

8. Yang Y., Xia J., Li J. et al. A novel impeller configuration to improve fungal physiology performance and energy conservation for cephalosporin C production // *Journal of Biotechnology*. 2012. Vol. 161. № 3. P. 250–256.
9. Zhgun A.A. Industrial production of antibiotics in fungi: current state, deciphering the molecular basis of classical strain improvement and increasing the production of high-yielding strains by the addition of low-molecular weight inducers // *Fermentation*. 2023. Vol. 9. № 12. 1027.
10. Newton G.G.F., Abraham E.P. Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing D-alpha-aminoadipic acid // *Biochemical Journal*. 1956. Vol. 62. № 4. P. 651–658.
11. Dumina M.V., Zhgun A.A., Novak M.I. et al. Comparative gene expression profiling reveals key changes in expression levels of cephalosporin C biosynthesis and transport genes between low and high-producing strains of *Acremonium chrysogenum* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014. Vol. 30. № 11. P. 2933–2941.
12. Hyvönen M.T., Keinänen T.A., Nuraeva G.K. et al. Hydroxylamine analogue of agmatine: Magic bullet for arginine decarboxylase // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10. № 3. 406.

УДК 577.15

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-3-8-9>

БИОХИМИЯ И ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИАМИНОКСИДАЗ И ОКСИДАЗ D-АМИНОКИСЛОТ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Д.Л. Атрошенко^{1,2,3}, Е.П. Сергеев^{1,2}, Д.И. Головина^{1,2}, В.И. Тишков¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

³Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Медицинский институт, Москва, Россия

Полиаминоксидазы (РАО) — FAD-зависимые ферменты, катализирующие окислительное дезаминирование полиаминов (спермидина, спермина, путресцина и их ацетилированных производных) с образованием пероксида водорода и соответствующих аминокислот. Структурно ферменты содержат домен связывания FAD и изогнутый катионо-направляющий канал, обеспечивающий распознавание полиаминовой цепи. У эукариот РАО локализованы в цитозоле, пероксисомах и/или апопласте и вовлечены в регуляцию роста, стресс-ответов и сигнальных путей, где пероксид водорода выступает вторичным мессенджером. Функции дрожжевых полиаминоксидаз остаются изучены неполно. Распространённая гипотеза об их участии в синтезе β-аланина, показанная для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в наших экспериментах не получила универсального подтверждения на модели *Ogataea parapolymorpha* DL-1, что делает изучение дрожжевых РАО актуальной задачей фундаментальной биохимии.

Изменение концентраций полиаминов в биологических жидкостях человека может служить маркером различных патологических состояний, включая злокачественные новообразования и нейродегенеративные процессы [1,2]. Наиболее распространённые аналитические подходы — ВЭЖХ–МС/МС либо ВЭЖХ–флуориметрия после предварительной дериватизации; однако они требуют сложной пробоподготовки, дорогостоящего оборудования и высокой квалификации персонала. Альтернативой является ферментативное определение: образование H₂O₂ в реакции, катализируемой РАО, делает эти ферменты удобными элементами электрохимических, оптических и хемилюминесцентных систем детекции. Таким образом, исследование дрожжевых полиаминоксидаз важно как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Нами клонированы гены, кодирующие предполагаемые полиаминоксидазы, из *O. parapolymorpha* DL-1 (3 гена), *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, *Lachancea thermotolerans* CBS 6340, *Sporopachyderma lactivora* Y-1647, *Cyberlindnera jadinii* Y-74, *Candida blankii* Y-2100. При экспрессии в *Escherichia coli* в растворимой форме были получены пять ферментов, для которых были изучены основные физико-химические свойства. Все ферменты демонстрируют различную субстратную специфичность и повышенную термостабильность по данным анализа ThermoFAD [3]. Один из ферментов *O. parapolymorpha* DL-1 проявлял высокие каталитические константы в реакциях с ацетилированными производными спермидина и спермина ($k_{\text{cat}} \approx 200$ и 350 с^{-1} соответственно), что делает его перспективным для детекции ацетилированных полиаминов. Фермент из *K. marxianus* показал умеренные каталитические параметры по отношению к широко распространённым полиаминам, что допускает его использование для оценки суммарного уровня полиаминов.

Оксидазы D-аминокислот (DAAO) - FAD-зависимые флавопротеины, которые осуществляют окислительное дезаминирование D-аминокислот до соответствующих α -кетокислот с одновременным образованием пероксида водорода и катиона аммония [4]. В рамках ферментов, действующих на D-аминокислоты, традиционно различают два ключевых класса: DAAO с широким субстратным профилем и DASPO высокоспецифичную к D-аспартату.

DAAO выполняет важные физиологические функции у млекопитающих и имеет широкий спектр биотехнологических применений. Один из наиболее известных примеров — участие фермента в промышленной схеме получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты (7-АЦК) из цефалоспорина C, служащей исходником для синтеза цефалоспориновых антибиотиков разных поколений. Кроме того, на базе DAAO активно развиваются биосенсоры для определения D-аминокислот: их уровень рассматривают как маркер ряда патологических состояний, а в пищевых матрицах — как показатель степени ферментации и бактериальной контаминации [5,6].

Функции и роль DAAO у дрожжей изучены недостаточно. В геномах микроорганизмов обычно описывают не более двух генов, кодирующих DAAO, однако при анализе генома *O. parapolymorpha* DL-1 нами идентифицировано шесть кандидатов. Эти гены были клонированы и гетерологично экспрессированы в клетках *E. coli*: пять ферментов получены в растворимой и активной форме, ещё один — в виде телец включения. Растворимые ферменты были очищены и охарактеризованы. Все ферменты имеют различные спектры субстратной специфичности. Каждая из них обладает наилучшими каталитическими параметрами с определенными D-аминокислотами среди описанных в литературе DAAO. Данные ферменты также имеют уникальные профили pH-активности и высокую температурную стабильность. Эти свойства делают их интересными для применения в биотехнологии. Кроме того, важным фактом является то, что такое большое количество DAAO из одного организма было охарактеризовано впервые и это делает OraDAAO интересными объектами для изучения функций оксидаз D-аминокислот в микроорганизмах.

Мы сформировали базу «свойство–структура» и на её основе разработали биоинформационно-структурный подход для надёжной идентификации новых DAAO. Метод позволил найти DAAO в археях *Natrarchaeobius halalkaliphilus* AArch4 и бактериях *Natronosporangium hydrolyticum* ACRA39 для которых была проведена первичная биохимическая характеристика.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 24-74-00121, а также в рамках Соглашения № 075-15-2021-1396 от 26.10.2021.

Литература

1. Casero R.A., Murray Stewart T., Pegg A.E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities // *Nature Reviews Cancer*. 2018. Vol. 18. № 11. P. 681–695.
2. Saiki S., Sasazawa Y., Fujimaki M. et al. A metabolic profile of polyamines in Parkinson disease: A promising biomarker // *Annals of Neurology*. 2019. Vol. 86. № 2. P. 251–263.
3. Forneris F., Orru R., Bonivento D. et al. ThermoFAD, a ThermoFluor®-adapted flavin ad hoc detection system for protein folding and ligand binding // *The FEBS Journal*. 2009. Vol. 276. № 10. P. 2833–2840.
4. Tishkov V.I., Khoronenkova S.V. D-amino acid oxidase: Structure, catalytic mechanism, and practical application // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. Vol. 70. № 1. P. 40–54.
5. Molla G., Piubelli L., Volonte F., Pilone M.S. Enzymatic detection of D-amino acids // *Unnatural Amino Acids: Methods and Protocols*. 2012. Vol. 794. P. 273–289.
6. Lata S., Batra B., Kumar P., Pundir C.S. Construction of an amperometric D-amino acid biosensor based on D-amino acid oxidase/carboxylated multiwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaniline modified gold electrode // *Analytical Biochemistry*. 2013. Vol. 437. № 1. P. 1–9.