

методику для исследования более широкого спектра антимикробных препаратов и антисептических средств.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда
№ 24-79-10042, <https://rscf.ru/project/24-79-10042/>*

ЛИТЕРАТУРА

1. Duygu Ercan, Ali Demicri. Recent advances for the production and recovery methods of lysozyme // *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016. №3 С. 1078–1088.
2. Филлипс Д. Трехмерная структура молекулы фермента // *Молекулы и клетки* (пер. с англ.). М., 1968. С. 78–90.
3. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 239 с.
4. Elliott F. Osserman, Robert E. Canfield, Sherman Beychok. Lysozyme // *Lysozyme Conference Arden House*, 1972. 641 с.
5. Muhammad Naveed, Yadong Wang. Purification, Characterization and Bactericidal Action of Lysozyme, Isolated from *Bacillus subtilis* BSN314: A Disintegrating Effect of Lysozyme on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria // *Molecules*, 2023. № 28. С. 290–301.
6. Бухарин О.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине // *Том. мед. ин-т. Томск*, 1974. 209 с.
7. Никифорова Д.В., Пашаян С.А. Биологическое значение лизоцима // *Достижения молодежной науки для агропромышленного комплекса: тез. докл. науч.-практ. конф. Тюмень*, 2023. С. 81–84.

УДК 579.22:579.69:577.152.1

М. Е. Василевская, мл. науч. сотр., асп.
Т. В. Семашко, канд. биол. наук, доц., зав. лаб.
Л. А. Жуковская, канд. биол. наук, доц., ст. науч. сотр.
(Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск)

СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ

Оксидаза D-аминокислот (ЕС 1.4.3.3, ДААО) является ФАД-содержащим ферментом, катализирующим окислительное дезаминирование D-аминокислот [1]. В результате реакции образуются пероксид водорода и иминокислота. В последующем иминокислота неферментативно гидролизуеться до α -кето кислоты и иона аммония. Характерной особенностью всех ДААО является высокая специфичность именно к D-изомерам аминокислот.

Оксидазы D-аминокислот обнаружены у прокариот, дрожжей,

грибов и млекопитающих [2]. Наиболее изучены DAAO дрожжей *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospodium toruloides*) и *Trigonopsis variabilis* [3]. DAAO может быть использована в тонком органическом синтезе оптически-активных соединений, получении α -кетокислот, неприродных L-аминокислот и получении из цефалоспориона C 7-аминоцефалоспороановой кислоты (7-АСА) – исходного материала для 50 типов β -лактамных антибиотиков, а также при создании биосенсоров для определения контаминации пищевых продуктов и напитков [4, 5]. Перспективно применение DAAO в качестве биомаркера различных заболеваний (нейродегенеративных (шизофрения), злокачественных новообразований (рак желудка, рак молочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, рак поджелудочной железы)), поскольку при этих заболеваниях наблюдаются значительные изменения как концентрации определенных D-аминокислот, так и активности самой DAAO [4, 5].

Цель работы – скрининг штаммов микроорганизмов способных синтезировать DAAO с определенной субстратной специфичностью.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись 12 штаммов-микроорганизмов, хранящиеся в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси: *T. variabilis* 93, *T. variabilis* 137, *R. toruloides* 163, *R. toruloides* 135, *Schizosaccharomyces octosporus* 92, *Candida boidinii* 29, *C. intermedia* 354, *Candida* sp. 348, *Lipomyces starkeyi* 120, *L. starkeyi* 122, *L. kockii* 121, *Ogataea angusta* 153.

Микроорганизмы выращивали глубинно в колбах Эрленмейера, объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на шейкере-инкубаторе (перемешивание 100 об/мин) при оптимальной температуре для каждого штамма в течение 72 часов. Питательная среда содержала (%): глюкозу – 1,0; сульфат аммония – 0,2; дрожжевой экстракт – 0,2; D-метионин 0,2 (в качестве индуктора). Исходный pH среды 7,0.

По окончании культивирования клетки центрифугировали при 6 000 оборотов/мин в течение 30 мин, а затем отмывали 2 раза в калий-фосфатном буфере (50 мМ, pH 8,0). Для приготовления бесклеточного экстракта использовали 30% раствор калий-фосфатного буфера (50 мМ, pH 8,0), содержащем 3 мМ ЭДТА и 0,1 М сахарозы.

Клетки разрушали с помощью ультразвука, используя дезинтегратор «Sonifier-450» («Brandson», США).

Гомогенат центрифугировали при 11 000 оборотов/мин в течение 30 мин, супернатант использовали для дальнейшей работы.

Активность DAAO определяли спектрофотометрически на приборе Ultrospec 2100 pro («Amersham», UK).

Результаты и обсуждение. Установлено, что способностью к

синтезу DAAO обладают 4 из 12 проверенных штаммов микроорганизмов *T. variabilis* 93, *T. variabilis* 137, *C. boidinii* 29 и *O. angusta* 153. Наиболее высокие показатели по уровню синтеза наблюдались у *T. variabilis* 93, *T. variabilis* 137 (0,45-1,75 ед/мл).

Важной характеристикой DAAO является их субстратная специфичность. Следует отметить, что согласно литературным данным DAAO характеризуются широкой субстратной специфичностью [2–5]. Была проверена способность ферментов отобранных штаммов к катализу реакций окисления D-метионина, D-аланина, D-серина. Особый интерес представлял D-аланин, как одна из наиболее часто встречающихся аминокислот клеточной стенки микроорганизмов.

Показано, что *T. variabilis* 93, *T. variabilis* 137, *C. boidinii* 29 обладали способностью катализировать реакции окисления всех трех исследуемых аминокислот. А DAAO *O. angusta* 153 проявляла специфичность только к D-аланину. По скорости катализируемых реакций следует выделить DAAO *T. variabilis* 93 и *T. variabilis* 137. Кроме того, был отмечен интересный факт, обнаруженный в процессе хранения ферментов: DAAO *T. variabilis* 93 сохраняла 100% активности при температуре хранения – 20°C в течение 1 мес.

Заключение. Таким образом, проведен скрининг штаммов микроорганизмов по их способности синтезировать фермент DAAO. Установлено, что *T. variabilis* 93, *T. variabilis* 137, *C. boidinii* 29 и *O. angusta* 153 обладают способностью к синтезу DAAO. Для дальнейших молекулярно-генетических исследований отобрано 2 штамма микроорганизмов: *T. variabilis* 93 и *T. variabilis* 137.

ЛИТЕРАТУРА

1. Curti, B. D- and L- amino acid oxidases / B. Curti, S. Ronchi, M. Pilone // Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes. – 1992. – Vol. 3. – P. 69 – 94.
2. Pilone, M. D-Amino acid oxidase: new findings / M. Pilone // Cellular and molecular sciences. – 2000. – Vol. 57. – P. 1732–1747.
3. Tishkov, V. I. D-Amino acid oxidase: structure, catalytic mechanism, and practical application / V.I. Tishkov, S.V. Khoronenkova // Biochemistry. – 2005. – Vol. 70, № 1. – P. 40-54.
4. Pollegioni, L. Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans / L. Pollegioni, L. Piubelli, S. Sacchi, M. Pilone, G. Molla // Cell. Mol. Life Sci. – 2007. – Vol. 64. – P. 1373 – 1394.
5. Pollegioni, L. Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives / L. Pollegioni, G. Molla, S. Sacchi, E. Rosini, R Verga, M. Pilone // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 78. – P. 1–16.