

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.151.45; 577.151.042

**АДСОРБЦИЯ ЛИЗОЦИМА НА ЖИВЫХ КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*  
И ЕГО БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В ПРИСУТСТВИИ  
ГЛИЦИНА И ЗАРЯЖЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ**

**Николай Владимирович Растрига<sup>1</sup>, Дария Алановна Гасанова<sup>2</sup>, Павел  
Андреевич Левашов<sup>3</sup>**

<sup>1-3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет

**Авторы, ответственные за переписку:** Николай Владимирович Растрига, nicolos@live.ru; Павел Андреевич Левашов, levashov@yahoo.com

**Аннотация.** Для человеческого и куриного лизоцима исследована взаимосвязь изменения параметров адсорбции фермента на живых бактериальных клетках *Escherichia coli* и установлена величина его эффективной бактериолитической активности в присутствии глицина и заряженных аминокислот. Как для человеческого, так и для куриного лизоцима показано, что свободные аминокислоты, добавленные до концентрации 1,5 мМ для глицина или 5,0 мМ для глутамата, аспартата, гистидина, аргинина и лизина уменьшают константу десорбции фермента на бактериальных клетках в 1,4–2,0 раза. Одновременно с этим наблюдается увеличение бактериолитической активности лизоцима в 1,5–1,9 раза. Таким образом, усиление антибактериальной активности в присутствии глицина и заряженных аминокислот может объясняться улучшением продуктивной сорбции фермента на субстрате – бактериальных клетках.

**Ключевые слова:** адсорбция лизоцима, бактериолитическая активность, человеческий лизоцим, куриный лизоцим, активаторы лизоцима, *Escherichia coli*

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-195-202

**Список сокращений:** КОЕ – колониобразующие единицы (бактериальные клетки), Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим.

**Финансирование.** Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках государственного задания «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды». Номер ЦИТИС: 121041500039-8.

**Для цитирования:** Растрига Н.В., Гасанова Д.А., Левашов П.А. Адсорбция лизоцима на живых клетках *Escherichia coli* и его бактериолитическая активность в присутствии глицина и заряженных аминокислот // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 2. С. 195–202.

## ORIGINAL ARTICLE

**ADSORPTION OF LYSOZYME ON LIVING CELLS OF *ESCHERICHIA COLI* AND ITS BACTERIOLYTIC ACTIVITY IN THE PRESENCE OF GLYCINE AND CHARGED AMINO ACIDS****Nikolay V. Rastriga<sup>1</sup>, Daria A. Gasanova<sup>2</sup>, Pavel A. Levashov<sup>3</sup>**

Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry

**Corresponding authors:** Nikolay V. Rastriga, nicolos@live.ru; Pavel A. Levashov, levashov@yahoo.com

**Abstract.** For human and chicken lysozyme, the relationship between changes in the parameters of enzyme adsorption on living *Escherichia coli* bacterial cells and the value of its effective bacteriolytic activity in the presence of glycine and charged amino acids was studied. It has been shown for both human and chicken lysozyme that free amino acids added to a concentration of 1.5 mM for glycine or 5.0 mM for glutamate, aspartate, histidine, arginine, and lysine reduce the desorption constant of the enzyme on bacterial cells to 1.4–2.0 times. At the same time, an increase in the bacteriolytic activity of lysozyme is also observed in 1.5–1.9 times. Thus, the enhancement of antibacterial activity in the presence of glycine and charged amino acids can be explained by an improvement in the productive sorption of the enzyme on the substrate, bacterial cells.

**Keywords:** adsorption of lysozyme, bacteriolytic activity, human lysozyme, chicken lysozyme, lysozyme activators, *Escherichia coli*

**Financial Support.** The work was performed at the Department of Chemical Enzymology of the Faculty of Chemistry of Lomonosov Moscow State University within the framework of the state task “Molecular design, structural and functional analysis and regulation of enzyme systems, cellular structures, bionanomaterials: fundamental foundations and applications in technology, medicine, environmental protection” Number CITIS: 121041500039-8.

**For citation:** Rastriga N.V., Daria A.G., Levashov P.A. Adsorption of Lysozyme on Living Cells of *Escherichia coli* and its Bacteriolytic Activity in the Presence of Glycine and Charged Amino Acids // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 2. P. 195–202.

Стремительное развитие фармацевтики, увеличение объема и доступности производимых лекарственных средств не только оказывают положительное влияние на продолжительность жизни людей, но и порождают новые проблемы, одной из которых стала возрастающая с каждым годом антибиотикорезистентность бактерий. Согласно данным Центра контроля и предупреждения заболеваний США (CDC), за 2019 г. 35 тыс. американцев становятся жертвой антибиотикорезистентных бактерий, хотя еще в 2017 г. этот показатель составлял 23 тыс. чел. [1, 2]. Во всем мире в качестве хорошей альтернативы антибиотикам для борьбы с резистентными бактериями все чаще рассматривают бактериолитические ферменты [3–5], гидролизующие сополимер клеточной стенки бактерии. Из бактериолитических ферментов наиболее известен и доступен яичный куриный лизоцим, ко-

торый уже находит разнообразное применение в биотехнологии и медицине [3, 6–8]. Лизоцим человека, который функционирует как в свободном виде, так и в составе иммунных клеток в целом близок по структуре к куриному лизоциму, но имеет отличия, которые потенциально могут отражаться на функциях [9–11]. Недавно было обнаружено, что на бактериолитическую активность куриного лизоцима против грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* существенно влияет присутствие в растворе глицина или заряженных аминокислот [12, 13], однако механизм подобной активации фермента пока не известен. Для человеческого лизоцима подобные исследования также не проводились. Известно, что в ходе ферментативного лизиса бактерий важную роль играет стадия сорбции фермента на поверхности клетки. Адсорбция (образование комплекса фермента с субстратом) может быть

как продуктивная, предшествующая катализу, так и непродуктивная, блокирующая антибактериальное действие фермента [14, 15]. Более того, недавно было обнаружено, что некоторые бактерии имеют ассоциированные с поверхностью клетки специализированные комплексы биополимеров, непродуктивно связывающие лизоцим для защиты бактерии от действия бактериолитического фермента [16–18].

В настоящей работе была поставлена задача изучить взаимосвязь влияния свободных заряженных аминокислот и глицина на скорость ферментативного лизиса бактерий, а также на сорбцию человеческого и куриного лизоцима на поверхности живых грамотрицательных палочек *E. coli*. Выбор модельного микроорганизма обусловлен тем, что другие близкородственные *E. coli* представители семейства Enterobacteriaceae вызывают множество опасных заболеваний у человека [19, 20]. Знания о влиянии эффекторов на активность и сорбцию лизоцима важны для более глубокого понимания механизмов активации как фермента в составе медикаментов, так и собственного фермента в человеческом организме. Полученная в исследовании информация может открыть новые пути в разработке высокоэффективных лекарственных антибактериальных препаратов.

### Экспериментальная часть

**Материалы.** Куриный яичный лизоцим, MES, Tris («Amresco», США), рекомбинантный лизоцим человека (выращенный в рисе), препарат лиофилизированных бактериальных клеток *Micrococcus luteus* («Sigma», США), L-гистидин, L-лизин («Serva», Германия), L-аргинин, L-аспарагиновая кислота («Merck», Германия), глицин («Roth», Германия), L-глутамат натрия («MeiHua», Китай), дрожжевой экстракт («Biospringer», Франция), пептон, триптон, бактоагар («BD Difco», США), глюкоза («Rokett Freg», Франция), соляная кислота, уксусная кислота («Компонент-Реактив», Россия), гидроксид натрия, хлорид натрия, сульфат магния («Panreac», Испания). Все измерения в работе проводились в буферном растворе 0,01 М Tris-MES-CH<sub>3</sub>COOH (pH 8,5).

*E. coli* (музейный штамм МН1) любезно предоставлен А.А. Белогуровым (НИМЦ Кардиологии Минздрава России). Клетки выращивали согласно стандартной методике [21]. Суспензию клеток *E. coli* концентрацией 10<sup>9</sup> КОЕ/мл (оптическое поглощение около 1,3 при длине волны 650 нм) в буферном растворе замораживали с помощью

жидкого азота порциями по 0,5 мл. Препарат хранили при температуре –70 °С не более 3 недель. Для каждого эксперимента суспензию бактерий *E. coli* размораживали, центрифугировали на центрифуге «MiniSpin» («Eppendorf», Германия) при 6000 об/мин (2073 g) в течение 7 минут. После отделения супернатанта осадок ресуспендировали в 400 мкл буферного раствора 0,01 М Tris-MES-CH<sub>3</sub>COOH (pH 8,5) при 37 °С. Значения pH буфера и его ионная сила оптимальны для проявления максимальной скорости лизиса клеток *E. coli* лизоцимом, согласно литературным данным, для куриного фермента [22]. Оптимальность этих условий подтверждена в настоящем исследовании и для человеческого фермента. Значение pH растворов свободных аминокислот перед измерением доводили до величины 8,5, используя HCl или NaOH. Согласно информации производителей препарата и литературным данным, в расчетах были приняты значения молекулярной массы куриного и человеческого лизоцима, равными 14,3 а и 16,5 кДа соответственно [3, 23].

**Измерение бактериолитической активности.** Бактериолитическую активность (скорость лизиса клеток *E. coli*) измеряли турбидиметрическим методом по изменению оптического поглощения  $A_{650}$  во времени ( $-A_{650}/dt$ ). Изменение во времени поглощения ( $V = -dA_{650}/dt$ ) пропорционально изменению числа клеток во времени ( $-d\text{КОЕ}/dt$ ) [22, 24]. Измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре «UV-1800» («Shimadzu», Япония) в кювете объемом 0,5 мл и длиной оптического пути 1 см при длине волны 650 нм и температуре 37 °С. В начале измерения концентрация бактериальных клеток в суспензии равнялась  $3 \cdot 10^8$  КОЕ/мл ( $A_{650} = 0,45$ ). Начальная скорость ферментативного лизиса клеток *E. coli* линейно зависит от концентрации лизоцима, возрастая в диапазоне 0,05–1,00 мкг/мл [22, 24, 25]. В экспериментах по измерению активности мы добавляли лизоцим до его конечной концентрации 0,1 мкг/мл. После внесения в реакционную смесь субстрата (бактериальных клеток) и растворов эффекторов (аминокислот) до добавления фермента (начала регистрации скорости ферментативного лизиса клеток) сначала в течение 3–4 минут регистрировали фоновое изменение поглощения, которое далее учитывали как поправку при расчете скорости ферментативного лизиса. Скорость фонового изменения поглощения  $A_{650}$  не превышала средней величины погрешности измерения скорости лизиса клеток

в присутствии фермента. Скорость ферментативного лизиса клеток регистрировали на протяжении 5 минут.

**Исследование адсорбции лизоцима на клетках *E. coli*.** Адсорбцию лизоцима на бактериальных клетках определяли по методике, аналогичной той, что описана в литературе [15, 26]. Готовили суспензию бактерий *E. coli* в буфере с концентрацией клеток  $3 \cdot 10^8$  КОЕ/мл ( $A_{650} = 0,45$ ). К суспензии добавляли лизоцим до конечной концентрации 50–250 мкг/мл и эффекторы

(аминокислоты) до соответствующих значений концентрации. Поскольку время достижения сорбционного равновесия составляет 4–5 минут при температуре 37 °С [15, 26], суспензию инкубировали в течение 7 минут в суховоздушном термостате «ТСО-1/80 СПУ модель 1005» (Россия) при 37 °С на качалке-мультиротаторе «Multi Bio RS-24» («Biosan», Латвия) со скоростью вращения-переворачивания пробирок 15 об/мин. После термостатирования образцы центрифугировали на центрифуге «Minispin»

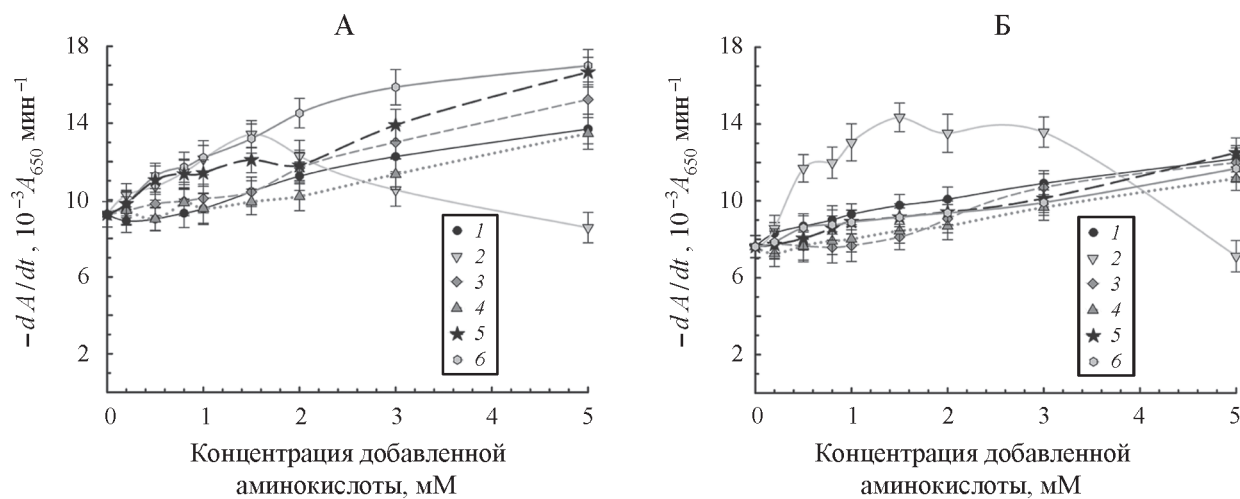


Рис. 1. Зависимость скорости лизиса клеток *E. coli* человеческим (А) и куриным (Б) лизоцимом от концентрации соответствующей свободной аминокислоты (1 – Glu, 2 – Gly, 3 – Arg, 4 – His, 5 – Asp, 6 – Lys)

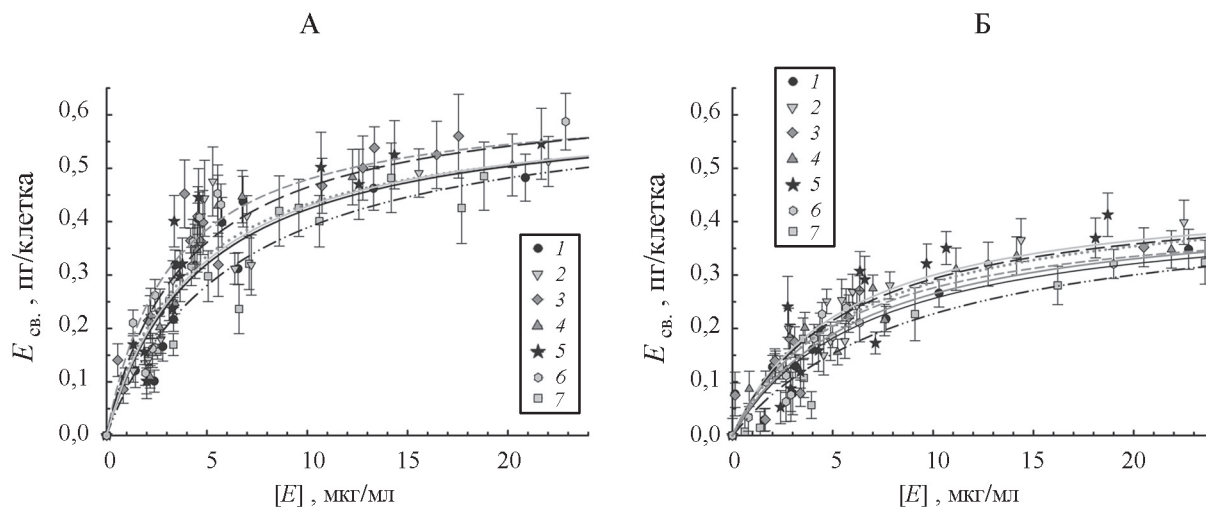


Рис. 2. Изотермы сорбции человеческого (А) и куриного (Б) лизоцима на бактериальных клетках *E. coli* в присутствии свободных аминокислот (1 – Glu, 2 – Gly, 3 – Arg, 4 – His, 5 – Asp, 6 – Lys, 7 – препарат без добавления свободных аминокислот). Концентрация глицина 1,5 мМ, концентрация остальных аминокислот 5 мМ

(«Eppendorf», Германия) в течение 7 минут при 6000 об/мин (2073 г), а затем отбирали надосадочную жидкость для дальнейшего определения концентрации несвязанного с клетками лизоцима по его активности на вспомогательном субстрате *M. luteus* [15, 26]. Исходя из количества изначально добавленного и оставшегося в растворе свободного лизоцима, рассчитывали количество связанного с клетками лизоцима и строили изотермы сорбции.

Каждое усредненное значение получено на основании не менее трех независимых экспериментов. Погрешности рассчитывали по распределению Стьюдента для доверительного интервала  $P = 0,95$ .

### Результаты и их обсуждение

На рис. 1 приведены зависимости скорости лизиса бактериальных клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимом от концентрации заряженных аминокислот и глицина. Можно утверждать, что изменение активности в присутствии эффекторов для человеческого и куриного лизоцима в целом носит сходный характер. Зависимость активности фермента от концентрации глицина имеет куполообразный вид с максимумом при концентрации аминокислоты

1,0–1,5 мМ. В присутствии заряженных аминокислот активность лизоцима практически монотонно растет на отрезке концентраций эффектора от 0 до 5 мМ. Следует отметить некоторые отличия человеческого лизоцима от куриного – менее выражен эффект активации в присутствии глицина, но в тоже время более выражена активация в присутствии аспартата, аргинина и лизина. Схожесть характера влияния одинаковых свободных аминокислот на активность ферментов свидетельствует, вероятно, о едином механизме активации этими эффекторами как человеческого, так и куриного лизоцима. Для дальнейшего сравнения активности и исследования адсорбции лизоцима на клетках мы зафиксировали концентрацию глицина и остальных аминокислот на уровне 1,5 и 5,0 мМ. Отношение скорости лизиса клеток в присутствии эффектора к скорости лизиса клеток в его отсутствие для фиксированных значений концентрации аминокислот представлены в таблице. Как видим, величина активации в присутствии разных эффекторов варьирует, увеличиваясь в 1,5–1,9 раза.

Для дальнейшего прояснения причин изменения скорости ферментативного лизиса клеток в присутствии свободных аминокислот нами

### Адсорбция лизоцима на живых клетках *E. coli*. Сорбционные параметры, рассчитанные по уравнению Ленгмюра

Эффектор		нет	Gly	Glu	Asp	Arg	Lys	His
Отношение скорости лизиса клеток в присутствии эффектора к скорости лизиса клеток в отсутствии эффектора	Ч	1	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2
	К	1	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Константа десорбции фермента на поверхности живых клеток $K_d$ , 10 <sup>-7</sup> М	Ч	3,8 ± 0,7	2,7 ± 0,6	2,8 ± 0,5	2,4 ± 0,6	1,9 ± 0,2	2,2 ± 0,4	2,5 ± 0,3
	К	6,6 ± 1,2	3,8 ± 0,6	4,8 ± 0,9	4,0 ± 0,7	3,8 ± 0,7	4,6 ± 0,6	4,3 ± 0,5
Максимальная сорбционная емкость $V_{max}$ , пг/клетка (сверху); аттомоль/клетка (снизу)	Ч	0,63 ± 0,04	0,62 ± 0,05	0,62 ± 0,04	0,65 ± 0,05	0,63 ± 0,02	0,65 ± 0,03	0,61 ± 0,06
		<u>38 ± 2</u>	<u>38 ± 3</u>	<u>38 ± 2</u>	<u>39 ± 3</u>	<u>38 ± 1</u>	<u>39 ± 2</u>	<u>37 ± 4</u>
	К	0,44 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,02
		<u>31 ± 1</u>	<u>32 ± 2</u>	<u>30 ± 1</u>	<u>32 ± 1</u>	<u>30 ± 1</u>	<u>30 ± 1</u>	<u>32 ± 1</u>
Кратность уменьшения константы десорбции в присутствии данного эффектора	Ч	1	1,4 ± 0,6	1,4 ± 0,5	1,6 ± 0,7	2,0 ± 0,5	1,7 ± 0,6	1,5 ± 0,5
	К	1	1,7 ± 0,6	1,4 ± 0,5	1,7 ± 0,6	1,7 ± 0,6	1,4 ± 0,5	1,5 ± 0,4

Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим. Концентрация глицина 1,5 мМ, концентрация остальных аминокислот 5 мМ.



была изучена адсорбция лизоцима на поверхности живых бактериальных клеток. Изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцима приведены на рис. 2. Как видно, зависимости удовлетворительно описываются уравнением сорбции Ленгмюра. Для нелинейной регрессии  $R^2$  составляет от 0,82 до 0,99. Некоторое отклонение экспериментальных данных от теоретических зависимостей по уравнению Ленгмюра можно объяснить неоднородностью центров связывания на поверхности клеток и образованием сложных ассоциатов между молекулами адсорбированного лизоцима. Таким образом, рассчитанные по теоретическому уравнению параметры адсорбции можно назвать эффективными, имеющими характер усредненных величин. Применение уравнения Ленгмюра позволяет нам рассчитать такие параметры адсорбции, как константа десорбции фермента с поверхности и максимальная сорбционная емкость (наибольшее количество лизоцима, которое может сорбироваться на поверхности клеток в рассматриваемой системе). Значения вычисленных по уравнению Ленгмюра сорбционных параметров приведены в таблице. Как видим, присутствие аминокислот в пределах погрешности эксперимента не влияет на максимальную сорбционную емкость, но во всех случаях уменьшает константу десорбции. Таким образом, добавление в систему свободных аминокислот не изменяет числа сайтов связывания фермента на поверхности бактериальных клеток, но улучшает параметры связывания фермента с поверхностью за счет изменения константы десорбции. Значение максимальной сорбционной емкости для человеческого лизоцима незначительно выше таковой для куриного, таким образом, оба типа лизоцима, вероятно, связываются с аналогичными сайтами связывания на поверхности клеток этих бактерий. Константы десорбции  $K_d$  у человеческого лизоцима в тех же условиях в 1,5–2,0 раза ниже, чем у куриного, что свидетельствует о его несколько более прочном связывании с клетками. Отношение константы десорбции в отсутствие эффектора к константе десорбции в его присутствии для обоих лизоцимов составляет 1,4–2,0, демонстрируя сходную по характеру картину влияния добавленных аминокислот на сорбционные параметры, что можно объяснить отно-

сительной близостью структур и свойств этих двух ферментов. Таким образом, улучшение параметров связывания фермента с поверхностью клеток в присутствии эффекторов коррелирует с усилением бактериолитической активности, т.е. наблюдается улучшенная продуктивная сорбция. Из литературных данных известно, что для *E. coli* при понижении осмолярности раствора на 30–40 мМ также наблюдается усиление сорбции лизоцима, но одновременно с этим происходит резкое падение бактериолитической активности [15], т.е. имеет место увеличение вклада непродуктивной сорбции. Таким образом, для клеток *E. coli* при влиянии различных факторов в разных условиях может наблюдаться как продуктивная, так и непродуктивная сорбция. Следует отметить, что характер адсорбции лизоцима может в значительной степени отличаться для разных видов бактерий. Так, например, по литературным данным, продуктивная сорбция лизоцима на грамположительных клетках *Lactobacillus plantarum* существенно возрастает при значении рН, соответствующем оптимуму активности, однако в этом случае усиление продуктивной сорбции определялось не изменением константы десорбции лизоцима, а увеличением эффективной сорбционной емкости [26].

### Заключение

В настоящей работе показано, что усиление бактериолитической активности лизоцима в отношении клеток *E. coli* в присутствии заряженных аминокислот и глицина сопровождается улучшением параметров адсорбции фермента на поверхности бактериальных клеток, что предположительно способствует образованию продуктивного комплекса фермента с субстратом – сополимером клеточной стенки бактерии. Одинаковые по характеру закономерности показаны как для куриного, так и для человеческого лизоцима. Полученные данные необходимы для более глубокого понимания механизмов природной регуляции лизоцима, они открывают новые пути для разработки высокоэффективных антибактериальных препаратов на основе этого фермента и на основе композиций низкомолекулярных веществ, активирующих собственный фермент человеческого организма.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen L., Todd R., Kiehlbauch J., Walters M., Kalten A. // 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2017. Vol. 66. N 1. P. 33. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6601a7>

2. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), National Center for Emerging Zoonotic and Infectious Diseases (U.S.). Division of Healthcare Quality Promotion. Antibiotic Resistance Coordination and Strategy Unit. // *Antibiotic Resistance Threats in the United States*. 2019. P. 118. <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>
3. Ferraboschi P.; Ciceri S.; Grisenti P. // *Antibiotics*. 2021. Vol. 10. P. 1534. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121534>
4. Kim H.-G., Hwang J.-S., Jae W.-Y., Son S.-E., Lee H.-J. // *Korean Journal of Veterinary Research*. 2016. Vol. 56. N 2. P. 103. <https://doi.org/10.14405/kjvr.2016.56.2.103>
5. São-José C., Costa A.R., Melo L.D.R. // *Front Microbiol*. 2022. Vol. 13. P. 884176. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.884176>
6. Di Schiena M.G., Ferrari S., Rongen R. Lysozyme Gel Formulations for Use as Disinfectants. US20130259852. U.S. Patent. 2013.
7. Tan H., Jin D., Qu X., Liu H., Chen X., Yin M., Liu C. // *Biomaterials*. 2019. Vol. 192. P. 392. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.047>
8. Ragland S.A., Criss A.K. // *PLoS Pathog*. 2017. Vol. 13. N 9. P. e1006512. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006512>
9. Hooke S.D., Radford S.E., Dobson C.M. // *Biochemistry*. 1994. Vol. 33. N 19. P. 5867. <https://doi.org/10.1021/bi00185a026>
10. Halper J.P., Latovitzki N., Bernstein H., Beychok S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1971. Vol. 68. N 3. P. 517. <https://doi:10.1073/pnas.68.3.517>
11. Sun D.P., Liao D.I., Remington S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. Vol. 86. N 14. P. 5361. <https://doi:10.1073/pnas.86.14.5361>
12. Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Овчинникова Е.Д., Атрошенко Д.Л., Савин С.С., Белогурова Н.Г., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. // *Acta Naturae*. Т. 9. № 2(33). С. 87. [Levashov P.A., Matolygina D.A., Ovchinnikova E.D., Atroshenko D.L., Savin S.S., Belogurova N.G., Smirnov S.A., Tishkov V.I., Levashov A.V. // *Acta Naturae*. 2017. Vol. 9. N 2. P. 82. <https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-2-82-87>]
13. Levashov P.A. Matolygina D.A. Ovchinnikova E.D. Adamova I.Yu., Gasanova D.A., Smirnov S.A., Nelyub V.A., Belogurova N.G., Tishkov V.I., Ereemeev N.L., Levashov A.V. // *FEBS Open Bio*. 2019. Vol. 9. P. 510. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12591>
14. Holler E, Rupley JA, Hess GP. // *Biochemistry*. 1975. Vol. 14 N.11. P. 2377. <https://doi.org/10.1021/bi00682a017>
15. Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A. // *Coll. Surf. B*. 2011. Vol. 88. P. 131. <https://doi.org/10.1016/j.col-surf.2011.06.021>
16. Grishin A.V., Karyagina A.S., Vasina D.V., Vasina I.V., Gushchin V.A., Lunin V.G. // *Crit. Rev. Microbiol*. 2020. Vol. 46. P. 703. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1825333>
17. Clarke C.A., Scheurwater E.M., Clarke A.J. // *J. Biol. Chem*. 2010. Vol. 285. N 20. P. 14843. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.120931>
18. Abergel C., Monchois V., Byrne D., Chenivesse S., Lembo F., Lazzaroni J.C., Claverie J.M. // *PNAS*. 2007. Vol. 104. N 15. P. 6394. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611019104>
19. Tilahun M., Kassa Y., Gedefie A., Ashagire M. // *Infect. Drug Resist*. 2021. Vol. 14. P. 4363. <https://doi.org/10.2147/IDR.S337611>
20. Van Duin D., Doi Y. // *Virulence*. 2017. Vol. 8. N 4. P. 460. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>
21. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1982. P. 545. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(83\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0307-4412(83)90068-7)
22. Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S.V., Belogurova N.G., Levashov A.V. // *Anal. Chem*. 2010. Vol. 82. N 5. P. 2161. <https://doi.org/10.1021/ac902978u>
23. Canfield R.E., Kammernan S., Sobel J.H., Morgan F.J. // *Nature New Biology*. 1971. Vol. 232. P. 16. <https://doi.org/10.1038/newbio232016a0>
24. Матолыгина Д.А., Душутина Н.С., Овчинникова Е.Д., Еремеев Н.Л., Белогурова Н.Г., Атрошенко Д.Л., Смирнов С.А., Савин С.С., Тишков В.И. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2018. Т. 59. № 2. С. 125. [Matolygina D.A., Dushutina N.S., Ovchinnikova E.D., Ereemeev N.L., Belogurova N.G., Atroshenko D.L., Smirnov S.A., Savin S.S., Tishkov V.I., Levashov P.A. // *Moscow Univ. Chem. Bull*. 2018. Vol. 73. N 2. P. 47. <https://doi.org/10.3103/S0027131418020104>]
25. Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Савин С.С., Захарова Г.С., Гасанова Д.А., Белогурова Н.Г., Овчинникова Е.Д., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. // *Вестн. Моск. ун-та*. 2015. Т. 56. № 6. С. 359. [Levashov, P.A., Matolygina, D.A., Osipova, H.E., Savin S.S., Zakharova G.S., Gasanova D.A., Belogurova N.G., Ovchinnikova E.D., Smirnov S.A., Tishkov V.I., Levashov A.V. // *Moscow Univ. Chem. Bull*. 2015. Vol. 70. N 6 P. 287. <https://doi.org/10.3103/S0027131415060048>]
26. Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*. 2015. Т. 56 № 6. P. 365. [Matolygina D.A., Osipova H.E., Smirnov S.A., Belogurova N.G., Ereemeev N.L., Tishkov V.I., Levashov A.V., Levashov P.A. // *Moscow Univ. Chem. Bull*. 2015. V. 70. N 6. P. 292. <https://doi.org/10.3103/S002713141506005X>]
27. Nam K.H. // *Applied Sciences*. 2022. Vol. 12. N 9. P. 4363. <https://doi.org/10.3390/app12094363>

**Информация об авторах**

Растрига Николай Владимирович – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, nicolos@live.ru;

Гасанова Дария Алановна – аспирантка кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, sova-sipuha@hotmail.com;

Левашов Павел Андреевич – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, levashov@yahoo.com.

**Вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм**

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Статья поступила в редакцию 05.09.2022;  
одобрена после рецензирования 12.10.2022;  
принята к публикации 14.10.2022.