

Микрометод для идентификации оксидаз с различным рН-оптимумом

Коломыцева М.П., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Шебанова А.Д., Ренфельд Ж.В., Черных А.М.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
г. Пушкино, kolomytseva@rambler.ru

Поиск новых биотехнологически ценных лакказ/оксидаз грибов с высоким редокс-потенциалом, активных в нейтрально-щелочной среде, активно привлекает исследователей последнее десятилетие во всем мире, однако сопряжен с проблемой редкой встречаемости подобных ферментов в природе.

Посредством модифицированного микрометода на основе хромогенной реакции с использованием индикаторных субстратов (сирингалдазина и 2,6-диметоксифенола, Рисунок 1) удалось провести успешную идентификацию лакказ/оксидаз грибов с различным рН-оптимумом в ходе погруженного культивирования 71 грибной культуры, относящихся к различным таксономическим группам (Kolomytseva et al., 2017). Показано, что рН-оптимум окисления выбранных индикаторных субстратов грибными оксидазами совпадает с рН-оптимумом окисления ими других фенольных соединений, за исключением АБТК.



Рис. 1 Типичные хромогенные реакции субстратов-индикаторов, катализируемые грибными лакказами/оксидазами: А – АБТК (2,2-азино-бис (3-этилбензотиазолин 6-сульфоная кислота), зеленый продукт), Б - сирингальдазин (3,5-диметоксибензальдегид, розовый продукт) и В - 2,6-диметоксифенол (желтый продукт).

Благодаря высокой чувствительности (детектируемая лакказная активность в 4-6 раз меньше, чем пороговая лакказная активность, определяемая спектрофотометрически), большой производительности (измерение множества образцов в малых объемах – до 150 мкл), экономичности и скорости измерений, представленная модификация хромогенной реакции может быть применена для идентификации следовых количеств лакказной/оксидазной активности в биологических жидкостях в совокупности с их чувствительностью к рН-значениям среды, а также позволяет проводить мониторинг динамики продукции лакказ/оксидаз грибов в процессе их погруженного культивирования.

В результате проведенного скрининга было отобрано 9 грибных культур из различных таксономических групп, продуцирующие как типичные лакказы/оксидазы (активные в кислой среде), так и нетипичные (наиболее активные в нейтрально-щелочных условиях среды).

Литература

1. Kolomytseva M., Myasoedova N., Samoilova A., Chernykh A., Podieiablonkaia E., Classen T., Pietruszka J., Golovleva L. Rapid identification of fungal laccases/oxidases with different pH-optimium. *Process Biochemistry*, 2017, Vol. 62, pp. 174-183, doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.027