

Медьсодержащие оксидазы бактерии *Streptomyces puniceus*: получение, характеристика ферментов

¹Трубицин И.В., ¹Трубицина Л.И., ^{1,2}Лисов А.В., ^{1,2}Ларионова А.П.,
^{1,2}Леонтьевский А.А.

¹ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино, lyubov_yurevich@mail.ru

²ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт,
г. Пушкино

Медьсодержащие оксидазы (МО) – ферменты из класса оксидоредуктаз, способные окислять широкий спектр органических и неорганических соединений. Повышенный интерес к МО вызван их востребованностью в различных биотехнологических процессах. В бактериальных геномах можно идентифицировать гены как двухдоменных (2д), так и трёхдоменных (3д) МО, причём в геноме одной бактерии можно идентифицировать до пяти генов МО. Большой интерес представляет получение и сравнительная характеристика МО, гены которых идентифицированы в одном бактериальном геноме. В настоящее время отсутствуют работы по исследованию различных в структурном отношении МО, полученных из одного микроорганизма, поэтому данная работа, целью которой является получение и сравнительная характеристика МО, идентифицированных в геноме бактерии *Streptomyces puniceus*, является актуальным исследованием.

В геноме бактерии *Streptomyces puniceus* NRRL В-2895 было идентифицировано четыре гена, относящихся к семейству МО. Белки WP_030188577.1, WP_030191459.1 и WP_078866770.1 были классифицированы как 3д МО, белок WP_030190946.1 – как 2д лакказы, которая ранее была получена нами и охарактеризована. Гены, кодирующие 3д МО WP_030191459.1 и WP_078866770.1, были амплифицированы с использованием в качестве матрицы геномной ДНК штамма *Streptomyces puniceus* ВКМ Ас-579, затем клонированы в экспрессионный вектор pQE-30 и экспрессированы в штаммах *Escherichia coli* М15 (pRep4) и *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3). При экспрессии в штамме М15 (pRep4) наблюдалась высокая продукция белков, однако они не обладали ферментативной активностью. При экспрессии в штамме BL21-CodonPlus (DE3) выход белков был низким, но МО обладали ферментативной активностью. Очистку МО проводили с помощью аффинной хроматографии: на колонке HisTrapTMFF с Ni-сефарозой. Белок WP_030191459.1 (СР3) сходил с колонки при элюции буфером с 300 мМ имидазолом, белок WP_078866770.1 (СР4) – с 20 мМ имидазолом.

Оба фермента окисляли типовые субстраты лакказ: АБТС – при кислых значениях рН; 2,6-ДМФ – при щелочных значениях рН. Фермент СР3 окислял АБТС с максимальной скоростью при рН 4,5; 2,6-ДМФ – при рН 8,5. Фермент СР4 окислял АБТС с максимальной скоростью при рН 2,15. С увеличением рН скорость реакции уменьшалась. Максимальная скорость окисления 2,6-ДМФ ферментом СР4 наблюдалась при рН 7,5. Температурный оптимум СР3 составил 90°C, СР4 – 50°C. Исследовано влияние ингибиторов на активность ферментов. Остаточная активность СР4 в присутствии 10 мМ ЭДТА составляла 58%, в присутствии 10 мМ азидата натрия – 2%. Фермент СР3 практически не ингибировался ЭДТА (фермент сохранял 96% начальной активности в присутствии 10 мМ ЭДТА), остаточная активность в присутствии 10 мМ азидата натрия составляла 32%. Фермент СР4 был способен обесцвечивать трифенилметановый краситель малахитовый зелёный без добавления медиаторов. Фермент СР3 обесцвечивал малахитовый зелёный только в паре с медиатором АБТС.

Результаты: получены ранее не исследованные 3д МО СР3 и СР4 бактерии *Streptomyces puniceus* ВКМ Ас-579; исследованы некоторые физико-химические свойства ферментов СР3 и СР4 (оптимумы рН, температурный оптимум); исследовано влияние

ингибиторов на активность ферментов; показана способность СР3 и СР4 обесцвечивать краситель малахитовый зелёный.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00566.