

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 577.15.1

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ D-АМИНОКИСЛОТ
И БИОАНАЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ОКСИДАЗ
D-АМИНОКИСЛОТ****Владимир Иванович Тишков¹, Михаил Дмитриевич Шеломов²,
Анастасия Александровна Пометун³, Святослав Сергеевич Савин⁴,
Денис Леонидович Атрошенко⁵**¹⁻⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия^{1,3,5} Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии
наук, Москва, Россия**Автор, ответственный за переписку:** Владимир Иванович Тишков,
vitishkov@gmail.com

Аннотация. Оксидаза D-аминокислот (DAAO) играет важную роль в функционировании как прокариот, так и эукариот. DAAO все более активно используется на практике, в том числе и для определения D-аминокислот в сложных образцах, включая ткани и жидкости человека. Во всех организмах, как правило, имеются два типа DAAO. Первый тип – это фермент, высокоспецифичный к D-аспартату, он имеет собственное название D-аспартатоксидаза (DASPO). DAAO второго типа характеризуется широким спектром субстратной специфичности, при этом предпочтение к той или иной D-аминокислоте варьирует от источника к источнику. Активность DAAO с большим числом субстратов сильно затрудняет селективное определение конкретной D-аминокислоты. Проблема часто решается выбором фермента, у которого в условиях анализа активность с другими D-аминокислотами, находящимися в образце, низкая или отсутствует. Нами для удобства процедуры выбора конкретного фермента собраны и проанализированы литературные данные о каталитических параметрах известных DAAO с наиболее важными D-аминокислотами. Кроме того, представлены аналогичные данные для новых рекомбинантных DAAO из метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1. Анализ данных показал, что с некоторыми D-аминокислотами новые OpaDASPO и OpaDAAO имеют самые высокие каталитические параметры.

Ключевые слова: оксидаза D-аминокислот, физиологическая роль, каталитические параметры, субстратная специфичность, *Ogataea parapolymorpha* DL-1
DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-72-84

Список сокращений: DAAO – оксидаза D-аминокислот, DASPO – D-аспартатоксидаза.

Финансирование. Поиск, сбор и анализ данных по каталитическим свойствам оксидаз D-аминокислот выполнен в рамках Соглашения № 075-15-2021-1396 от 26/10/2021 о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий на реализацию отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы. Определение кинетических параметров новых DAAO и DASPO из дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1 выполнены в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследо-

ваний РФФИ 21-34-70040 мол_а_мос. Сбор и анализ литературных источников по физиологической роли оксидаз D-аминокислот выполнен в рамках государственного задания.

Для цитирования: Тишков В.И., Шеломов Д.М., Пометун А.А., Савин С.С., Атрошенко Д.Л. Физиологическая роль D-аминокислот и биоаналитический потенциал оксидаз D-аминокислот // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 2. С. 72–84.

SCIENTIFIC REVIEW

PHYSIOLOGICAL ROLE OF D-AMINO ACIDS AND BIOANALYTICAL POTENTIAL OF D-AMINO ACID OXIDASES

Vladimir I. Tishkov¹, Michail D. Shelomov², Anastaiya A. Pometun³, Svyatoslav S. Savin⁴, Denis L. Atroshenko⁵

^{1–5} Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^{1,3,5} Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Author for correspondence: Vladimir I. Tishkov, vitishkov@gmail.com

Abstract. D-amino acid oxidase (DAAO) plays an important role in the functioning of both prokaryotes and eukaryotes. DAAO is increasingly being used in practice, including for the determination of D-amino acids in complex samples, including human tissues and fluids. There are generally two types of DAAO in all organisms. The first type is an enzyme highly specific for D-aspartate and has its own name D-aspartate oxidase (DASPO). DAAO of the second type is characterized by a wide spectrum of substrate specificity, with preference for one or another D-amino acid varying from source to source. The activity of DAAO with a large number of substrates greatly complicates the selective determination of a particular D-amino acid. The problem is often solved by choosing an enzyme that, under the conditions of analysis, has low or no activity with other D-amino acids present in the sample. For the convenience of selecting a particular enzyme, we have collected and analyzed literature data on the catalytic parameters of known DAAOs with the most important D-amino acids. In addition, similar data are presented for novel recombinant DAAOs from the methylotrophic yeast *Ogataea parapolymorpha* DL-1. Analysis of the data shows that, with the D-amino acid series, the new OpaDASPO and OpaDAAO have the highest catalytic parameters.

Keywords: D-amino acid oxidase, physiological role, catalytic parameters, substrate specificity, *Ogataea parapolymorpha* DL-1

List of abbreviations: DAAO – D-amino acid oxidase, DASPO – D-aspartate oxidase

Financial support. Search, collection and analysis of kinetic data for D-amino acids oxidases was done under financial support of State agreement № 075-15-2021-1396 of 26/10/2021 for grants from Federal budget in the frame of Federal scientific-research program for development of genetic technologies in 2019–2027. Determination of kinetic parameters of new DAAO and DASPO from the *O. parapolymorpha* DL-1 yeast was done under financial support of Russian Foundation for Basic Research, grant RFBR 21-34-70040 mol_a_mos. Search of literature about physiological role of D-amino acids was done within state research programme.

For citation: Tishkov V.I., Shelomov M.D., Pometun A.A., Savin S.S., Atroshenko D.L. Physiological Role of D-Amino Acids and Bioanalytical Potential of D-Amino Acid Oxidases // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 2. P. 72–84.

Оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) – фермент класса флавопротеинов, специфично окисляющий D-аминокислоты в соответствующие α -кетокислоты с образованием пероксида водорода и иона аммония. Первые оксидаза D-аминокислот была обнаружена и первично охарактеризована Хансом Кребсом в 1935 г. в ходе экспериментов по изучению экстрактов из почек свиньи [1]. С тех пор DAAO стала важным модельным объектом для ферментов класса флавопротеинов и активно используется на практике. Данный фермент содержит флавинадениндинуклеотид (FAD) в активном центре в качестве кофактора, а также имеет кислородный канал, по которому молекулы кислорода попадают в активный центр. Отличительной структурной особенностью этого фермента является наличие укладки по Россману в FAD-связывающем домене [2]. Ферменты класса флавопротеинов объединяют следующие свойства: они используют кислород в окислительно-восстановительной реакции и окисляют субстрат с помощью молекулы FAD или альтернативных кофакторов [3].

Гены, кодирующие оксидазы D-аминокислот, были обнаружены в геноме прокариот и эукариот. Наиболее изучены DAAO из дрожжей, поскольку они обладают наилучшими каталитическими параметрами и находят непосредственное практическое применение. Активно изучается DAAO человека (hDAAO) [4], так как она играет важную роль в метаболизме нейромедиатора D-серина – коагониста N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторов [5]. Регуляция ее активности имеет медицинское значение, поэтому поиск соответствующих ингибиторов представляет собой важную задачу для фармацевтики. Было установлено, что пониженный уровень D-серина коррелирует с развитием шизофрении [6, 7], а повышенный уровень D-серина наблюдается при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) [8]. Схожую роль выполняют DAAO из почек свиньи (pkDAAO) [9]. Также были охарактеризованы оксидазы из гепатопанкреаса карпа (ChDAAO) [10], нематоды *Caenorhabditis elegans* (ceDAAO) [11].

Особое внимание стоит уделить оксидазам D-аминокислот из микроорганизмов. DAAO были найдены как в бактериях, так и в дрожжах. В геномах бактерий с помощью биоинформатического анализа было найдено более 200 генов, предположительно кодирующих оксидазы D-аминокислот, однако только 11 из них обладают значительной идентичностью аминокислотных последовательностей с дрожжевыми DAAO (в диапазоне от 25

до 31%) [12, 13]. DAAO имеют достаточно высокую гомологию с другим функционально схожим ферментом глицинооксидазой (GOX). Вследствие этого большое число генов DAAO аннотированы в геномах как GOX и наоборот. В основном найденные гены находятся в грамположительных актинобактериях, так как клеточная стенка бактерий содержит производные D-аланина и D-глутамата, которые DAAO способна окислять, разрушая тем самым клеточную стенку. Кроме того, пероксид водорода (один из продуктов реакции, катализируемой DAAO) является токсичным для бактерий из-за отсутствия у них пероксисом для безопасной утилизации высокоактивных форм кислорода (ROS). Поэтому в бактериях чаще всего встречается FAD-содержащая дегидрогеназа D-аминокислот, которая способна метаболизировать D-аминокислоты без участия кислорода. До 2022 г. были выделены и изучены всего три DAAO из бактерий *Arthrobacter protophormiae* (ApDAAO) [14], *Rubrobacter xylanophilus* (RxDAAO) [15] и *Streptomyces coelicolor* (ScDAAO) [16]. Нами с помощью разработанного в нашей лаборатории биоинформационно-структурного подхода в геномах экстремофильных бактерий были найдены еще 6 генов потенциальных DAAO, а также впервые в мире был найден ген DAAO в археях [17]. Были построены модельные структуры. Их сравнение со структурами известных DAAO, а также детальный анализ структуры активных центров показали, что все семь ферментов относят именно к DAAO, а не к близкородственным глицинооксидазам. Достоверность предсказания была подтверждена на примере DAAO из *Natronosporangium hydrolyticum* АСРА39 (NhDAAO). Ген этого фермента был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli*. Рекомбинантная NhDAAO была активна с рядом D-аминокислот и не активна с глицином [17].

В эукариотах DAAO встречается намного чаще. Гены, предположительно кодирующие оксидазы D-аминокислот, были найдены почти во всех секвенированных геномах дрожжей. Ферментативная активность DAAO была обнаружена и описана в следующих видах дрожжей: *Rhodotorula gracilis* [18], *Trigonopsis variabilis* [19], *Pichia pastoris* [20], *Fusarium solani* [21], *Candida boidinii* [22], *Fusarium oxysporum* [23] и *Rasamsonia emersonii* [24]. В нашей лаборатории были клонированы шесть генов (пять DAAO и одна DASPO) из дрожжей *Ogataea parapolymerha* DL-1 (ранее известные как *Hansenula polymorpha*). В настоящее

время эти гены экспрессированы в клетках *E. coli* и начато изучение свойств рекомбинантных ферментов [25].

Обширное присутствие ДААО в дрожжах объясняется наличием у них особой органеллы – пероксисомы, в которой могут происходить окислительные процессы с образованием высокоактивных форм кислорода без ущерба для микроорганизма. В структуре дрожжевых ДААО часто присутствует специальная сигнальная последовательность PTS1 (Ser-(Lys/His/Arg)-Leu), которая связывается с рецепторами, отвечающими за доставку ферментов в пероксисому. При экспрессии оксидазы D-аминокислот количество и размер пероксисом в дрожжах увеличивается. Это было показано на примере дрожжей *Rhodotorula gracilis* [20] и *Candida boidinii* [27]. Однако не все дрожжевые оксидазы D-аминокислот обладают пероксисомальной сигнальной последовательностью. Было показано (на примере дрожжей *Candida boidinii* и *Hansenula polymorpha*), что ДААО могут проявлять активность и в цитозоле [53]. Экспрессия ДААО индуцируется D-аминокислотами, причем для разных генов наилучшими являются разные индукторы. Например, для ДААО из дрожжей *T. variabilis* лучшие индукторы – D,L-Met; D,L-Ala; D,L-Leu и D,L-Val. Индукция может быть вызвана также синтетическими D-аминокислотами, которые не метаболизируются [29].

Биологические роли оксидаз D-аминокислот очень разнообразны и различаются в разных организмах. Чем сложнее организм, тем более разнообразны роли ДААО. Считается, что в микроорганизмах ДААО участвует в метаболизме D-аминокислот, используя их в качестве источника азота и иногда углерода. У млекопитающих ДААО выполняет чаще регуляторную функцию, отвечая за метаболизм гормонов и нейромедиаторов, которые представляют собой D-аминокислоты.

Изменение уровня D-аминокислот имеет большое влияние на организм в целом. Например, было показано, что выключение гена *daao* и повышение концентрации D-аминокислот в тканях мозга мышей улучшают пространственное обучение. Был проведен эксперимент по сравнению скорости обучения мышей с нокаутом гена *daao* и обычных мышей в лабиринте Морриса, который является тестом на пространственное мышление и память у грызунов. Было обнаружено, что мыши с нокаутом гена *daao* имеют

преимущество в этом тесте по сравнению с обычными мышами, что свидетельствует о более высокой скорости пространственного обучения [30].

Наиболее активно изучаемой функцией ДААО у млекопитающих является регуляция уровня D-серина. Эта D-аминокислота является нейромедиатором, нейромодулятором рецепторов N-метил-D-аспартат (NMDA) в мозгу. Оксидаза D-аминокислот у человека имеет белок-активатор G72, который регулирует ее активность. Было показано, что мутации в гене этого белка и в гене ДААО коррелируют с развитием шизофрении. Повышение уровня экспрессии белка-активатора G72 приводит к повышению активности ДААО, что в свою очередь приводит к понижению уровня D-серина и, соответственно, активности NMDA-рецепторов, которые выполняют множественные функции в нейронах [31]. Помимо шизофрении нарушения активности ДААО связывают с болезнью Альцгеймера, так как повышенный уровень D-Ala в сером веществе и спинномозговой жидкости коррелирует с развитием этой болезни [7].

Важной физиологической функцией ДААО является регуляция секреции гормонов. Одним из важнейших регуляторов секреции гормонов у млекопитающих является D-аспартат. Эта D-аминокислота регулирует секрецию мелатонина, пролактина, тестостерона, лютеинизирующего гормона и гормона роста. Соответственно, нарушение его метаболизма может приводить к большому числу разнообразных заболеваний. Также было показано, что D-аспартат накапливается с возрастом в хрящевой ткани, дентине и белом веществе, что может быть использовано в качестве возрастного маркера [32–34].

D-Phe является еще одной D-аминокислотой, которая играет важную роль в поддержании гомеостаза. Возникновение и протекание многих заболеваний сопровождается изменением уровня D-Phe. Эта D-аминокислота была найдена в самых разных жидкостях человека – от плазмы и мочи до спинномозговой и амниотической жидкости [35]. В случае болезни Альцгеймера изменяется уровень не только D-Ala, но и D-Phe [36]. Анализ образцов мочи беременных женщин с гестационным диабетом показал повышенный уровень этой D-аминокислоты [37]. D-Phe предлагается использовать в качестве компонента лекарственных средств, например, при снятии синдрома похмелья [38].

ДААО способна метаболизировать неканонические D-аминокислоты в живых организмах. Одним из примеров служит нитроаргинин. Это соединение является ингибитором NO-синтетазы – регулятора артериальной гипертензии. Нитроаргинин существует в клетке в виде смеси L- и D-изомеров: изначально синтезируется нитро-D-аргинин, который затем превращается в биологически активный L-изомер. Этот процесс обеспечивается в том числе и с помощью оксидазы D-аминокислот [39].

ДААО, вероятно, является компонентом антибактериальной системы в нейтрофилах, метаболизирует экзогенные D-аминокислоты в печени и участвует в синтезе пептидных гормонов. Предполагается, что ДААО участвует в метаболизме D-тиазолин-2-карбоксилевой кислоты в печени млекопитающих, которая является частью внутриклеточной сигнальной системы для различных гормонов [40].

В случае немлекопитающих одна из интересных функций ДААО заключается в регуляции осмотического давления у ракообразных и двусторчатых моллюсков. Показано, что в условиях солевого стресса эти типы организмов накапливают в тканях D-аланин [41].

В связи с вышесказанным совершенно очевидно, что селективная детекция D-аминокислот в сложных биологических образцах является актуальной и важной научной задачей. В последние два десятилетия активно разрабатываются различные ферментные и неферментные методы анализа. Преимущество ДААО заключается в ее практически абсолютной стереоспецифичности именно к D-изомерам аминокислот. Это свойство очень важно, поскольку концентрация L-аминокислот в образцах намного выше. По этой причине ДААО активно используется для детекции и определения концентрации D-аминокислот в разных условиях. Можно выделить две основные сферы применения ДААО для анализа: пищевая промышленность и медицина. В пищевой промышленности ДААО используется для контроля процесса ферментации и детекции бактериального заражения. Так как клеточная стенка бактерий состоит из пептидогликанов, включающих в себя D-аминокислоты, определение свободных D-аминокислот, в первую очередь D-аланина, может являться маркером бактериального лизиса. Одним из примеров биосенсора на основе ДААО, который применяют в пищевом производстве, является биосенсор, использующий двухферментную систему ДААО пируватоксида-

за для специфичного определения D-аланина при мониторинге процесса ферментации.

Определение концентрации D-аланина осуществляется путем определения изменения концентрации кислорода в реакционной смеси с помощью кислородного электрода, так как и оксидаза D-аминокислот и пируватоксидаза используют молекулярный кислород в качестве второго субстрата [42].

В медицине оксидаза D-аминокислот в основном используется для двух целей: контроль энантиомерной чистоты стереоселективных лекарственных препаратов и определения уровня D-аминокислот в физиологических жидкостях. Контроль за энантиомерной чистотой препаратов очень важен, так как часто только один из изомеров обладает терапевтическими свойствами, а второй стереоизомер (например, талидомид) может вызывать сильный отрицательный эффект. Одним из примеров применения оксидазы D-аминокислот в этой области является контроль за энантиомерной чистотой препарата для лечения нарушений функций щитовидной железы – L-T₄ ((+)-3,3',5,5'-тетраидо-L-тиронин). Этот препарат выполняет роль прогормона для L-T₃, в то время как его энантиомер D-T₄, который является побочным продуктом реакции синтеза L-T₄, не проявляет никакой активности в щитовидной железе. Поэтому для контроля чистоты получаемого препарата используют биосенсоры на основе оксидазы D-аминокислот [43]. Биосенсоры на основе ДААО используют также для детектирования D-пипеколовой кислоты, которая является маркером цирроза печени и хронической печеночной энцефалопатии [44].

Любой метод анализа должен обеспечивать селективное определение целевого аналита. В случае определения D-аминокислот с помощью ДААО эта проблема легко решается при определении D-аспартата, поскольку во всех организмах имеется высокоспецифичная оксидаза D-Asp. В этом случае ДААО второго типа с широкой субстратной специфичностью не является идеальным ферментом. Например, RgДААО имеет сравнимые каталитические параметры с D-Ser и D-Ala, в общем случае их селективная детекция при сравнимых значениях концентрации просто невозможна. Однако на основе этого фермента был предложен биосенсор для детекции D-Ser в спинномозговой жидкости [45]. Это стало возможным потому, что в спинномозговой жидкости при норме уровень D-Ser в 10 раз выше такового

Т а б л и ц а 1

Каталитические параметры оксидаз D-аминокислот с D-серином

| DAAO | Условия измерения | k_{cat}, c^{-1} | K_M, mM | $k_{cat} / K_M, mM^{-1}c^{-1}$ | Источник |
|----------|-------------------|-------------------|-----------|--------------------------------|----------|
| ОpaDAAO1 | pH 8,0; 30 °C | 93,6 | 20,6 | 4,54 | с.д. |
| CbDAAO | pH 8,0; 30 °C | 77,3 | 33,7 | 2,29 | [22] |
| TvDAAO | pH 8,0; 30 °C | 20 | 37 | 0,54 | [50] |
| pkDAAO | pH 8,3; 25 °C | 3,0 | 3,3 | 0,909 | [52] |
| hDAAO | pH 8,3; 25 °C | 2,83 | 3,6 | 0,787 | [53] |
| ceDAAO | pH 8,3; 37 °C | 1,51 | 20 | 0,075 | [51] |
| hDAAO | pH 8,3; 37 °C | 1,23 | 6,42 | 0,191 | [51] |

П р и м е ч а н и е: с.д. – собственные данные.

Т а б л и ц а 2

Каталитические параметры оксидаз D-аминокислот с D-аланином

| DAAO | Условия измерения | k_{cat}, c^{-1} | K_M, mM | $k_{cat} / K_M, mM^{-1}c^{-1}$ | Источник |
|----------|----------------------|-------------------|-----------|--------------------------------|----------|
| ОpaDAAO1 | pH 8,0; 30 °C | 240 | 6,3 | 38,1 | с.д. |
| ReDAAO | pH 8,0; 55 °C | 189 | 2,7 | 69,9 | [19] |
| CboDAAO | pH 8,0; 30 °C | 117 | 4,28 | 27,4 | [22] |
| TvDAAO | pH 8,0; 30 °C | 109 | 17 | 6,54 | [50] |
| RgDAAO | pH 8,5; 25 °C | 83,3 | 0,8 | 102 | [46] |
| RgDAAO | pH 8,5; 25 °C | 81,3 | 1 | 81,3 | [53] |
| ceDAAO | pH 8,3; 37 °C | 14,9 | 6,89 | 2,17 | [51] |
| pkDAAO | pH 8,5; 25 °C | 7,33 | 1,7 | 4,33 | [53] |
| pkDAAO | pH 8,3; 25 °C | 6,5 | 0,77 | 8,44 | [52] |
| hDAAO | pH 8,3; 25 °C | 5,5 | 0,9 | 6,11 | [53] |
| hDAAO | pH 8,3; 37 °C | 3,66 | 1,08 | 3,39 | [51] |

П р и м е ч а н и е: с.д. – собственные данные.

для D-Ala. Проблема получения DAAO с необходимым спектром субстратной специфичности может быть решена с помощью методов белковой инженерии. Однако, несмотря на большие успехи современной науки в этой области, такой подход достаточно трудоемок и не всегда гарантирует успех. Например, эксперименты по получению мутантных RgDAAO для селективного определения D-Ser и D-Ala были начаты в 2002 г. [46] и завершились только в 2021 г. [47]. В нашей лаборатории в 2012 г. также были получены мутантные варианты TvDAAO, активные с D-Ser и не активные с D-Ala и наоборот [48]. Однако такие

мутанты были получены нецеленаправленно, поскольку основной целью настоящей работы было улучшение каталитических параметров TvDAAO с цефалоспорином C.

Вторым более быстрым подходом является выбор на основании литературных данных фермента с каталитическими свойствами, наиболее подходящими для анализа. На практике такая процедура оказывается не очень простой задачей, поскольку определение параметров разными авторами проводилось в разных условиях. Кроме того, для разных субстратов данные приведены в разных статьях. В связи с этим мы про-

вели поиск по публикациям, в результате которого собрали и проанализировали каталитические параметры для наиболее изученных ДААО. Данные представлены для D-аминокислот, определение которых наиболее востребовано на практике. Это D-серин, D-аланин, D-аспартат, D-глутамат, D-метионин, D-пролин, D-фенилаланин и D-тирозин. Для удобства также приведены данные по окислению цефаоспорина C с помощью как ДААО дикого типа, так и ее мутантов. Максимальная скорость была преобразована в наблюдаемую каталитическую константу с использованием молекулярной массы 40 кДа как средней для большинства ДААО. Если в анализируемой статье не были представлены значения каталитической эффективности, мы пересчитывали их из констант Михаэлиса и наблюдаемых каталитических констант. Кроме того, в дополнение к известным ферментам для каждой D-аминокислоты приведены данные для новых OpaDAAO и OpaDASPO, которые были недавно получены в нашей лаборатории. Особо отметим, что для ДААО из термофильных дрожжей *Rasamsonia emersonii* [24] и бактерий *Rubrobacter xylanophilus* [15] параметры были определены при повышенной температуре (55 и 60 °С соответственно). То же самое относится и к DASPO из *Thermomyces dupontii* (TdDASPO) [49]. В таблицах условия проведения эксперимента для этих ферментов выделены полужирным курсивом. Во всех таблицах данные отсортированы по уменьшению каталитической константы. Наиболее высокие значения каталитической эффективности выделены полужирным шрифтом.

На основании представленных данных можно заключить, что дрожжевые оксидазы с большинством из изученных субстратов в среднем обладают большей каталитической эффективностью, чем ДААО из млекопитающих. Исходя из спектров субстратной специфичности, ДААО можно разделить на две группы – одни ферменты проявляют наилучшую активность с небольшими неполярными субстратами, такими как D-серин и D-аланин (табл. 1, 2), другие более активны с D-аминокислотами с большими гидрофобными боковыми радикалами. К первой группе относятся CbDAAO и новая OpaDAAO1, ко второй можно отнести TvDAAO, RgDAAO и ReDAAO. Отметим, что новая OpaDAAO1 имеет самую высокую каталитическую константу с D-Ala, однако лидером по каталитической эффективности с этим субстратом является RgDAAO.

Отдельно стоит выделить D-аспартатоксидазы, которые проявляют активность исключительно с D-аминокислотами с отрицательно заряженными боковыми радикалами – D-аспартатом и D-глутаматом. Наилучше каталитические характеристики с D-Asp показывает новая DASPO из дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1 (OpaDASPO) (табл. 3). Однако высокие каталитические параметры и с D-Glu (табл. 4) не позволяют ее использовать в качестве универсального фермента для детекции D-Asp в присутствии сравнимых концентраций D-Glu. D-Met является «хорошим» субстратом для большинства ДААО (табл. 5), что, вероятно, служит причиной использования этой D-аминокислоты для определения активности. Однако при использовании этого субстрата наблюдается сильное различие между ферментами с высокими каталитическими константами и высокой каталитической эффективностью. Похожая ситуация наблюдается и в случае D-Pro (табл. 6).

Интересная ситуация с активностью наблюдается в случае ДААО с D-Phe и D-Tyr (табл. 7, 8). До недавнего времени фактически отсутствовали ДААО с D-Phe, обладающие хорошими характеристиками. Особенно это заметно по каталитической эффективности. Однако клонирование и экспрессия гена OpaDAAO3 в клетках *E. coli* позволили получить высокоэффективный катализатор с этим субстратом. Здесь следует отметить высокое значение каталитической эффективности, поскольку этот параметр играет важную роль при создании биосенсоров.

В случае с D-Tyr в дополнение к ферменту из *C. boidinii* высокие показатели демонстрирует ДААО из бактерий *Rubrobacter xylanophilus* [15] (табл. 8). RxDAAO имеет самую низкую константу Михаэлиса после OpaDAAO2, что и обеспечивает высокое значение каталитической эффективности.

Стоит также отметить, что многие оксидазы D-аминокислот проявляют активность и с неканоническими D-аминокислотами. Одним из самых известных неканонических субстратов ДААО является цефалоспорин C, из которого с помощью двустадийного биокаталитического процесса получают 7-аминоцефалоспоровую кислоту (7-АЦК), которая используется в качестве исходного синтона для производства полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков разных поколений. В данном случае безусловным лидером является TvDAAO (табл. 9). В силу практической важности и востребованности

Т а б л и ц а 3

Каталитические параметры оксидаз D-аминокислот с D-аспаратом

| DAAO | Условия измерения | k_{cat}, c^{-1} | K_M, mM | $k_{cat} / K_M, mM^{-1}c^{-1}$ | Источник |
|-----------|----------------------|-------------------|-----------|--------------------------------|----------|
| ОpaDASPO | pH 8,0; 30 °C | 81,5 | 0,44 | 184 | с.д. |
| hDASPO | pH 8,3; 37 °C | 70,6 | 2,14 | 33 | [51] |
| TdDASPO | pH 7,5; 60 °C | 123 | 8,77 | 14 | [49] |
| ceDASPO-1 | pH 8,3; 37 °C | 26,1 | 5,54 | 4,71 | [51] |
| ceDASPO-2 | pH 8,3; 37 °C | 9,49 | 4,2 | 2,26 | [51] |
| ceDASPO-3 | pH 8,3; 37 °C | 2,51 | 3,81 | 0,658 | [51] |
| RgDAAO | pH 8,5; 25 °C | 0,48 | 18 | 0,0267 | [46] |

П р и м е ч а н и е: с.д. – собственные данные.

Т а б л и ц а 4

Каталитические параметры оксидаз D-аминокислот с D-глутаматом

| DAAO | Условия измерения | k_{cat}, c^{-1} | K_M, mM | $k_{cat} / K_M, mM^{-1}c^{-1}$ | Источник |
|-----------|----------------------|-------------------|-----------|--------------------------------|----------|
| ОpaDASPO | pH 8,0; 30 °C | 47,8 | 0,61 | 78,4 | с.д. |
| TdDASPO | pH 7,5; 60 °C | 217 | 2,16 | 100 | [49] |
| ceDASPO-1 | pH 8,3; 37 °C | 35,4 | 1,06 | 33,4 | [51] |
| ReDAAO | pH 8,0; 55 °C | 90,7 | 12,1 | 7,49 | [19] |
| hDASPO | pH 8,3; 37 °C | 5,54 | 40 | 0,139 | [51] |
| ceDASPO-2 | pH 8,3; 37 °C | 3,01 | 0,8 | 3,76 | [51] |
| RgDAAO | pH 8,5; 25 °C | 1,0 | 77,3 | 0,0133 | [46] |
| ceDASPO-3 | pH 8,3; 37 °C | 0,76 | 0,68 | 1,12 | [51] |

П р и м е ч а н и е: с.д. – собственные данные.

Т а б л и ц а 5

Каталитические параметры оксидаз D-аминокислот с D-метионином

| DAAO | Условия измерения | k_{cat}, c^{-1} | K_M, mM | $k_{cat} / K_M, mM^{-1}c^{-1}$ | Источник |
|----------|----------------------|-------------------|-----------|--------------------------------|----------|
| ОpaDAAO3 | pH 8,0; 30 °C | 141 | 1,98 | 71,2 | с.д. |
| СbDAAO | pH 8,0; 30 °C | 127 | 27,4 | 4,65 | [22] |
| ReDAAO | pH 8,0; 55 °C | 120 | 0,213 | 562 | [19] |
| TvDAAO | pH 8,0; 30 °C | 81,0 | 0,46 | 176 | [50] |
| RgDAAO | pH 8,5; 25 °C | 76,7 | 0,20 | 425 | [46] |
| pkDAAO | pH 8,3; 25 °C | 6,83 | 0,65 | 10,5 | [52] |

П р и м е ч а н и е: с.д. – собственные данные.

Т а б л и ц а 6

Каталитические параметры оксидаз D-аминокислот с D-пролином

| DAAO | Условия измерения | $k_{\text{cat.}}, \text{с}^{-1}$ | $K_M, \text{мМ}$ | $k_{\text{cat.}} / K_M, \text{мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ | Источник |
|----------|-------------------|----------------------------------|------------------|--|----------|
| RgDAAO | pH 8,5; 25 °C | 77,3 | 21,5 | 3,6 | [46] |
| hDAAO | pH 8,3; 25 °C | 15 | 1,7 | 8,82 | [53] |
| pkDAAO | pH 8,3; 25 °C | 10,3 | 0,56 | 18,5 | [52] |
| OpаDAAO3 | pH 8,0; 30 °C | 14 | 46,9 | 0,3 | с.д. |

П р и м е ч а н и е: с.д. – собственные данные.

Т а б л и ц а 7

Каталитические параметры оксидаз D-аминокислот с D-фенилаланином

| DAAO | Условия измерения | $k_{\text{cat.}}, \text{с}^{-1}$ | $K_M, \text{мМ}$ | $k_{\text{cat.}} / K_M, \text{мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ | Источник |
|----------|-------------------|----------------------------------|------------------|--|----------|
| OpаDAAO3 | pH 8,0; 30 °C | 104 | 0,249 | 417,7 | с.д. |
| TvDAAO | pH 8,0; 30 °C | 27 | 0,37 | 73 | [50] |
| ceDAAO | pH 8,3; 37 °C | 25,1 | 2,72 | 9,21 | [51] |
| pkDAAO | pH 8,3; 25 °C | 16,7 | 1,4 | 11,9 | [52] |
| hDAAO | pH 8,3; 37 °C | 9,89 | 2,59 | 3,82 | [51] |

П р и м е ч а н и е: с.д. – собственные данные.

Т а б л и ц а 8

Каталитические параметры оксидаз D-аминокислот с D-тирозином

| DAAO | Условия измерения | $k_{\text{cat.}}, \text{с}^{-1}$ | $K_M, \text{мМ}$ | $k_{\text{cat.}} / K_M, \text{мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ | Источник |
|----------|----------------------|----------------------------------|------------------|--|----------|
| CbDAAO | pH 8,0; 30 °C | 77,3 | 33,7 | 2,29 | [22] |
| OpаDAAO2 | pH 8,0; 30 °C | 12,4 | 0,08 | 155 | с.д. |
| RxDAAO | pH 8,0; 60 °C | 53 | 0,197 | 269 | [15] |
| ceDAAO | pH 8,3; 37 °C | 1,51 | 20 | 0,075 | [51] |
| hDAAO | pH 8,3; 25 °C | 2,83 | 3,6 | 0,787 | [53] |
| hDAAO | pH 8,3; 37 °C | 1,23 | 6,42 | 0,191 | [51] |
| pkDAAO | pH 8,3; 25 °C | 3 | 3,3 | 0,909 | [52] |
| TvDAAO | pH 8,0; 30 °C | 20 | 37 | 0,54 | [50] |

П р и м е ч а н и е: с.д. – собственные данные.

этого фермента для получения 7-АЦК разными исследователями были выполнены эксперименты по белковой инженерии для увеличения температурной и химической стабильности и каталитической активности. В настоящее время самыми высокими показателями обладает мутантная TvDAAO с шестью аминокислотными заменами [50].

При подведении итогов анализа каталитических свойств DAAO и DASPO из разных источников следует отметить три важных момента.

1. Поиск генов новых оксидаз в геномах является высокоэффективным и продуктивным подходом для получения ферментов с нужными свойствами. Наглядным примером является клонирование в нашей лаборатории генов пяти DAAO

Т а б л и ц а 9

Каталитические параметры оксидаз D-аминокислот с цефалоспорином C

| Фермент | Условия измерения | $k_{\text{cat.}}$, с ⁻¹ | K_M , мМ | $k_{\text{cat.}} / K_M$, мМ ⁻¹ с ⁻¹ | Источник |
|---|-------------------|-------------------------------------|------------|--|----------|
| CbDAAO | pH 8,0; 30 °C | n.a. | n.a. | n.a. | [53] |
| pkDAAO | pH 8,5; 25 °C | 0,65 | 2,3 | 0,283 | [53] |
| TvDAAO | pH 8,5; 25 °C | 71,7 | 2,4 | 29,8 | [53] |
| RgDAAO | pH 8,5; 25 °C | 73,3 | 4 | 18,3 | [53] |
| TvDAAO | pH 8,0; 30 °C | 36 | 1,4 | 18 | [50] |
| TvDAAO E32R/F33D/C108F | pH 8,0; 30 °C | 1,15 | 25,5 | 22 | [50] |
| TvDAAO E32R/F33D/F54S/C108F | pH 8,0; 30 °C | 1,9 | 88 | 45 | [50] |
| TvDAAO F54S/C108F/M156L | pH 8,0; 30 °C | 1,9 | 119 | 60 | [50] |
| TvDAAO E32R/F33D/F54S/C108F/ M156L | pH 8,0; 30 °C | 1,6 | 106 | 66 | [50] |
| TvDAAO E32R/F33D/F54S/C108F/ M156L/C298G | pH 8,0; 30 °C | 0,8 | 65 | 79 | [50] |
| TvDAAO E32R/F33D/F54S/C108F/ M156L/C298N | pH 8,0; 30 °C | 2,9 | 121 | 42 | [50] |
| TvDAAO E32R/F33D/F54S/C108F/ M156L/C298Q | pH 8,0; 30 °C | 1,4 | 68 | 50 | [50] |
| TvDAAO | pH 8,0; 30 °C | 19 | 2,6 | 7,2 | [54] |
| TvDAAO C108F | pH 8,0; 30 °C | 21 | 0,99 | 21,3 | [54] |
| TvDAAO C108A | pH 8,0; 30 °C | 23 | 0,71 | 31,8 | [54] |
| TvDAAO C108S | pH 8,0; 30 °C | 10,8 | 5,6 | 1,9 | [54] |

П р и м е ч а н и е: n.a. – активность отсутствует.

и одной DASPO из дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1. Предложенный нами биоинформационно-структурный подход отбора подходящих генов [17] позволяет повысить эффективность выбора, снизить число скринируемых генов для получения нужного результата, снижая таким образом трудоемкость и сокращая время поиска новых ферментов.

2. В литературе почти не обсуждается проблема того, что у большинства эукариотических оксидаз D-аминокислот максимум активности наблюдается при pH 8,0 и выше, в то время как оптимум стабильности находится при значении pH, равном приблизительно 7. Поэтому при поиске новых оксидаз следует уделять особое внимание получению ферментов с одинаковыми pH-

профилями стабильности и активности. В этом случае возможно длительное непрерывное изменение концентрации целевой D-аминокислоты с помощью биосенсора. Результаты предварительных экспериментов показали, что некоторые новые OpaDAAO имеют одинаковые pH-оптимумы активности и стабильности.

3. В настоящее время становится популярным поиск генов новых DAAO и DASPO в тер-

мофильных микроорганизмах. Однако ферменты термофилов в обычных условиях (25–30 °C), как правило, уступают по активности ферментам из мезофилов. В то же время ферменты из мезофилов часто имеют достаточно высокую термостабильность. Например, новая DASPO из дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1 по своей термостабильности превосходит все известные DASPO.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Krebs H.A. // Biochem. J. 1935. Vol. 29. N 7. P. 1620–44.
- Tishkov V.I., Khoronenkova S.V. // Biochemistry (Moscow). 2005. Vol. 70. N 1. P. 40–54 (DOI: 10.1007/s10541-005-0050-2).
- Massey V., Hemmerich P. // Biochem. Soc. Trans. 1980. Vol. 8. N 3. P. 246–57.
- Fukui K., Miyake Y. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 18631–18638 (DOI: S0021-9258(19)37007-3).
- Pollegioni L., Molla G. // Trends Biotechnol. 2011. Vol. 29. P. 276–283 (DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.01.010).
- Chumakov I., Blumenfeld M., Guerassimenko O., Cavarec L., Palicio M., Abderrahim H., Bougueleret L., Barry C., Tanaka H., La R.P., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002. Vol. 99. P. 13675–13680 (DOI: 10.1073/pnas.182412499).
- Cheng Y.J., Lin C.H., Lane H.Y. // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. N 20. P. 10917 (DOI: 10.3390/ijms222010917).
- Sacchi S., Cappelletti P., Murtas G. // Front Mol Biosci. 2018. Vol. 5. P. 55.
- Fukui K., Watanabe F., Shibata T., & Miyake Y. // Biochemistry. 1987. Vol. 26. P. 3612–3618 (DOI: 10.1021/bi00386a054).
- Sarower M.G., Okada S., Abe H. // Arch. Biochem. Biophys.. 2003. Vol. 420. N 1. P. 121–129.
- Katane M., Seida Y., Sekine M., Furuchi T., Homma H. // FEBS J. 2007. Vol. 274. P. 137–149 (DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05571.x).
- Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone M.S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 78. P. 1–16 (DOI: 10.1007/s00253-007-1282-4).
- Takahashi S., Abe K., Kera Y. // Bioengineered. 2015. Vol. 6. P. 237–241 (DOI:10.1080/21655979.2015.1052917).
- Geueke B., Weckbecker A., Hummel W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 74. P. 1240–1247 (DOI: 10.1007/s00253-006-0776-9).
- Takahashi S., Furukawara M., Omae K., Tado-koro N., Saito Y., Abe K., Kera Y. // Appl. Environ. Microbiol. 2014. Vol. 80. P. 7219–7229 (DOI: 10.1128/AEM.02193-14).
- Saito Y., Takahashi S., Kobayashi M., Abe K., Kera Y. // Ann. Microbiol. 2014. Vol. 64. P. 1167–1177 (DOI: org/10.1007/s13213-013-0756-0).
- Атрошенко Д.Л., Головина Д.И., Сергеев Е.П., Шеломов М.Д., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Чубарь Т.А., Пометун А.А., Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2022. Vol. 14. № 4. С. 55.
- Pollegioni L., Molla G., Campaner S., Martegani E., Pilone M.S. // J. Biotechnol. 1997. Vol. 58. P. 115–123 (DOI: 10.1016/s0168-1656(97)00142-9).
- Gonzalez F.J., Montes J., Martin F., Lopez M.C., Ferminan E., Catalan J., Galan M.A., Dominguez A. // Yeast. 1997. Vol. 13. P. 1399–1408 (DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(199712)13:15<1399>).
- Klompmaker S.H., Kilic A., Baerends R.J., Veenhuis M., van der Klei I.J. // FEMS Yeast Res. 2010. Vol. 10. P. 708–716 (DOI: 10.1111/j.1567-1364.2010.00647.x).
- Isogai T., Ono H., Ishitani Y., Kojo H., Ueda Y., Kohsaka M. // J. Biochem. 1990. Vol. 108. P. 1063–1069 (DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123306).
- Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001. Vol. 65. P. 627–633 (DOI: 10.1271/bbb.65.627).
- Gabler M., Fischer L. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 3750–3753 (DOI: 10.1128/AEM.65.8.3750-3753.1999).
- Shimekake Y., Furuichi T., Abe K., Kera Y., Takahashi S. // Sci. Rep. 2019. Vol. 9. P. 11948 (DOI: 10.1038/s41598-019-48480-y).
- Атрошенко Д., Шеломов М., Zhgun A., Avdanina D., Eldarov M., Pomietun A., Chubar T., Savin S., Tishkov V. // FEBS Open Bio. 2018. Vol. 8(S1). P. 190 (DOI: 10.1002/2211-5463.12453).
- Perotti M.E., Pollegioni L., Pilone M.S. // Eur. J. Cell Biol. 1991. Vol. 55. P. 104–113.
- Sulter G.J., Waterham H.R., Goodman J.M., Veenhuis M. // Arch. Microbiol. 1990. Vol. 153, 485–489 (DOI: 10.1007/BF00248431).
- Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. // Yeast. 2000. Vol. 16. P. 1217–1227 (DOI: 10.1002/1097-0061(20000930)16:13<1217>).
- Horner R., Wagner F., Fischer L. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. Vol. 62. P. 2106–2110 (DOI: 10.1128/aem.62.6.2106-2110.1996).
- Maekawa M., Watanabe M., Yamaguchi S., Konno R., Hori Y. // Neurosc. Res. 2005. Vol. 53. N 1. P. 34–38.
- Korostishevsky M., Kaganovich M., Cholostoy A.,

- Ashkenazi M., Ratner Y., Dahary D., Bernstein J., Bening-Abu-Shach U., Ben-Asher E., Lancet D. // *Biol. Psych.* 2004. Vol. 56. N 3. P. 169–176.
32. Man E.H., Sandhouse M.E., Burg J., Fisher G.H. // *Science.* 1983. Vol. 220. N 4604. P. 1407–1408.
33. Ohtani S., Matsushima Y., Ohhira H., Watanabe A. // *Growth Dev. Aging.* 1995. Vol. 59. N 1–2. P. 55–61.
34. Helfman P.M., Bada J.L. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1975. T. 72. N 8. C. 2891–2894.
35. Armstrong D.W., Gasper M., Lee S.H., Zukowski J., Ercal N. // *Chirality.* 1993. Vol. 5. P. 375–378 (DOI: 10.1002/chir.530050519).
36. Xing Y., Li X., Guo X., Cui Y., // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. Vol. 408. P. 141–150 (DOI: 10.1007/s00216-015-9086-3).
37. Lorenzo M.P., Dudzik D., Varas E., Gibellini M., Skotnicki M., Zorawski M., Zarzycki W., Pellati F., Garcia A. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. Vol. 107. P. 480–487 (DOI: 10.1016/j.jpba.2015.01.015).
38. Jukić T., Rojc B., Boben-Bardutzky D., Hafner M., Ihan A., // *Coll. Antropol.* 2011. Vol. 35. P. 1225–1230.
39. Poinar H.N., Hoss M., Bada J.L., Paabo S. // *Science.* 1996. Vol. 272. P. 864–866 (DOI: 10.1126/science.272.5263.864).
40. Fitzpatrick P. F., Massey V. // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. N 3. P. 1166–1171.
41. Abe H., Yoshikawa N., Sarower M.G., Okada S. // *Biol. Pharm. Bull.* 2005. Vol. 28. N 9. P. 1571–1577.
42. Inaba Y., Mizukami K., Hamada-Sato N., Kobayashi T., Imada C., Watanabe E. // *Biosens. Bioelectron.* 2003. Vol. 19. P. 423–431 (DOI: 10.1016/s0956-5663(03)00200-8).
43. Stefan R.I., Bokretzion R.G., van Staden J.F., Aboul-Enen H.Y. // *Biosens. Bioelectron.* 2003. Vol. 19. P. 261–267 (DOI: 10.1016/s0956-5663(03)00210-0).
44. Stefan R.-I., van Staden J.F., Aboul-Enen H.Y. // *Sens. Actuat. B: Chemical.* 2003. Vol. 94. N 3. P. 271–275.
45. Pernot P., Mothet J.P., Schuvailo O., Soldatkin A., Pollegioni L., Pilone M., Adeline M.T., Cespuglio R., Marinesco S. // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80. P. 1589–1597 (DOI:10.1021/ac702230w).
46. Sacchi S., Lorenzi S., Molla G., Pilone M.S., Rossetti C., Pollegioni L. // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 27510–27516 (DOI: 10.1074/jbc.M203946200).
47. Moussa S., Murtas G., Pollegioni L., Mauzeroll J. // *ACS Appl. Bio Mater.* 2021. Vol. 4. P. 5598–5604 (DOI: 10.1021/acsabm.1c00409).
48. Komarova N.V., Golubev I.V., Khoronenkova S.V., Chubar' T.A., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Mosc.).* 2012. Vol. 77. P. 1181–1189 (DOI: 10.1134/S0006297912100100).
49. Takahashi S., Osugi K., Shimekake Y., Shinbo A., Abe K., Kera Y. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. Vol. 103. P. 4053–4064 (DOI: 10.1007/s00253-019-09787-y [pii];10.1007/s00253-019-09787-y).
50. Atroshenko D.L., Shelomov M.D., Zarubina S.A., Negru N.Y., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20. P. 4412 (DOI: 10.3390/ijms20184412).
51. Katane M., Saitoh, Y., Seida Y., Sekine M., Furuichi, T., Homma H. // *Chem. Biodivers.* 2010. Vol. 7. P. 1424–1434 (DOI: 10.1002/cbdv.200900294).
52. Setoyama C., Nishina Y., Mizutani H., Miyahara I., Hirotsu K., Kamiya N., Shiga K., Miura R. // *J. Biochem.* 2006. Vol. 139. P. 873–879 (DOI: 139/5/873 [pii];10.1093/jb/mvj094).
53. Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M.S. // *Biotechnol. Prog.* 2004. Vol. 20. P. 467–473 (DOI: 10.1021/bp034206q).
54. Хороненкова С.В. Рекомбинантная оксидаза D-аминокислот: получение и структурно-функциональные исследования // Дис. ... канд. хим. наук. М., 2008. 162 с.

Информация об авторах

Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; докт. хим. наук, профессор, (vitishkov@gmail.com);

Шеломов Михаил Дмитриевич – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, scarshell@gmail.com;

Пометун Анастасия Александровна – ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (aapometun@gmail.com);

Савин Святослав Сергеевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (savinslava@gmail.com)

Атрошенко Денис Леонидович – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (atrdenis@gmail.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 25.11.2022;
одобрена после рецензирования 29.11.2022;
принята к публикации 14.12.2022.