

УДК 579.25:577.152.1

Т.В. Семашко, доц., канд. биол. наук, вед. науч. сотр.
(Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск);

В.А. Зубарь, студ. биологического факультета
(Белорусский государственный университет, Минск);

Л.А. Жуковская, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.
(Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск)

БИЛИРУБИНОКСИДАЗЫ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ: ПОДБОР МЕТОДОВ СКРИНИНГА МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТА

Билирубиноксидаза (КФ 1.3.3.5) является медьсодержащей оксидазой, которая катализирует окисление билирубина до биливердина *in vitro*. При этом происходит четырехэлектронное восстановление молекулярного кислорода до воды. Фермент нашел применение в текстильной, целлюлозно-бумажной, пищевой и косметической промышленности, медицине. Его используют в органическом синтезе, для детоксикации и обесцвечивания сточных вод, для деградации ксенобиотиков и биоремедиации [1].

Фермент обладает рядом уникальных свойств таких как: температурная стабильность, мягкие условия окисления широкого спектра органических веществ без образования токсичных промежуточных продуктов [1, 2]. Это делает билирубиноксидазу привлекательной для более глубокого изучения, первоначальным этапом которого является поиск микроорганизмов – продуцентов фермента.

Цель работы: анализ методов первичного скрининга микроорганизмов-продуцентов билирубиноксидазы.

Отбор продуцентов любых ферментов можно проводить двумя способами: с использованием дифференциальных сред и методом ДНК-скрининга. Первый метод считается классическим, он позволяет проверить большое количество культур путем выращивания их на средах, содержащих соединения, обеспечивающие отбор определенных штаммов-продуцентов. Нами была проверена способность штаммов расти на средах, содержащих, илирубин в качестве субстрата и о-дианизидин в качестве хромогенного индикатора проявления ферментативной активности. В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов *Myrothecium* sp., *Bacillus subtilis* 12, *Saccharomyces cerevisiae*, находящиеся в коллекции лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси. Гриб *Myrothecium* и бактерии *Bacillus subtilis* – известны, по литературным данным, как культуры, синтезирующие

билирубиноксидазы, *Saccharomyces cerevisiae* не является продуцентом данного фермента. При взаимодействии билирубина и о-дианизидина под действием билирубиноксидаз должна образовываться коричневая окраска вокруг колоний. Однако окраска наблюдалась во всех проверенных случаях. Вероятно, данные культуры синтезируют лакказы или фенолоксидазы, что мешало проведению скрининга с помощью дифференциальных сред, поэтому в последующем использовался скрининг продуцентов билирубиноксидаз с помощью праймеров.

Для ДНК скрининга с помощью праймеров и анализа нуклеотидных последовательностей использовали следующие компьютерные программы. MEGA, SnapGene Viewer, MolBiol.ru, Clustal Omega, NCBI, NCBI GenBank, BLAST, NCBI Gene.

Было выявлено, что среди дрожжей не встречались штаммы, несущие гены билирубиноксидазы. Гены билирубиноксидазы обнаружены у 14 видов микроорганизмов. Наибольшее количество штаммов микроорганизмов, имеющих данные гены, относятся к отделу *Ascomycota*. Сравнительный анализ экзонных последовательностей, кодирующих данный фермент показал низкий уровень гомологии. Для более детального анализа использовали последовательности генов билирубиноксидазы микроорганизмов отделов *Ascomycota* (8 штаммов) и *Basidiomycota* (2 штамма).

При построении филогенетического древа было выяснено, что *Colletotrichum scovillei*, *Colletotrichum orchidophilum*, *Colletotrichum higginsianum* IMI 349063, являются наиболее близкими в эволюционном плане. *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum siamense* образуют общий кластер с данными представителями. Штамм *Colletotrichum scovillei* TJNH1 эволюционировали другим путем. *Verticillium dahliae* VdLs.17, *Verticillium alfalfae* VaMs.102 являются сходными. Гены, обнаруженные в одном штамме могут идти по разным путям эволюции (например, *Pyricularia oryzae* 70-15, *Pestalotiopsis fici* W106-1, *Myrothecium verrucaria*).

Руководствуясь данными, полученными после выравнивая, можно заключить, что нуклеотидные последовательности, кодирующие билирубиноксидазы, характеризуются низким процентом гомологии. Поэтому для скрининга были выбраны наиболее консервативные последовательности, имеющие высокую степень сходства (рисунок). Таким образом, в результате проведенного эксперимента были подобраны 2 пары праймеров, температура отжига которых составляла 52-55 °С.

```

1 agatccgacgacctggcagcatatccattcctgggttctcgttcaaggaacaaggcga 227
2 tgatgcaattgtcgtcaaccggtgtcttcctgaccgctcatcacaggaagaaggcga 200
  *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1 tatccattggcagcggtttcttccaagccggatcttcgtgggctgatggctcccgctttcgt 347
2 cattcattggcagcggcttcttccaagaagggaactaactggcggacgggtggtcgttttgt 320
  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Forward BF3 20 п.о. температура отжига праймеров 52-54 °C
1 gacccaatgccccgctgcctctgggdatagtttccgtgacaaattcaatgtcccagacca 407
2 taatcaatgccccatgccccgggcatctcttccctctacgacttccgggtccctgacca 380
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1 agctogaacgttttggtatcactcgcctcttccaccsaatattgtgacggcctcagagg 467
2 agctggcaccttctggtagccacagccatcttatcaactcagtagctgggatggcttaagagg 440
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1 accattcgtgggtatcagcaccctcggacttggacttggatttatacagatattgacaacgc 527
2 tcctattgtcgtttacgaccsaatgatccacatgcagatttgtatgatgtcgacaacga 500
  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1 agcaatgctgtcaacattgtcccatcaccgctggatagatattcagatcttctgctggcca 824
2 agctgacagtgtaaacaccgagcctctagttgtcggacgccatcccattcttctgctggaca 800
  *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1 acgctactccttctcgttctgactgctgatcaaaccttggcaactactggattcgcggcaa 884
2 caggcctactccttctcgttctttagcgggtcaaggacatcgacaactactggattcgcggcaa 860
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     18 53
2 ccctaacttcggcacaactggattcggcagtggtatcaactctgccattctgcccctacga 920
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1 tcctgcggcggcagcgttagtcaa---cactggcactggcgcaacgacaacgctcactat 1409
2 ccgatctcggcggcagctcgtctcggaccggcagccggccggcgaacgacaacgctcagat 1394
  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Revers 18 п.о. температура отжига праймеров 53 °C GTGACGTTGTGCTTCGCG
19 п.о. температура отжига праймеров 53-55 °C MGTGACGTTGTGCTTCGCG
1 tcgcttctgtgaccgacaaaccsaagcggctggttcctccactgtcacattgattggcatct 1469
2 ccgattcacgaccgacaaaccgggtccggtgggttcctccactgcccacatcgactccacgt 1454
  ** *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Revers 17 п.о. температура отжига праймеров 52 °C

```

Рисунок – Поиск консервативных последовательностей у генов базидиомицетов, кодирующих билирубиноксидазу

Подобранные праймеры будут использоваться в дальнейшей работе для скрининга грибов отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota*, продуцирующих билирубиноксидазу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mano, N. Features and applications of bilirubin oxidases / N. Mano // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 96, №2. – P. 301–307.
2. Kataoka K. High-level expression of *Myrothecium verrucaria* bilirubin oxidase in *Pichia pastoris*, and its facile purification and characterization / K. Kataoka, K. Tanaka, Y. Sakai, T. Sakurai // Protein Expr Purif. – 2005. – Vol. 41, №1. – P.77–83.