

## Генетическая инактивация генов оксидаз D-аминокислот у метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*

Научный руководитель – Георгий Владимирович Максимов

*Liu Wenxue* -

Аспирант

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: 1276003034@qq.com

Оксидазы D-аминокислот выполняют важные функции в живых организмах и находят широкое практическое применение в биотехнологии.

Функции ДААО достаточно многообразны и включают как прямое участие в катаболизме, так и сигнальную роль [1]. У ферментов из разных источников в широких пределах варьируют значения специфической активности по отношению к разным субстратам [2]. В целом микробные ДААО обладают более высокой активностью по отношению к D-АА с гидрофобными боковыми радикалами.

В последние годы были созданы системы экспрессии ДААО, однако метилотрофные дрожжи благодаря эффективным регулируемым промоторам генов утилизации метанола можно легко проводить оптимизацию процессов ферментации рекомбинантных штаммов-продуцентов ДААО и устранять проблему токсичности гетерологичных ДААО для клеток *E. coli*.

В настоящее время вызывает интерес выяснить физиологическую роль, биохимические особенности продуктов отдельных генов, особенности их регуляции. С помощью известной системы *cre-lox*, которая разработана в лаборатории молекулярной генетики ФИЦ Биотехнологии РАН, можно многократно использовать один и тот же маркер LEU2 для проведения многочисленных последовательных «нокаутов». В данной работе эта система была использована для создания нокаутных конструкций и последующей генетической инактивации генов HP\_2082, HP\_2165, HP\_2400 [3].

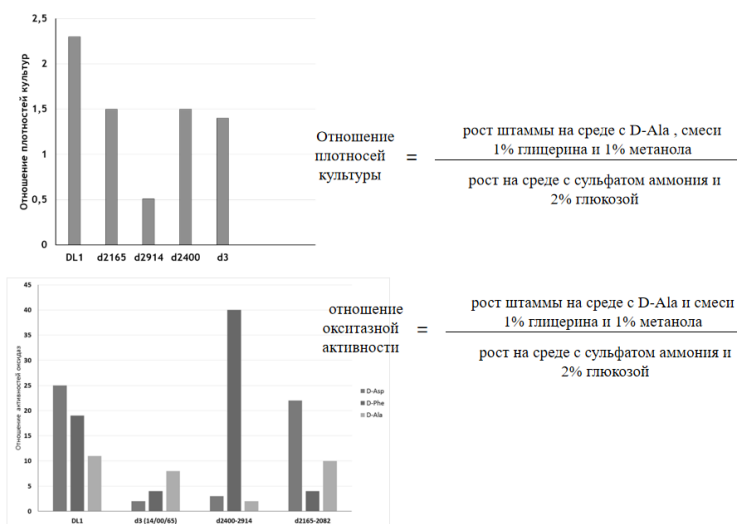
Цель нашей работы заключалась в предварительной физиологической и биохимической характеристике генов ДААО штамма DL1 *in vivo* с использованием техники генного нокаута, а также в определении характера экспрессии этих генов и регуляции активности ДААО в зависимости от источников азота и углерода.

Проведенное исследование показало, что при культивировании *in vitro* выявлена субстратная специфичность оксидаз нокаутных штаммов *H. polymorpha*, присутствие D-аланина в сочетании с 1% глицерином и 1% метанолом в культуральной среде является индуктором активности трех основных ДААО *H. polymorpha*, а наличие в среде глюкозы и L-аланина, наоборот, репрессорами оксидазной активности.

### Источники и литература

- 1) Khoronenkova S. V, Tishkov V.I. D-amino acid oxidase: physiological role and applications. // Biochem. Biokhimii [U+FE20] a [U+FE21]. 2008. Vol. 73, № 13. P. 1511–1518.
- 2) Pollegioni L. et al. Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 78, № 1. P. 1–16.
- 3) Okonechnikov K. et al. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012.

### Иллюстрации



**Рис. 1.** Различия в параметрах роста штаммов на средах с разными источниками азота и углерода и изменение активности оксидаз в присутствии источников углерода и азота.