

УДК 577.151; 577.152

## МИНОРНЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ИЗОФЕРМЕНТЫ ЛАККАЗ *Trametes hirsuta* 072: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

О.С. Савинова\*, И.Н. Зоров, Д.В. Васина, А.П. Сеницын, Т.В. Федорова

*(Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; \*e-mail: savinova\_os@rambler.ru)*

Лакказы (КФ 1.10.3.2) – мультимедные полифенолоксидазы, обнаруженные у живых организмов, в частности у грибов. Грибные лакказы кодируются мультигенными семействами, которые могут содержать до 17 генов. При этом не все изоферменты можно получить с помощью нативных продуцентов. Предыдущие исследования показали, что мицелиальный гриб *Penicillium canescens* представляет собой перспективный объект для гетерологичной экспрессии различных изоферментов лакказ базидиомицета *Trametes hirsuta* 072. В настоящей работе оптимизированы условия культивирования рекомбинантных штаммов *P. canescens* – продуцентов гетерологичных минорных лакказ *T. hirsuta* 072. Оптимизация методики выделения изоферментов rLacD и rLacF позволила повысить их выход и удельную активность rLacD. Измерена температура плавления минорных изоферментов лакказ и проведено изучение гликозилирования изоферментов.

**Ключевые слова:** лакказа, изоферменты, *Trametes hirsuta*, *Penicillium canescens*, свойства.

Проблема утилизации отходов лигноцеллюлозной биомассы (древесины, соломы, стеблей зерновых и проч.) на сегодняшний день весьма актуальна. Процесс утилизации во многом зависит от модификации (деструкции) входящего в состав лигноцеллюлозы лигнина – сложного биополимера нерегулярного строения, представляющего собой смесь ароматических моно- и олигомеров. В природных экосистемах в качестве основных деструкторов лигноцеллюлозной биомассы выступают грибы, причем более 90% разлагаемой лигноцеллюлозы приходится на долю базидиомицетов [1]. Известно, что их способность к разложению лигноцеллюлозы обеспечивается действием уникального комплекса внеклеточных ферментов, ключевую роль в котором играют лакказы (КФ 1.10.3.2) [2]. Лакказы обладают достаточно высокой стабильностью, широкой субстратной специфичностью в отношении различных фенольных соединений [4, 5] и способностью восстанавливать кислород без образования пероксида. Кроме того, они могут модифицировать различные ксенобиотики (например, гербициды, красители и проч.), что также востребовано в различных отраслях биотехнологии [4–6]. Следует отметить, что в последнее время растет востребованность не только лакказ с широкой субстратной специфичностью, но и более узкоспецифичных ферментов, способных селективно модифицировать определенные компоненты сложных смесей [7].

В настоящее время биотехнологический потенциал лакказ раскрыт не полностью. Это связано, в первую очередь, с ограниченностью знаний об их физико-химических и каталитических свойствах, а также с отсутствием высокоактивных продуцентов. Накопленные данные по полногеномному секвенированию высших грибов показали, что лакказы кодируются мультигенными семействами, число членов которых может достигать семнадцати [8]. При этом существенная продукция белка у нативного продуцента обычно ограничивается небольшим спектром изоферментов лакказ.

Базидиальные грибы белой гнили рода *Trametes* – перспективный объект для изучения. Как правило, представители этого рода продуцируют один конститутивный (мажорный) изофермент лакказы практически во всех условиях культивирования [9–11]. Остальные изоферменты представляют собой индуцибельные (минорные) формы, отличающиеся от мажорных своими биохимическими свойствами [11–15]. Получение минорных изоферментов с помощью нативных продуцентов обычно затруднительно из-за сложности подбора условий культивирования и индукторов, необходимых для их биосинтеза. По этой причине у большинства представителей грибов этого рода только мажорные изоферменты лакказ изучены в достаточной степени [16, 17].

Таким образом, поиск новых изоферментов лакказ базидиальных грибов и сравнительное изуче-

ние их свойств представляет собой актуальную задачу современной биохимии не только с практической точки зрения, но и с фундаментальной.

Базидиомицет *Trametes hirsuta* 072 – эффективный деструктор лигнина. Его мультигенное семейство лакказ представлено семью генами (*lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF* и *lacG*) [18]. В предыдущих работах, помимо нативного мажорного изофермента LacA, нам удалось также получить рекомбинантные минорные изоферменты rLacC, rLacD и rLacF [19–21] в аскомиците *Penicillium canescens* и частично их охарактеризовать. Цель настоящего исследования – оптимизация условий культивирования рекомбинантных штаммов-продуцентов минорных лакказ, оптимизация условий очистки целевых ферментов и изучение их свойств.

### Материалы и методы

**Использованные штаммы и среды.** В работе использованы штаммы *P. canescens* Cc1(25)25, *P. canescens* Dc2(6)23, *P. canescens* Fc3(5)27 – продуценты рекомбинантных изоферментов rLacC, rLacD и rLacF *T. hirsuta* 072 соответственно, полученные нами ранее [17, 22].

Штаммы выращивали, как описано в [23] при разных значениях pH (4,6; 5,6; 7,0) и разной концентрации сульфата меди (0,001–2 мМ). Для изучения кинетики ферментативной активности штаммы выращивали в течение 8 суток в выбранных условиях, отбирая пробы через каждые 24 ч.

**Определение ферментативной активности.** Активность изоферментов определяли спектрофотометрически на спектрофотометре «PerkinElmer Lambda 35» (США), как описано в [22]. В качестве хромогенного субстрата использовали раствор 2,2-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты)диаммониевой соли (АБТС,  $\lambda = 436$  нм,  $\epsilon = 29\,500$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>). За условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 мин. Удельную активность рассчитывали на 1 мг белка.

**Определение концентрации белка.** Образцы культуральной жидкости (КЖ) центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 5 мин. Концентрацию белка в супернатанте определяли спектрофотометрически с помощью коммерческого набора BCA Protein Assay Kit («Pierce», США), согласно методике производителя.

**Очистка изоферментов.** Первоначальная схема (1) очистки рекомбинантных изоферментов описана в работах [17, 22]. Оптимизированная схема (2) очистки включала следующие стадии:

фильтрат КЖ концентрировали на ультрафильтрационной установке «Millipore Pellicon 2 mini» («Merck», Германия) в тангенциальном потоке с применением целлюлозной мембраны. Затем ультрафильтрат диализовали против буферного раствора (для rLacD использовали 5 мМ Трис-ацетатный буфер (pH 8,0); для rLacF использовали 5 мМ Bis-Трис (pH 6,0)), наносили на колонку с носителем Source 15Q («GE Healthcare», «Uppsala», Швеция), уравновешенную соответствующим буферным раствором. Элюцию проводили в градиенте соли хлорида натрия (для rLacD использовали 5 мМ Трис-ацетатный буфер (pH 8,0) до 5 мМ Трис-ацетатный буфер + 400 мМ NaCl (pH 8,0); для rLacF использовали 5 мМ Bis-Трис (pH 6,0) до 5 мМ Bis-Трис + 400 мМ NaCl (pH 6,0)). Наиболее активные фракции объединяли и концентрировали. На следующем этапе ферменты, диализованные против 30 мМ Na-ацетатного буферного раствора с pH 5,0, наносили на колонку с носителем Source 15ISO («GE Healthcare», «Uppsala», Швеция), уравновешенную 1,7 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 30 мМ Na-ацетатного буферного раствора с pH 5,0. Элюировали 30 мМ Na-ацетатным буфером (pH 5,0). Активные фракции объединяли, концентрировали и использовали для дальнейшего исследования.

**Анализ белковых фракций.** Молекулярную массу (М.м.) изоферментов определяли с помощью SDS-электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле, как описано в [22]. Для определения изоэлектрической точки (ИЭТ, *pI*) белков проводили изоэлектрическую фокусировку в полиакриламидном геле в диапазоне амфолитов с pH 3,0–10,0 («Serva Electrophoresis», Германия) на приборе «111 Mini IEF Cell» («Bio-Rad», США). Градиент pH измеряли с помощью стандартов для калибровки («GE Healthcare», Великобритания). Для окрашивания белков использовали «Coomassie Brilliant Blue R-250» («AppliChem», Германия). Расчетные молекулярные массы и ИЭТ изоферментов определяли по известным аминокислотным последовательностям с помощью сервиса ExPASy (<https://www.expasy.org/>) [24].

**Анализ сайтов гликозилирования.** Расположение сайтов гликозилирования изоферментов лакказ рассчитывали по известным аминокислотным последовательностям с помощью сервиса NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) [25]. Для экспериментального подтверждения их наличия из геля, полученного после SDS-электрофореза, вырезали фрагмент

белкового пятна, соответствующего целевому изоферменту, а затем, используя стандартный протокол [26], проводили гидролиз белка. Полученные пептиды экстрагировали из геля 20%-м раствором ацетонитрила, содержащим 0,1% трифторуксусной кислоты, и определяли MALDI-TOF/TOF MS методом спектрометрии на масс-спектрометре «Ultraflextreme» («BRUKER», Германия). Идентификацию белков осуществляли с помощью программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Для обработки масс-спектров использовали программный пакет FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonics», Германия).

**Изучение термостабильности изоферментов методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).** Температуру плавления ( $T_{пл.}$ ) лакказ определяли с помощью нанодифференциального сканирующего калориметра «N-DSC III» («TA Instruments», США) при скорости нагрева 1 °С/мин, температуре от 30 до 95 °С и избыточном давлении 3,0 атм. Концентрация белка составляла 1,2 мг/мл. Базовые корректировки были выполнены и сглажены путем вычитания буферной термограммы. Данные проанализированы на приборе «Launch NanoAnalyze Software» («TA Instruments», США). Калориметрическую теплоту ( $\Delta H_{кал.}$ ) рассчитывали по величине площади под кривой зависимости избыточной теплоемкости белка от температуры, а температуру плавления ( $T_{пл.}$ ) определяли как температуру максимума пика кривой плавления. Относительная погрешность при расчете  $\Delta H_{кал.}$  составляла 5–8%. Экспериментальная ошибка измерения  $T_{пл.}$  не превышала  $\pm 0,2^\circ$ .

## Результаты и обсуждение

**Оптимизация условий культивирования продуцентов.** Одним из простых методов стимуляции синтеза лакказы и увеличения ее активности является добавление в среду ионов меди, как правило, в виде  $\text{CuSO}_4$  [27, 28]. Однако в слишком высокой концентрации ионы меди чрезвычайно токсичны для клеток, в первую очередь, из-за способности участвовать в образовании гидроксильных радикалов, приводящих к разрушению клеточных структур [29, 30]. Поэтому в настоящей работе было проведено определение оптимальной концентрации  $\text{CuSO}_4$  в среде, чтобы избежать ингибирования роста гриба и одновременно стимулировать продукцию целевых ферментов в активной форме. В среду для выращивания продуцентов лакказ добавляли сульфат меди в концентрации от 0,001 до 2 мМ. Было показано, что максимальная активность всех

целевых изоферментов достигается при использовании 0,5 мМ  $\text{CuSO}_4$  и составляет 190, 104 и 150 УЕ/мл для rLacC, rLacD и rLacF соответственно. При прочих концентрациях  $\text{CuSO}_4$  (в исследуемом диапазоне) активность изоферментов уменьшалась без изменения скорости роста культуры, за исключением концентрации 2 мМ (в этом случае происходило ингибирование роста).

Кроме того, был осуществлен подбор оптимального исходного значения pH среды. Были использованы три начальных значения pH (4,6; 5,6; 7,0). Наибольшая активность целевых белков достигалась при pH 4,6 для всех изоферментов. Этот результат соответствует литературным данным, поскольку в проведенных ранее исследованиях было показано, что оптимальные значения pH среды для грибных лакказ находятся в диапазоне pH от 4 до 6 [6]. Следует отметить, что в процессе культивирования (при исходном pH 4,6) наблюдались различия в скорости изменения pH ростовой среды. Однако после 6 суток значение pH среды составляло около 7,0 для всех исследуемых штаммов. Та же тенденция сохранялась и для реципиентного штамма. Известно, что защелачивание среды в процессе культивирования характерно для мицелиальных грибов рода *Penicillium* и связано с дезаминированием аминокислот и последующим образованием аммиака [31].

Оптимальную продолжительность культивирования штаммов для выделения целевых изоферментов в выбранных условиях определяли в течение 8 суток (рис. 1). Из рис. 1 видно, что для всех штаммов существенное увеличение активности целевых ферментов происходило после 4 суток культивирования вплоть до 8 суток. Однако после 6 суток культивирования у всех штаммов наблюдался интенсивный автолиз клеток, поэтому в качестве оптимальной выбрана продолжительность 6 суток. На 6-е сутки активность изоферментов rLacC и rLacF в КЖ достигала значений 150–190 УЕ/мл, а активность rLacD – примерно в полтора раза ниже.

**Очистка и свойства минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072.** Ранее нами была разработана схема очистки для выделения мажорного нативного LacA из КЖ *T. hirsuta* 072 [19]. Эта схема (с некоторыми модификациями) была использована также для очистки рекомбинантных минорных rLacC, rLacD и rLacF [17, 22] (табл. 1, схема 1). Однако показано, что удельная активность изоферментов rLacD и rLacF (40 и 41 УЕ/мг соответственно), выделенных по данной схеме, была существенно ниже по сравнению с rLacC (260,3 УЕ/мг). Можно ви-

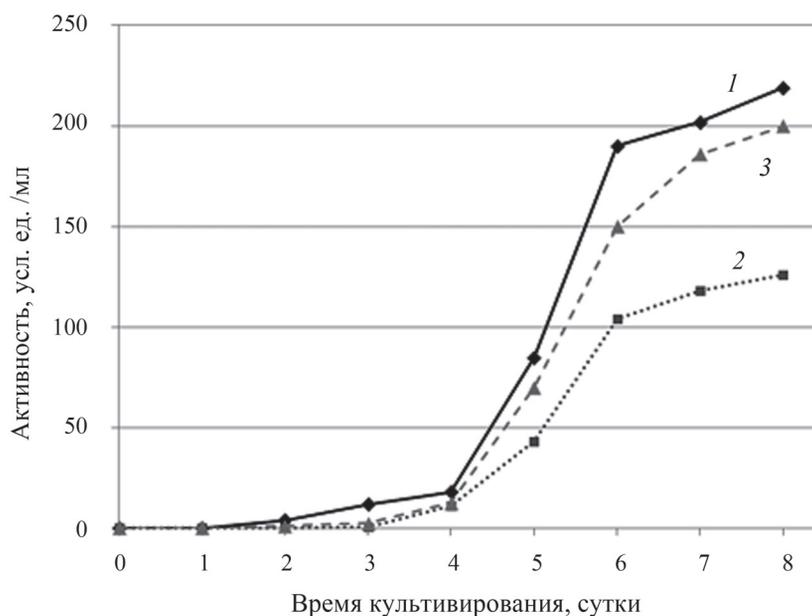


Рис. 1. Кинетика изменения активности лакказ в зависимости от продолжительности культивирования штаммов: 1 – rLacC, 2 – rLacD, 3 – rLacF (даны средние значения по трем техническим повторностям, ошибка не превышает 3%)

дет, что основной лимитирующей стадией в схеме 1 является высаживание белков сульфатом аммония. Поэтому в настоящей работе на первой стадии выделения rLacD и rLacF для концентрирования белков была использована ультрафильтрация КЖ в тангенциальном потоке на целлюлозной мембране. Кроме того, ионообменную хроматографию проводили на носителе Source 15Q, а вместо гельпроникающей хроматографии использовали гидрофобную хроматографию на носителе Source 15ISO (табл. 1, схема 2).

Оптимизация схемы очистки позволила сократить число стадий выделения изоферментов rLacD и rLacF, при этом их выход увеличился до соответственно 13 и 12% (от общей активности в исходной КЖ). Удалось также повысить удельную активность полученного изофермента rLacD до 63 УЕ/мг. Удельная активность rLacF не изменилась. Масс-спектрометрическая идентификация полученных белков подтвердила, что они представляют собой изоферменты rLacC, rLacD и rLacF. Все полученные изоферменты в растворе имели голубую окраску разной интенсивности, свойственную классическим голубым лакказам [32]. Значения молекулярной массы и изоэлектрические точки изоферментов отличались от предсказанных (рис. 2, табл. 2).

Как видно из представленных данных, изоферменты LacA и rLacC имеют близкие молекулярные свойства (М.м. и  $pI$ ), что позволило успешно применить схему, разработанную для очистки

LacA, для очистки также и рекомбинантного изофермента rLacC. Однако значения М.м. и ИЭТ двух других минорных изоферментов (rLacD и rLacF) существенно различаются. Кроме того, при выращивании продуцента rLacF полученная КЖ оказалась более пигментированной, по сравнению с двумя другими продуцентами (rLacD и rLacC), что также затрудняло очистку этого изофермента по схеме 1.

Как видно из рис. 2, значения М.м. полученных рекомбинантных ферментов отличались от расчетных (табл. 2), при этом значения М.м. rLacD и rLacF были значительно выше, чем у rLacC. Исходя из полученных данных, степень гликозилирования изоферментов составила 17, 20 и 23% для rLacC, rLacF и rLacD соответственно. Таким образом, было установлено, что полученные рекомбинантные изоферменты rLacD и rLacF имеют большую степень гликозилирования, чем rLacC и изученная ранее LacA [11], что может быть связано с наличием дополнительных сайтов гликозилирования на поверхности белковых глобул. Анализ аминокислотных последовательностей изоферментов rLacD, rLacC и rLacF показал, что расчетное количество и расположение сайтов N-гликозилирования лакказ *T. hirsuta* 072 заметно отличается, причем для LacF число расчетных сайтов в два раза меньше, по сравнению с двумя другими минорными изоферментами. На рис. 3 представлен фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей изофер-

Таблица 1

Очистка рекомбинантных минорных изоферментов лакказы *T. hirsuta* 072

| Лакказы   | rLacC                |           |                                  |          |                      | rLacD     |                                  |          |                      |           | rLacF                            |          |                      |           |                                  |          |
|---|----------------------|-----------|----------------------------------|----------|----------------------|-----------|----------------------------------|----------|----------------------|-----------|----------------------------------|----------|----------------------|-----------|----------------------------------|----------|
|   | общая активность, УЕ | белок, мг | удельная активность, УЕ/мг белка | выход, % | общая активность, УЕ | белок, мг | удельная активность, УЕ/мг белка | выход, % | общая активность, УЕ | белок, мг | удельная активность, УЕ/мг белка | выход, % | общая активность, УЕ | белок, мг | удельная активность, УЕ/мг белка | выход, % |
| схема 1 [17,22]   |                      |           |                                  |          |                      |           |                                  |          |                      |           |                                  |          |                      |           |                                  |          |
| Стадия выделения  |                      |           |                                  |          |                      |           |                                  |          |                      |           |                                  |          |                      |           |                                  |          |
| КЖ  | 32795                | 6900      | 4,8                              | 100      | 19296                | 3859      | 5                                | 100      | 23690                | 3076      | 7,7                              | 100      | 23690                | 3076      | 7,7                              | 100      |
| Осаждение (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 40087                | 680       | 59                               | 122,2    | 12500                | 1644      | 7,6                              | 64,8     | 14460                | 1112,3    | 13                               | 61       | 14460                | 1112,3    | 13                               | 61       |
| DEAE-целлюлоза  | 36905                | 260       | 141,9                            | 112,5    | 12000                | 1165,1    | 10,3                             | 62,2     | 13410                | 590,7     | 22,7                             | 56,6     | 13410                | 590,7     | 22,7                             | 56,6     |
| DEAE-Тоуорpearl 650 М                                     | 13216                | 54        | 244,7                            | 40,3     | 2836                 | 144       | 19,7                             | 14,7     | 5005                 | 206       | 24,3                             | 21,1     | 5005                 | 206       | 24,3                             | 21,1     |
| Superdex 75   | 7079                 | 27,2      | 260,3                            | 21,6     | 1425                 | 35,6      | 40                               | 7,4      | 1506                 | 53,4      | 28,2                             | 6,4      | 1506                 | 53,4      | 28,2                             | 6,4      |
| Phenyl-Sepharose  | –                    | –         | –                                | –        | –                    | –         | –                                | –        | 700                  | 17,2      | 41                               | 3        | 700                  | 17,2      | 41                               | 3        |
| схема 2 (в настоящей работе)                              |                      |           |                                  |          |                      |           |                                  |          |                      |           |                                  |          |                      |           |                                  |          |
| КЖ  | –                    | –         | –                                | –        | 27890                | 12000     | 2,3                              | 100      | 26640                | 5760      | 4,6                              | 100      | 26640                | 5760      | 4,6                              | 100      |
| Ультрафильтрация  | –                    | –         | –                                | –        | 21700                | 4100      | 5,3                              | 78       | 23200                | 1748      | 13,3                             | 87       | 23200                | 1748      | 13,3                             | 87       |
| Source 15Q  | –                    | –         | –                                | –        | 5500                 | 108       | 51                               | 20       | 4776                 | 180       | 26,5                             | 18       | 4776                 | 180       | 26,5                             | 18       |
| Source 15ISO  | –                    | –         | –                                | –        | 3745                 | 59        | 63                               | 13       | 3240                 | 80        | 41                               | 12       | 3240                 | 80        | 41                               | 12       |

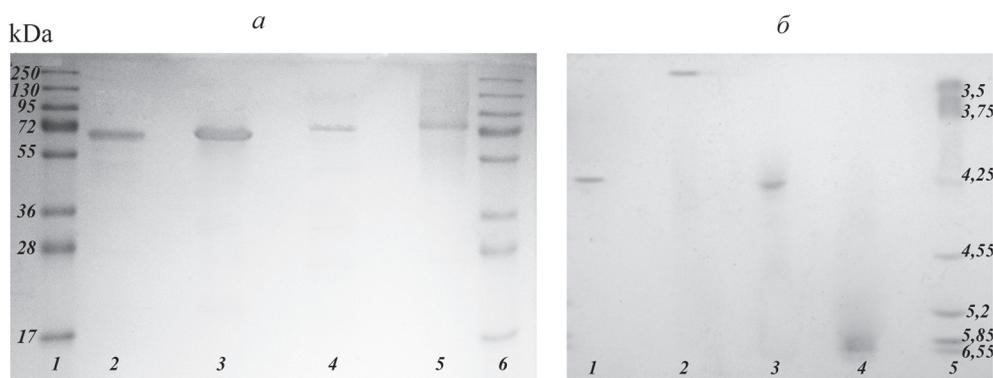


Рис. 2. Электрофоретический анализ препаратов лакказ: *a* – SDS-электрофорез в денатурирующих условиях (1, 6 – маркер, 2 – LacA, 3 – rLacC, 4 – rLacF, 5 – rLacD); *б* – изоэлектрофокусирование изоферментов лакказ (1 – LacA, 2 – rLacC, 3 – rLacF, 4 – rLacD, 5 – маркер)

ментов лакказ *T. hirsuta* 072 в районе аминокислотных остатков, где расположены сайты N-гликозилирования.

Как видно из рис. 3, для изученных в настоящей работе изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 консервативны два сайта гликозилирования (Asn<sup>75</sup> и Asn<sup>457</sup>). При этом наличие только Asn<sup>75</sup> удалось экспериментально подтвердить для всех изученных изоферментов лакказ. Интересно, что для rLacC и rLacD экспериментально подтверждено наличие таких уникальных сайтов, как Asn<sup>207</sup> и Asn<sup>292</sup> соответственно (рис. 3), которые не обнаружены у других описанных в литературе грибных лакказ. Следует отметить, что в структуре LacA, выделенного из природного продуцента (PDB:3FPX) [19], обнаружены четыре занятых сайта гликозилирования из восьми возможных (табл. 2), а в структуре рекомбинантной rLacA (PDB: 5LDU), полученной нами ранее в *P. canescens* [23], было подтверждено наличие дополнительного сайта N- гликозилирования Asn<sup>398</sup>, помимо сайтов, подтвержденных для LacA. Наличие данного сайта гликозилирования экспериментально подтверждено и для rLacF (рис. 3, Asn<sup>402</sup>). В работе [33] в 3D-структурах разных изофер-

ментов лакказ гриба *Puccinoporus sanguineus* также были обнаружены различия в расположении сайтов N-гликозилирования.

Известно, что гликозилирование белков влияет на их термостабильность. В связи с этим в настоящей работе было проведено исследование термостабильности минорных изоферментов лакказ (табл. 3). Кривые плавления рекомбинантных ферментов имеют два максимума (в отличие от нативной лакказы LacA), причем величины  $T_{пл}$ , как первого, так и второго пиков у всех исследованных ферментов очень близки, в то время как значения теплоты плавления ( $\Delta H_{кал}$ ) сильно варьируют (табл. 3). Примечательно, что наименее стабильная при 60 °C лакказа rLacC имеет самое высокое значение  $\Delta H_{кал}$ , но  $T_{пл}$  первого пика плавления составляет 60 °C, в то время как у остальных рекомбинантных лакказ этот показатель сдвинут на 1–2 °C в область более высоких температур. У нативной лакказы LacA первый пик плавления отсутствует, а значение теплоты плавления самое низкое из всех изученных изоферментов.

Таким образом, можно предположить, что различия в физико-химических и каталитических

Т а б л и ц а 2

Свойства изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072

| Изофермент | Молекулярная масса |            | Значение <i>pI</i> |            | Число сайтов гликозилирования |                |
|------------|--------------------|------------|--------------------|------------|-------------------------------|----------------|
|            | расчетная          | полученная | расчетное          | полученное | расчетное                     | подтвержденное |
| LacA       | 55,9               | 66         | 5,06               | 4,0        | 8                             | 4 [19]         |
| rLacC      | 55,6               | 67         | 4,4                | 3,1        | 11                            | 2              |
| rLacD      | 57,6               | 75         | 5,72               | 6,5        | 10                            | 3              |
| rLacF      | 56,3               | 70         | 5,01               | 4,2        | 5                             | 3              |

| Фермент     | Сайты гликозилирования                          |  |  |  |
|-------------|---|--|--|--|
|             | *   |  |  |  |
| <b>LacA</b> | N <sup>72</sup> LTNHTMLK <sup>80</sup>          | Y <sup>116</sup> DFQVPDQA <sup>124</sup> | P <sup>199</sup> SDTTAELSVI <sup>209</sup> | C <sup>226</sup> DPNHTFSI <sup>234</sup> |
| <b>LacF</b> | K <sup>76</sup> LTNHTMLK <sup>84</sup>          | Y <sup>120</sup> DFHVPGQA <sup>128</sup> | T <sup>203</sup> TNTDAEVSVI <sup>213</sup> | C <sup>230</sup> DPAYTFSI <sup>238</sup> |
| <b>LacC</b> | Q <sup>78</sup> LTNSTMLK <sup>86</sup>          | Y <sup>118</sup> DFNVTDQA <sup>126</sup> | T <sup>201</sup> GGNSTNLTVI <sup>211</sup> | C <sup>228</sup> DPNHTFSI <sup>236</sup> |
| <b>LacD</b> | K <sup>72</sup> LTNETMLT <sup>80</sup>          | Y <sup>116</sup> NFQVPDQT <sup>124</sup> | A <sup>201</sup> GNPTSELAVI <sup>211</sup> | C <sup>228</sup> DPRYNFTI <sup>236</sup> |
| <b>LacA</b> | D <sup>235</sup> GHNLTIIIE <sup>243</sup>       | P <sup>284</sup> NFGNVGFD <sup>292</sup> | T <sup>311</sup> TNQTTSVKPL <sup>321</sup> | F <sup>351</sup> NFNGSNF <sup>358</sup>  |
| <b>LacF</b> | D <sup>239</sup> NHDLTVIE <sup>247</sup>        | P <sup>288</sup> LFGTTGFA <sup>296</sup> | T <sup>315</sup> SSQGNSTKAL <sup>325</sup> | F <sup>355</sup> SFNGTNF <sup>362</sup>  |
| <b>LacC</b> | D <sup>237</sup> GHNMTIIIE <sup>245</sup>       | P <sup>286</sup> NTGTTDFA <sup>294</sup> | T <sup>313</sup> TNQTTSVAPL <sup>323</sup> | I <sup>353</sup> SFNGSAF <sup>360</sup>  |
| <b>LacD</b> | D <sup>237</sup> GHNMTIIIE <sup>245</sup>       | Q <sup>289</sup> NLNTGFA <sup>297</sup>  | T <sup>316</sup> TQSPNSVAFL <sup>326</sup> | L <sup>356</sup> NFTKGEF <sup>363</sup>  |
|             | **  |  |  |  |
| <b>LacA</b> | N <sup>361</sup> GASVFP...LSGAQ <sup>381</sup>  | L <sup>395</sup> PSNASIEI <sup>403</sup> | A <sup>454</sup> GDNVTIRF <sup>462</sup>   | D <sup>513</sup> ALDPNDQ <sup>520</sup>  |
| <b>LacF</b> | N <sup>365</sup> GATFKPP...LSGAK <sup>385</sup> | L <sup>399</sup> PSNATIEL <sup>407</sup> | P <sup>456</sup> GDNVTIRF <sup>464</sup>   | D <sup>515</sup> ALDESQ <sup>522</sup>   |
| <b>LacC</b> | N <sup>363</sup> DATYTSP...LSGAQ <sup>383</sup> | L <sup>397</sup> PSNSTVEL <sup>405</sup> | A <sup>455</sup> GDNVTIRF <sup>463</sup>   | D <sup>514</sup> ALGSDH <sup>521</sup>   |
| <b>LacD</b> | N <sup>366</sup> NVSFKPP...LNGTL <sup>386</sup> | L <sup>400</sup> PPYSTIEL <sup>408</sup> | P <sup>459</sup> TDNVTVRF <sup>467</sup>   | D <sup>516</sup> KAMNITV <sup>523</sup>  |

Рис. 3. Сайты N-гликозилирования изоферментов лакказ LacA (GenBank: KP027478.1), LacC (GenBank: KP027479.1), LacD (GenBank: KP027480.1), LacF (GenBank: KP027482.1) *T. hirsuta* 072: подчеркиванием выделены рассчитанные сайты гликозилирования; звездочкой (\*, \*\*) обозначены консервативные сайты, серым – подтвержденные сайты, жирным шрифтом – дополнительный сайт, наличие которого показано для рекомбинантной лакказы А (у нативной отсутствует); рамкой обозначены уникальные сайты гликозилирования, наличие которых подтверждено экспериментально

Т а б л и ц а 3

Термостабильность и параметры тепловых переходов изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072

| Параметр                           | LacA      | rLacC | rLacD | rLacF |
|------------------------------------|-----------|-------|-------|-------|
| $\Delta H_{\text{кал}}$ , кДж/моль | 287 [34]  | 1776  | 1306  | 600   |
| $T_{\text{пл}}$ , °C               |           |       |       |       |
| 1-й пик плавления                  | –         | 60    | 62    | 61    |
| 2-й пик плавления                  | 69 [34]   | 67    | 67    | 68    |
| $\tau_{1/2}$ (60 °C), мин          | 12±2 [17] | 4±2   | 22±2  | 12±2  |

свойствах изоферментов лакказ, показанные здесь и ранее [17, 22], вероятно, обусловлены паттерном гликозилирования изоферментов. Однако мы не можем однозначно утверждать, что характеристики, полученные для рекомбинантных минорных изоферментов, аналогичны характеристикам изоферментов из природного продуцента. Поэтому поиск способов получения нативных минорных изоферментов лакказ

*T. hirsuta* 072 на сегодняшний день остается актуальной задачей.

Авторы выражают благодарность С.Ю. Клейменову, сотруднику лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, за помощь в проведении экспериментов по дифференциальной сканирующей калориметрии. Конфликта интересов нет.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baldrian P. // FEMS Microbiol. Rev. 2006. Vol. 30. N 2. P. 215.
- Have T.R., Teunissen P.J.M. // Chem. Rev. 2001. Vol. 101. N 11. P. 3397.
- Riva S. // Trends Biotechnol. 2006. Vol. 24. N 5. P. 219.
- Khan R., Bhawana P., Fulekar M.H. // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2013. Vol. 12. N 1. P. 75.
- Chandra R., Chowdhary P. // Environ. Sci. Process. Impacts. 2015. Vol. 17. N 2. P. 326.
- Viswanath B. et al. // Enzyme Res. 2014. Vol. 2014. P. 1.
- Minussi R.C., Pastore G.M., Duran N. 2002. Vol. 13. N 6–7. P. 205.
- Kilaru S., Hoegger P.J., Kues U. // Curr. Genet. 2006. Vol. 50. N 1. P. 45.

9. Jia L.D. et al. // J. Basic Microbiol. 2005. Vol. 45. N 3. P. 190–198.
10. Lorenzo M., Moldes D., Sanromán M.Á. // Chemosphere. 2006. Vol. 63. N 6. P. 912.
11. Vasina D.V. et al. // Biochimie. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 116. P. 154.
12. Yaver D.S. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. Vol. 62. N 3. P. 834.
13. Temp U., Zierold U., Eggert C. // Gene. 1999. Vol. 236. N 1. P. 169.
14. Xiao Y.Z. et al. // Mycologia. 2004. Vol. 96. N 1. P. 26.
15. Koschorreck K. et al. // Arch. Biochem. Biophys. 2008. Vol. 474. N 1. P. 213.
16. Yang J. et al. // Front. Microbiol. 2017. Vol. 8. N MAY.
17. Savinova O.S. et al. // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10. N February. P. 1.
18. Pavlov A.R. et al. // Genome Announc. American Society for Microbiology, 2015. Vol. 3. N 6. P. e01287-15.
19. Polyakov K.M. et al. // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography. 2009. Vol. 65. N 6. P. 611.
20. Rebrikov D.V. et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. Vol. 42. N 6. P. 564.
21. Glazunova O. et al. // Catalysts. 2018. Vol. 8. N 4. P. 152.
22. Savinova O.S. et al. // Biochimie. 2017. Vol. 142. P. 183.
23. Abyanova A.R. et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. Vol. 46. N 3. P. 313.
24. Wilkins M.R. et al. // Methods Mol. Biol. 2005. Vol. 112. P. 531.
25. Gupta R., Brunak S. // Biocomput. 2002. 2002. Vol. 322. P. 310.
26. Smith B.J., Tempst P. Protein Sequencing Protocols. Totowa, 1997.
27. Huber M., Lerch K. // FEBS Lett. 1987. Vol. 219. N 2. P. 335.
28. Palmieri G. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. Vol. 66. N 3. P. 920.
29. Arora D.S., Rampal P. // J. Basic Microbiol. 2002. Vol. 42. N 5. P. 295.
30. Galhaup C., Haltrich D. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. Vol. 56. N 1–2. P. 225.
31. Paveia M.H. // Mycopathologia. 1975. Vol. 55. P. 35.
32. Morozova O.V. et al. // Biochem. 2007. Vol. 72. N 10. P. 1136.
33. Orlikowska M. et al. // Int. J. Biol. Macromol. 2018. Vol. 107. P. 1629.
34. Glazunova O.A. et al. // PLoS One. 2018. Vol. 13. N 6. P. e0197667.

Поступила в редакцию 10.11.2018  
Получена после доработки 12.02.2019  
Принята к публикации 14.02.2019

## THE MINOR RECOMBINANT LACCASE ISOZYMES OF *Trametes hirsuta* 072: OBTAINING AND PROPERTIES

O.S. Savinova\*, I.N. Zorov, D.V. Vasina, A.P. Sinitsyn, T.V. Fedorova

(A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences; \*e-mail: savinova\_os@rambler.ru)

**Laccases (EC 1.10.3.2) are multicopper polyphenol oxidases found in various organisms, in particular, in fungi. Fungal laccases are encoded by multigenic families, which can contain up to 17 genes. However, not all isozymes can be obtained from native producers. Previous studies have shown that the filamentous fungus *Penicillium canescens* is a promising object for the heterologous expression of various laccase isozymes of *Trametes hirsuta* 072. In this work, the cultivation conditions of *P. canescens* strains, recombinant producers of *T. hirsuta* heterologous minor laccase, have been optimized. Optimization of rLacD and rLacF purification method increased their yield and specific activity of rLacD. In addition, the melting points of minor laccase isoenzymes were measured and the glycosylation of isoenzymes was studied.**

**Key words:** laccase, isozymes, *Trametes hirsuta*, *Penicillium canescens*, properties.

**Сведения об авторах:** Савинова Ольга Сергеевна – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (savinova\_os@rambler.ru); Зоров Иван Никитич – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (inzogov@mail.ru); Васина Дарья Владимировна – науч. сотр. лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. биол. наук (d.v.vasina@gmail.com); Синицын Аркадий Пантелеймонович – зав. лабораторией биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, профессор, докт. хим. наук (apsinitsyn@gmail.com); Федорова Татьяна Васильевна – зав. лабораторией молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. техн. наук (fedorova\_tv@mail.ru).