



Биокаталитические технологии синтеза акриловых мономеров

Константин ЛАВРОВ,

к.б.н.

Александр ЯНЕНКО

д.б.н., проф.

Юбилейная конференция

**Генетика микроорганизмов:
от геномики к биоэкономике**

50 лет институту ГосНИИгенетика



Акриловые мономеры – основа широкого спектра полимеров

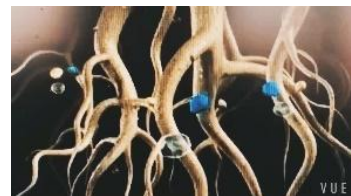
Водорастворимые – нефтедобыча, горное дело, очистка воды



Акриловые волокна – индустрия пластиков, текстиль



Суперабсорбенты – сельское хозяйство, хранение, гигиена



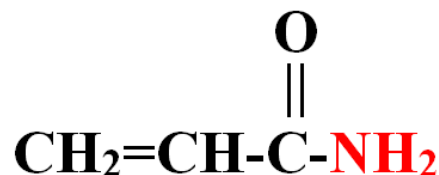


Акриловые мономеры очень разнообразны

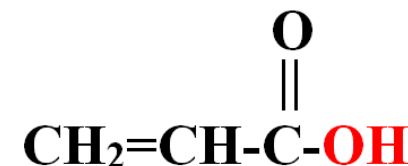
Базовые

Акрилонитрил $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{N}$

Акриламид

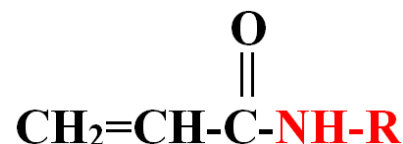


Акриловая кислота

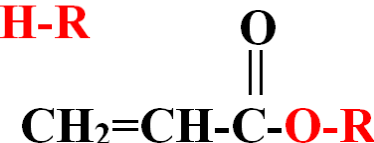


Функционализированные

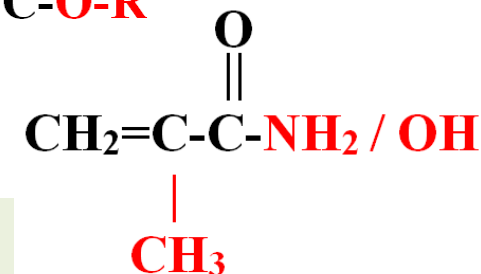
N-замещённые акриламиды



Эфиры акриловой кислоты



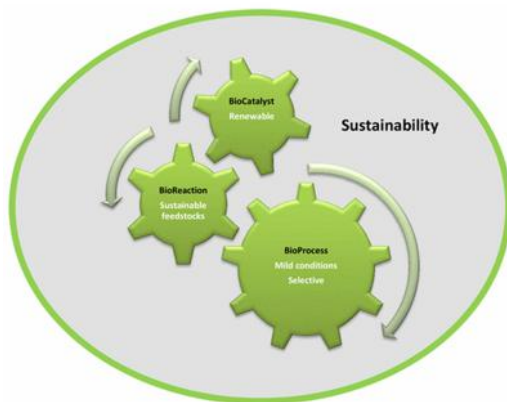
Метакриламид/метакриловая кислота



Коммерчески доступно более 200 мономеров

Более 20 из них производится в промышленных количествах.

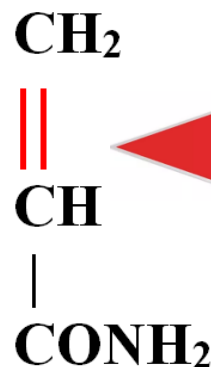
Почему именно биокатализ?



Лабильные соединения
Оптические чистоты
Экология

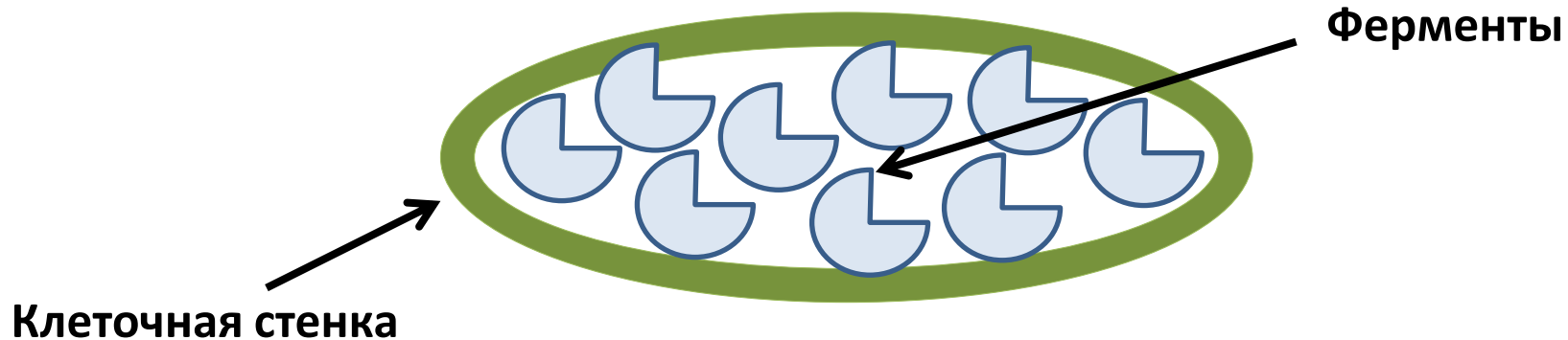
Двойная связь – «слабое место» акриловых мономеров

**Спонтанная
полимеризация**



**Присоединение
групп**

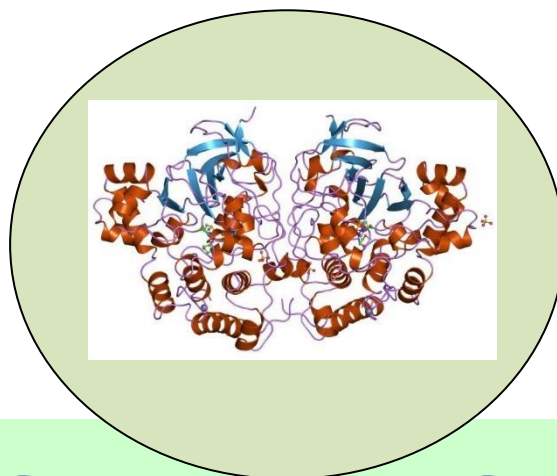
Цельноклеточный биокатализ - преимущества



Природно-иммобилизованные ферменты – стабильность активности, не надо выделять, просто получать, легко хранить

Легко разрабатывать новые формы (на базе микробной платформы)

Биокаталитическое получение акриламида



Нитрилгидратаза



Акрилонитрил

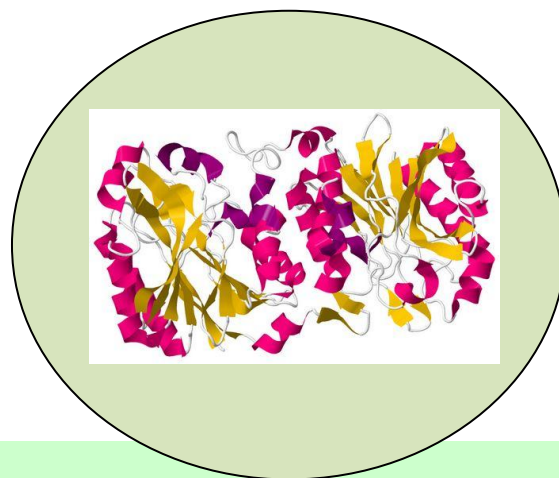


Акриламид

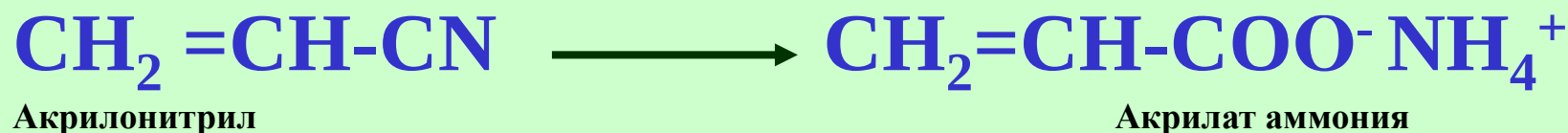
20°C, pH 7

50% водный раствор

Биокаталитическое получение акриловой кислоты (в форме акрилата аммония)



Нитрилаза

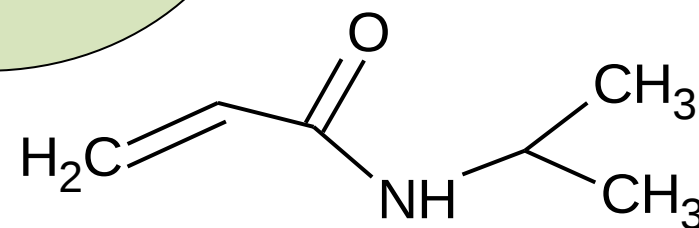
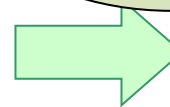
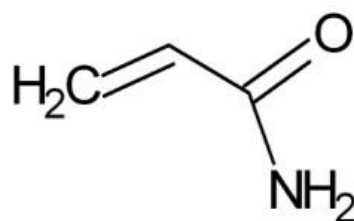
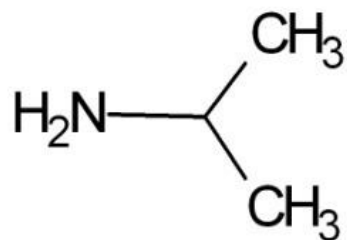
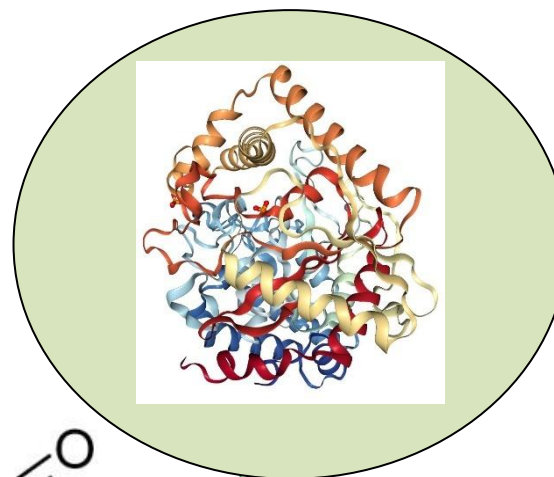


20°C, pH 7

30% водный раствор

Биокаталитическое получение N-замещённых акриламидов

Ациламидаза



Изопропиламин

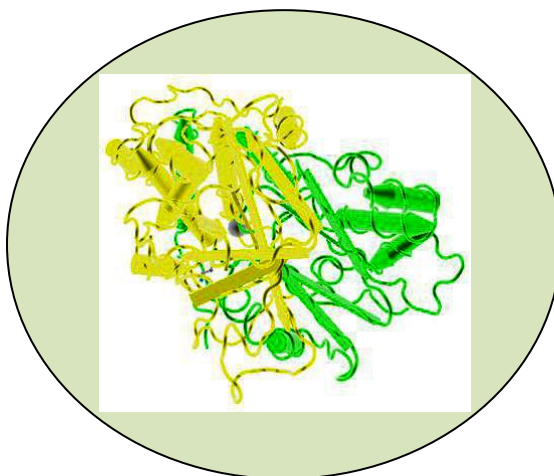
Акриламид

Изопропил-
акриламид

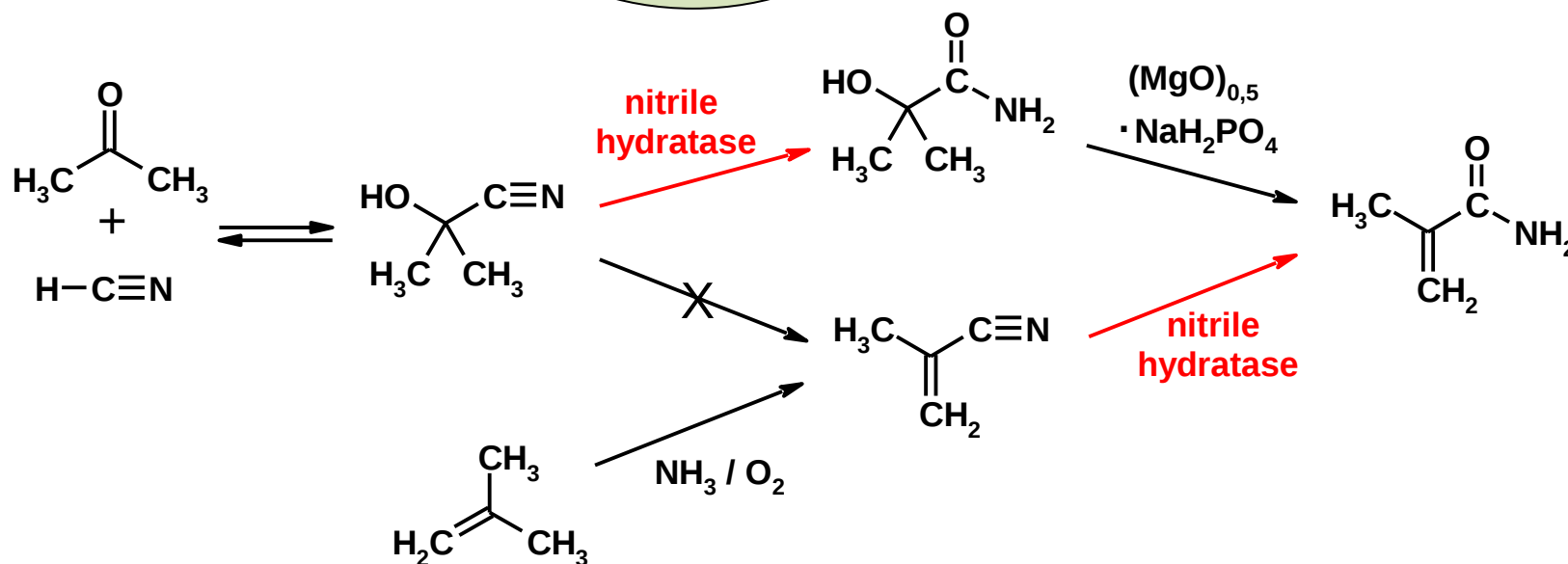
20°C, pH 8 - 10

5 - 12% водный раствор

Биокаталитическое получение метакриламида



Цианид-
устойчивая
нитрилгидратаза



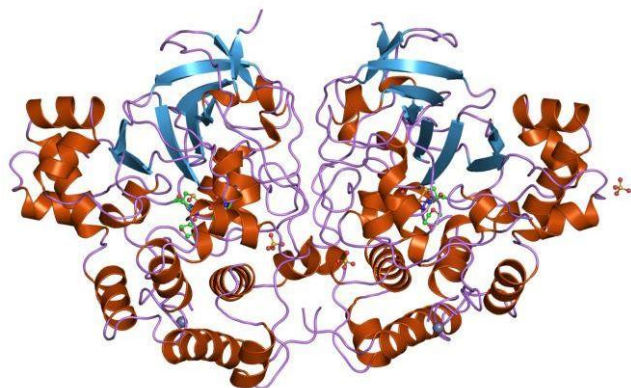
Традиционная химическая схема получения мономеров из нефти



Новая схема получения мономеров из нефти



Кобальт-зависимая нитрилгидратаза (акриламид)



Впервые показано в ГосНИИгенетика:

- Транскрипция зависит от кобальта
- Стабильность обеих субъединиц зависит от кобальта
- Высокая металло-селективность механизма сборки активного фермента

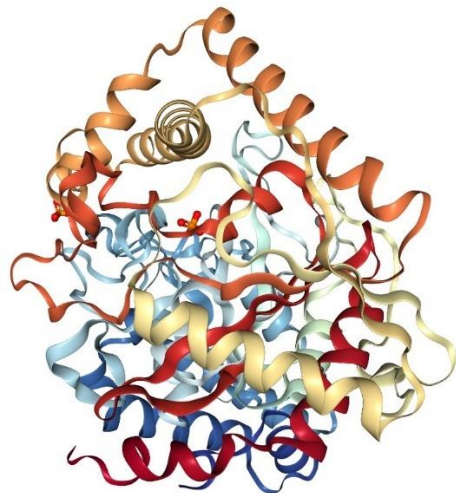
***In vivo* metal selectivity of metal-dependent biosynthesis of Co-type nitrile hydratase in *Rhodococcus* bacteria**

K.V. Lavrov*, A.O. Shemyakina, E.G. Grechishnikova, A.D. Novikov, T.I. Kalinina, A.S. Yanenko
***Metallomics*, 2018, in press**

New *cblA* gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus rhodochrous*

K.V. Lavrov*, A.O. Shemyakina, E.G. Grechishnikova, A.D. Novikov, T.I. Kalinina, A.S. Yanenko
***Research in Microbiology*, 2018, V. 169, Iss. 4–5, pp. 227-236**

Новая ациламидаза (N-замещённые акриламиды)



- Открыта в ГосНИИгенетика
- Уникальная субстратная специфичность – N-замещённые амиды, в т.ч. Акриламиды
- Два типа активности – гидролитическая и ацилтрансферазная
- Новая группа в составе семейства стереоселективных амидаз

Экспрессия гена ациламидазы в штаммах *Rhodococcus erythropolis*

К.В. Лавров, А.Д. Новиков, Л.Е. Рябченко, А.С. Яненко

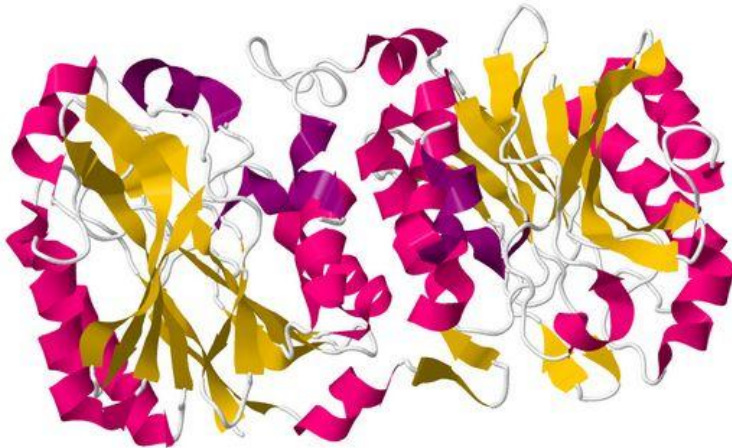
ГЕНЕТИКА, 2014, том 50, № 9, с. 1133–1137

Новая ациламидаза из *Rhodococcus erythropolis* TA37, способная гидролизовать N-замещённые амиды

К. В. Лавров, И.А. Залунин, Е. К. Котлова, А.С. Яненко

БИОХИМИЯ, 2010, том 75, вып. 8, с. 1111 – 1119

Нитрилазы (акриловая кислота)



- Группа ферментов с различными субстратными специфичностями
- Высокая активность по отношению к акрилонитрилу или ароматическим нитрилам

Optimization of expression of nitrilase from *Alcaligenes denitrificans* in *Rhodococcus rhodochrous*

K.V. Lavrov*, A.O. Shemyakina, E.G. Grechishnikova, A.D. Novikov, T.I. Kalinina, A.S. Yanenko
Applied Biochemistry and Microbiology , 2019, in press

Bacterial Strain *Alcaligenes denitrificans* C-32 Containing Two Nitrilases with Different Substrate Specificities

A. D. Novikov, L. E. Riabchenko, T. E. Leonova, G. A. Larikova, K. V. Lavrov, S. A. Glinskii, A. S. Yanenko

Applied Biochemistry and Microbiology, 2017, V. 53, Iss. 8, pp 786–791

Цианид-устойчивые нитрилгидратазы (метакриламид)



- Группа ферментов с различными субстратными специфичностями
- Кобальт- и железо содержащие ферменты с высокой активностью
- Уникально высокая устойчивость к цианиду

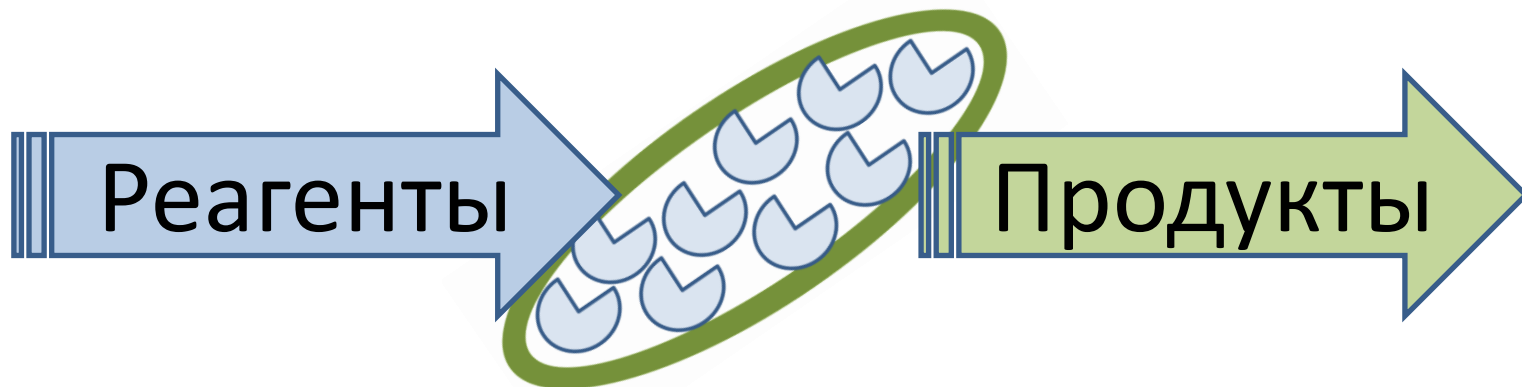
Screening, Characterization and Application of Cyanide-resistant Nitrile Hydratases

T. Gerasimova, A. Novikov, S. Osswald, A. Yanenko

Engineering in Life Sciences, 2004, 4, No. 6

Достоинства клеток бактерий *Rhodococcus* для биокатализа акриловых мономеров

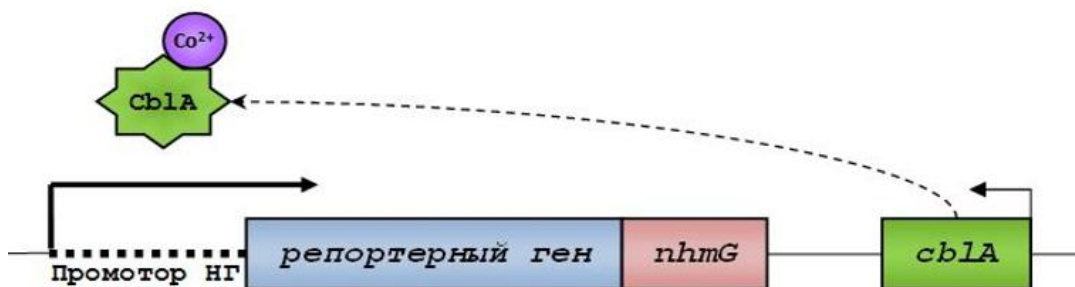
- Относительно гидрофобная мембрана – может легко трансформировать разные соединения
- Природно богаты разными ферментами
- Прочные, стрессоустойчивые клетки
- Растут на простых минеральных средах



Генетика родококков – новый механизм кобальт-зависимой регуляции генов



Группа генов, сверх-экспрессия которых зависит от кобальта



Новый металло-зависимый транскрипционный регулятор *cb1A*

Экспрессия независимо регулируется кобальтом, амидами, углеродом

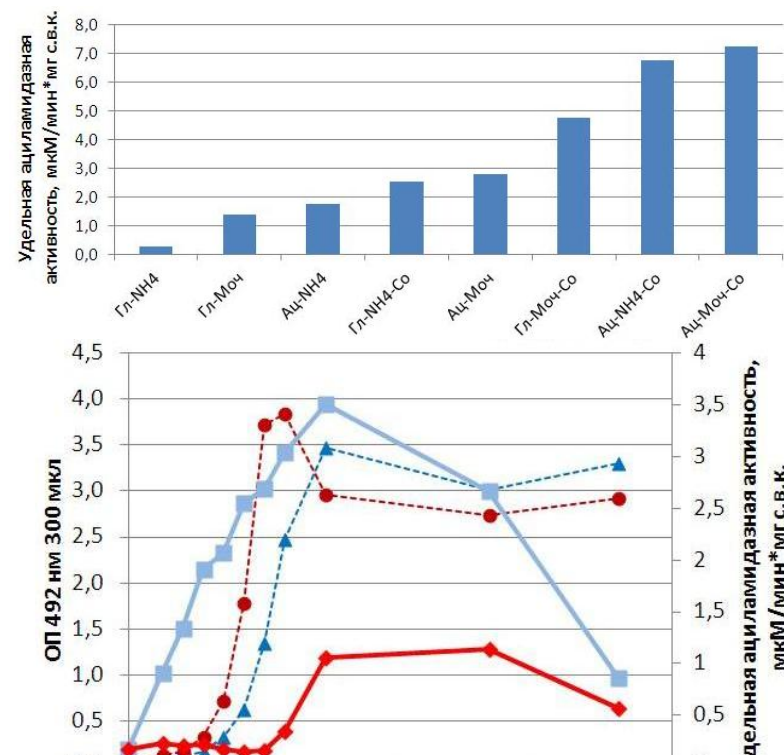
New *cb1A* gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus rhodochrous*

K.V. Lavrov*, A.O. Shemyakina, E.G. Grechishnikova, A.D. Novikov, T.I. Kalinina, A.S. Yanenko

Research in Microbiology, 2018, V. 169, Iss. 4–5, pp. 227-236

Регулируемая сверх-экспрессия генов под контролем промотора нитрилгидратазы

- Независимо регулируется тремя различными факторами питательной среды – источником углерода, азота, и ионами металла
- Гибко настраиваемая по силе
- Может быть активирована или сразу, или на стационарной стадии роста культуры.



Направленная регуляция активности промотора нитрилгидратазы в экспрессионной системе в бактериях *Rhodococcus rhodochrous*

Шемякина А.О., Гречишникова Е.Г., Новиков А.Д., Калинина Т.А., Лавров К. В., Яненко А.С.

Труды конференции «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике», Москва-Пушино, 3-5 октября 2018

Панель промоторов родококков – инструментарий для генной инженерии

Промоторы генов из *Corynebacterium glutamicum*:

Peftu – фактор элонгации трансляции

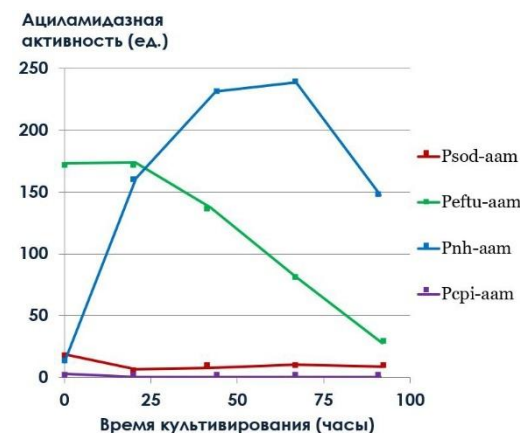
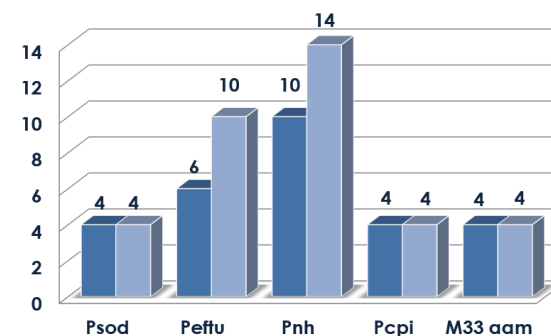
Psod – супероксиддисмутаза

PcspB – белок S-слоя

Промоторы генов из *Rhodococcus*:

Pcpi – ген изоцитратлиазы

Pnh, Pnh-mut – ген нитрилгидратазы

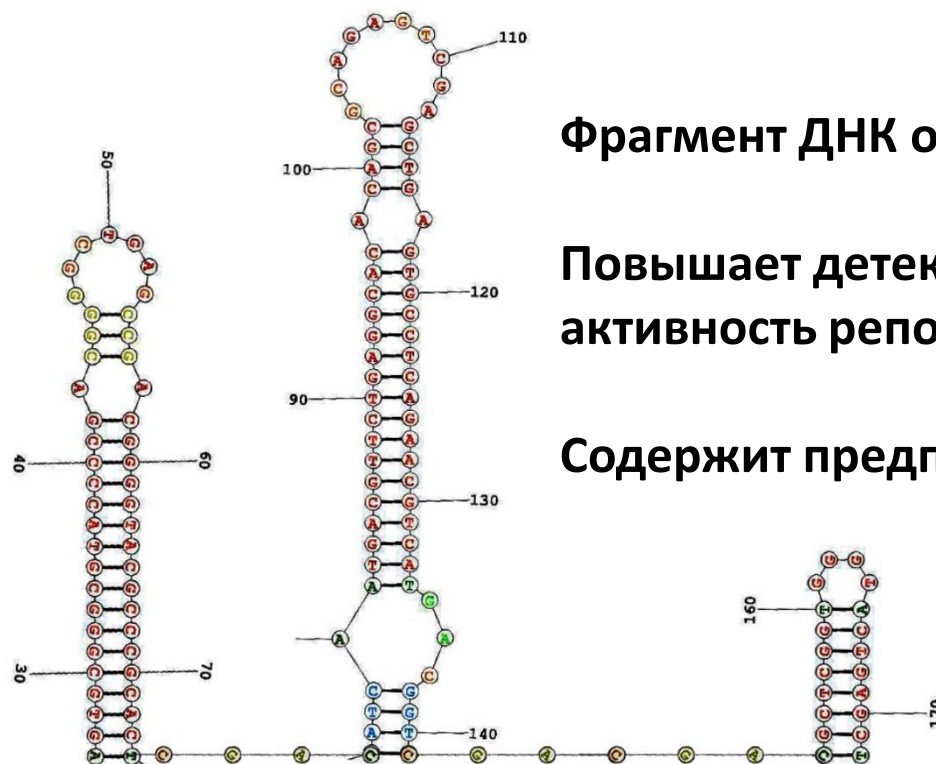


Изучение функционирования набора промоторов в *Rhodococcus rhodochrous*

Гречишникова Е.Г., Шемякина А.О., Лавров К. В., Яненко А.С.

Труды XIX Зимней школы по биофизике и молекулярной биологии, ПИЯФ, С-Петербург, 17-22 февраля 2018

Новый элемент, улучшающий уровень транскрипции



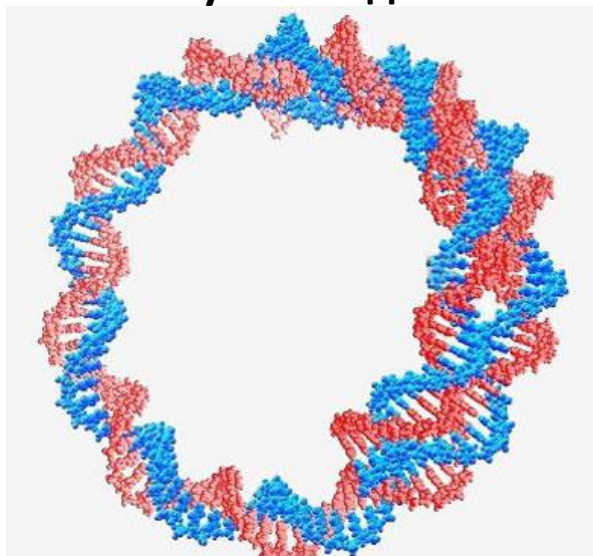
Фрагмент ДНК ок. 150 п.н. после гена

Повышает детектируемый уровень транскрипции, и
активность репортёров на порядок

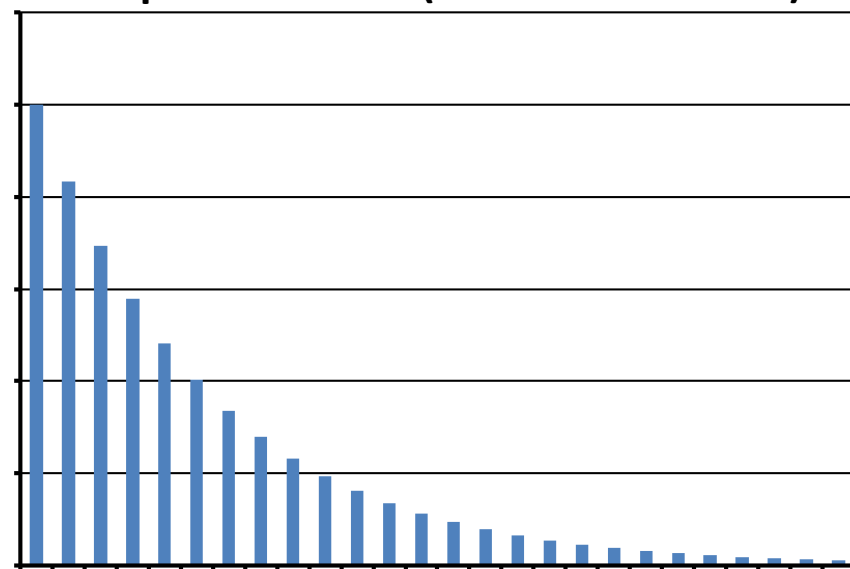
Содержит предполагаемые шпилечные структуры

Полногеномное секвенирование и транскриптомика

Геномы 6 – 9 млн. пар
нуклеотидов



Профиль дифференциальной
экспрессии генов (5 – 6 тысяч генов)



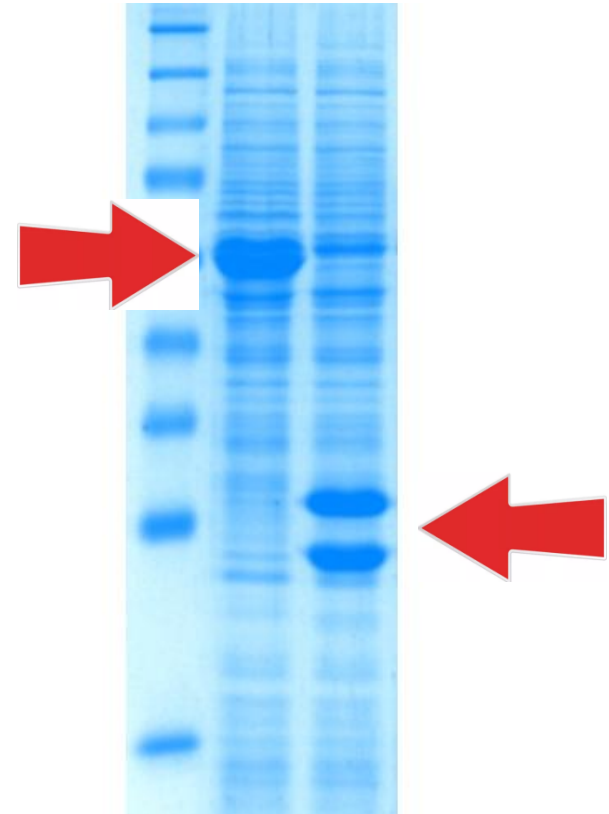
**Draft Genome Sequence of Rhodococcus sp. Strain M8, Which
Can Degrade a Broad Range of Nitriles**

A.D. Novikov, a K.V. Lavrov, A.S. Kasianov, T.V. Gerasimova, A.S. Yanenko

***Genome Announcements*, Volume 6 Issue 6**

Делаем новую микробную платформу

- Набор удобных репортёрных генов
- Быстрое конструирование штаммов с экспрессионными кассетами в хромосоме
- Набор промоторов и векторов
- Набор охарактеризованных штаммов
- Высокий уровень продукции внутриклеточных белков – до 50% от растворимых



Пригодна и для биокатализа, и для синтеза метаболитов



ГосНИИгенетика – с юбилеем!

1968



2018

**Штаммов, граммов на литр, статей!
Обязательно - детей!**