

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-гистицин 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 агара, 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* B-8870

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

• * Продолжение.

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

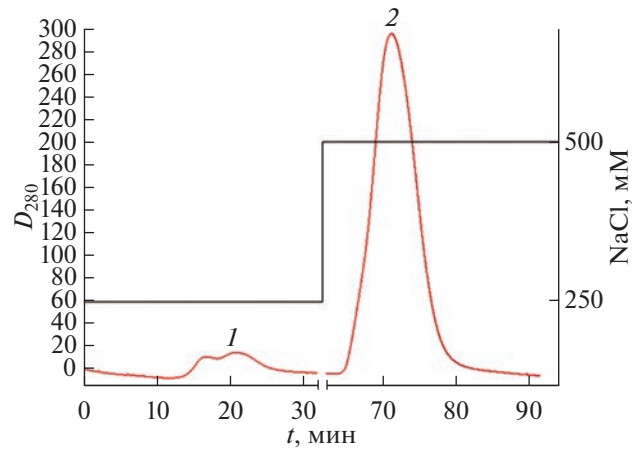


Рис. 1. Хроматограмма очистки стафилолитической амидазы из *S. hyicus* B-8870 катионообменной хроматографией: 1 – промывка колонки от балластных веществ буферным раствором, содержащим 250 мМ NaCl; 2 – элюция белка буферным раствором, содержащим 500 мМ NaCl.

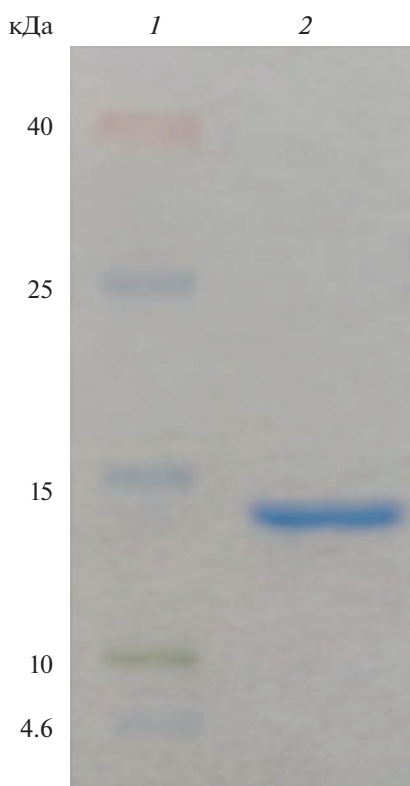


Рис. 2. Электрофорез образца очищенной катионообменной хроматографией стафилолитической амидазы из *S. hyicus* B-8870 в 15%-ном ПААГ с ДДС-Na: 1 – маркерные белки P126628; 2 – очищенная стафилолитическая амидаза из *S. hyicus* B-8870.

(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 хроматомасс-спектрометрическим анализом, были найдены 34 уникальных пептида соответствующие стафилолитической амидазе. Таким образом показано, что выделенный белок, действительно, является стафилолитической амидазой. Первичная структура стафилолитической амидазы, определенная хроматомасс-спектрометрическим анализом приведена ниже:

GluGluIleAspLysTyrProArgProValLysSerAlaGlnProAsnTyrHisTrpLysAsnAsnCysThrTrpCysValHisAsnLysArgAsnGlnThrLysArgTyrLeuProSerHisPheThrHisAlaLysAsnTrpLeuSerGluAlaLysLysAlaGlyPheLysThrGlyLysArgProLeuAlaGlyAlaValLeuGlnThrProLysGlyGlyAspGlyLeuGlyHisValAlaPheValGluPheValAsnAlaAsnGlySerIleLysIleSerGluTyrAsnTyrAsnValA

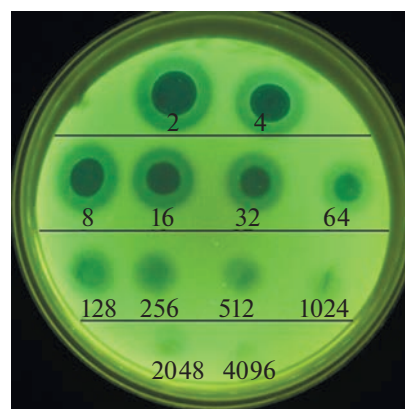


Рис. 3. Spot-тест антистафилококковой активности фермента из *S. hyicus*. Начальное количество белка в пробе 420 нг. Цифрами указаны двукратные разведения образца раствора фермента.

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 эндонуклеина СНАР_{LysGH15}. Обладая заметной антимикробной активностью, в отношении референс-штамма метициллинрезистентного *S. aureus* 2701, фрагмент СНАР_{LysGH15} так же показал отрицательную корреляцию ферментативной активности с концентрацией NaCl, а температурный оптимум

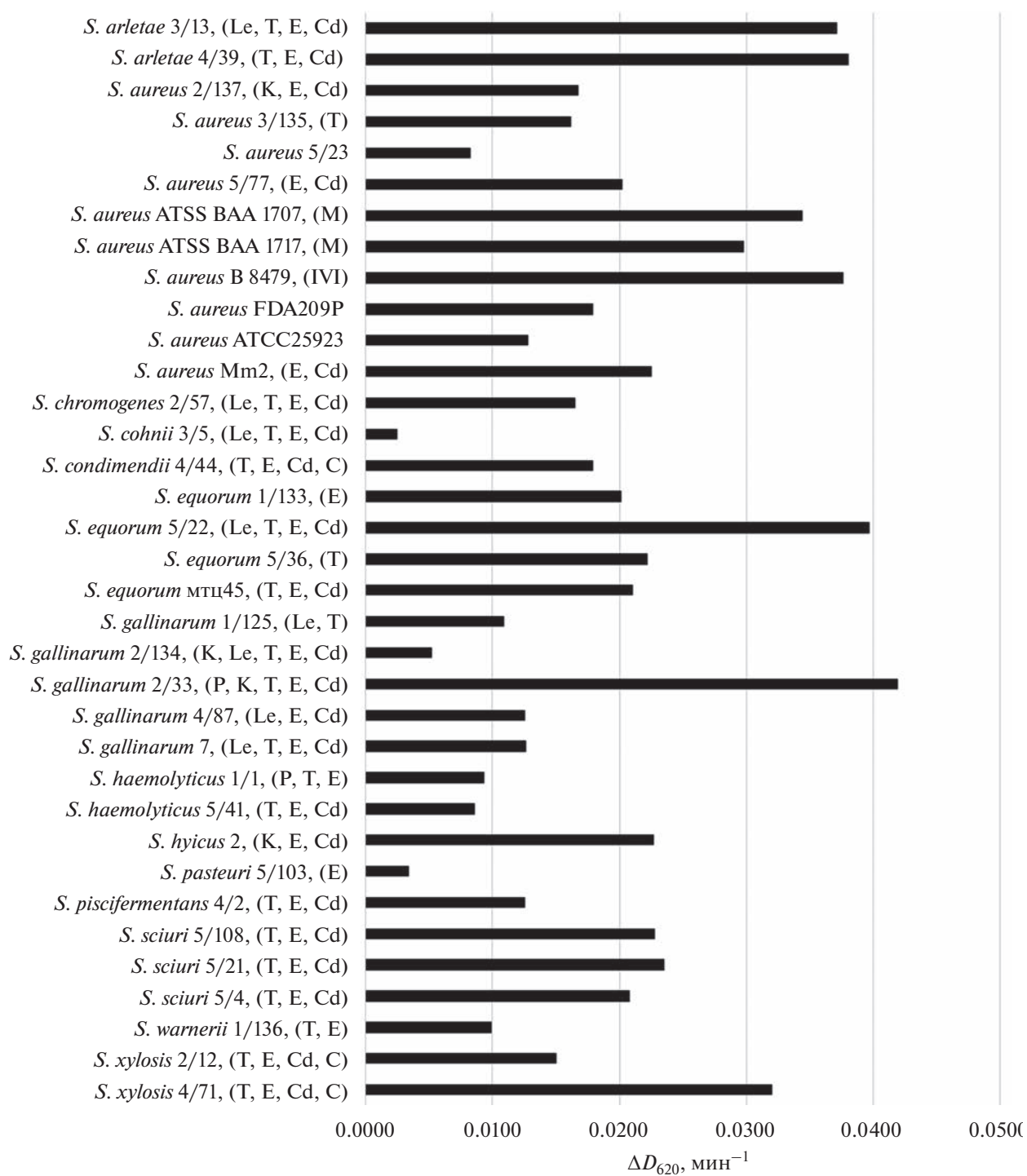


Рис. 4. Средняя скорость лизиса стафилококковых клеток стафилолитической амидазой из *S. hyicus* B-8870.

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	LNIIKIATYT	VLSTLVLTGF	TNIDTGVKNF	TQHEAKAAAI	DKYPRPIKTA
<i>S. hyicus</i> B-8870					EEI	DKYPRPVKSA
	QPNYHWKNNC	TWYVHNKRNQ	TKRYLPSSFT	HAKNWLSEAK	KAGFKTGKTP	LAGAILQTSK
	QPNYHWKNNC	TWCVHNKRNQ	TKRYLPSSHFT	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-

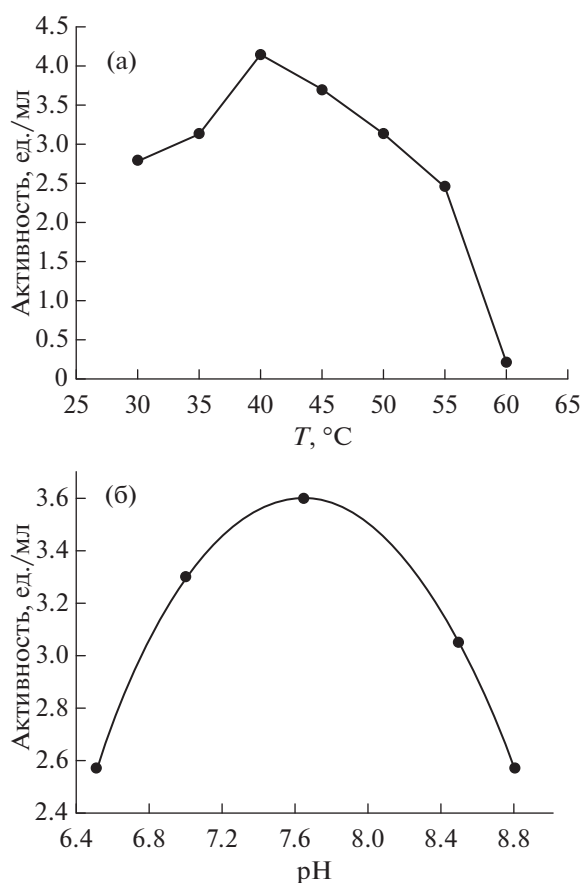


Рис. 5. Зависимость активности стафилолитической амидазы из *S. hyicus*-8870 от температуры (а) и pH буферного раствора (б).

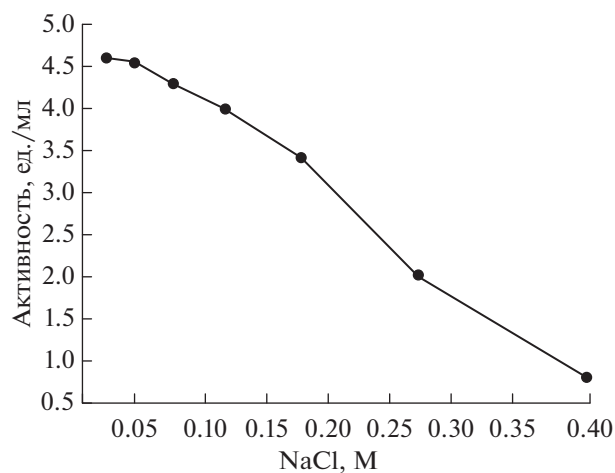


Рис. 6. Зависимость ферментативной активности стафилолитической амидазы от концентрации NaCl в растворе.

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 $\epsilon_{\frac{\text{mg}}{\text{ml}}}^{280} 3.94$, 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