

УДК 616-092.4

И. А. Любкевич, студ., С. А. Смирнова, студ., А. И. Зорин, асп.,  
В. П. Молчанов, д-р техн. наук, проф.  
(ТвГТУ, Тверь)

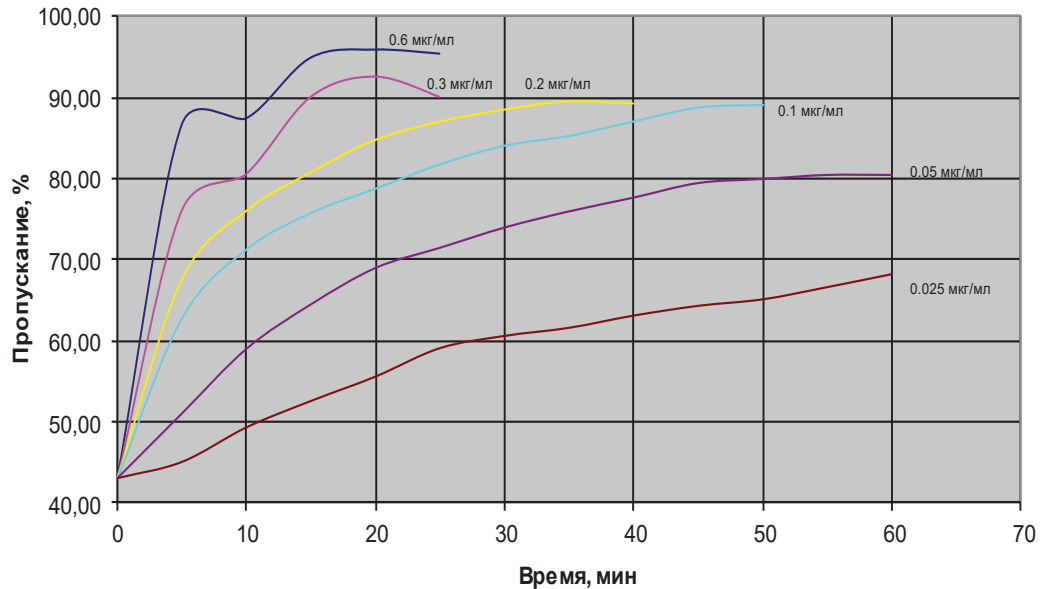
**РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИЗОЦИМА  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТОВОЙ КУЛЬТУРЫ  
*MICROCOCCLUS LUTEUS***

Лизоцим (КФ 3.2.1.17) – антимикробный пептид, обладающий выраженной антимикробной активностью. Это фермент относится к классу муреиновых гидролаз, переваривающих пептидогликан, содержащийся в бактериях [1]. Фермент лизоцим известен также как мурамидаза, 1,4- $\beta$ -N-ацетилмурамидаза или N-ацетилмурамидгликангидролаза. Он обладает бактерицидным потенциалом в отношении различных патогенных бактерий. В процессе своей активности он биodeградирует клеточную стенку бактерий, катализируя гидролиз между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в пептидогликановом слое [2,3].

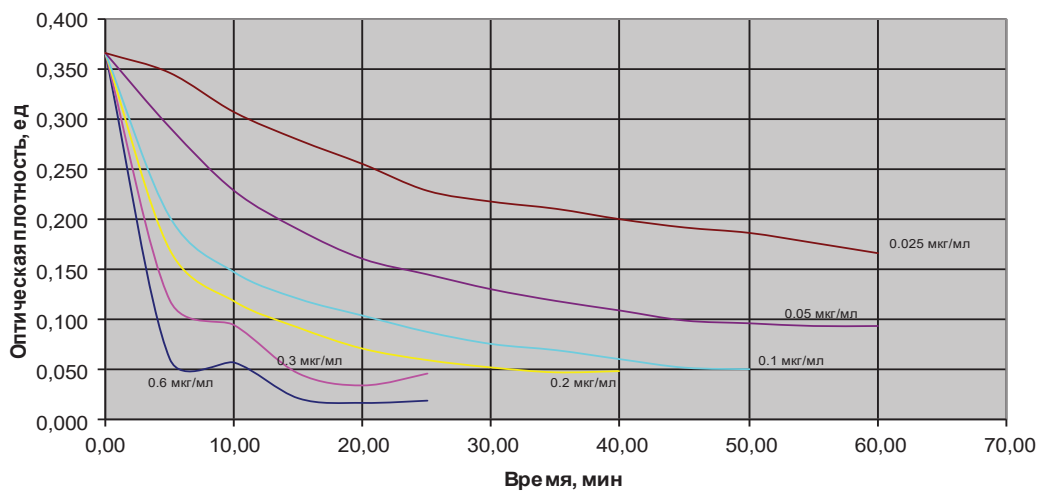
Лизоцим играет важную роль в иммунной системе организма, участвуя в защите от бактерий и вирусов. У людей и животных он присутствует в слюне, слезной жидкости, молозиве, крови и других тканях организма. В организме человека и животных он выполняет защитную функцию, уничтожая бактерии путем разрушения их клеточных стенок [4]. Наличие лизоцима в слезной жидкости помогает предотвратить инфекции глаз, защищая роговицу и конъюнктиву. Лизоцим также присутствует в слюне, помогая в защите полости рта от бактерий и предотвращая развитие кариеса и пародонтита [5,6]. Таким образом, лизоцим может эффективно применяться в биотехнологических процессах, таких как производство фармацевтических препаратов для лечения различных инфекций (пневмония, бронхит, ангина, синусит и др.) [7].

В основу предлагаемой уникальной методики определения активности лизоцима положено его литическое действие на тест-культуру *Micrococcus Luteus*. Лизоцим расщепляет пептидогликановую оболочку бактерий (гликозидная связь) – под влиянием разности осмотического давления клетка разрушается, содержимое проливается в окружающую среду, – оптическая плотность раствора падает. В ходе экспериментального тестирования разработанной методики анализа активности раствора лизоцима были в вышеприведенных условиях на базе биотехнологической лаборатории кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Тверского

государственного технического университета (ТвГТУ) были получены данные, представленные на рис. 1 и 2. Результаты показывают, что в исследуемом диапазоне изменение характеристик светопропускания во времени не линейно. Степень кривизны кинетической кривой зависит от активности раствора. Наибольшей линейностью обладают пробы с минимальным содержанием (активностью) лизоцима.



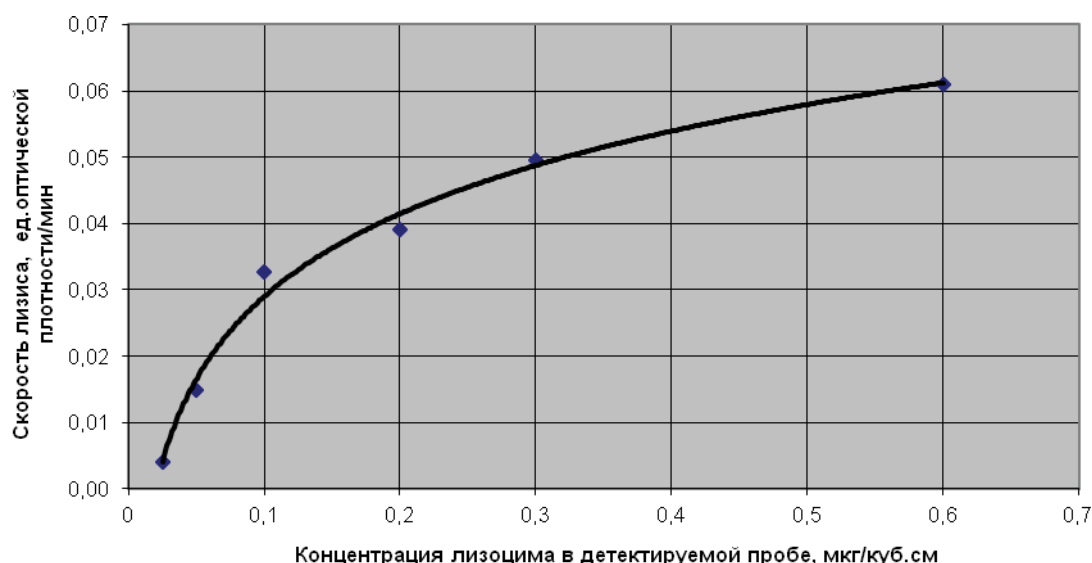
**Рисунок 1 – Кинетика лизиса микрококка при различном содержании лизоцима (измерение по шкале пропускания)**



**Рисунок 2 – Кинетика лизиса микрококка при различном содержании лизоцима (измерение по шкале оптической плотности)**

Для получения воспроизводимой методики необходимо связать начальную скорость лизиса с концентрацией или активностью препарата и определить пределы оптимальных концентраций фермента и субстрата, исключить влияние посторонних факторов: температурный коэффициент, ионная сила и т.д. Предпочтение было отдано минимизации времени исследования (инкубирования) пробы, так как полностью устранить процессы коагуляции, сильно выраженные во времени, невозможно.

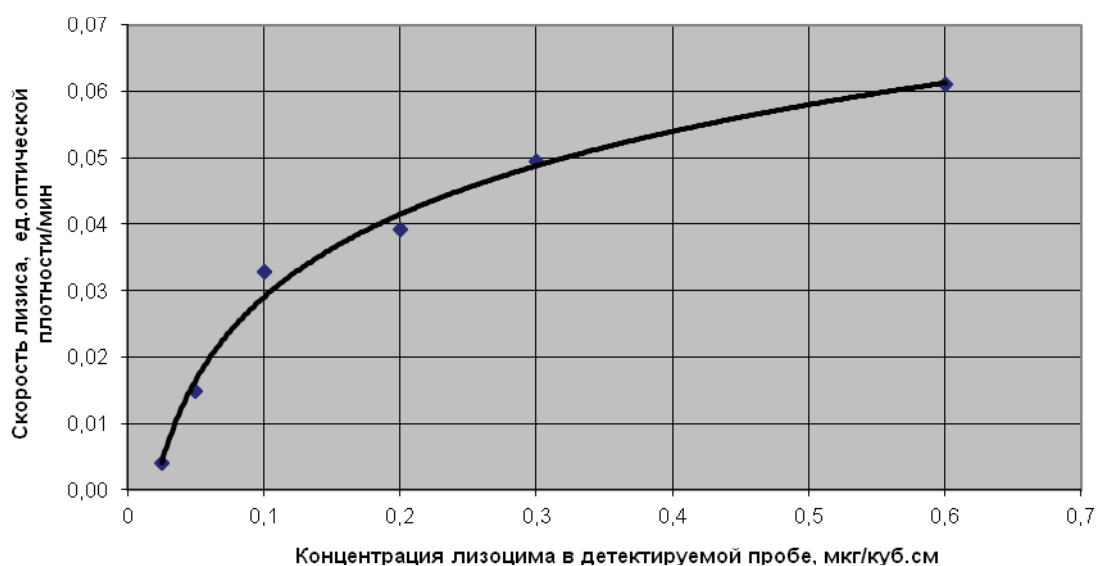
На рис. 3 и 4 представлены зависимости начальной скорости лизиса от концентрации фермента в разных вариантах измерения.



**Рисунок 3 – Зависимость найденной начальной скорости лизиса (по шкале оптической плотности) в зависимости от концентрации лизоцима**

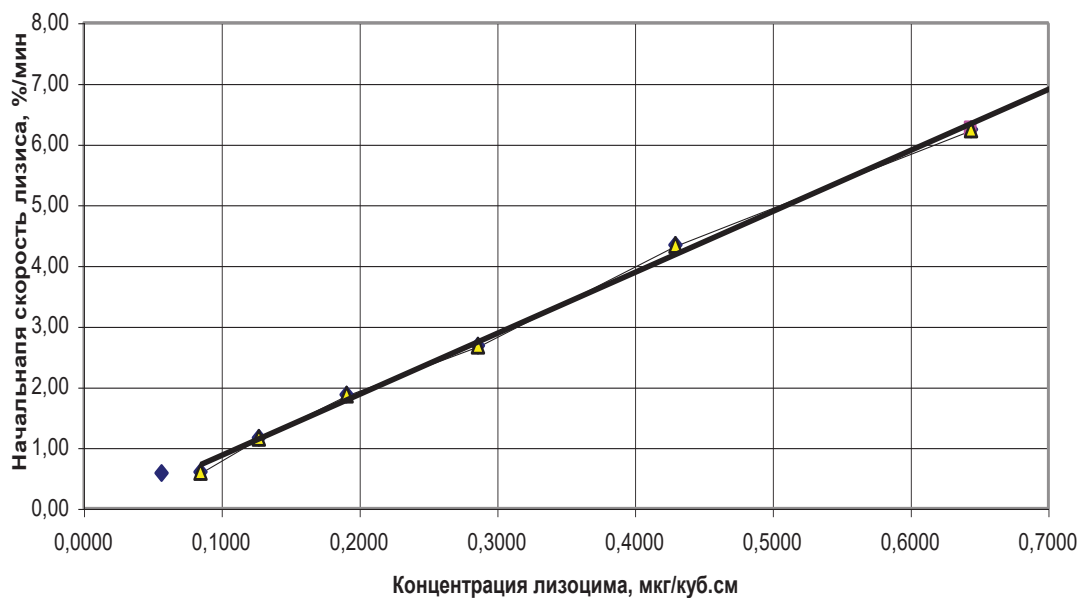
На рис. 3 видно, что такая зависимость существует, но в данных условиях она не линейна. Последнее связано с очень высокой скоростью лизиса активных проб, обеспечивающей необходимую глубину в более короткий срок. В результате данные усредняются, и показания активности (концентрации фермента) занижаются. Показания рис. 4 аналогичны. Определить оптимальный способ измерения изменения характеристик светопропускания необходимо при выявлении пределов возможной концентрации субстрата.

Кинетика лизиса микрококка снималась на спектрофотометре СФ-26 в кювете 5 мм без термостатирования. Для большей информативности данные лизиса фиксировались в течение 10 минут через каждые 0.25 мин исследования, далее – через 0.5 мин. Полученные экспериментальные данные были обработаны и представлены в табл. 1.



**Рисунок 4 – Зависимость найденной начальной скорости лизиса (по шкале пропускания) в зависимости от концентрации лизоцима**

На основании полученных данных определена линейная зависимость активности лизоцима от его концентрации, представленная в табл. 2 и на рис. 5.



**Рисунок 5 – Зависимость начальной скорости лизиса от концентрации лизоцима в детектируемой пробе**

**Таблица 1 – Исследование кинетики лизиса микрококка  
при разных концентрациях фермента**

| Время,<br>мин | Концентрация лизоцима в субстратно-ферментативной смеси, мкг/мл |       |       |       |       |       |       |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|               | 0.058                                                           | 0.087 | 0.130 | 0.195 | 0.293 | 0.439 | 0.658 |
|               | Пропускание, %                                                  |       |       |       |       |       |       |
| 0.00          | 50.90                                                           | 50.80 | 51.20 | 53.00 | 53.00 | 54.30 | 54.00 |
| 0.25          | 51.10                                                           | 50.80 | 51.50 | 53.50 | 53.90 | 55.70 | 56.00 |
| 0.50          | 51.10                                                           | 50.90 | 51.50 | 53.90 | 54.70 | 56.80 | 57.70 |
| 0.75          | 51.20                                                           | 51.00 | 51.80 | 54.50 | 55.40 | 57.90 | 59.50 |
| 1.00          | 51.40                                                           | 51.10 | 52.20 | 55.00 | 56.20 | 59.00 | 61.30 |
| 1.25          | 51.50                                                           | 51.30 | 52.50 | 55.50 | 56.90 | 59.90 | 62.50 |
| 1.50          | 51.70                                                           | 51.40 | 52.80 | 56.00 | 57.50 | 60.90 | 64.50 |
| 2.00          | 52.00                                                           | 51.70 | 53.50 | 57.00 | 58.80 | 62.60 | 66.50 |
| 2.50          | 52.30                                                           | 52.10 | 54.10 | 57.80 | 60.00 | 64.10 | 67.50 |
| 3.00          | 52.60                                                           | 52.30 | 54.60 | 58.70 | 61.10 | 65.50 | 68.90 |
| 3.50          | 52.90                                                           | 52.60 | 55.20 | 59.40 | 62.20 | 66.70 | 70.00 |
| 4.00          | 53.30                                                           | 52.90 | 55.80 | 60.20 | 63.20 | 67.80 | 71.10 |
| 4.50          | 53.50                                                           | 53.20 | 56.30 | 61.00 | 64.00 | 68.70 | 72.00 |
| 5.00          | 53.80                                                           | 53.50 | 56.80 | 61.70 | 64.90 | 69.60 | 72.80 |
| 5.50          | 54.10                                                           | 53.80 | 57.30 | 62.40 | 65.70 | 70.40 | 73.60 |
| 6.00          | 54.40                                                           | 54.00 | 57.80 | 63.00 | 66.30 | 71.20 | 74.30 |
| 6.50          | 54.60                                                           | 54.40 | 58.20 | 63.60 | 67.00 | 71.80 | 74.90 |
| 7.00          | 55.00                                                           | 54.60 | 58.50 | 64.10 | 67.60 | 72.50 | 75.40 |
| 7.50          | 55.20                                                           | 54.80 | 59.20 | 64.60 | 68.10 | 73.00 | 76.00 |
| 8.00          | 55.50                                                           | 55.20 | 59.60 | 65.10 | 68.70 | 73.60 | 76.50 |
| 8.50          | 55.80                                                           | 55.40 | 59.90 | 65.60 | 69.20 | 74.10 | 77.00 |
| 9.00          | 56.00                                                           | 55.70 | 60.30 | 66.00 | 69.60 | 74.60 | 77.40 |
| 9.50          | 56.30                                                           | 55.90 | 60.70 | 66.40 | 70.00 | 75.10 | 77.80 |
| 10.00         | 56.50                                                           | 56.10 | 61.10 | 66.90 | 70.50 | 75.50 | 78.20 |

**Таблица 2 – Начальная скорость лизиса пробы в зависимости  
от концентрации в ней лизоцима**

| Концентрация лизоцима в субстратно-ферментативной смеси, мкг/см <sup>3</sup> | 0.64 | 0.43 | 0.29 | 0.19 | 0.13 | 0.08 | 0.06 |
|------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Начальная скорость лизиса, %/мин                                             | 6.24 | 4.34 | 2.68 | 1.87 | 1.16 | 0.60 | 0.58 |

Проведенные исследования подтверждают возможность анализа активности *in vitro* раствора фермента лизоцима с использованием тест-культуры *Micrococcus Luteus*. Предложенная в работе уникальная методика биотехнологического тестирования является достаточно эффективной и может быть использована на фармацевтических, биотехнологических и пищевых предприятиях для лабораторного контроля качества готовых препаратов, обладающих антимикробной активностью, а также в научно-исследовательской практике. В ходе дальнейших исследований предполагается распространить данную

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  $\alpha$ -кето кислоты и иона аммония. Характерной особенностью всех ДААО является высокая специфичность именно к D-изомерам аминокислот.

Оксидазы D-аминокислот обнаружены у прокариот, дрожжей,