

УДК 577.152.3:579.22

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА СТАФИЛОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА ИЗ *Staphylococcus hyicus*

© 2023 г. Т. В. Федоров¹, *, М. Г. Теймуразов¹, А. К. Сурин¹, О. И. Тазина¹, С. Ф. Бикетов¹

¹ “Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии”
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
п. Оболенск, Серпуховский р-н, Московская обл., 142279 Россия

*e-mail: tfedorov@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.01.2023 г.

После доработки 13.04.2023 г.

Принята к публикации 30.04.2023 г.

В работе представлены результаты идентификации нового стафилолитического фермента из культуральной жидкости *Staphylococcus hyicus* В-8870. Первичная последовательность фермента имела максимальное сходство с СНАР-доменом N-ацетилмурамил-L-аланинамидазы из *Staphylococcus sciuri* DD 4747. Фермент активен в отношении широкого спектра микроорганизмов рода *Staphylococcus*, в том числе MRSA штаммов. Молекулярная масса фермента 13993 Да, коэффициент поглощения при 280 нм — $\epsilon \frac{\text{мг}}{\text{мл}}$ 3.94, значение изоэлектрической точки — pI 10.35. Удельная активность фермента по отношению к клеточной суспензии *S. aureus* FDA 209P — 1518 ед./мг, оптимум pH — 7.7 и температуры — 40°C.

Ключевые слова: *Staphylococcus hyicus*, СНАР домен, стафилолитический фермент, MRSA

DOI: 10.31857/S0555109923050057, **EDN:** WTWAXK

Стафилококкозы являются наиболее распространенными социально значимыми заболеваниями, охватывающими все возрастные слои населения. Высокая распространенность, устойчивость во внешней среде, а также к антибиотикам [1], способность поражать практически все органы и ткани, хронизация инфекции с образованием биопленок, делают стафилококковые заболевания трудноизлечимыми даже при использовании современных антимикробных препаратов широкого спектра действия. Включение в схемы лечения новых лекарственных средств с принципиально иными механизмами действия, в частности, обладающих стафилолитической активностью, может существенно повысить эффективность антимикробной терапии. Исследование стафилолитических ферментов является одним из этапов на пути создания высокоэффективных медицинских препаратов, которые могут быть с успехом включены как в имеющиеся схемы лечения стафилококкозов, так и использоваться индивидуально, например, в случаях таких серьезных, практически неизлечимых заболеваний, как стафилококковый эндокардит, стафилококковое поражение суставов, разнообразные поражения внутренних органов с образованием биопленок.

В последние годы большое внимание уделяется бактериальным и фаговым лизинам, которые в основном имеют модульную организацию. Одной из структурных единиц лизинов является СНАР-домен (цистеин-гистидин зависимая амидогидролаза/эндопептидаза), длина которого составляет около 120 аминокислотных остатков [2], проявляющий самостоятельную ферментативную активность в отношении бактериального пептидогликана [3, 4]. Домен СНАР способен участвовать в двух различных каталитических реакциях расщепления пептидогликана [5, 6]. Проявляя пептидазную активность, он расщепляет связь между D-аланином и первым глицином пентаглицинового мостика. Действуя как амидаза, разрывает связь между остатком N-ацетилмурамовой кислоты и L-аланином на N-конце ствольного пептида. Присутствие СНАР-домена, по-видимому, определяет тип активности лизинов, в состав которых он входит, проявляют ли они только пептидазную активность (например, LysK), только амидазную активность (например, Skl) или обе вместе (например, LysN) [7–9]. В фаговых белках домен СНАР, в основном, расположен в N-концевой области, тогда как в бактериальных белках он присутствует на C-конце [10]. Созданные химерные лизины, в состав которых входит домен

СНАР, обладают повышенной по сравнению с исходными формами активностью [11]. Таким образом, поиск и изучение разнообразных форм бактериальных лизисов дает возможность получения перспективных антибактериальных средств широкого спектра воздействия на инфекционные агенты. Данная работа посвящена исследованию нового стафилолитического фермента, выделенного из культуральной жидкости микроорганизма *Staphylococcus hyicus*, спектру его антимикробных свойств, физико-химическим и биохимическим характеристикам.

МЕТОДИКА

Культивирование и штаммы микроорганизмов.

Культивирование микроорганизма *Staphylococcus hyicus* B-8870, а также тестовых культур проводили на плотной питательной среде LB при 37°C.

Глубинное культивирование проводили в качалочных колбах, содержащих по 200 см³ LB-бульона, при температуре 37°C со скоростью перемешивания 200 об./мин.

Тестирование лизиса культуры *S. aureus* FDA209P на чашках (Spot-тест) проводили по методу, предложенному в работе [12]. Чашку Петри заливали 20 мл агар, состоящего из питательной среды № 1 (“HiMedia Laboratories Pvt. Ltd”, Индия) с добавлением бактериологического агара до 1%. После застывания нижнего слоя агара в колбу с расплавленным и охлажденным до 50°C полужидким агаром Мюллер-Хинтона (“HiMedia Laboratories Pvt. Ltd”) вносили суспензию тест-штамма *Staphylococcus aureus* FDA209P до конечной концентрации 0.5 ед. по Мак-Фарланду, перемешивали и наслаивали по 5 мл на чашки с уже разлитым слоем агара. Чашки оставляли до застывания агара и слегка подсушивали. На подготовленные чашки наносили по 10 мкл двукратных разведений исследуемого раствора фермента. Чашки инкубировали при температуре 37°C. Учет результатов проводили через 16–18 ч.

Тест-штаммы *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* FDA209P (ATCC 6538), *S. aureus* B 8479, (MRSA), *S. aureus* ATCC BAA 1717 (MRSA), *S. aureus* ATCC BAA 1707, (MRSA) получены из музея “ГКПМ-Оболensk” (Россия). Остальные штаммы – *S. xylophilus* 4/71, *S. xylophilus* 2/12, *S. warnerii* 1/136, *S. sciuri* 5/4, *S. sciuri* 5/21, *S. sciuri* 5/108, *S. piscifermentans* 4/2, *S. pasteurii* 5/103, *S. hyicus* 2, *S. haemolyticus* 5/41, *S. haemolyticus* 1/1, *S. gallinarum* 7, *S. gallinarum* 4/87, *S. gallinarum* 2/33, *S. gallinarum* 2/134, *S. gallinarum* 1/125, *S. equorum* мтц45, *S. equorum* 5/36, *S. equorum* 5/22, *S. equorum* 1/133, *S. condimentii* 4/44, *S. cohnii* 3/5, *S. chromogenes* 2/57, *S. aureus* мт2, *S. aureus* 5/77, *S. aureus* 5/23, *S. aureus* 3/135, *S. aureus* 2/137, *S. arletae* 4/39, *S. arletae* 3/13 выделены из клинического материала от птиц и

свиней в лаборатории “ГКПМ-Оболensk” (Россия).

Тестирование чувствительности к противомикробным препаратам проводилось диск-диффузионным методом на чашках с агаром Мюллера-Хинтона (“HiMedia Laboratories Pvt. Ltd”, Индия) в соответствии с рекомендациями руководства Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI 2012, Франция). Штаммы тестировали на чувствительность к пятнадцати антибиотикам разных классов: ванкомицин (Va – 10 мкг/диск), хлорамфеникол (C – 30 мкг/диск), Клиндамицин (Cd – 10 мкг на диск), канамицин (K – 30 мкг на диск), линезолид (Lz – 10 мкг на диск), амикацин (Ak – 30 мкг на диск), виргинамицин (Vi – 15 мкг на диск), тобрамицин (Tb – 10 мкг на диск), тетрациклин (T – 30 мкг на диск), стрептомицин (S – 10 мкг на диск) – все “HiMedia Laboratories Pvt.” (Индия), тейкопланин (Te – 30 мкг на диск), эритромицин (E – 5 мкг на диск), левофлоксацин (Le – 5 мкг на диск), метициллин (M – 10 мкг на диск), бензилпенициллин (P – 10 мкг на диск) – Bioanalyse (Диакон, Россия). Анализы проводились в двух повторах.

Видовую принадлежность исследуемого микроорганизма определяли с помощью масс-спектрометрического анализа MALDI TOF (“Bruker Daltonics” Германия). Подготовку проб проводили согласно предложенной методике [13]. Экстракцию белков осуществляли согласно протоколу компании “Bruker Daltonics” (Германия). Также использовали метод прямого нанесения культуры на мишень. Результаты исследований были автоматически обобщены с использованием программы FlexAnalysis (версия 3.3) (“Bruker Daltonics” Германия).

Биохимические свойства оценивали с помощью набора “Staphy-test” (“Lachema”, Чехия).

Выделение и очистка фермента. Стафилолитическую активность определяли, используя в качестве субстрата живые клетки *S. aureus* FDA209P. За 1 единицу (ед.) активности принимали снижение оптической плотности клеточной суспензии вдвое, в течение 10 мин в объеме 6 мл при начальной оптической плотности $D_{620} \approx 0.250$ и температуре 37°C с учетом значения спонтанного лизиса контрольной суспензии микробных клеток. Исходная активность раствора фермента была не более 4.5 ед./мл. Конечная концентрация фермента во всех экспериментах составляла ~85–100 нг/мл (0.13–0.15 ед./мл).

Определение антистафилококковой активности стафилолитической амидазы из *S. hyicus* B-8870 проводили по той же методике, используя в качестве субстрата суспензии клеток референсных штаммов и клинических изолятов различных видов стафилококков.

Хроматографическую очистку стафилолитической амидазы из *S. hyicus*-887 проводили на хроматографе ÄKTA start (“Cytiva”, США) с программным обеспечением UNICORN start 1.0, на колонке с носителем CM-Sepharose Fast Flow (“Cytiva”), объемом 100 см³, уравновешенным буферным раствором (5 мМ трис-HCl, pH 7.8). Освобождение от балластных веществ проводили тем же буферным раствором, содержащим 250 мМ NaCl. Элюцию фермента проводили, увеличивая концентрацию NaCl до 500 мМ. Концентрацию белка оценивали спектрофотометрически по поглощению раствора при D_{280} . Раствор фермента хранили при –70°C.

Степень чистоты фермента оценивали электрофорезом по Лэмли с соавт. [14] в 15%-ном ПААГ, с использованием маркерных белков P126628 (“Thermo Fisher Scientific”, Германия).

Аминокислотная последовательность. Аминокислотную последовательность фермента определяли методом масс-спектрометрии. Анализируемый белок подвергали независимому гидролизу тремя протеазами (трипсин, химо трипсин и протеиназа К). Полученные пептиды разделяли с помощью нанопотоковой хроматографии на хроматографе Easy nLC1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США), разделение пептидов проводили на капиллярной колонке C18 с зернением 3.5 мкм, с порами 100 Å. Длина колонки составляла 150 мм, диаметр колонки 0.075 мкм. Разделение проводили в градиенте ацетонитрила 5–80% в течение 90 мин, скорость потока растворителя при хроматографии составила 250 нл/мин. В качестве детектора использовали масс-спектрометр высокого разрешения Orbitrap Elite (“Thermo Fisher Scientific”, Германия). Пептиды, элюируемые с колонки ионизировали методом наноэлектрораспыления. Напряжение на входном капилляре составляло 1.9 кВ, температура входного капилляра – 200°C. Ионы пептидов анализировали с помощью тандемной масс-спектрометрии, фрагментацию ионов инициировали соударением с инертным газом (азотом), в высокоэнергетической ячейке соударений. Панорамные спектры записывали в диапазоне 300–160 m/z с разрешением 60000, спектры фрагментации записывали в диапазоне 100–2000 m/z с разрешением 15000.

Анализ полученных результатов проводили с помощью коммерческой программы Peaks Studio 7.5. При идентификации белка использовали следующие параметры: ошибка в измерении массы не более 10.0 ppm, ошибка в определении масс фрагментов не более 0.3 Да. В качестве возможных модификаций аминокислот использовали окисление метионинов и модификацию муравьиной кислотой.

Расчет коэффициента поглощения раствора белка 1 мг/мл при 280 нм, проводили по формуле:

$(5700n_{Tyr} + 1300n_{Trp})/M$, где M – молекулярная масса, n – количество аминокислотных остатков.

Физико-химические свойства. Зависимость ферментативной активности от pH исследовали в ацетатном (pH 6.4–6.8), фосфатном (pH 7.0–8.3) и трис-HCl (pH 8.5–9.0) 5 мМ буферных растворах, переводя в них суспензию стафилококковых клеток центрифугированием (4200 g, 15 мин) и 3-кратной промывкой. Замену буферных растворов в растворе фермента проводили на колонках с сефадексом PD MiniTrap G 25 (“Cytiva”, США), уравновешенных соответствующими буферными растворами. Температурную зависимость ферментативной активности исследовали в 5 мМ трис-HCl буферном растворе. В этом же растворе проводили исследования по влиянию концентрации NaCl на активность фермента. Все эксперименты проводились с использованием, в качестве контроля, суспензии стафилококковых клеток в соответствующих условиях без присутствия раствора фермента.

Кинетические свойства. Кинетические характеристики определяли на приборе Multiskan Sky (“Thermo Fisher Scientific”) в 96-луночном планшетном устройстве, при температуре 37°C, измеряя D_{620} суспензии клеток, не превышающую 0.9. Конечная концентрация фермента составляла 420 нг/мл. За скорость ферментативной реакции принимали снижение оптической плотности суспензии клеток *S. aureus* FDA 209P за 1 мин ($\Delta D_{620} \text{ мин}^{-1}$), с учетом значения спонтанного лизиса культуры. Кажущиеся константы $K_{m(\text{каж})}$ и $V_{\text{max}(\text{каж})}$ определяли по первичным экспериментальным данным в программе “Prism 9.3”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

При оценке клинических изолятов сельскохозяйственной птицы был выделен микроорганизм с выраженной антистафилококковой активностью, обнаруженной, в ходе совместного роста при высеве патологического материала из подглазничного синуса бройлера на плотную питательную среду. Биохимические показатели, определенные методом “STAPHY-test”, выявили принадлежность изолята к виду *Staphylococcus hyicus*. Биохимические показатели отличались от стандартных лишь по показателям расщепления лактозы, галактозы и утилизации нитрата. Последний показатель, свойственный 70–80% штаммов, отсутствовал у данного микроорганизма (табл. 1).

Биохимические показатели штамма *Staphylococcus hyicus* B-8870. Методом масс-спектрометрического анализа MALDI TOF, определена принадлежность изолята к виду *Staphylococcus hyicus*.

В ходе совместного культивирования изолята *S. hyicus* с тестовым штаммом *S. aureus* FDA 209P на плотной питательной среде LB, было отмечено

Таблица 1. Биохимические показатели штамма *Staphylococcus hyicus* В-8870

Биохимический показатель, “STAPHYtest”								
VPT	URE	ARG	ORN	BGA	GLR	ESL	NIT	PHS
Стандарт								
–	d	+	–	–	(+)	–	+	+
Штамм В-8870								
–	–	+	–	–	–	–	–	+
GAL	SUC	TRE	MAN	XYL	MLT	MNS	LAC	OXI
Стандарт*								
+	+	+	–	–	–	+	+	–
Штамм В-8870*								
–	+	+	–	–	–	+	–	–

• * Продолжение.

Таблица 2. Очистка стафилолитической амидазы из культуральной жидкости *S. hyicus* В-8870

Стадия очистки	Объем, мл	Белок, мг/мл	Активность, ед./мл	Суммарная активность, ед.	Выход, %
Культуральная жидкость	930	–	11	10230	100
Элюат	45	0.5	205	9225	90

подавление роста колоний последнего. В процессе культивирования штамма-продуцента *S. hyicus* В-8870 на жидкой питательной среде LB до достижения значения поглощения D_{620} 9.2 была получена культуральная жидкость, обладающая антистафилококковой активностью. После отделения биомассы центрифугированием из супернатанта ме-

тодом ионообменной хроматографии, был выделен (рис. 1, табл. 2) электрофоретически чистый белок. По результатам электрофореза в ПААГ (рис. 2) белок имел молекулярную массу ~14 кДа.

Небольшая (для ферментов) молекулярная масса предполагала пониженную иммуногенность в ходе возможного парентерального применения, а степень чистоты выделенного белка была достаточной для успешного определения его первичной последовательности.

Специфическую активность фермента оценивали в Spot-тесте на агаризованной среде с культурой тест-штамма *S. aureus* FDA 209P. Как видно из результатов Spot-теста, зона просветления наблюдалась вплоть до 12 разведения раствора фермента, что составляло 103 пг в пробе.

Штамм-продуцент стафилолитической амидазы *S. hyicus* был депонирован в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур “ГКПМ – Оболенск” под номером В-8870.

Ферментативную активность выделенного белка проверяли на клинических изолятах, а также тестовых, в том числе метициллинрезистентных и полирезистентных штаммах стафилококков (рис. 4). Помимо стафилококков, были исследованы и другие грамположительные микроорганизмы родов *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Listeria*, *Bacillus* в качестве субстратов для ферментативной активности белка

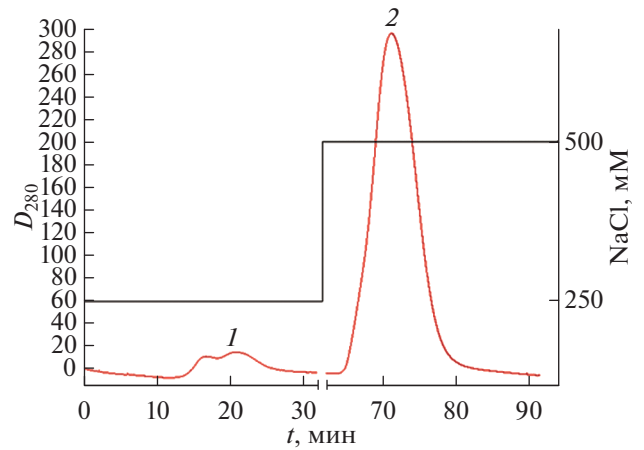


Рис. 1. Хроматограмма очистки стафилолитической амидазы из *S. hyicus* В-8870 катионообменной хроматографией: 1 – промывка колонки от балластных веществ буферным раствором, содержащим 250 мМ NaCl; 2 – элюция белка буферным раствором, содержащим 500 мМ NaCl.

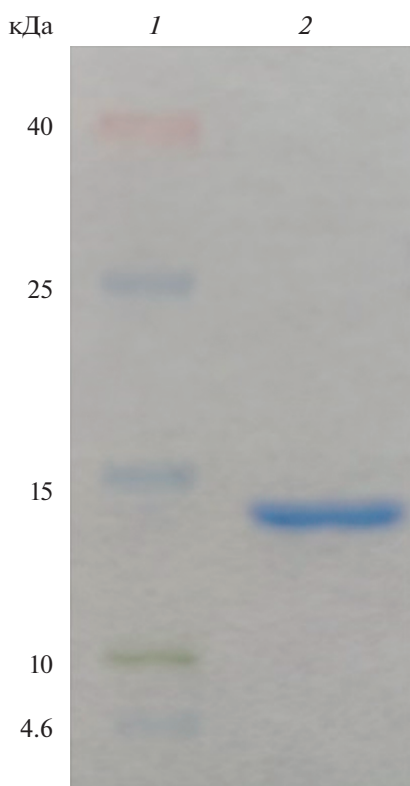


Рис. 2. Электрофорез образца очищенной катионообменной хроматографией стафилолитической амидазы из *S. hyicus* B-8870 в 15%-ном ПААГ с ДДС-Na: 1 – маркерные белки P126628; 2 – очищенная стафилолитическая амидаза из *S. hyicus* B-8870.

(не включены в рис. 4). В этих случаях не наблюдалось бактериолитической активности фермента.

Бактериолитическая активность фермента из *S. hyicus* B-8870 проявлялась в отношении всех исследованных клинических изолятов и референсных штаммов стафилококков, что свидетельствовало о широком спектре литических свойств исследуемого фермента в отношении микроорганизмов *Staphylococcus* spp.

В результате идентификации белка хроматомасспектрометрическим анализом, были найдены 34 уникальных пептида соответствующие стафилолитической амидазе. Таким образом показано, что выделенный белок, действительно, является стафилолитической амидазой. Первичная структура стафилолитической амидазы, определенная хроматомасспектрометрическим анализом приведена ниже:

GluGluIleAspLysTyrProArgProValLysSerAlaGlnProAsnTyrHisTrpLysAsnAsnCysThrTrpCysValHisAsnLysArgAsnGlnThrLysArgTyrLeuProSerHisPheThrHisAlaLysAsnTrpLeuSerGluAlaLysLysAlaGlyPheLysThrGlyLysArgProLeuAlaGlyAlaValLeuGlnThrProLysGlyGlyAspGlyLeuGlyHisValAlaPheValGluPheValAsnAlaAsnGlySerIleLysIleSerGluTyrAsnTyrAsnValA

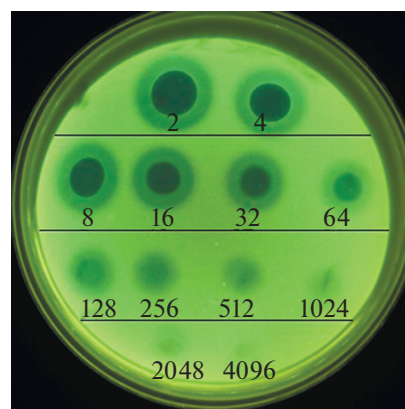


Рис. 3. Spot-тест антистафилококковой активности фермента из *S. hyicus*. Начальное количество белка в пробе 420 нг. Цифрами указаны двукратные разведения образца раствора фермента.

rgLeuGlyTyrGlyThrArgThrLeuThrLysAlaGlnAlaAlaThrTyrAsnTyrIleTyr

При оценке аминокислотной последовательности в базе данных NCBI показано 98%-ное сходство участка СНАР-домена фермента стафилолитической амидазы из *S. sciuri* DD 4747 [15] с аминокислотной последовательностью фермента из *S. hyicus* B-8870. Белок из *S. hyicus* B-8870 состоит из 123 аминокислотных остатков, 12 из которых (выделены в табл. 3) не соответствовали участку первичной последовательности белка из *S. sciuri* DD 4747, что составляло 9.8% (табл. 3).

По первичной структуре была определена молекулярная масса фермента, которая составила 13993 Да. Вычислен коэффициент поглощения белка при $D_{280} - \epsilon \frac{\text{мг}}{\text{мл}}$ 3.94, а также значение изоэлектрической точки pI 10.35. На основании этих данных определена удельная активность фермента – 1518 ед./мг. Определена зависимость ферментативной активности стафилолитической амидазы от температуры. Ее максимальное значение находилось около 40°C. Начиная с 45°C активность резко падала и к 60°C практически полностью утрачивалась (рис. 5).

Представленные результаты определения pH-оптимума активности фермента и ее зависимости от концентрации NaCl в растворе (рис. 6), совпадали с результатами, приведенными в работе [16], в которой представлены близкие показатели для клонированного фрагмента бактериофагового эндוליцина $\text{CHAP}_{\text{LysGH15}}$. Обладая заметной антимикробной активностью, в отношении референс-штамма метициллинрезистентного *S. aureus* 2701, фрагмент $\text{CHAP}_{\text{LysGH15}}$ так же показал отрицательную корреляцию ферментативной активности с концентрацией NaCl, а температурный оптимум

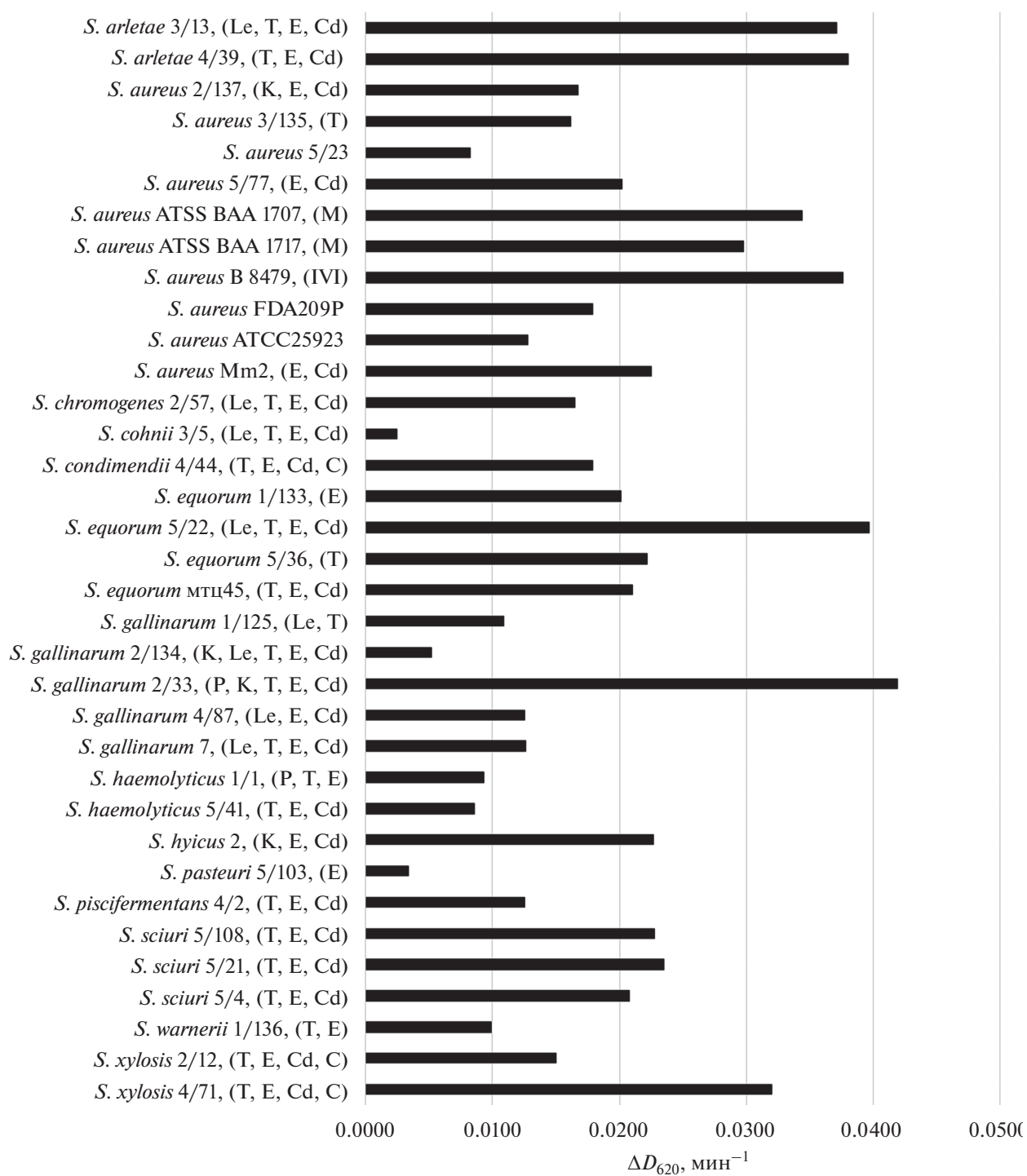


Рис. 4. Средняя скорость лизиса стафилококковых клеток стафилолитической амидазой из *S. hyicus* B-8870.

находился в пределах 40°C, что подтвердило сходство исследуемого белка с СНАР-доменом.

Ингибирующее действие ионов NaCl было подтверждено исследованием кинетических характеристик фермента. При отсутствии в буфер-

ном растворе ионов соли (NaCl) значения $K_{m(\text{каж})}$ и $V_{\text{max}(\text{каж})}$ были соответственно равны $0.5 D_{620}$ и $0.011 \Delta D_{620} \text{ мин}^{-1}$. С повышением концентрации NaCl значение $K_{m(\text{каж})}$ в реакции гидролиза амидазой суспензии стафилококковых клеток возрас-

Таблица 3. Сравнение аминокислотных последовательностей N-ацетилмуромил L-аланинамидазы из *S. sciuri* и амидазы из *S. hyicus*

Штаммы	Аминокислотная последовательность					
<i>S. sciuri</i> DD 4747	MGSNIQGENI	LNIKKIATYT	VLSTLVLTGF	TNIDTGVKNF	TQHEAKAAAI	DKYPRPIKTA
<i>S. hyicus</i> B-8870					EEI	DKYPRPVKSA
	QPNYHWKNNC	TWYVHNKRNQ	TKRYLPSSFT	HAKNWLSEAK	KAGFKTGKTP	LAGAILQTSK
	QPNYHWKNNC	TWCVHNKRNQ	TKRYLPSHFT	HAKNWLSEAK	KAGFKTGKRP	LAGAVLQTPK
	GGGGLGHVAF	VEKVNANGSI	KISEYNYNVS	LGYGTRTLTK	AQAATYNYIY	
	GGDGLGHVAF	VERVNANGSI	KISEYNYNVR	LGYGTRTLTK	AQAATYNYIY	

тало (табл. 4), а при концентрации соли 0.4 М не определялось, ввиду практически полной остановки ферментативной реакции, что свидетельствует об ухудшении связывания фермента с субстратом и ингибировании NaCl активности фермента, которое носит обратимый характер, поскольку перевод фермента и субстрата в буферный раствор без

NaCl полностью восстанавливал литические свойства амидазы.

Таким образом, согласно полученным результатам, штамм *S. hyicus* B-8870 обладал способностью при культивировании в среде LB секретировать в культуральную жидкость антистафилококковый лизин со стафилолитической амидазной активностью, который по своей первичной последовательности и физико-химическим характеристикам представлял СНАР-домен, обладающий литической активностью в отношении 14 исследованных видов микроорганизмов рода *Staphylococcus*, в том числе метициллинрезистентных и полирезистентных штаммов. Молекулярная масса исследованного фермента 13993 Да, коэффициент поглощения при 280 нм – $\epsilon \frac{\text{МГ}}{\text{МЛ}}$ 3.94, значение изоэлектрической точки – pI 10.35. Удельная активность фермента по отношению к клеточной суспензии *S. aureus* FDA 209P – 1518 ед./мг, оптимум pH – 7.7 и температуры – 40°C. Исследован-

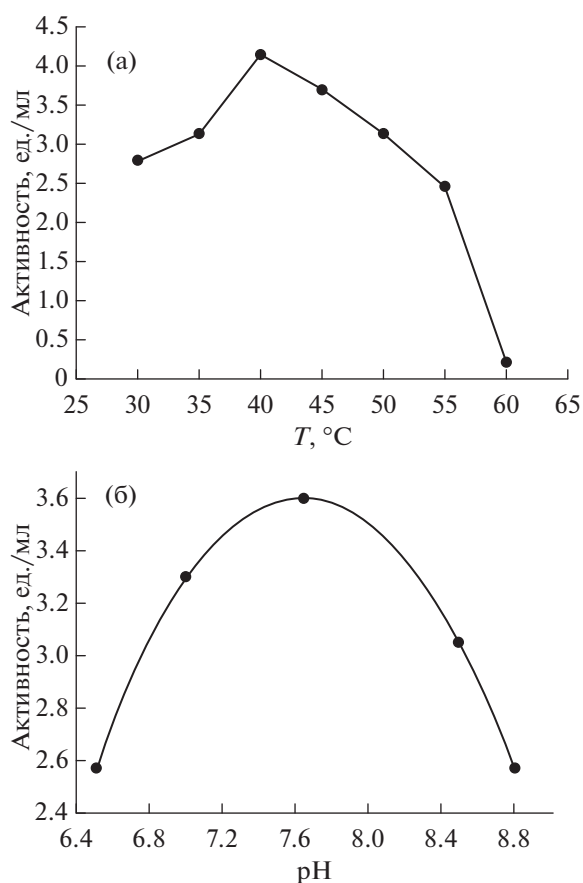


Рис. 5. Зависимость активности стафилолитической амидазы из *S. hyicus*-8870 от температуры (а) и pH буферного раствора (б).

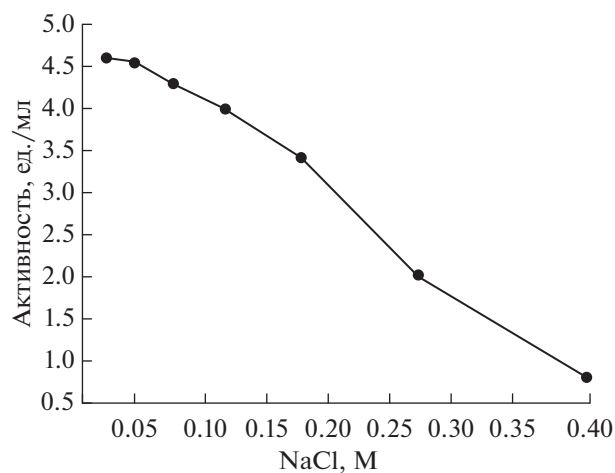


Рис. 6. Зависимость ферментативной активности стафилолитической амидазы от концентрации NaCl в растворе.

Таблица 4. Влияние ионов NaCl на кинетические параметры лизиса клеток *S. aureus* FDA 209P при действии амидазы из *S. hyicus* B-8870

[NaCl], М	K_m (каж), D_{620}	V_m (каж), $\Delta D_{620} \text{ мин}^{-1}$
0	0.5	0.011
0.05	2.2	0.038
0.15	5.8	0.035
0.2	7.8	0.086
0.4	—	—

ный фермент может быть перспективным кандидатом для создания рекомбинантного ферментного антистафилококкового препарата как медицинского, так и ветеринарного назначения. Кроме того, фермент может быть использован в диагностических и лабораторных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karam G., Chastre J., Wilcox M., Vincent J.-L. // Critical Care. 2016. V. 20. P. 136–145.
2. Vermassen A., Leroy S., Talon R., Provot C., Popowska M., Desvaux M. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 331–358.
3. Son B., Kong M., Ryu S. // Viruses. 2018. V. 10. P. 284–296.
4. Fujiki J., Nakamura T., Furusawa T., Ohno H., Takahashi H., Kitana J., Usui M., Higuchi H., Tanji Y., Tamura Y., Iwano H. // Pharmaceuticals. 2018. V. 11. P. 25–44.
5. Bateman A., Rawlings N.D. // Trends Biochem. Sci. 2003. V. 28. P. 234–237.
6. Rigden D.J., Jedrzejewski M.J., Galperin M.Y. // Trends Biochem. Sci. 2003. V. 28. P. 230–234.
7. Llull D., Lopez R., Garcia E. // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 1959–1964.
8. Becker S.C., Dong S., Baker J.R., Foster-Frey J., Pritchard D.G., Donovan D. M. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 294. P. 52–60.
9. Frankel M.B., Schneewind O. // J. Biol. Chem. 2012. № 287. P. 10460–10471.
10. Zou Y., Hou C. // Comput. Biol. Chem. 2010. V. 34. P. 251–257.
11. Li X., Wang S., Nyaruaba R., Liu H., Yang H., Wei H.A. // Antibiotics. 2021. V. 10. P. 461–474.
12. Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. P. 85–106.
13. Alispahic M., Hummel K., Jandreski-Cvetkovic D. et al. // J. Med. Microbiol. 2010. V. 59. P. 295–301.
14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227 № 5259. P. 680–685.
15. Heath L.S., Gargis S.R., Smithberg S.R., Johnson H.P., Heath H.E., LeBlanc P.A., Sloan G.L. // FEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 249. P. 227–231.
16. J., Yang R., Yu S., Zhao W. // J Dairy Sci. 2021. V. 104. P. 2641–2653.

Isolation, Purification and some Properties of Staphylolytic Enzyme from *Staphylococcus hyicus*

T. V. Fedorov^a, *, M. G. Teymurazov^a, A. K. Surin^a, O. I. Tazina^a, and S. F. Biketov^a

^a “State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology” of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, 142279 Russia

*e-mail: tfedorov@yandex.ru

The paper presents data on the identification of a new staphylolytic enzyme from the cultural liquid of *Staphylococcus hyicus* B-8870. The primary sequence of the enzyme has the maximum similarity to the CHAP domain of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase from *Staphylococcus sciuri* DD 4747. The enzyme is active against a wide range of microorganisms of the *Staphylococcus* genus, including MRSA strains. The molecular weight of the enzyme is 13993 Da, the absorption coefficient at 280 nm is $\epsilon_{\frac{\text{mg}}{\text{ml}}}^{\text{mg}} 3.94$, the value of the isoelectric point pI 10.35. The specific activity of the enzyme in relation to the cell suspension of *S. aureus* FDA 209P is 1518 U/mg with an optimum pH of 7.7 and a temperature of 40°C.

Keywords: *Staphylococcus hyicus*, CHAP domain, Staphylolytic enzyme, MRSA