

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *OGATAEAPARAPOLYMORPHA* DL1

Д.Л. Атрошенко^{1,2}, М.Д. Шеломов^{1,2}, Ю.А. Ушакова¹, С.С. Савин¹, В.И. Тишков^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Оксидаза D-аминокислот (DAAO) – это фермент, который катализирует окисление D-аминокислот в соответствующие α-кетокислоты с образованием пероксида водорода и иона аммония. DAAO играет важную роль как в прокариотах, так и эукариотах. В последних особая роль относится к регуляции нервной деятельности. Пониженный уровень D-Ser приводит к возникновению шизофрении. В случае таких тяжелых нейродегенеративных заболеваний как болезни Альцгеймера и Паркинсона, возрастает уровень D-аланина. Разработка высокочувствительных методов детекции этих D-аминокислот может быть использована для анализа возможности возникновения вышеуказанных нейродегенеративных заболеваний.

В пищевой биотехнологии уровень D-аминокислот можно использовать для определения качества пищевых продуктов. С увеличением времени хранения пищевых продуктов в основном происходит увеличение содержания D-Ala. Это связано с тем, что D-Ala является основной D-аминокислотой пептидогликана клеточной стенки бактерий.

Активно развивающимся подходом для определения уровня D-аминокислот является использование биосенсоров на основе оксидаз D-аминокислот, которые не взаимодействуют с L-аминокислотами. Биосенсоры просты в использовании, экспрессные и относительно дешевые. Основным препятствием стала широкая субстратная специфичность имеющихся DAAO (в первую очередь из почек свиньи, дрожжей *T.variabilis* и *R.gracilis*, которые с D-Ala и D-Ser имеют близкие кинетические параметры). Это особенно важно в случае определения D-Ala, концентрация которого в клетке примерно в 10 раз ниже концентрации D-Ser. Поэтому в настоящее время самой важной задачей является получение препаратов DAAO высокоспецифичных или к D-Ala, или к D-Ser. Нами была получена DAAO из дрожжей *Ogataeapara polymorpha* DL1, высокоспецифичная к D-Ala. Причем его удельная активность оказалась минимум в два раза выше по сравнению с другими DAAO, описанными в литературе.

Важным свойством для подбора условий реакции является температурная стабильность фермента. Детальные данные по кинетике инактивации и знание механизма инактивации фермента позволит подобрать оптимальные условия работы и хранения биосенсора. Кроме того, знание механизма инактивации необходимо при использовании методов рационального дизайна с целью повышения стабильности фермента.

В данной работе изучена термоинактивация OraDAAO1 в диапазоне температур 48–52 °C. Исследовано влияние начальной концентрации фермента и добавления дополнительных количеств молекулы FAD на кинетику термоинактивации. Исходя из полученных кинетических данных, предположен механизм термоинактивации OraDAAO1, проанализирована советующая кинетическая схема и определены константы инактивации OraDAAO1.

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук (МК-6239.2021.1.4).