ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ ԳՐԻԳՈՐ ԿԱՄՈՅԻ

ԽՄՈՐԱՄԱՆԿԱՅԻՆ D-ԱՄԻՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱԶԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ, ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ ԵՎ ԱՆԱԼԻՏԻԿ ՆՊԱՏԱԿՆԵՐՈՎ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.04 - «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ

կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստճանի

հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2012

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ГЕВОРГЯН ГРИГОР КАМОЕВИЧ

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук по специальности

03.00.04 – “Биохимия”

ЕРЕВАН – 2012

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Մ. Ա. Դավթյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Գ. Վ. Ապրիկյան

կենս. գիտ. թեկնածու Գ. Մ. Մկրտչյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2012թ. հուլիսի 3-ին, ժամը 14^{00}-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկա 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, ք. Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2012թ. հունիսի 2-ին

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Լ. Հ. Նավասարդյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель: академик НАН РА, доктор биол. наук, профессор М. А. Давтян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук, профессор Г. В. Априкян

кандидат биол. наук Г. М. Мкртчян

Ведущая организация: Государственный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 3-го июля 2012г., в 14^{00} часов, на заседании Специализированного совета 051 Биофизика ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, г. Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан 2-го июня 2012г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
доктор биол. наук, профессор Л. А. Навасардян

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ ԳՐԻԳՈՐ ԿԱՄՈՅԻ

ԽՄՈՐԱՍՆԿԱՅԻՆ D-ԱՄԻՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱԶԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ, ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ ԵՎ ԱՆԱԼԻՏԻԿ ՆՊԱՏԱԿՆԵՐՈՎ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.04 - «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ

կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստճանի

հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2012

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ГЕВОРГЯН ГРИГОР КАМОЕВИЧ

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук по специальности

03.00.04 – “Биохимия”

ЕРЕВАН – 2012

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Մ. Ա. Դավթյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Գ. Վ. Ապրիկյան

կենս. գիտ. թեկնածու Գ. Մ. Մկրտչյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2012թ. հուլիսի 3-ին, ժամը 14^{00}-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկա 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, ք. Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2012թ. հունիսի 2-ին

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Լ. Հ. Նավասարդյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель: академик НАН РА, доктор биол. наук, профессор М. А. Давтян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук, профессор Г. В. Априкян

кандидат биол. наук Г. М. Мкртчян

Ведущая организация: Государственный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 3-го июля 2012г., в 14^{00} часов, на заседании Специализированного совета 051 Биофизика ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, г. Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан 2-го июня 2012г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
доктор биол. наук, профессор Л. А. Навасардян

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Թեմայի արդիականությունը և հիմնավորումը: D-ամինաթթվային օքսիդազը (DAAO) բացառիկ կարևոր նշանակություն ունի ինչպես միկրոօրգանիզմների, այնպես էլ մարդկանց, կենդանական և բուսական օրգանիզմների նյութափոխանակության գործընթացում (Pilone M.S., 2000): Մարդկանց և կենդանիների օրգանիզմում D-ամինաթթվային օքսիդազը պատասխանատու է բջջում D-ամինաթթուների որոշակի մակարդակի ապահովման համար: Օրինակ, գլխուղեղի հյուսվածքներում ֆերմենտը վերահսկում է D-սերինի պարունակությունը, որը մասնակցում է նյարդային համակարգի գործունեության կարգավորմանը: Ներկայումս հստակ ցույց է տրված, որ գլխուղեղում D-ամինաթթվային օքսիդազի բարձր ակտիվությունը շիզոֆրենիայի առաջացման հիմնական պատճառներից մեկն է: Ալցհեյմերի հիվանդությամբ տառապող մարդկանց մոտ նկատվում է ֆերմենտի ակտիվության իջեցում, ինչի արդյունքում գլխուղեղի հյուսվածքներում նկատելիորեն ավելանում է D-ալանինի պարունակությունը: D-ամինաթթվային օքսիդազի ցածր ակտիվությունը բնութագրական է նաև որոշ երիկամային հիվանդությունների համար: Բացի դրանից, D-ամինաթթվային օքսիդազը մասնակցում է նաև ծերացման պրոցեսների կարգավորմանը:

Գործնականում այս ֆերմենտը կիրառվում է հիմնականում ցեֆալոսպորին C-ի բիոկատալիտիկ օքսիդացման պրոցեսում, որի արդյունքում առաջանում է 7-ամինոցեֆալոսպորինաթթու (Conlon et al., 1995): Վերջինս նախանյութ է հանդիսանում տարբեր բնույթի կիսասինթետիկ ցեֆալոսպորինների արտադրման համար (ամբողջ աշխարհում արտադրվող դեղագործական պրեպարատների արժեքի 10% բաժին է ընկնում β-լակտամային հակաբիոտիկներին) (Курочкина В., 2002): Բացի դրանից D-ամինաթթվային օքսիդազը մեծապես կիրառվում է անալիտիկ կենսատեխնոլոգիական պրոցեսներում, ասիմետրիկ սինթեզի բնագավառում, α-կետոթթուների ստացման մեջ (Beard et al., 2002), ինչպես նաև պոտենցիալ մեծ նշանակություն ունի մի շարք պսիխոսոմատիկ (շիզոֆրենիա, Ալցհեյմերի հիվանդություն, Պարկինսոնիզմ և այլն) և ուռուցքաբանական հիվանդությունների ախտորոշման և մոնիտորինգի համակարգերի ստեղծման գործում (Pernot et al., 2008; Тишков и др., 2008):

Չնայած իր ունեցած մեծ տեսական ու գործնական նշանակությանը՝ D-ամինաթթվային օքսիդազը մինչ վերջին ժամանակներս բավականին քիչ էր ուսումնասիրված: Ներկայումս գործնականում բավականին մեծ ծավալով փորձարարական տվյալներ կան կուտակված խոզերի երիկամներից և *Rhodotorula gracilis* խմորասնկերից անջատված D-ամինաթթվային օքսիդազների վերաբերյալ, սակայն այդ ֆերմենտների եռաչափ տարածական կառուցվածքը բացահայտվել է միայն նախորդ տասնամյակի ընթացքում: 2006թ. հրատարակվեց մեկ այլ ֆերմենտի՝ մարդկանց օրգանիզմից անջատված D-ամինաթթվային օքսիդազի կառուցվածքի վերաբերյալ աշխատություն (Kawazoe et al.): Այս ֆերմենտի հանդեպ գիտնականների հետաքրքրությունը գնալով զգալիորեն աճում է, ինչը կապված է մարդու օրգանիզմում նրա ունեցած ֆիզիոլոգիական դերի նոր ասպեկտների բացահայտման հետ:

Ֆերմենտի ազդեցության մեխանիզմի հետազոտման արդյունքները համադրելով կառուցվածքի վերաբերյալ տվյալների հետ, հնարավորություն է ընձեռնվում ստեղծել հիմք՝ ուղղորդված եղանակով փոփոխված հատկություններով ֆերմենտ ստանալու համար, որը

կարող է կիրառվել որպես անհրաժեշտ հատկանիշներով բիոկատալիզատոր: Ներկայումս նման աշխատանքներ կատարվում են RgDAAO-ի համար, մինչդեռ այլ աղբյուրներից ստացված ֆերմենտների համար նմանատիպ տվյալներ գրականության մեջ չեն հանդիպում (Sacchi S., Pollegioni L., Pilone M.S.):

Բոլոր հայտնի D-ամինաթթվային օքսիդազների շարքում գործնականում ավելի շատ կիրառություն ունի *Trigonopsis variabilis* խմորասնկերից անջատվածը: Դա պայմանավորված է վերջինիս բարձր ջերմակայունությամբ և ցեֆալոսպորին C-ի հանդեպ ունեցած առավել բարձր ակտիվությամբ (Dib et al., 2008): Այնուամենայնիվ, չնայած TvDAAO-ի ավելի քան 30-ամյա ուսումնասիրման պատմությանը, այդ ֆերմենտի կառուցվածքի և ազդեցության մեխանիզմի վերաբերյալ փորձնական տվյալները ներկայումս այնքան էլ շատ չեն: Դա հանգեցնում է նրան, որ գործնական նպատակներով օգտագործվում է միայն վայրի տիպի ֆերմենտը, որն օպտիմալ չէ նույնիսկ այդ ֆերմենտի մասնակցությամբ մշակված պրոցեսների համար: Գոյություն ունեն մի շարք առաջնահերթ խնդիրներ, որոնք լուծում են պահանջում՝ պրակտիկայում ֆերմենտի լայնամասշտաբ կիրառման համար:

Թերևս առաջին խնդիրը D-ամինաթթվային օքսիդազի ստացման արդյունավետ ու էժան համակարգերի բացակայությունն է: Հիմնականում ֆերմենտի կենսասինթեզի համար օգտագործում են մուտանտ շտամներ և *E. coli*-ից ու տարբեր խմորասնկերից ստացված ռեկոմբինանտ շտամներ, սակայն նույնիսկ այդ դեպքում ըստ ակտիվության բարձր ելքով ֆերմենտ չի հաջողվում ստանալ, ինչպես նաև հնարավոր չէ ապահովել ֆերմենտի բարձր պարունակությունը բջջում: Հենց այդ պատճառով էլ ներկայումս DAAO-ի ստացման ինքնարժեքը բավականին բարձր է:

Երկրորդ խնդիրն այն է, որ չնայած հայտնի բոլոր D-ամինաթթվային օքսիդազների շարքում TvDAAO օժտված է ամենաբարձր ջերմակայունությամբ, նրա օպերացիոն և ջերմաստիճանային ստաբիլությունը բավարար չեն ֆերմենտի արդյունավետ կիրառման համար:

Երրորդ խնդիրը կապված է այն փաստի հետ, որ ֆերմենտը բարձր ակտիվություն է ցուցաբերում սահմանափակ թվով D-ամինաթթուների նկատմամբ, մինչդեռ կենսատեխնոլոգիական տեսակետից հետաքրքրական միացությունների սպեկտրն ավելի լայն է: Բացի դրանից՝ բժշկության մեջ ախտորոշման նպատակով անհրաժեշտ են ֆերմենտներ, որոնք բարձր սպեցիֆիկություն ունեն որոշակի D-ամինաթթուների նկատմամբ և ակտիվ չեն օրգանիզմի տվյալ հյուսվածքներում պարունակվող այլ միացությունների հանդեպ: Հենց այդ պատճառով էլ թիրախային D-ամինաթթուների նկատմամբ կատալիտիկ ակտիվության բարձրացման համար, հատկապես տարբեր բնական ու ոչ բնական սուբստրատների ներկայությամբ, անհրաժեշտ է լինում ստանալ ֆերմենտի մուտանտ ձևեր՝ պահանջվող սուբստրատային սպեցիֆիկությամբ:

Հաշվի առնելով վերոնշյալ բոլոր հանգամանքները՝ մեր առջև խնդիր է դրված եղել համեմատաբար մատչելի խմորասնկային աղբյուրից ստանալ բարձր ելքով D-ամինաթթվային օքսիդազ, անջատել և մաքրել այն հնարավորինս պարզ ու արագ մեթոդիկայով, ուսումնասիրել ստացված մաքուր ֆերմենտի ֆիզիկաքիմիական ու կատալիտիկ հատկությունները, կատարել ֆերմենտի իմմոբիլիզացիա և իմմոբիլիզացված ֆերմենտի հատկությունների համեմատում ազատ ձևի հետ՝ բժշկակենսաբանական մի

շարք գործնական ասպարեզներում նրա կիրառման հնարավորությունների վերլուծման նպատակով:

Այս հարցերի պարզաբանման նպատակով իրականացվել են ստորև բերվող հետազոտությունները:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Բոլոր փորձերն իրականացվել են *Candida guilliermondii* խմորասնկերի վրա.

1. իրականացնել խմորասնկերի աճեցման պայմանների օպտիմալացում՝ բարձր ելքով և տեսակարար ակտիվությամբ D-ամինաթթվային օքսիդազ ստանալու նպատակով,
2. մշակել *C.guilliermondii* խմորասնկերից D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրման համեմատաբար պարզ և արագ մեթոդիկա,
3. հետազոտել տվյալ խմորասնկերից ստացված DAAO մի շարք ֆիզիկաքիմիական և կատալիտիկ հատկությունները,
4. պարզաբանել D-ամինաթթվային օքսիդազի կայունության հարցը և մի շարք նյութերի ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա,
5. իրականացնել D-ամինաթթվային օքսիդազի իմմոբիլիզացիա՝ նախապես ուսումնասիրելով դրա համար առավել բարենպաստ կրիչները,
6. համեմատել ազատ և իմմոբիլիզացված ֆերմենտի հատկությունները՝ հատկապես սուբստրատային սպեցիֆիկության տեսանկյունից,
7. գնահատել իմմոբիլիզացված D-ամինաթթվային օքսիդազի կիրառման հնարավորությունները տարբեր կենսաբանական բնագավառներում:

Աշխատանքի գիտական նորույթը և գործնական արժեքը: Այս աշխատությունում մշակվել է *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջներից DAAO ստացման մեթոդիկա, որն առավել պարզ ու մատչելի է ինքնարժեքով, աչքի է ընկնում իր արդյունավետությամբ և արագությամբ: Մշակվել է նաև խմորասնկային բջիջներում DAAO քանակության ինդուկցիայի մեթոդ՝ բարձր ելքով ֆերմենտ ստանալու նպատակով:

Ֆերմենտի անբավարար կայունության հետ կապված խնդիրը ևս լուծվել է: Այդ տեսանկյունից մանրամասն ուսումնասիրվել և բնութագրվել են CgDAAO ֆիզիկաքիմիական ու կատալիտիկ հատկությունները, մշակվել մեթոդներ ֆերմենտի կայունացման համար:

Երրորդ խնդիրը, կապված ֆերմենտի՝ սահմանափակ թվով D-ամինաթթուների նկատմամբ ցուցաբերած ակտիվության հետ, լուծվել է առանց ինդուկցիայի DAAO ստացման մեթոդիկայի մշակման միջոցով, որի շնորհիվ հաջողվել է ստանալ ավելի լայն սուբստրատային սպեցիֆիկությամբ օժտված ֆերմենտային պատրաստուկ:

Աշխատանքի գործնական նշանակությունը: Հոմոգեն վիճակում ստացված ֆերմենտային պատրաստուկների՝ անալիտիկ նպատակներով կիրառման համար կատարվել է ֆերմենտի իմմոբիլիզացիա համեմատաբար բարձր ելքով, որն ինչ-որ չափով լուծում է նաև ֆերմենտի կայունացման հարցը:

Անկասկած տվյալ աշխատանքի արդյունքները կարող են օգտագործվել մի շարք կենսատեխնոլոգիական ու բժշկակենսաբանական նպատակներով, որոնց հիմքում ընկած կլինի հոմոգեն DAAO իմմոբիլիզացված պրեպարատների կիրառումը:

Աշխատանքի փորձաքննությունը և հրապարակումները: Ատենախոսությունը փորձաքննության է ենթարկվել ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի կենսաքիմիայի ամբիոնի և գիտահետազոտական լաբորատորիայի ընդլայնված նիստում:

Ստացված արդյունքները զեկուցվել են FEBS Advanced Lecture Course "Trends in Genetics: Genomic Instability and Pathways of Response" գիտաժողովում (Yerevan, 2011):

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված է 4 հոդված և գիտաժողովի 1 թեզիս:

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսությունը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտման օբյեկտի և մեթոդների նկարագրությունից, հետազոտությունների արդյունքներից ու քննարկումներից, եզրակացություններից և օգտագործված գրականության ցուցակից:

Աշխատանքը շարադրված է համակարգչային տեքստի 141 էջերում: Պարունակում է 13 աղյուսակ և 29 նկար:

ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ ՕԲՅԵԿՏ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Ուսումնասիրությունների համար օբյեկտ են հանդիսացել *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջները ԵՊՀ միկրոօրգանիզմների հավաքածուից: Խմորասնկերի աճեցման համար լավագույն պայմանները հետևյալն են. **սննդամիջավայրի աղային կազմը** (1լ համար) – 3,1 գ $(NH_4)_2SO_4$, 10 գ գլյուկոզ, 1,23 գ KH_2PO_4, 0,125 գ NaCl, 0,125 գ $CaCl_2.2H_2O$, 0,625 գ $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 գ $ZnSO_4$, 80 մկգ բիոտին, 10 գ խմորասնկային էքստրակտ, 30 մՄ DL-ալանին (միայն ինդուկցիայի համար), pH հասցվել է 5,5՝ 10% HCl-ի օգտագործմամբ: Մագնեզիումի սուլֆատի, կալցիումի քլորիդի ու բիոտինի լուծույթները պատրաստվում են ստերիլ վիճակում և ավելացվում են սննդամիջավայրի ախտահանումից հետո: **Բջիջների ֆերմենտացիան** կատարվել է 500 մլ-ոց էռլենմեյերի կոլբաներում, սննդամիջավայրի ծավալը – 80-100 մլ, 5%-ոց ինոկուլյատով 10^9 բջիջների սուսպենզիայի օգտագործմամբ: Խմորասնկերն աճեցվել են թափահարիչի վրա 30˚C-ում 200 պտույտ/րոպե արագությամբ 20ժ ընթացքում, որից հետո բջիջները հավաքվել են ցենտրիֆուգման միջոցով (10.000g, 20', 4˚C) և պահվել են -20˚C մինչ օգտագործելը:

Խմորասնկային բջիջները 20 րոպե տևողությամբ հոմոգենիզացվել են 4˚C-ում ուլտրաձայնային մշակման միջոցով՝ աշխատանքային բուֆերում (0,1 մՄ PMSF և 2 մՄ EDTA պարունակող 20 մՄ Tris-HCl բուֆեր (pH 8,3)): Սպիտակուցի քանակությունը որոշվել է Լոուրիի (Lowry et al., 1951), Բրեդֆորդի (Bradford, 1976) կամ Գրովսի-Դեյվիսի (Groves et al., 1968) մեթոդով՝ կախված նմուշում սպիտակուցի կոնցենտրացիայից և մեր առջև դրված խնդրի նպատակից:

DAAO ակտիվության որոշում: D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության որոշման համար օգտագործվել է DAAO-պերօքսիդազ երկֆերմենտային համակարգը: Ռեակցիոն խառնուրդը (գումարային ծավալը 1 մլ, օպտիկական ուղին՝ 0,5 սմ) պարունակում է 30 մՄ D-պրոլին, 5 մՄ ֆենոլ, 0,3 մՄ 4-ամինո-անտիպիրին 50 մՄ Tris-HCl բուֆերում (pH 8,3) և 2 Միավոր ծովաբողկի պերօքսիդազ: ՖԱԴ-ը կարող է բացակայել ռեակցիոն խառնուրդից՝ առանց որևէ բացասական ազդեցություն թողնելու ֆերմենտի ակտիվության որոշման վրա: Ռեակցիոն խառնուրդը ինկուբացվել է 30˚C և չափվել է զարգացող գունավորման

ինտենսիվությունը 550 նմ ալիքի երկարության տակ: Որպես ակտիվության միավոր (Ս) ընդունվել է 1 մմոլ H_2O_2 առաջացումը 1 րոպեում 30˚C ջերմաստիճանում:

DAAO մաքրում: D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրումն իրականացվել է հետևյալ կերպ. խմորասնկային զանգվածը ՈւՋ մշակելուց հետո ցենտրիֆուգվել է (10.000g, 20’, 4˚C), ապա վերնստվածքը անցկացվել է DEAE-Tp 650M անիոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի աշտարակով (2,7x46 սմ), որը նախապես հավասարակշռվել է աշխատանքային բուֆերով: Էլյուցիան իրականացվել է 0-0,15 Մ NaCl գրադիենտով՝ Tris-HCl բուֆերում, pH 8,3: Ֆերմենտապես ակտիվ ֆրակցիաները գումարվել են, դիալիզից հետո pH հասցվել է 8,9, որից հետո իրականացվել է քրոմատոֆոկուսացման առաջին փուլը PBE 94 փոխանակիչով (1,5x15սմ): Աշտարակը նախապես հավասարակշռվել է Tris-ացետատային բուֆերով (pH 8,9): Ֆերմենտը դուրս է մղվել pH գծային գրադիենտով 8,9-5,0 միջակայքում, որի ապահովումն իրականացվել է հատուկ պոլիբուֆերային էլյուենտների (Polybuffer 96 և Polybuffer 74)՝ համապատասխան համամասնությամբ ու նոսրացումներով կիրառման շնորհիվ (համաձայն արտադրողի ցուցմունքների, “Pharmacia Fine Chemicals”, Sweden): Դրան հաջորդել է քրոմատոֆոկուսացման երկրորդ փուլը նույն փոխանակիչով (PBE 94, 1,5x6 սմ), սակայն pH ավելի նեղ տիրույթում (7,6-6,5): Աշտարակը նախապես հավասարակշռվել է Tris-ացետատային բուֆերով (pH 7,6), իսկ ֆերմենտը դուրս է մղվել pH 6,5 պոլիբուֆերով: Ֆերմենտի ակտիվ ֆրակցիաները գումարվել են, ենթարկվել դիալիզի, խտացվել պոլիէթիլենգլիկոլով, pH հասցվել է 8,3 և կատարվել է հել-ֆիլտրացիա Tp HW-50F խեժով (1,0×70 սմ), որի նախնական հավասարակշռումն ու նրանից ֆերմենտի էլյուցիան իրականացվել են 20 մՄ աշխատանքային բուֆերով: Յուրաքանչյուր փուլից հետո ստացված ֆերմենտատիվ պատրաստուկների մաքրության աստիճանը ստուգելու համար կատարվել է պոլիակրիլամիդային հել-էլեկտրոֆորեզ: Վերջինս, ինչպես նաև ենթամիավորների մոլեկուլային զանգվածի որոշման ժամանակ նատրիումի դոդեցիլսուլֆատի առկայությամբ կատարվող հել-էլեկտրոֆորեզն իրականացվել են Լաեմլիի մեթոդով (Laemmli U., 1970):

DAAO իմմոբիլիզացիա: D-ամինաթթվային օքսիդազի իմմոբիլիզացիայի համար սիլոքրոմ C 80 խեժը 5ժ տևողությամբ ենթարկվում է ջերմամշակման 500°C պայմաններում, ապա սառեցվում է, կշռվում 1գ խեժին 20-25 մգ սպիտակուցի հաշվարկով, ավելացվում է 2% γ-ամինոպրոպիլ-էթօքսիսիլանի լուծույթ ացետոնում և 48ժ պահվում 45°C՝ մեկընդմեջ թափահարելով: Դրանից հետո կատարվում է պոլիմերի լվացում ացետոնով 2-3 անգամ, ապա բաց վիճակում 12ժ պահվում է 45°C-ում՝ չորանալու համար: Չորանալուց հետո կատարվում է սիլոքրոմ C 80-ի բուն ակտիվացման գործընթացը. 1ժ տևողությամբ պահվում է 2,5% գլուտարալդեհիդի լուծույթում 4°C պայմաններում՝ 1-2 անգամ թեթևակի խառնելով: Ակտիվացումից հետո խեժը 8-10 անգամ լվացվում է թորած ջրով, ապա ավելացվում է սպիտակուցի լուծույթն ու պահվում 4°C-ում՝ 24ժ տևողությամբ: Սպիտակուցի ադսորբցիայից հետո խեժը 2-3 անգամ լվացվում է 100 մՄ Tris-HCl բուֆերով (pH 8,3)՝ ազատ ալդեհիդային խմբերի կապման համար: Այդ ամենից հետո կատարվել է խեժի վրա ադսորբված ֆերմենտի ակտիվության որոշում (1գ խեժի հաշվարկով):

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

Candida guilliermondii խմորասնկային բջիջներից բարձր ելքով D-ամինաթթվային օքսիդազ ստանալու նպատակով կատարվել է աճեցման մեթոդիկայի օպտիմալացում հետևյալ պարամետրերով.

- աճեցման միջավայրի կազմի բարելավում,
- հավելումների պարունակություն (ռիբոֆլավին, D-ամինաթթուներ, բիոտին, գլյուկոզ, խմորասնկային էքստրակտ և այլն),
- ինդուկտորի տեսակի և կոնցենտրացիայի բարելավում,
- աճեցման ջերմաստիճանի բարելավում,
- աէրացիայի պայմանների բարելավում,
- աճեցման ընդհանուր տևողության բարելավում:

Հարկ է նշել, որ նախկինում *C.guilliermondii* խմորասնկային բջիջներն աճեցվել են Դավթյանի և համահեղինակների կողմից առաջարկված սինթետիկ հեղուկ միջավայրում (Давтян и др., 1980), որը համարվել է առավել հարմար տարբերակ այս բջիջների կուլտիվացման համար: Այդ միջավայրի կազմի մեջ մտնում էր (1 լ համար). 3,1 գ $(NH_4)_2SO_4$ որպես ազոտի միակ աղբյուր, 10 գ գլյուկոզ որպես ածխածնի և էներգիայի աղբյուր, 1,23 գ KH_2PO_4, 0,125 գ NaCl, 0,625 գ $MgSO_4.7H_2O$, 0,125 գ $CaCl_2.2H_2O$ և 80 մկգ բիոտին (pH 5,5): Քանի որ նշված քանակական արժեքները *C.guilliermondii* համար ստացվել են բազմաթիվ փորձնական ուսումնասիրությունների հիման վրա, ուստի դրանք այս հետազոտություններում պահպանվել են անփոփոխ, միայն բարելավվել են աճեցման պայմանները, տարբեր ինդուկտորների ու որոշ հավելումների պարունակությունը սննդամիջավայրի կազմում:

Ցույց է տրվել, որ ռիբոֆլավինի հագեցնող (100 մգ/լ) և ավելցուկային (400 մգ/լ) քանակներով օգտագործումը տնտեսապես բացարձակ շահավետ չէ: Մյուս կողմից, հաշվի առնելով նաև ռիբոֆլավինի ոչ պակաս թանկարժեք լինելն ու ստացված արդյունքները 25 մգ/լ դեպքում (7,2% աճ ակտիվ ֆերմենտի ելքի համար), դժվար չէ ենթադրել, որ նրա մեծ քանակների կիրառումը տնտեսապես արդարացված չէ, և այն որպես ինդուկտոր կիրառելու ժամանակ կարելի է օգտագործել ոչ ավել, քան 25 մգ/լ կոնցենտրացիայով:

Ընդհանրացնելով ստացված արդյունքները՝ որոշվել է հետագա աշխատանքներում *C.guilliermondii* խմորասնկերի աճեցման համար սննդամիջավայրի կազմում որպես ածխածնի և էներգիայի աղբյուր օգտագործել 10 գ/լ գլյուկոզ և 10 գ/լ խմորասնկային էքստրակտ, ֆերմենտացիան կատարել 500 կամ 1000 մլ տարողությամբ կոնաձև կոլբաներում, որոնցում սննդամիջավայրի ծավալը պահել 10%, իսկ թափահարիչի արագությունը՝ 200 պտույտ/ր, 18-20 ժ տևողությամբ:

Խմորասնկերի մոտ կենսազանգվածի ավելացման համար կարևորագույն գործոններից է համարվում նաև ֆերմենտացիոն միջավայրում բիոտինի օպտիմալ քանակությունը: Ինչպես հայտնի է, բիոտինի ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում բարձրանում է բջջապատի թափանցելիությունը ներբջջային գլուտամինաթթվի հանդեպ: Բացի դրանից՝ բիոտինը խթանում է նաև ֆոսֆոենոլպիրուվատ-կարբոքսիլազ ֆերմենտի ակտիվությունը, որը կարևոր նշանակություն ունի գլուտամինի կենսասինթեզի պրոցեսում: Սակայն ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ Դավթյանի և հեղինակների կողմից

առաջարկված 80 մկգ/լ կոնցենտրացիան բիոտինի համար հանդիսանում է ամենաօպտիմալը: Համեմատության համար նշենք, որ 800 մկգ/լ բիոտին օգտագործելու դեպքում (տասնապատիկ շատ քանակով) ֆերմենտի ելքի ավելացումը կազմում է ընդամենը 3-4%, իսկ տեսակարար ակտիվությունն էական փոփոխությունների չի ենթարկվում: Հետևաբար, բիոտինի համար ևս որոշվեց օգտագործել այն կոնցենտրացիայով (80 մկգ/լ), որը համարվում է օպտիմալ *C.guilliermondii* խմորասնկերի աճեցման համար (Давтян и др.., 1986):

Այսպիսով, տարբեր հավելումների ներառումը սննդամիջավայրի կազմում (գլյուկոզ, խմորասնկային էքստրակտ, բիոտին, ռիբոֆլավին և այլն), ինչպես նաև աէրացիայի պայմանների բարելավումը, թույլ տվեց մեծացնել ակտիվ ֆերմենտի ելքը 12.5 անգամ (535-ից մինչև 6698 Մ/լ):

Մեծ նշանակություն ուներ նաև Zn^{2+} իոնների ազդեցության ուսումնասիրումը ֆերմենտի ելքի ու տեսակարար ակտիվության վրա: Մի շարք հետազոտողների մոտ նշվում էր (Alonso et al., 1999), որ տարբեր աղբյուրներից անջատված D-ամինաթթվային օքսիդազների համար որոշ մետաղի իոններ խթանիչ ազդեցություն են ցուցաբերում ինչպես ֆերմենտի ելքի, այնպես էլ տեսակարար ակտիվության վրա: Այդ նպատակով ուսումնասիրվել է սննդամիջավայրում ցինկի սուլֆատի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը ֆերմենտի վերոնշյալ պարամետրերի վրա: Ստացված արդյունքները ներկայացված են աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1

Zn^{2+} իոնների ազդեցությունը CgDAAO ելքի ու տեսակարար ակտիվության վրա

Ցինկի սուլֆատի կոնցենտրացիա, մՄ	Կենսազանգված, գ/լ	Ընդհանուր ակտիվություն, Մ/լ	Տեսակարար ակտիվություն, Մ/գկ
0	17,2	6065	352,6
50	16,4	6332	386,1
100	17,5	6886	393,5
250	16,9	7196	425,8
500	15,3	5927	387,4

Ինչպես երևում է աղյուսակից Zn^{2+} իոններն էապես ազդում են ֆերմենտի ելքի ու տեսակարար ակտիվության վրա, մասնավորապես լավագույն արդյունքները նկատվել են ցինկի սուլֆատի 250 մՄ կոնցենտրացիայի դեպքում (համապատասխանում է սննդամիջավայրի կազմում 0,1 գ/լ կոնցենտրացիայով $ZnSO_4$): Կարևոր է ընդգծել, որ ցինկի սուլֆատի կոնցենտրացիան խմորասնկերի աճեցման սննդամիջավայրում 280-300 մՄ արժեքից բարձր լինելու դեպքում նկատվում է բջիջների աճի արագության զգալի անկում, ինչը, հավանաբար, կապված է բարձր կոնցենտրացիաների ցիտոտոքսիկ ազդեցությամբ: Այսինքն՝ մի կողմից Zn^{2+} իոնները միանշանակ խթանիչ ազդեցություն ունեն CgDAAO վրա, իսկ մյուս կողմից՝ մեծ քանակներով թունավոր են, ինչը շատ հավանական է, մանավանդ PMSF առկայությամբ: Վերջինս մտնում է ֆերմենտի անջատման ու մաքրման

աշխատանքային բուֆերի (20 մՄ Tris-HCl, 0,1 մՄ PMSF, 2 մՄ EDTA, pH 8,3) կազմության մեջ:

DAAO խթանման հարցում հետաքրքիր երևույթ է նկատվում, երբ ստանդարտ սննդամիջավայրի կազմում ավելացվում է D-ալանին/L-ալանին խառնուրդից՝ տարբեր համամասնություններով: D-ամինաթթվային օքսիդազի առավելագույն արտադրություն նկատվել է, երբ D-ալանին/L-ալանին քանակական հարաբերությունը կազմել է 3:1: L-ալանինի բացակայության կամ 1:1 հարաբերության (ռացեմիկ խառնուրդ) դեպքում սպեցիֆիկ ակտիվության տվյալները գրեթե նույնն էին և կազմում էին 3:1 հարաբերության դեպքում գրանցված արժեքի 75%: L-ալանինի քանակը D-իզոմերի համեմատ ավելի մեծ լինելու դեպքում նկատվում է հակադարձ համեմատական կապ, այսինքն՝ ֆերմենտի և կենսազանգվածի ելքը L-ալանինի ավելացմանը զուգահեռ աստիճանաբար փոքրանում են: Միայն մաքուր L-ալանին օգտագործելու ժամանակ D-ամինաթթվային օքսիդազի ինդուկցիա տեղի չի ունենում: Այնուամենայնիվ, DAAO ստացման նման պատկերը, երբ D-ալանին/L-ալանին հարաբերությունը > 1:1, անսպասելի էր և ինչ որ չափով նույնիսկ դժվար բացատրելի, չնայած որ նմանատիպ երևույթ նկատվել է նաև *Fusarium oxysporum* սնկերի մոտ (50% ավել) (Gabler et al., 1999):

Ելնելով տնտեսական շահավետության տեսանկյունից՝ նպատակահարմար չէ օգտագործել մաքուր D-ամինաթթուներ սննդամիջավայրի կազմում, ուստի որոշվեց հետագա հետազոտությունների ընթացքում D-ամինաթթվային օքսիդազի իդուկցիայի համար օգտագործել սովորական ռացեմիկ խառնուրդներ (որոնցում D- և L-ամինաթթուների հարաբերությունը կազմում է 1:1), ինչպես նշված է այլ հեղինակների մոտ (Horner et al., 1996; Pilone et al., 1989):

Անհրաժեշտ է ընդգծել բացառիկ կարևոր նշանակություն ունեցող մի փաստ: Տարբեր D-ամինաթթուների ազդեցության ուսումնասիրությունը կատարվել էր նաև նախքան Zn^{2+} իոնների դրական ազդեցության հայտնաբերումը: Ցույց է տրվել, որ CgDAAO ելքի ու ակտիվության վրա D-ամինաթթուների խթանիչ ազդեցության պատկերը, եթե սննդամիջավայրի կազմում բացակայում են Zn^{2+} իոնները, լիովին տարբերվում է վերոնշյալից: Համեմատության կարգով նշենք, որ լավագույն խթանիչ հանդիսացող DL-մեթիոնինի համար Zn^{2+} իոնների բացակայության դեպքում տեսակարար ակտիվության հարաբերական աճը կազմել է 60%, իսկ այդ դեպքում լավագույն արդյունք ցուցաբերել է D-պրոլինը:

Այսպիսով, *Candida guilliermondii* խմորասնկերի կուլտիվացման պրոցեսի բարելավման ադյունքում D-ամինաթթվային օքսիդազի ելքի ու տեսակարար ակտիվության լավագույն արժեքները ստացվում են հետևյալ պայմաններում. սննդամիջավայրի կազմը 1 լ համար՝ $(NH_4)_2SO_4$ - 3,1 գ; KH_2PO_4 - 1,23 գ; $MgSO_4.7H_2O$ - 0,625 գ; $CaCl_2.2H_2O$ - 0,125 գ; NaCl - 0,125 գ; $ZnSO_4$ – 0,1 գ; գլյուկոզ - 10 գ/լ; բիոտին - 80 մկգ/լ; ռիբոֆլավին - 25 մգ/լ; խմորասնկային էքստրակտ - 10 գ/լ; DL-ալանին - 30 մՄ, կուլտիվացման պայմաններ՝ 500-1000 մլ կոնաձև կոլբաներում, 8-10% կոլբայի ծավալի լցվածությամբ, 200 պտույտ/ր թափահարիչի արագությամբ, 18-20 ժ կուլտիվացման տևողությամբ, 30°C ջերմաստիճանում:

D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրում

C.guilliermondii խմորասնկերի D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրման մեթոդիկան իր մեջ ներառում է իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիա DEAE-Tp 650M անիոնափոխանակիչով, կրկնակի քրոմատոֆոկուսացում PBE 94 խեժով, ապա հել-ֆիլտրացիա Tp HW-50F պոլիմերային փոխանակիչով լցված աշտարակով (աղյ. 2): Այս բարեփոխված մեթոդիկայով մաքրման արդյունքում ստացվում է 13,1 Միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությամբ DAAO հոմոգեն պրեպարատ 14,8% ելքով:

Աղյուսակ 2

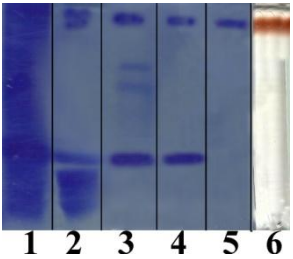
D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրման բարեփոխված պրոցեսն ըստ փուլերի

Մաքրման փուլ	Ընդհ. ակտիվութ, Մ	Սպիտակուց, մգ	Տեսակարար ակտիվութ, Մ/մգ	Մաքրման գործակից	Ելք, (%)
Խմորասնկային էքստրակտ	106.3	6250	0.017	1	100
DEAE-Tp 650M անիոնափոխանակիչ	84.1	557	0.151	9	79.2
Քրոմատոֆոկուսացում առաջին փուլ	39.1	26.6	1.47	86	36.8
Քրոմատոֆոկուսացում երկրորդ փուլ	31.2	7.9	3.95	232	29.4
Tp-50F հել-ֆիլտրացիա	15.7	1.2	13.1	771	14.8

Անհրաժեշտ է ընդգծել, որ սկզբնապես մենք հրաժարվել էինք խմորասնկերի աճեցման սննդամիջավայրում D-ամինաթթուների կիրառումից՝ լայն սպեցիֆիկությամբ օժտված ֆերմենտային պրեպարատ ստանալու նպատակով: Սակայն բարձր ելքով ֆերմենտ ստանալու համար կարելի է իրականացնել ֆերմենտ-սպիտակուցի նախնական ինդուկցիա՝ սննդամիջավայրի կազմում 30 մՄ DL-ալանինի ավելացմամբ: Վերջին հանգամանքի շնորհիվ ստացված խմորասնկային էքստրակտի սկզբնական ակտիվությունը (0.017 Մ/մգ) գրեթե 2.6 անգամ ավելի բարձր է եղել (աղյ. 2), քան առանց ինդուկցիայի ստացման դեպքում, որի ժամանակ այն կազմել էր 0.0065 Մ/մգ:

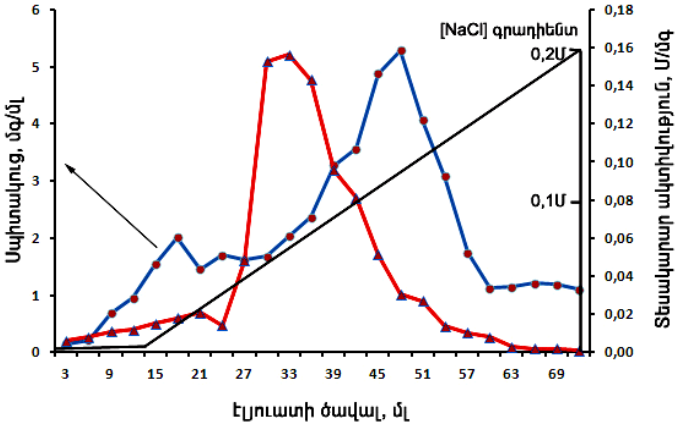
Մաքրման պրոցեսի բարելավման հաջորդ առանձնահատկությունն այն էր, որ տվյալ դեպքում մենք բացառեցինք նաև հիդրոֆոբ քրոմատոգրաֆիայի փուլը՝ վերջինիս ժամանակ նկատվող տեսակարար ակտիվության մեծ կորստի պատճառով: Դեռևս 1980-ական թթ. ցույց էր տրվել, որ խմորասնկերի D-ամինաթթվային օքսիդազն ունի մեծ խնամակցություն հիդրոֆոբ փոխանակիչների նկատմամբ, ինչի շնորհիվ այս ֆերմենտը շատ հաճախ մաքրվել է հիդրոֆոբ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով (Desphande et al., 1987): Սակայն մաքրմանը զուգընթաց նկատվում էր նաև ֆերմենտի տեսակարար ակտիվության զգալի անկում՝ որպես էլյուենտ կիրառվող աղերի կամ դուրս մղող այլ ռեագենտների ազդեցությամբ: Այդ պատճառով անիոնափոխանակիչից անմիջապես հետո ֆերմենտային պատրաստուկը մաքրվել է քրոմատոֆոկուսացման աշտարակով:

Առաջին անգամ ցույց է տրվել քրոմատոֆոկուսացման մեթոդի բարձր արդյունավետությունը CgDAAO մաքրման պրոցեսի ընթացքում: Առաջարկվող մյուս բարելավումն այն էր, որ քրոմատոֆոկուսացման առաջին փուլից (pH 8,9-5,0 միջակայքում) հետո գումարվել են ֆերմենտապես ակտիվ բոլոր ֆրակցիաները, ենթարկվել դիալիզի (Tris-HCl բուֆեր, pH 7.6), ապա կրկին մաքրվել քրոմատոֆոկուսացման միջոցով՝ pH-ի ավելի նեղ տիրույթում (7.6-6.5): Քրոմատոֆոկուսացման երկրորդ փուլից հետո ֆերմենտի ակտիվ ֆրակցիաները գումարվել են, խտացվել պոլիէթիլենգլիկոլով, pH հասցվել է 8,3 և կատարվել է հել-ֆիլտրացիա (Tp HW-50F; 70x1,0 սմ; որպես էլյուենտ կիրառվել է 20 մՄ աշխատանքային բուֆեր): Յուրաքանչյուր փուլից հետո ստացված ֆերմենտատիվ պրեպարատների մաքրության աստիճանը ստուգելու համար կատարվել է պոլիակրիլամիդային հել-էլեկտրոֆորեզ, որի արդյունքները ներկայացված են նկ. 1-ում:

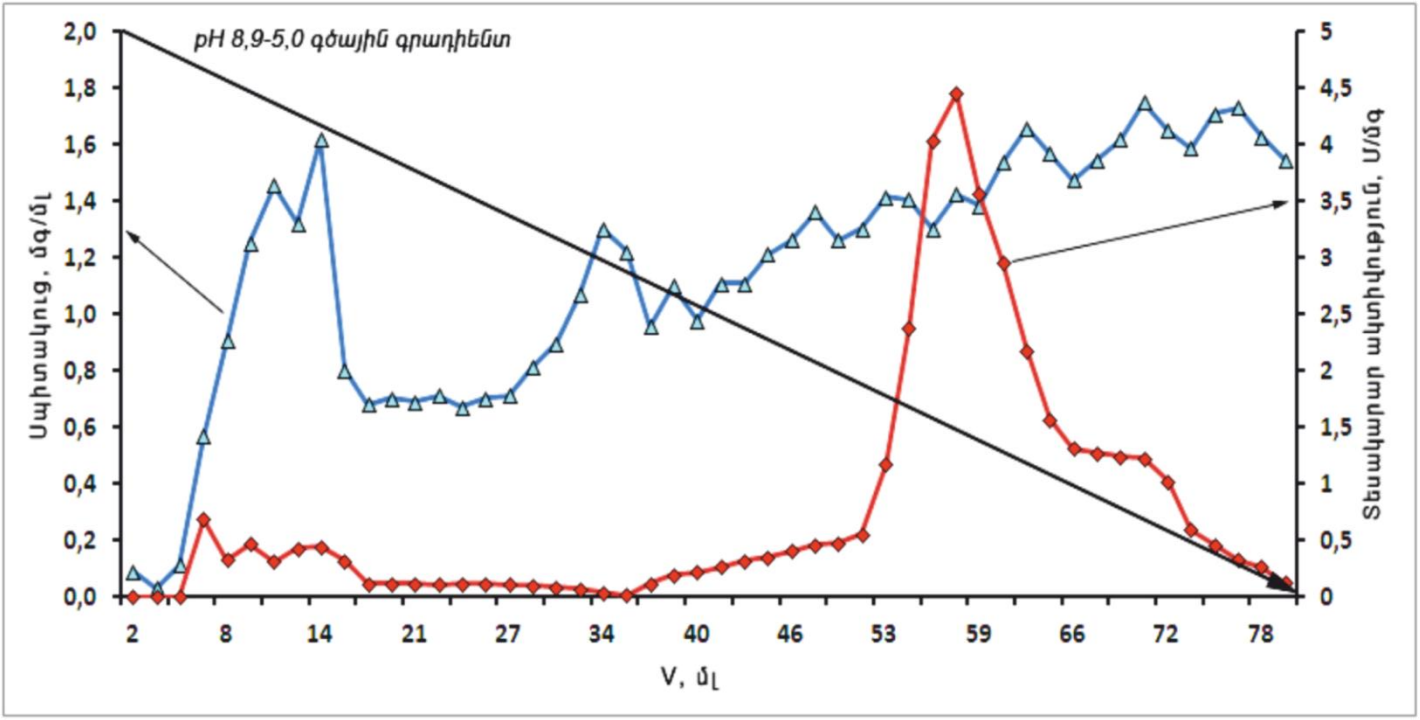


1-5 Հելը ներկվել է Coomassie Brilliant Blue R-250 ներկով
1. անբջջիջ խմորասնկային էքստրակտ,
2. DEAE-Tp 650M անիոնափոխանակիչ,
3. PBE 94 քրոմատոֆոկուսացում 1,
4. PBE 94 քրոմատոֆոկուսացում 2,
5. Tp HW-50F հել-ֆիլտրացիա,
6. հել-ֆիլտրացիայից ստացված հոմոգեն ֆերմենտային պատրաստուկի հել-էլեկտրոֆորեզ և ստացված հելի ֆերմենտատիվ ներկում DAB-ով՝ կիրառելով D-Ala որպես սուբստրատ:

Նկ. 1. CgDAAO մաքրման տարբեր փուլերում ստացված ֆերմենտային պատրաստուկների հոմոգենության որոշումը PAAG-էլեկտրոֆորեզի մեթոդով



Նկ. 2. D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրումը DEAE-Tp 650M անիոնափոխանակիչով
Էլյուցիան կատարվել է 0-0,2 Մ NaCl գծային գրադիենտով 20 մՄ աշխատանքային բուֆերում; դուրս մղման արագությունը – 0,16 մլ/ր:



Նկ. 3. *C.guilliermondii*D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրումը քրոմատոֆոկուսացման մեթոդով
PBE 94 փոխանակիչ; հավասարակշռման համար օգտագործվել է 25 մՄ Tris-ացետատային բուֆեր, pH 8,9; որպես էլյուենտ կիրառվել է pH 5,0 պոլի բուֆեր; դուրս մղման արագությունը՝ 1 մլ/ր:

Այսպիսով, քրոմատոֆոկուսացման մեթոդով հնարավոր է մաքրել DAAO պատրաստուկները՝ շրջանցելով հիդրոֆոբ քրոմատոգրաֆիայի փուլը: Մաքրման այս մեթոդը բացի իր ունեցած բարձր արդյունավետությունից (մաքրման գործակից՝ 27-30), հետագայում նաև լայն հնարավորություն է տալիս հել-ֆիլտրացիայի համար, քանի որ նշված երկու մեթոդներն, ըստ էության, նշանակալիորեն տարբերվում են միմյանցից, և դրանց համատեղ հաջորդական կիրառումը բավականին շահավետ է:

Մաքրման այս մեթոդիկայի կարևոր առանձնահատկություններից է նաև այն, որ ամբողջ մաքրման պրոցեսի ընթացքում ֆերմենտի տեսակարար ակտիվության պահպանման կամ կայունացման տեսանկյունից ՖԱԴ-ի ավելացում չի պահանջվում:

C.guilliermondii D-ամինաթթվային օքսիդազի հատկությունների ուսումնասիրում

Սուբստրատային սպեցիֆիկություն

Ապացուցված է, որ D-ամինաթթվային օքսիդազն օժտված է բացարձակ ստերեոսպեցիֆիկությամբ D-ամինաթթուների նկատմամբ, իսկ L-ամինաթթուների հանդեպ ընդհանրապես ակտիվություն չի ցուցաբերում (Pollegioni et al., 1992): Ցույց է տրվել նաև, որ L-իզոմերների առկայությունը ռեակցիոն խառնուրդում չի խանգարում D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության դրսևորմանը, հետևաբար, որոշ D-ամինաթթուների փոխարեն սուբստրատային սպեցիֆիկության որոշման փորձերում կարելի է օգտագործել DL-ռացեմատային խառնուրդ՝ մաքուր D-ամինաթթուների կոնցենտրացիայի կրկնակի քանակով, որպեսզի ապահովվի չափման պայմանների հավասարությունը:

D-պրոլինի և D-ալանինի համար որոշվել են Միխաելիսի կոնստանտն ու V_{max}՝ իրենց ստանդարտ շեղումների չափով: Հաշվարկներն ու սխալի տոկոսի որոշումն իրականացվել է GAUSS 4.0 մաթեմատիկական ծրագրի օգնությամբ: *C.guilliermondii*-ից ստացված մաքուր DAAO սուբստրատային սպեցիֆիկության տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 3-ում:

Ինչպես երևում է աղյուսակից, CgDAAO ակտիվություն է ցուցաբերում մի շարք D-ամինաթթուների հանդեպ, որոնց թվում լավագույն սուբստրատ է համարվում D-պրոլինը: Այս տեսակետից ֆերմենտը նման է hDAAO-ին, որը, բացի նրանից, որ առավելապես ակտիվ է D-պրոլինի հանդեպ, կարող է օքսիդացնել նաև օպտիկապես ոչ ակտիվ գլիցինը (Pollegioni et al., 1992): Նմանություններ նկատվում են նաև *Candida boidini*-ից անջատված DAAO հետ, որն առավելապես օքսիդացնում է չեզոք և հիդրոֆոբ D-ամինաթթուները՝ համեմատաբար կարճ ածխածնային շղթայով (Yurimoto et al., 2001): Մյուս կողմից՝ CgDAAO տարբերվում է այլ խմորասնկերից անջատված ֆերմենտներից իր ունեցած առավել լայն սուբստրատային սպեցիֆիկությամբ: Այս վերջին հանգամանքը, հավանաբար, պայմանավորված է *C.guilliermondii*-ից DAAO-ի ոչ ինդուկտիվ ստացմամբ: Այդ ենթադրության օգտին են վկայում մաքրման բարելավված մեթոդիկայով ստացված CgDAAO սուբստրատային սպեցիֆիկության տվյալները, որոնք որոշակիորեն զիջում են առաջինին, քանի որ ստացվել են սննդամիջավայրի կազմում 15-30 մՄ DL-ալանինով ինդուկցիայի պայմաններում: Այս կարգի սպեցիֆիկությունը հավանաբար կապված է CgDAAO ակտիվ կենտրոնի եռաչափ տարածական կառուցվածքի հետ, որն, ի տարբերություն hDAAO-ի, լավ ուսումնասիրված չէ:

Աղյուսակ 3

C.guilliermondii-ից անջատված DAAO սուբստրատային սպեցիֆիկությունը

Սուբստրատ	Կոնց., մՄ	Հարաբերական ակտիվություն, % *	K_M, մՄ	V_{max}, Մ/մգ
D-պրոլին	30	100.0	7.88±0.94	22.28±3.59
D-ալանին	30	74.5	8.77±1.02	16.85±3.38
D-վալին	30	29.1	n.t.**	n.t.
D-լեյցին	30	3.9	n.t.	n.t.
D-սերին	30	13.2	n.t.	n.t.
D-լիզին	30	3.4	n.t.	n.t.
D-տրիպտոֆան	10	3.3	n.t.	n.t.
D-թիրոզին	15	0.8	n.t.	n.t.
DL-իզոլեյցին	60	83.6	n.t.	n.t.
DL-մեթիոնին	60	7.6	n.t.	n.t.
DL-տրեոնին	60	6.1	n.t.	n.t.
DL-ասպարտատ	60	11.2	n.t.	n.t.
DL-ասպարագին	30	7.7	n.t.	n.t.
DL-նորվալին	60	71.6	n.t.	n.t.
Գլիցին	60	5.8	n.t.	n.t.
L-պրոլին	30	0	n.t.	n.t.
L-տրեոնին	30	0	n.t.	n.t.
L-իզոլեյցին	30	0	n.t.	n.t.

Ֆերմենտը ակտիվություն չի ցուցաբերում ոչ մի L-ամինաթթվի հանդեպ

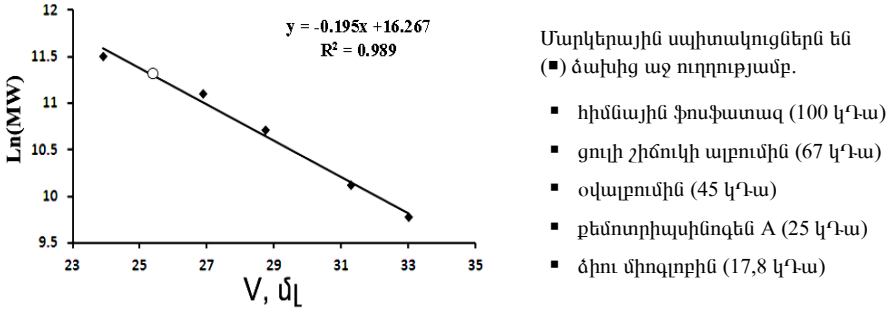
Ներկայացված արժեքները հանդիսանում են նվազագույնը 3 չափումների միջինացված արդյունք

* Հարաբերական ակտիվությունը տրված է լավագույն սուբստրատ հանդիսացող D-պրոլինի համեմատ

** n.t., ուսումնասիրված չէ

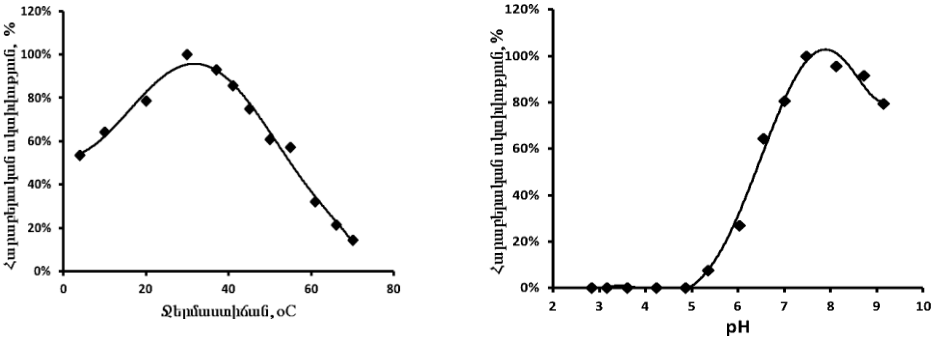
Մոլեկուլային զանգվածի որոշում

CgDAAO մոլեկուլային զանգվածի որոշումն իրականացվել է ֆերմենտի մաքուր պրեպարատի հել-ֆիլտրացիայի օգնությամբ՝ Tp HW-50F խեժի միջոցով: Ինչպես ցույց էր տրված վերջնական մաքուր պատրաստուկի SDS-PAAG էլեկտրոֆորեզի ժամանակ նկատվում է մեկ սպիտակուցային շերտ՝ 38,4±1,2 կԴա մոլեկուլային զանգվածով, իսկ հել-ֆիլտրացիայի տվյալներով CgDAAO ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը կազմել է 78,6 կԴա (նկ. 4), ինչը թույլ է տալիս ենթադրել, որ *C.guilliermondii*-ից անջատված D-ամինաթթվային օքսիդազը բնության մեջ գոյություն ունի հոմոդիմերի ձևով: Այս տեսակետից CgDAAO նման է *Rhodotorula gracilis* (Lee et al., 1998), *Rhodosporidium toruloides* (Simonetta et al., 1987) և *Trigonopsis variabilis* (Szwajcer et al., 1985) միկրոօրգանիզմներից ստացված DAAO-ներին, որոնք ունեն համապատասխանաբար 79, 72 և 80 կԴա մոլեկուլային զանգված:



Նկ. 4. CgDAAO (o) մոլեկուլային զանգվածի որոշումը Tp HW-50F փոխանակիչով

Ֆերմենտի ջերմաստիճանային և pH օպտիմում



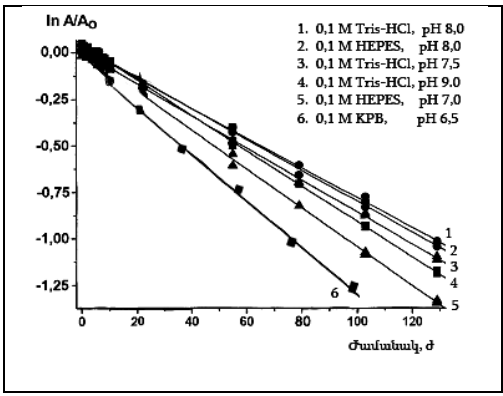
Նկ. 5. CgDAAO ջերմաստիճանային և pH օպտիմումի կորերը

Նկարից երևում է, որ CgDAAO ֆերմենտի pH օպտիմումն ընկած է 7,5-8,4 տիրույթում, իսկ օպտիմալ ջերմաստիճանային պայմանները գտնվում են 28-35°C

միջակայքում, որտեղ ֆերմենտի ակտիվությունը կազմում է ավելի քան 90% սկզբնականի համեմատ, ուստի հաջորդող բոլոր փորձերում ընտրվել է 30°C, pH 8,3:

Ֆերմենտի ակտիվության ջերմաստիճանային կախվածության կորերի և Արենիուսի բանաձևի օգնությամբ որոշվել է DAAO կատալիզվող ռեակցիայի ակտիվացման էներգիայի արժեքը 30°C-ում, որը կազմել է 60 կՋ/մոլ: Ֆերմենտի իզոէլեկտրիկ կետը 6,85±0,05 է, որը որոշվել է անալիտիկ իզոֆոկուսացման մեթոդով:

Նկ. 6-ում ներկայացված է CgDAAO pH կայունության ուսումնասիրումը տարբեր բուֆերային լուծույթներում, իսկ կից աղյուսակում ներկայացված են ինակտիվացման արագության հաստատունները, որոնք հաշվարկվել են՝ ըստ նկարում պատկերված ինակտիվացման կախվածությունների թեքության անկյան տանգենսի:



Բուֆեր	K_i
Tris-HCl, pH 8,0	2,25±0,03
HEPES, pH 8,0	2,33±0,04
Tris-HCl, pH 7,5	2,52±0,04
Tris-HCl, pH 9,0	2,57±0,05
HEPES, pH 7,0	2,94±0,06
KPB, pH 6,5	3,51±0,08

Նկ. 6. Ֆերմենտի մնացորդային ակտիվության կախվածությունը ժամանակից կիսալոգարիթմական կոորդինատներով համակարգում տարբեր pH արժեքներով բուֆերային լուծույթներում: Ֆերմենտի կոնցենտրացիան – 20 մկգ/մլ, 25°C:

DAAO արգելակման ու կայունության ուսումնասիրում

Հատուկ ուսումնասիրվել է DTNB և PCMB ազդեցությունը CgDAAO ակտիվության վրա: Այդ միացությունները հզոր թիոլային արգելակիչներ են, և 1 մՄ կոնցենտրացիայի դեպքում անմիջապես ընկճում են D-ամինաթթվային օքսիդազին: Դա վկայում է ֆերմենտի կատալիտիկ հատկությունների դրսևորման մեխանիզմում սուլֆիհիդրիլային խմբերի կարևորության մասին: Ֆերմենտի ընկճումից հետո լուծույթին ավելացվել է 5 մՄ մերկապտոէթանոլ և հետազոտվել ռեակտիվացիան 1 շաբաթվա կտրվածքով: Ցույց է տրվել, որ այդ պրոցեսը բավականին դանդաղ է, և ֆերմենտի սկզբնական ակտիվությունը վերականգնվում է ոչ ավել, քան 25%-ով: 10-15 մՄ կոնցենտրացիայով նատրիումի բենզոատը բերում է ֆերմենտի արագ և ամբողջական ինակտիվացմանը, որը մնում է անփոփոխ հետագա պահպանման ընթացքում:

Ցույց է տրվել, որ ֆերմենտը հեշտությամբ ինակտիվանում է պրոտեազների և որոշ մետաղների իոնների ազդեցությամբ: Այդ պատճառով որոշվել է աշխատանքային բուֆերի կազմում որպես պաշտպանիչ միացություններ օգտագործել 0,1 մՄ PMSF և 2 մՄ EDTA, որոնց համատեղ կիրառումն այլ պրոտեկտորների համեմատ առավել արդյունավետ էր:

D-ամինաթթվային օքսիդազի ջրային լուծույթների կայունացման փորձերը էկզոգեն ՖԱԴ-ի ավելացմամբ արդյունավետ չէին: Հավանաբար դա պայմանավորված է նրանով, որ DAAO համարվում է դեհիդրոգենազների խմբի ֆլավին-պարունակող ֆերմենտ, որի պրոստետիկ խումբն ուժեղ, բայց ոչ կովալենտ կապված FAD-ն է: Այս փաստի օգտին է վկայում նաև այն հանգամանքը, որ CgDAAO մաքրման պրոցեսի փուլերից որևէ մեկում ՖԱԴ-ի ավելացումը չի բերում ֆերմենտի տեսակարար ակտիվության աճին, քանի որ, ըստ երևույթին, նույնիսկ մաքրման պայմաններում ՖԱԴ-ի դիսոցում տեղի չի ունենում:

D-ամինաթթվային օքսիդազի իմմոբիլիզացիա

Ֆերմենտների իմմոբիլիզացիան հնարավորություն է տալիս դրանք հեշտությամբ վերականգնել և կրկին օգտագործել: Բացի դրանից՝ այն նաև նպաստում է ֆերմենտների կայունացմանը և հեշտացնում կատալիզվող պրոցեսի իրականացումը, հետևաբար բերում է կենսատեխնոլոգիական պրոցեսի ինքնարժեքի նվազմանն ու արդյունավետության բարձրացմանը: CgDAAO իմմոբիլիզացվել է սիլոքրոմ C 80 կրիչի վրա: Վերջինս սիլիկատային պոլիմեր է, որը հեշտությամբ կարելի է ենթարկել մոդիֆիկացման՝ տարբեր ֆունկցիոնալ խմբերի ամրացմամբ, որոնց միջոցով էլ կատարվում է ֆերմենտ-սպիտակուցների կապումը: Համեմատելով ստացված տվյալները (1գ խեժի հաշվարկով) ֆերմենտի սկզբնական քանակության հետ՝ որոշվել է իմմոբիլիզացիայի ելքը (17-22%), որը բավականին լավ արդյունք է պինդ պոլիմերների վրա ֆերմենտների կապման տեսանկյունից:

D-ամինաթթվային օքսիդազի իմմոբիլիզացիայից հետո կատարվել է վերջինիս ֆիզիկաքիմիական հատկությունների ուսումնասիրում և համեմատում ազատ ձևի հետ: Առաջին հերթին ցույց է տրվել, որ էապես փոխվում է ֆերմենտի ջերմաստիճանային կայունությունը, մասնավորապես՝ $T_կ$-ի արժեքը 45,6°C-ից դառնում է 57,4°C: Ջերմակայունության բարձրացման երևույթը բնութագրական է մի շարք ֆերմենտների համար, հատկապես պինդ կրիչների վրա իմմոբիլիզացնելիս, որը տվյալ դեպքում պայմանավորված է սիլիկատային պոլիմերի կառուցվածքային առանձնահատկությամբ: Մյուս կողմից՝ ցույց է տրվել, որ սիլոքրոմ C 80-ը բացասական ազդեցություն չի թողնում ֆերմենտի ակտիվության դրսևորման վրա, այսինքն՝ DAAO ինակտիվացում սիլիկատային կրիչից չի նկատվում: Բացի դրանից՝ D-ամինաթթվային օքսիդազի pH կայունության միջակայքը 0,5-1,0 միավորով տեղաշարժվել է դեպի թթվային տիրույթը: pH օպտիմումի նման փոփոխությունը հավանաբար պայմանավորված է այն հանգամանքով, որ պրոտոնացված վիճակում ամինոխմբի խնամակցությունը մեծանում է գլուտարալդեհիդի ալդեհիդային խմբերի նկատմամբ, իսկ ֆերմենտի կապը սիլոքրոմ C 80 հետ իրականանում է շիֆֆյան հիմքերի առաջացման սկզբունքով:

D-ամինաթթվային օքսիդազի սուբստրատային սպեցիֆիկության սպեկտրը իմմոբիլիզացիայից հետո էական փոփոխությունների չի ենթարկվում: Միայն անհրաժեշտ է ընդգծել, որ փոքր-ինչ նվազում է ֆերմենտի խնամակցությունը արոմատիկ և հիմնային D-ամինաթթուների նկատմամբ, ինչը ազատ ֆերմենտի մոտ ևս բարձր մակարդակի վրա չէր գտնվում:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Կատարվել է *C.guilliermondii* խմորասնկերի աճեցման պայմանների օպտիմալացում՝ բարձր ելքով և տեսակարար ակտիվությամբ D-ամինաթթվային օքսիդազ ստանալու նպատակով: Ֆերմենտի առավելագույն ելքը նկատվում է բարելավված կազմով սննդամիջավայրում 18-20ժ խմորասնկերի աճեցման պայմաններում՝ Zn^{2+} իոնների առկայությամբ:
2. D-ամինաթթվային օքսիդազի ելքը կարելի է խթանել սննդամիջավայրի կազմում 15-30 մՄ DL-ալանինի ռացեմիկ խառնուրդի ավելացմամբ, չնայած լավագույն արդյունքներ նկատվում են D- և L-ամինաթթուների 3:1 հարաբերությամբ ավելացման դեպքում:
3. Մշակվել և բարելավվել է *C.guilliermondii* խմորասնկերից DAAO մաքրման մեթոդիկա, որն իր մեջ ներառում է անիոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիա DEAE-Tp650M խեժով, քրոմատոֆոկուսացման 2 փուլերը PBE 94 փոխանակիչով և հել-ֆիլտրացիա Tp-50F պոլիմերով: Արդյունքում հնարավոր է եղել ստանալ 13,1 Միավոր/մգ տեսակարար ակտիվությամբ DAAO հոմոգեն պրեպարատ 14,8% ելքով:
4. *C.guilliermondii*-ից անջատված D-ամինաթթվային օքսիդազը 78,6 կԴա մոլեկուլային զանգվածով հոմոդիմեր է, որը կազմված է 38,4 կԴա մոլեկուլային զանգվածով 2 ենթամիավորներից: Նրա իզոէլեկտրիկ կետը՝ pI = 6,85; E_a = 60 կՋ/մոլ 30°C-ում; ֆերմենտը կայուն է pH 7,0-9,0 միջակայքում, սակայն ջերմակայունությունը բավականին ցածր է ($T_կ$=45,6°C):
5. Պարզաբանվել է ֆերմենտի սուբստրատային սպեցիֆիկության հարցը. CgDAAO ակտիվություն է ցուցաբերում առավելապես կարճ ածխածնային շղթայով չեզոք և հիդրոֆոբ D-ամինաթթուների հանդեպ: Լավագույն սուբստրատ համարվում են D-պրոլինը (K_M=7,88±0,94 մՄ) և D-ալանինը (K_M=8,77±1,02 մՄ): Ցույց է տրվել, որ սննդամիջավայրի կազմում DL-ռացեմատների առկայությամբ ֆերմենտի ինդուկցիայի ժամանակ անջատված DAAO մոտ նկատվում է սուբստրատային սպեցիֆիկության սպեկտրի նեղացում:
6. Ուսումնասիրվել է տարբեր միացությունների ազդեցությունը DAAO ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել, որ այն հանդիսանում է թիոլային ֆերմենտ, որի ակտիվությունն ընկճվում է PCMB, DTNB, նատրիումի բենզոատով, ինչպես նաև որոշ երկվալենտ մետաղների իոններով:
7. CgDAAO ֆերմենտի կայունության և ակտիվության դրսևորման համար ՖԱԴ-ի ավելացում չի պահանջվում, սակայն ֆերմենտն իր սպեկտրալ հատկություններով լիովին իդենտիկ չէ ֆլավոպրոտեինների հետ:
8. Իրականացվել է D-ամինաթթվային օքսիդազի իմմոբիլիզացիա սիլոքրոմ C 80 պոլիմերի վրա 17-22% ընդհանուր ելքով, որի արդյունքում տեղի է ունենում ֆերմենտի ջերմակայունության բարձրացում 12°C-ով ($T_կ$=57,4°C), իսկ pH օպտիմումի տիրույթը 0,5-1,0 միավորով տեղաշարժվում է դեպի թթվային միջակայք: Սուբստրատային սպեցիֆիկության սպեկտրն էական փոփոխությունների չի ենթարկվել:

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված գիտական աշխատանքների ցուցակ

1. Gevorgyan G. K., Davtyan M. A. - Influence of fermentation conditions on D-amino acid oxidase activity in *Candida guilliermondii* // The Book of Abstracts, FEBS Advanced Lecture Course “Trends in Genetics: Genomic Instability and Pathways of Response”. p. 67. Yerevan, Armenia, 20-26 February, 2011,
2. Геворгян Г. К. - Оптимизация состава ферментационной среды и условий культивации штамма *Candida guilliermondii* для получения D-аминокислотной оксидазы с высоким выходом // “Биологический журнал Армении”, 2011г., том 63, вып. 4, стр. 115-121.
3. Геворгян Г. К., Давтян М. А. - Изучение стабильности оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Candida guilliermondii НП-4* // Журнал “Вестник МАНЭБ”, 2011г., том 17, вып. 3, №4, стр. 36-39.
4. Gevorgyan G. K., Davtyan M. A., Hambardzumyan A. A. - Purification and properties of D-amino-acid oxidase from *Candida guilliermondii* НП-4 // Reports of NAS RA, 2012, vol. 112, № 2, pp.200-207.
5. Գևորգյան Գ. Կ., Դավթյան Մ. Ա. - *Candida guilliermondii НП-4* խմորասնկերի D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրման պրոցեսի բարելավումը // ԵՊՀ գիտական տեղեկագիր, Քիմիա և կենսաբանություն սերիա, 2012, №2, 41-45:

ГЕВОРГЯН ГРИГОР КАМОЕВИЧ

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: оксидаза D-аминокислот, очистка фермента, *Candida guilliermondii*, иммобилизация, силохром С 80, оптическая чистота, цефалоспориновые антибиотики.

D-аминокислоты играют важную роль в регуляции жизнедеятельности различных организмов. В случае ряда заболеваний в тканях мозга, сыворотке крови, спинномозговой жидкости наблюдаются значительные изменения как концентрации определенных D-аминокислот, так и активности самой оксидазы D-аминокислот. Оксидаза D-аминокислот относится к классу FAD-содержащих оксидоредуктаз и катализирует окислительное дезаминирование D-аминокислот в соответствующие α-кетокислоты (КФ 1.4.3.3, DAAO). Этот фермент достаточно широко распространен в природе. Он был найден как в микроорганизмах, так и в млекопитающих. Несмотря на то, что впервые DAAO была обнаружена Кребсом в тканях животных еще в 30-е годы прошлого столетия, этот фермент не привлекал большого внимания исследователей вплоть до конца 80-х годов XX века. В случае ферментов из позвоночных это было

связано с большой трудоемкостью процесса выделения из-за их малого содержания и низкой стабильностью этих белков, а DAAO из микроорганизмов на тот момент не представляли никакого практического интереса. Фактически все эксперименты ограничивались всего двумя оксидазами D-аминокислот - из почек свиньи (pkDAAO) и дрожжей *T.variabilis* (TvDAAO). Интерес ученых к DAAO стал активно расти с середины 90-х годов прошлого века, что было связано сразу с несколькими факторами. В последние пять лет опубликовался целый ряд обзорных статей про структуру и каталитический механизм действия оксидазы D-аминокислот. Фермент играет исключительно важную роль в метаболизме микроорганизмов. В организме животных и человека DAAO отвечает за поддержание определенного уровня D-аминокислот в клетке. Например, в тканях мозга фермент контролирует содержание D-серина, который участвует в регуляции деятельности нервной системы. В настоящее время установлено, что повышенная активность DAAO в мозге служит одной из причин возникновения шизофрении. У пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, наблюдается снижение активности фермента, в результате чего в тканях мозга значительно возрастает содержание D-аланина. Пониженная активность DAAO характерна также для некоторых почечных заболеваний. Кроме того, оксидаза D-аминокислот принимает участие в регуляции процессов старения. На практике этот фермент используется главным образом в биокаталитическом процессе окисления цефалоспорина С в 7-аминоцефалоспорановую кислоту - исходное соединение для производства полусинтетических цефалоспоринов различных поколений (доля β-лактамных антибиотиков составляет 10% от стоимости всех производимых в мире фармацевтических препаратов).

Несмотря на высокую теоретическую и практическую значимость, оксидаза D-аминокислот до недавнего времени была малоизученным ферментом. Интерес ученых к этому ферменту активно растет в последние годы в связи с открытием новых аспектов, связанных с физиологической ролью DAAO в организме человека.

Целью данной работы являлось получение оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Candida* guilliermondii с высоким выходом, разработка доступного, быстрого и эффективного метода очистки фермента, изучение его физико-химических и каталитических свойств, осуществление иммобилизации и сравнение свойств полученного препарата с таковыми для свободного фермента для возможного его применения в различных областях биологии.

В биотехнологии иммобилизированные, чистые препараты оксидазы D-аминокислот, обладающие широким спектром субстратной специфичности, могут быть использованы в процессе очистки DL-рацемических смесей - для получения чистых L-аминокислот; для детекции D-аминокислот в биологических образцах; для оценки оптической чистоты аминокислот; в составе биосенсоров - для определения бактериальной зараженности пищевых продуктов и напитков; а также для получения α-кетокислот и ряда цефалоспориновых антибиотиков.

В медицине оксидаза D-аминокислот имеет большое потенциальное значение для создания систем диагностики и мониторинга ряда психосоматических (шизофрении, болезни Альцгеймера и Паркинсона и др.) и онкологических заболеваний.

GEVORGYAN GRIGOR

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND POSSIBLE APPLICATION OF THE YEAST D-AMINO ACID OXIDASE FOR ANALYTICAL PURPOSES

SUMMARY

Keywords: D-amino acid oxidase, enzyme purification, *Candida guilliermondii*, immobilization, silochrome C 80, optycal purity, cephalosporin antibiotics

D-amino acids play a key role in regulation of many processes in living cells. Significant changes of both D-amino acid concentration and D-amino acid oxidase activity level are observed in brain tissues, serum and cerebrospinal liquid during some diseases. D-amino acid oxidase (EC 1.4.3.3, DAAO) is a member of the class of FAD-containing oxidoreductase and catalyzes the oxidative deamination of D-amino acids, producing the corresponding α-keto acid and ammonia with concomitant reduction of molecular oxygen to hydrogen peroxide. DAAO was first described by Krebs in 1935. The enzyme is widespread in nature, from microorganisms to mammals. The latter have DAAO localized in various tissues, e.g. brain, kidney, and liver. Until 1980s, no systematic studies on DAAO of vertebrates were performed because of their low content in tissues and low stability. Microbial DAAO, except that of the yeast *Trigonopsis variabilis*, had no any practical importance. All studies were focused on the enzymes from porcine kidney (pkDAAO) and *T.variabilis* (TvDAAO). In the mid 1990s, interest in DAAO was revived, and a number of reviews on D-amino acid oxidase catalytic mechanism and structure have been published in the past five years. The last review on the properties of microbial DAAOs was published in 2008. This enzyme has a considerable important role in the metabolism of microorganisms. In human and animal organism DAAO is responsible for maintenance of certain D-amino acids level in cells. For example, in brain tissue this enzyme controls D-serine level, which participates in regulation of the activity of nervous system. Presently it is established that increased DAAO activity level in brain can cause schizophrenia. Patients with Alzheimer's disease have decreased enzyme activity level, resulting to significant increase of D-alanine in brain tissue. Declined DAAO activity is typical for some kidney diseases. Also D-amino acid oxidase assists the regulation of aging processes. In practice, this enzyme is mainly used in the biocatalytic oxidation of cephalosporin C into 7-aminocephalosporanic acid - the starting material for the production of semisynthetic cephalosporins of different generations (the proportion of β-lactam antibiotics is 10% of all produced in the world of pharmaceutical products).

Despite its theoretical and practical importance DAAO was insufficiently known enzyme until recently. Scientists' interest of this enzyme increased in recent years, which is associated with the new aspects of the physiological role of DAAO in human organism.

The aim of this work is to obtain D-amino acid oxidase from the yeast *Candida guilliermondii* with the higher yield, create an accessible, fast and effective purification method, characterize enzyme physicochemical and catalytic properties, perform immobilization and compare the resulted preparation properties with the properties of the free enzyme to analyze it's potential use in various fields of biology.

In biotechnological applications immobilized solid preparations of DAAO with wide substrate specificity can be used in the purification of DL-racemic mixtures and production of pure L-amino acids, for detection of D-amino acids in various biological samples, estimation of optical purity of amino acids, in biosensors for food and drinks bacterial contamination determination, production of α-keto acids and synthesis of the series of cephalosporin antibiotics.

In medicine D-amino acid oxidase has a major potential significance in establishment of diagnostic systems for monitoring the series of psychosomatic (schizophrenia, Alzheimer's disease, Parkinson's syndrome etc.) and oncological diseases.