдём к рассмотрению примеров использования микроорганизмов в синтезе. Первыми рассмотрим каскадные биотрансформации. Одним из преимуществ микробиологического синтеза является высокая стереоселективность. В данной работе разработан каскад реакций для асимметрического биоэпоксибования электрондефицитных α,β -ненасыщенных кетонов. Для этого в клетку *E. coli* с помощью плазмидного вектора были встроены два гена с целью совместной экспрессии ферментов алкогольдегидрогеназы и стиролмонооксидазы. Как утверждают авторы статьи, большинство хиральных эпоксидных кетонов, полученных в этой работе, не были описаны с использованием химических подходов, что свидетельствует о значении биокаталитического подхода к этой группе промежуточных соединений. Также обнаружено, что введение 15% изопропанола блокирует 3-й шаг, что позволяет получать асимметрические спирты.

Таким образом, разработанная система способна переключаться с одного продукта на другой.



Рассмотрим следующий пример использования каскада биотрансформаций – биосинтез важного промышленного соединения, а именно терефталевой кислоты. Терефталевая кислота является прекурсором для полиэтилентерефталата и в настоящее время в промышленности производится путем энергоемкого и потенциально опасного процесса окисления *para*-ксилола. Авторы следующей статьи осуществили разработку модифицированной системы *Escherichia coli* для биологической трансформации *para*-ксилола в терефталевую кислоту. Спроектированный штамм *E. coli* производит представленный синтетический путь с помощью совместной экспрессии пяти ферментов, которые последовательно окисляют метильные группы ксилола до карбоксильных. В качестве источника энергии для осуществляемых превращений используется глюкоза, перерабатываемая в ходе клеточного метаболизма.

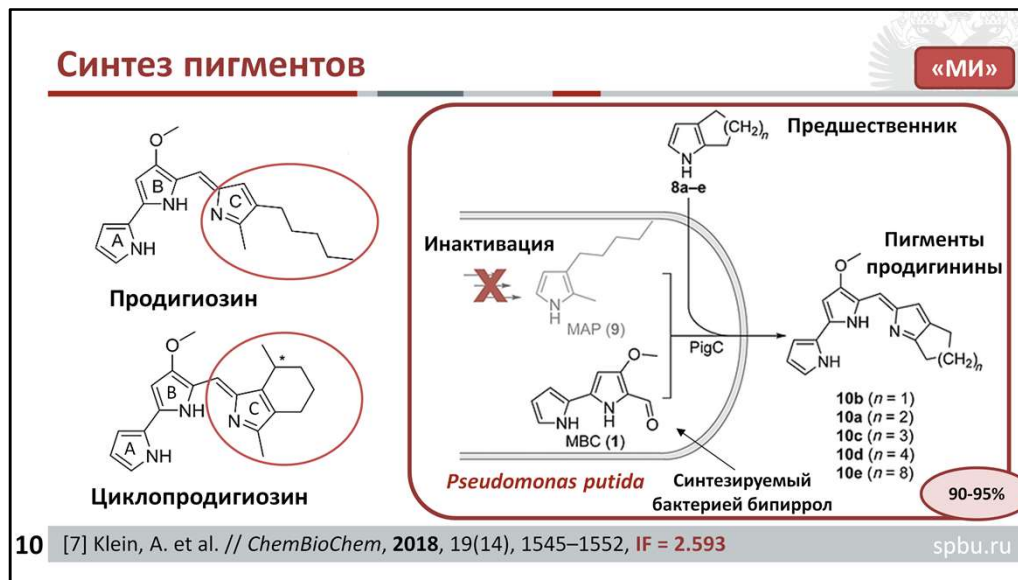
В рамках процесса ферментации штамм преобразует 8,8 г *para*-ксилола в 13,3 г терефталевой кислоты, что соответствует выходу 96,7% в пересчёте на исходное соединение. Эти результаты позволяют предположить, что представленная система *E. coli* может стать перспективной альтернативой настоящему промышленному способу производства терефталевой кислоты, который осуществляется при температурах порядка 230 °C и повышенном давлении в специальных титановых реакторах.



В данной работе авторы использовали микроорганизмы для восстановления кетоакриловых соединений (КАС). Обычно алкены восстанавливают в атмосфере водорода и в присутствии переходных металлов в качестве катализаторов. Однако есть способ избежать их применения. *E. coli* содержат оксидоредуктазы, благодаря которым возможна генерация восстановительных эквивалентов *in situ*.

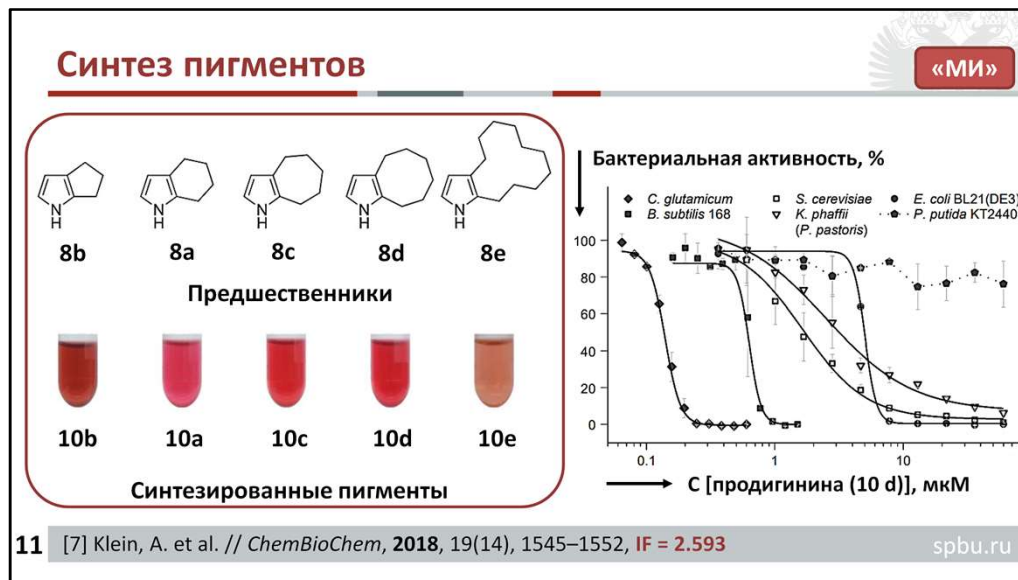
В рамках исследования проводили реакцию с бутенилзамещенными кетоакриловыми эфирами (метилловым, этиловым, бензиловым) и соответствующей карбоновой кислотой. Для всех протестированных соединений наблюдалось селективное восстановление С=С связи акрилового остатка. Для определения биосовместимости реакции авторы проанализировали ее влияние на клетки *E. coli*. Выяснилось, что метиловый и этиловый эфиры оказались крайне токсичными. (верхний график)

Также была исследована скорость образования продукта. Для проведения реакции с кислотой (вещество 1-Н) было достаточно 4 часов, тогда как для бензилового эфира (1-Вн) - 6 часов. (нижний график)



Теперь перейдём ко второму подходу использования микроорганизмов – метаболической инженерии. Авторы следующей работы описали метод получения продигининов – красных трипиррольных пигментов, синтезируемых микроорганизмами. С-пиррольное кольцо может иметь *n*-алкильные заместители (как у продигиозина) или циклические (как у циклопродигиозина). Для увеличения разнообразия данных пигментов и получения неприродных соединений используется стратегия введения искусственного предшественника пигмента и его дальнейшее включение в молекулу продуцируемого вещества.

Сначала авторы статьи блокировали появление в бактерии *Pseudomonas putida* природного предшественника пигмента – 2-метил-3-амилпиррола (МАР) – путем удаления кодирующего его гена. Это вызывало остановку синтеза продигинина, и бактерия оставалась неокрашенной. Однако после введения в штамм искусственно синтезированных предшественников 8a-e наблюдалось образование пигментов 10a-e, окрашенных в красный цвет.



На слайде представлены продигинины, которые были получены авторами статьи. Можно заметить отличие окраски 10b и 10e от 10a,c,d. Это обусловлено меньшей степенью включения предшественников 8b и 8e в продуцируемый пигмент. Было сделано предположение, что циклы средних размеров более предпочтительны для включения.

Также авторы обнаружили проявление антибактериального эффекта полученными продигининами. На графике показана зависимость бактериальной активности от концентрации продигинина 10d. При содержании пигмента 10 мкМ у всех бактерий, кроме одной, активность снижается до минимума. Единственная толерантная к пигменту бактерия - *Pseudomonas putida*. Она остается активной даже при увеличении концентрации продигинина до 60 мкМ. Подобная устойчивость делает эту бактерию подходящим хозяином для синтеза данных соединений.



В данной статье авторы использовали пекарские дрожжи для синтеза жирных кислот, которые могут применяться в производстве олеохимикатов и биотоплива. Суть исследования заключалась в перенаправлении метаболических путей в пользу липогенеза.

На первой схеме представлены типичные метаболические процессы в дрожжах. Пируват частично идет не в цикл Кребса, а на образование этанола. Для переноса пирувата в митохондрии (включение его в цикл Кребса) была усилена экспрессия генов, кодирующих белок MPC.

На второй схеме отмечено, что уже большая часть пирувата участвует в цикле Кребса и идет на образование ацетил-КоА. На данном этапе необходимо было добиться сверхэкспрессии генов, кодирующих белок YHM2, который способствует переносу цитрата из митохондрий для его дальнейшего участия в синтезе СЖК. Также было ограничено поступление пирувата в этанольную ветвь путем снижения активности пируватдекарбоксилазы (PDC). Можно заметить, что на третьей схеме этой ветви уже нет. В дополнение была достигнута сверхэкспрессия цитратсинтазы (RtCit1), которая катализирует получение цитрата из оксалоацетата в цикле Кребса.

На фотографии можно увидеть ферментер, в котором проводили синтез.



Таким образом, микробиологический синтез продолжает развиваться за счет достижений в генной инженерии, метаболической инженерии и синтетической биологии. Среди минусов данного подхода можно перечислить малые объемы используемого субстрата и низкую концентрацию продукта, а также трудоемкий путь разработки схемы синтеза. С другой стороны, микроорганизмы способны превращать легкодоступное сырье в широкий спектр ценных соединений. Данные системы обычно являются высокоселективными, нетоксичными, биоразлагаемыми и активными в мягких водных условиях. Возможность проведения каскада реакций внутри одной клетки избавляет от необходимости выделения промежуточных соединений, что повышает выход конечного продукта. В настоящий момент уже появляются коммерчески доступные стандартизированные компоненты для создания цельной системы биосинтеза, что способствует упрощению процесса.

Список литературы

- [1] Sheldon, R., Brady, D. «Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis» // *ChemSusChem*, **2019**, 12, 2859 – 2881, **IF = 7.804**
- [2] Wu, S., Li, Z. «Whole-Cell Cascade Biotransformations for One-Pot Multistep Organic Synthesis» // *ChemCatChem*, **2017**, 10(10), 2164–2178, **IF = 4.495**
- [3] Nora, L. et al. «The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools»// *Microbial biotechnology*, 2018, 0, 1–23, **IF = 4.857**
- [4] Wu, S., Li, Z. «Switchable asymmetric bio-epoxidation of α,β -unsaturated ketones» // *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 1158–1161, **IF = 6.164**
- [5] Luo, Z., Lee, S. «Biotransformation of p-xylene into terephthalic acid by engineered *Escherichia coli*»// *Nat. Commun.*, **2017**, 8, 15689, **IF = 11.880**
- [6] Brewster, R. et al. «Transition Metal-Free Reduction of Activated Alkenes Using a Living Microorganism»// *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58(36), 12409 – 12414, **IF = 12.257**
- [7] Klein, A. et al. «Preparation of cyclic prodiginines by mutasynthesis in *Pseudomonas putida* KT2440»// *ChemBioChem*, **2018**, 19(14), 1545 – 1552, **IF = 2.593**
- [8] Yu, T. et al. «Reprogramming Yeast Metabolism from Alcoholic Fermentation to Lipogenesis»// *Cell*, **2018**, 174(6), 1549–1558, **IF = 36.216**

14

Спасибо за внимание!

spbu.ru

На данном слайде представлен список литературы. На этом всё, спасибо за внимание!