

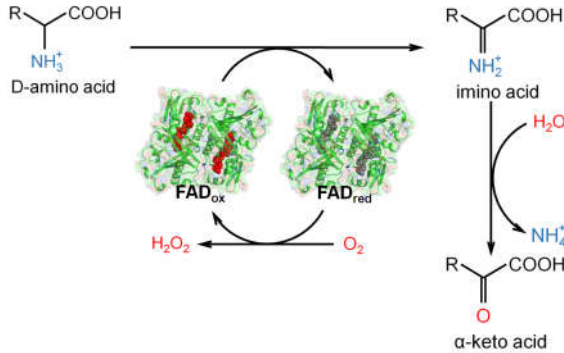


Шеломов М.Д.^{1,2}, Атрошенко Д.Л.^{1,2}, Эльдаров М.А.³, Тишков В.И.^{1,2,3}

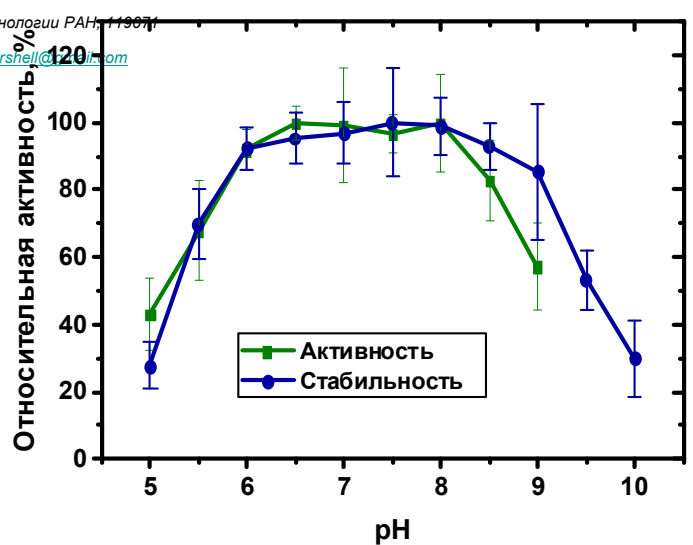
Лаборатория химической энзимологии, Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991

Оксидаза D-аминокислот (DAAO)

Оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) катализирует реакцию образования α-кетокислот с выделением пероксида водорода и иона аммония, используя в качестве субстратов соответствующие D-аминокислоты и молекулярный кислород.



Профили pH-активности и стабильности



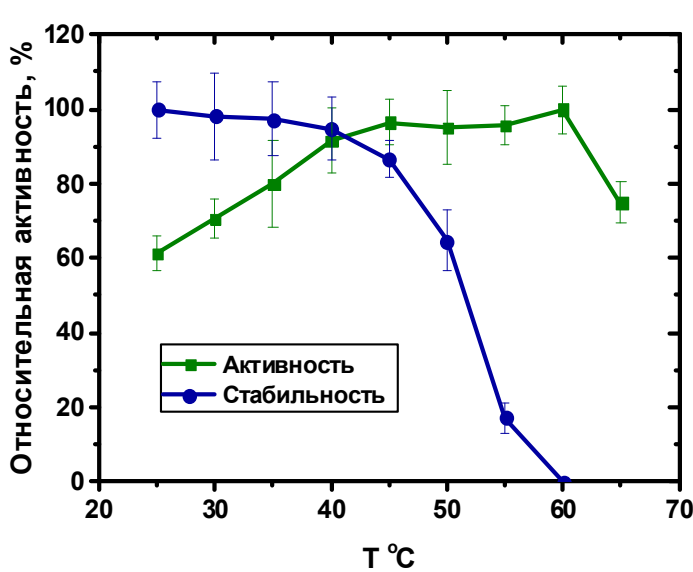
Введение

Ген данного фермента был обнаружен в большом количестве различных организмов, от дрожжей до человека. В микроорганизмах он служит для включения D-аминокислот в метаболизм клетки и возможности использовать их в качестве единственного источника азота. Также данный фермент находит широкое практическое применение в различных областях биотехнологии. Это и синтез α-кетокислот, получение не природных L-аминокислот, отдельно стоит отметить процесс получения 7-аминоцефалоспориновой кислоты, из которой затем получают цефалоспориновые антибиотики различных поколений. Таким образом, существует потребность в поиске оксидаз D-аминокислот с параметрами, подходящими для их использования в промышленности. Также интересно изучение их роли в метаболизме микроорганизмов. В мейлтофных дрожжах *Hansenula Polymorpha* были обнаружены четыре гена, предположительно кодирующие DAAO.

Целью нашей работы стало получение рекомбинантной оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Hansenula Polymorpha* и изучение ее свойств.

Была проведена экспрессия в клетках *E. coli*, выделение и очистка хроматографическими методами. Определена pH и температурная стабильности и активности, также были определены каталитические параметры фермента с набором D-аминокислот.

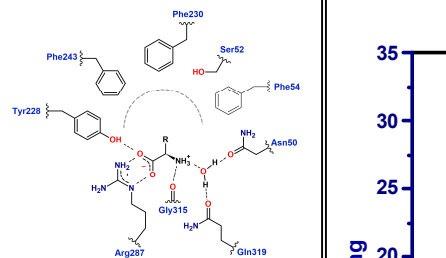
Профили температурной активности и стабильности



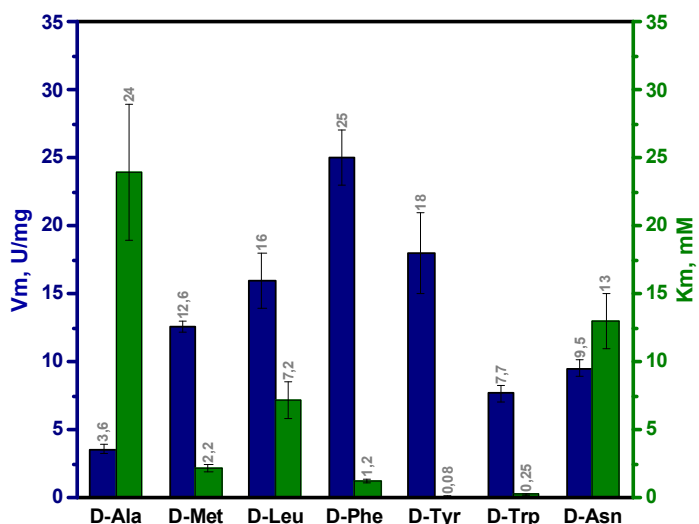
Результаты очистки

Стадия очистки	V, ml	∑ a, U	Выход стадий, %	a/A280	Степень очистки
Бесклеточный экстракт	11	141		0,13	1
Двукратная анионообменная хроматография на MonoQ	8	30	21	6,7	50
Концентрирование и обессоливание G25	11	22	15	6,8	50

Модель активного центра ОраDAAO-2



Субстратная специфичность



Выводы

- 1) Получена новая рекомбинантная DAAO из дрожжей *Hansenula Polymorpha* DL-1 (ОраDAAO-2). Предложена простая и эффективная методика очистки.
- 2) Определены профили pH-активности и pH-стабильности ОраDAAO-2.
- 3) Определена субстратная специфичность и температурная стабильность данного фермента.