

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

Институт Биохимии им. А.Н. Баха

На правах рукописи

Савинова Ольга Сергеевна

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИНОРНЫХ ИЗОФЕРМЕНТОВ
ЛАККАЗ БАЗИДИОМИЦЕТА *TRAMETES HIRSUTA* 072 В
PENICILLIUM CANESCENS И ИХ СРАВНИТЕЛЬНАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА**

03.01.04. Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор химических наук,
профессор Сеницын А.П.
кандидат биологических наук
Тяжелова Т.В.

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Лакказы и лакказо-подобные медьсодержащие оксидазы.....	14
1.1.1 Строение активного центра и механизм действия лакказ.....	16
1.1.2 Трехмерные структуры лакказ.....	17
1.2 Основные характеристики лакказ.....	18
1.2.1 Окислительно-восстановительный потенциал.....	19
1.2.2 Термо- и рН- зависимость активности лакказ.....	21
1.2.3 Каталитические константы.....	22
1.2.4 Гликозилирование.....	24
1.2.5 Субстратная специфичность лакказ.....	25
1.3 Разнообразие лакказ в природе и их физиологические роли... ..	26
1.3.1 Физиологическая роль грибных лакказ.....	27
1.3.2 Мультигенные семейства грибных лакказ.....	29
1.4 Лакказы базидиомицетов рода <i>Trametes</i>	37
1.5 Системы экспрессии гетерологичных белков.....	40
1.5.1 Бактериальные системы экспрессии.....	42
1.5.2 Дрожжевые системы экспрессии.....	43
1.5.3 Грибные системы экспрессии.....	44
1.6 Практическое применение лакказ.....	48
1.7 Анализ рынка коммерческих препаратов лакказ.....	54
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	59
2.1 Реактивы и коммерческие наборы.....	59
2.2 Штаммы микроорганизмов.....	60
2.3 Среды и условия культивирования.....	60
2.3.1 Культивирование <i>T. hirsuta</i> 072.....	60
2.3.2 Культивирование <i>P. canescens</i>	61

2.3.3	Культивирование <i>A. nidulans</i>	62
2.3.4	Другие среды, использованные в работе.....	62
2.4	Создание продуцентов рекомбинантных изоферментов лакказ <i>T. hirsuta</i> 072.....	62
2.4.1	Конструирование плазмиды для трансформации в <i>A. nidulans</i>	62
2.4.2	Конструирование плазмид для трансформации в <i>P. canescens</i>	63
2.4.3	Трансформация <i>E. coli</i>	65
2.4.4	Трансформация <i>P. canescens</i> и <i>A. nidulans</i>	65
2.4.5	Выделение ДНК.....	66
2.4.6	Выделение РНК.....	66
2.4.7	Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени	67
2.5	Определение внеклеточной протеолитической активности.....	68
2.6	Выделение и очистка рекомбинантных изоферментов.....	70
2.6.1	Определение концентрации белка.....	72
2.6.2	Электрофоретическое разделение белков.....	72
2.6.3	Определение активности изоферментов.....	73
2.7	Характеристика рекомбинантных изоферментов.....	74
2.7.1	Оценка окислительно-восстановительного потенциала изоферментов лакказ.....	74
2.7.2	Определение каталитических параметров.....	74
2.7.3	Определение субстратной специфичности изоферментов....	74
2.8	Оценка потенциала изоферментов к деградации красителей...	75
2.9	Программное обеспечение для анализа данных.....	76
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....		77
3.1	Выбор системы для экспрессии минорных рекомбинантных лакказ <i>T. hirsuta</i> 072.....	77

3.2 Создание продуцентов минорных лакказ.....	83
3.2.1 Клонирование генов лакказ и создание плазмидных конструкций.....	83
3.2.2 Трансформация <i>P. canescens</i> , анализ активности и уровня экспрессии целевых белков.....	87
3.3 Оптимизация условий культивирования трансформантов.....	91
3.3.1 Концентрация меди в среде.....	91
3.3.2 Продолжительность культивирования.....	92
3.3.3 pH среды.....	93
3.4 Поиск факторов, лимитирующих продукцию изоферментов лакказ.....	94
3.4.1 Динамика изменения pH в процессе культивирования.....	94
3.4.2 Протеолитическая активность.....	95
3.4.3 Изучение частоты использования кодонов для <i>P. canescens</i>	98
3.5 Выделение и очистка минорных изоферментов лакказ <i>T. hirsuta 072</i>	101
3.6 Спектральный анализ изоферментов	104
3.7 Характеристика рекомбинантных минорных лакказ	106
3.7.1 Молекулярные свойства лакказ	106
3.7.2 Физико-химические свойства изоферментов.....	109
3.7.3 Окислительно-восстановительный потенциал минорных изоферментов.....	116
3.7.4 Каталитические свойства изоферментов.....	118
3.8 Оценка возможностей биотехнологического применения изоферментов лакказ.....	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	129
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	131
БЛАГОДАРНОСТИ.....	150
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	151

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А.к. - аминокислота

АБТС - 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты)

диаммониевая соль

АКП - активность кислых протеаз

АТР - атразин

БСА - бычий сывороточный альбумин

ГБТ - 1-гидроксибензотриазол

ГВ - гваякол

ГП - глюкозо-пептонная среда

ГПХ - гель проникающая хроматография

ГХ - гидрофобная хроматография

ДМФ - 2,6-диметоксифенол

ИОХ - ионообменная хроматография

ИЭТ (pI) - изоэлектрическая точка белка

КЖ - культуральная жидкость

КФБ - калий-фосфатный буфер

ЛМС - лакказа-медиаторная система

М.м. - молекулярная масса

ММ - минимальная среда

ММО - мультимедные оксидазы

ОВП - окислительно-восстановительный потенциал

ОПА - общая протеолитическая активность

ПКХ - пирокатехин

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени

СинК - синаповая кислота

ТХУ - трихлоруксусная кислота

УФ - ультрафиолет

ФК - феруловая кислота

ЦБП - целлюлозно-бумажная промышленность

ЭПР - электронный парамагнитный резонанс

CDS - кодирующая последовательность

K_M - константа Михаэлиса

k_{cat} - константа каталитической эффективности

Лас - лакказа

LB - среда для выращивания *E.coli*

PAGE - электрофорез в полиакриламидном геле

PDB - Protein Data Bank

RQ - относительный уровень экспрессии гена

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Лигноцеллюлоза – один из основных источников возобновляемого органического сырья на Земле – очень устойчива к разложению. Это в первую очередь обусловлено присутствием лигнина – сложного биополимера нерегулярного строения, представляющего собой смесь ароматических моно- и олигомеров. Утилизация отходов лигноцеллюлозной биомассы (соломы, стеблей зерновых, отходов деревопереработки и проч.), большим количеством которых характеризуются целлюлозно-бумажная и сельскохозяйственная отрасли промышленности, на сегодняшний день является актуальной проблемой, поскольку успешная переработка лигноцеллюлозы во многом зависит от модификации (деструкции) лигнина. В настоящее время в основном используются химические методы обработки лигноцеллюлозной биомассы (например, с помощью сульфатного и сульфитного способов в целлюлозно-бумажной промышленности) [1], что наносит значительный урон окружающей среде. Поэтому, в условиях перехода к «зеленым технологиям» биоремедиации актуальным становится поиск методов, альтернативных химическим.

В природных экосистемах основными деструкторами лигноцеллюлозной биомассы являются грибы, причем более 90% разлагаемой лигноцеллюлозы приходится на долю базидиальных макромицетов [2]. Поэтому для изучения механизмов, лежащих в основе биодеструкции лигнина, с целью их последующего применения в различных областях биотехнологии эти объекты являются наиболее перспективными.

Известно, что разложение лигноцеллюлозы реализуется за счет действия уникального комплекса внеклеточных ферментов грибов. Одними из ключевых ферментов этого комплекса являются лакказы [3]. Они признаны идеальными биокатализаторами для «зеленой» биотехнологии [4, 5], поскольку обладают широкой субстратной специфичностью в отношении фенольных соединений и достаточно высокой стабильностью. Кроме того, они способны модифицировать

различные ксенобиотики (например, гербициды, красители и проч.), что также востребовано в различных отраслях биотехнологии. Недостатком некоторых лакказ является их сравнительно низкий окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), однако эта проблема легко решается применением правильно подобранных низкомолекулярных медиаторов [5]. В последнее время прослеживается тенденция востребованности не только лакказ с широкой субстратной специфичностью, но и узкоспецифичных ферментов, способных выборочно модифицировать определенные компоненты сложных смесей [6].

В настоящее время промышленное применение лакказ базидиомицетов ограничено, и их биотехнологический потенциал раскрыт не до конца. Это связано, в первую очередь, с ограниченностью знаний об их физико-химических и каталитических свойствах, а также с отсутствием высокоактивных продуцентов лакказ. Накопленные за последние годы данные по полногеномному секвенированию высших грибов-деструкторов древесины показали, что лакказы кодируются мультигенными семействами, количество членов которых может достигать семнадцати [7]. При этом существенная продукция белка обычно ограничивается небольшим спектром изоферментов. Таким образом, актуальной задачей современной биохимии и молекулярной биологии микроорганизмов является поиск новых изоферментов лакказ и создание их эффективных продуцентов для исследования свойств.

Базидиальные грибы белой гнили рода *Trametes* являются перспективным объектом для изучения. Мультигенные семейства лакказ у них представлены 4-7 генами, однако они характеризуются продукцией одного основного конститутивного изофермента (мажорного) в виде многочисленных изоформ с разной степенью гликозилирования практически во всех условиях культивирования [8–10]. Остальные изоферменты, в основном, представляют собой индуцибельные (минорные) формы, которые значительно отличаются от мажорных по своим биохимическим свойствам [10–14]. В ряде случаев их получение с помощью нативных продуцентов является затруднительным, поскольку далеко не всегда удается подобрать условия культивирования,

оптимальные для их биосинтеза. По этой причине у большинства представителей грибов этого рода только мажорные изоферменты лакказ изучены в достаточной степени.

Гриб *Trametes hirsuta* 072 является эффективным деструктором лигнина. Его мультигенное семейство лакказ представлено семью генами (*lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF* и *lacG*) [15], однако изучен продукт только одного гена (мажорный изофермент LacA) [16–18]. Функции и свойства остальных изоферментов неизвестны из-за невозможности их получения с помощью нативного продуцента. Таким образом, получение и сравнительное изучение свойств этих изоферментов актуально как с фундаментальной, так и с практической точек зрения.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является получение и сравнительное изучение свойств рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* 072.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- выбор подходящей экспрессионной системы для гетерологичной экспрессии минорных изоферментов лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* 072;
- получение штаммов-продуцентов рекомбинантных минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 с помощью методов генетической инженерии;
- выделение и очистка рекомбинантных минорных изоферментов лакказ;
- исследование физико-химических и каталитических свойств минорных рекомбинантных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 и проведение сравнительного анализа свойств минорных изоферментов со свойствами мажорного изофермента LacA;
- исследование потенциала биотехнологического применения минорных изоферментов лакказ для обезвреживания отходов различных отраслей промышленности, содержащих токсичные соединения (на примере красителей).

Научная новизна. В настоящем исследовании впервые с помощью гетерологичной экспрессии в аскомиците *Penicillium canescens* получены три эффективных продуцента рекомбинантных минорных изоферментов лакказ

(rLacC, rLacD и rLacF) базидиомицета *T. hirsuta* 072. Эти рекомбинантные изоферменты впервые выделены, очищены и охарактеризованы. Определены температурные и рН-оптимумы активности минорных изоферментов и их термостабильность, изучены спектральные и каталитические свойства изоферментов, а также их субстратная специфичность. Проведен комплексный сравнительный анализ свойств минорных изоферментов со свойствами мажорного изофермента LacA и выявлены их сходства и отличия. Обнаружено, что минорные изоферменты rLacD и rLacF проявляют бóльшую эффективность при деградации красителей конго красного и фенолового красного в составе лакказы-медиаторных систем (ЛМС), чем мажорный LacA, что делает эти изоферменты потенциально перспективными для применения в биотехнологии.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Теоретическая значимость настоящего исследования заключается во всестороннем изучении свойств трех ранее не охарактеризованных минорных рекомбинантных изоферментов лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* 072 – типичного представителя грибов-лигнолитиков. На сегодняшний день в литературе в основном представлены данные по свойствам мажорных изоферментов лакказ из различных источников. Представители минорных изоферментов охарактеризованы фрагментарно, либо вовсе не изучены из-за сложности их получения. Отсутствие полной характеристики всех членов мультигенных семейств лакказ затрудняет сравнение изоферментов между собой и, следовательно, не позволяет определить их роли в жизнедеятельности грибов.

С практической точки зрения настоящее исследование может послужить базой для создания ферментных препаратов на основе изоферментов лакказ для целевого применения в разных отраслях промышленности. Проведенная в настоящей работе оценка потенциала использования полученных минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 для обезвреживания отходов различных отраслей промышленности, содержащих токсичные соединения (на примере красителей), показала, что применение минорных изоферментов rLacD и rLacF в

составе ЛМС позволяет успешно обесцвечивать красители. Следует отметить, что в случае обесцвечивания конго красного и фенолового красного результаты, полученные с применением rLacD и rLacF, превосходят результат, полученный с применением мажорного изофермента LacA. Кроме того, изофермент rLacD имеет наиболее высокую термостабильность среди изученных представителей данного семейства, что может послужить преимуществом при практическом использовании этого изофермента.

Методология и методы исследования. При проведении исследования были использованы современные биохимические, физико-химические, молекулярно-генетические и микробиологические методы работы с аскомицетами и базидиомицетами. Ряд экспериментов проведен с использованием оригинальных подходов, разработанных в лаборатории, в которой выполнялись исследования. Статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с общепринятыми алгоритмами.

Степень достоверности результатов. Результаты, полученные в настоящем исследовании подтверждены экспериментально. На основании анализа полученных данных сделаны корректные выводы.

Личный вклад диссертанта. Экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, обработку полученных данных, а также оформление и публикацию результатов.

Положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Экспрессионная система на основе аскомицета *P. canescens* является наиболее эффективной для гетерологичной экспрессии минорных изоферментов лакказ базидиомицета *T. hirsuta* 072. С помощью методов генетической инженерии сконструированы плазмиды, несущие последовательности, кодирующие целевые гены лакказ, и созданы эффективные штаммы-продуценты трех рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиомицета *T. hirsuta* 072 (rLacC, rLacD и rLacF).

2. Рекомбинантные минорные изоферменты rLacC, rLacD и rLacF *T.hirsuta* 072 выделены в гомогенном виде в количестве, достаточном для их характеристики. Изучены свойства минорных изоферментов (молекулярные массы, ИЭТ, температурные и рН-зависимости активности, термостабильность, каталитические свойства, субстратная специфичность, ОВП) и проведено сравнение этих свойств с таковыми мажорного изофермента LacA.
3. Минорный изофермент rLacC обладает наиболее низким среди исследованных изоферментов ОВП, проявляет низкую реакционную способность по отношению к ароматическим аминам, обладает наименьшей термостабильностью и наиболее кислой ИЭТ, а также имеет более узкий диапазон оптимальных значений рН и температуры.
4. Минорный изофермент rLacD имеет наибольшую термостабильность и наименее кислую ИЭТ по сравнению с другими изоферментами лакказ *T. hirsuta* 072. Кроме того, rLacD обладает сниженной способностью к окислению феруловой кислоты и не способен окислять *n*-кумаровую кислоту – типичные субстраты для базидиальных лакказ.
5. Минорный rLacF является наиболее близким по своим свойствам к мажорному изоферменту LacA, однако обладает более низким ОВП;
6. Минорные члены лакказного мультигенного семейства проявляют активность при деградации различных красителей, причем изоферменты rLacD и rLacF в составе ЛМС показывают более высокую эффективность деградации красителей конго красного и фенолового красного, чем мажорный LacA, и, в перспективе, могут быть использованы для применения в биотехнологии.

Апробация результатов работы. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов» (Москва, Россия, 2014 г.), «Dead Wood Meeting & Course» (Ламми, Финляндия, 2016 г.), «Биокатализ-2017» (Московская область, Россия, 2017 г.), «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск,

Республика Беларусь, 2017 г.), «Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды» (Чебоксары, Россия, 2018 г.), «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2018 г.), 43-й Международный конгресс Федерации Европейских биохимических обществ – FEBS (Прага, Чехия, 2018 г.), XVIII Международная конференция молодых ученых «Леса Евразии – Сербские Леса» (Белград, Сербия, 2018).

Публикации. По материалам настоящей диссертационной работы опубликовано 4 статьи (в отечественных и зарубежных журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов ВАК РФ) и 9 тезисов докладов на международных и российских конференциях.

Связь с государственными программами. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ «Разработка модифицированных ферментных препаратов для эффективной биodeградации целлюлозосодержащих материалов», уникальный идентификатор проекта RFMEFI61617X0081. Соглашение о субсидии 14.616.21.0081 от 17.07.2017.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лакказы и лакказо-подобные медьсодержащие оксидазы

Лакказы (КФ 1.10.3.2) и лакказо-подобные оксидазы входят в группу мультимедных оксидаз (ММО) - ферментов, содержащих в активном центре атомы меди и катализирующих одноэлектронное окисление субстратов с сопутствующим четырехэлектронным восстановлением молекулярного кислорода до воды [19]. В ходе изучения ММО были предприняты попытки их классифицировать. Более 10000 ММО, доступных в базах данных, условно были разделены на 16 семейств на основе их последовательностей, структуры (по количеству доменов), а также в зависимости от источника и выполняемой функции (таблица 1).

Таблица 1- Классификация ММО [20]

Группа	Семейство
3-доменные ММО	
A	Лакказы базидиомицетов
B	ММО аскомицетов
C	Лакказы насекомых
D	ММО пигментов грибов
E	Грибные ферроксидазы
F	Грибные и растительные аскорбатоксидазы
G	Растительные лакказы
H	Бактериальные белки устойчивости к меди (CopA)
I	Бактериальные билирубиноксидазы
J	Бактериальные лакказы (CueO)
L	Бактериальные ММО
2-доменные ММО	
K	SLAC гомологи типа B (подобные маленьким лакказам <i>Streptomyces coelicolor</i>)
M	ММО архей типа A
N	Бактериальные ММО типа B
O	ММО архей и бактерий типа C
6-доменные ММО	
P	Церулоплазмины

Однако приведенная классификация имеет «размытые» границы между семействами, т.к. для четкого разграничения между «истинными» лакказами, лакказо-подобными белками и остальными ММО необходимы дополнительные исследования. Данных, полученных при биоинформатическом анализе известных аминокислотных последовательностей ММО [19,21,22], недостаточно, поскольку большинство последовательностей в геномных базах данных, аннотированных как лакказы, все еще экспериментально не проверены. Классификация лакказ сильно усложняется тем, что они обнаруживаются у представителей различных царств живой природы и играют разные функциональные роли. Поэтому до сих пор не существует описанного унифицированного паттерна, подходящего для идентификации «истинных» лакказ. Некоторые ученые, ссылаясь на первую лакказу, выделенную из лакового дерева *Rhus vernicifera* в 1883 году [23], высказывают предположение, что только ферменты, выделенные из растительных источников в присутствии природного субстрата урушиола (ненасыщенного алкилкатехина), следует называть лакказами. Другие авторы называют «лакказо-подобными мультимедными оксидазами» все ферменты группы [24]. Однако традиционно для описания типичных лакказ из бизидиомицетов и аскомицетов используется термин «лакказа *sensu stricto*» [25], обозначающий мультимедную оксидазу, имеющую в активном центре четыре атома меди, а также проявляющую некоторую фенолоксидазную активность.

Лакказы являются привлекательными объектами для изучения, поскольку они катализируют окисление различных фенольных соединений и при этом способны к восстановлению кислорода без образования пероксида. Эта способность является большим преимуществом этого фермента, например, по сравнению с гем-содержащими пероксидазами, использующими перекись водорода в качестве акцептора электронов для окисления субстрата [26].

1.1.1 Структура активного центра и механизм действия лакказы

Четыре атома меди, входящие в каталитический центр лакказы, делятся на три группы по спектральным признакам: один ион меди первого типа (Т1), один второго типа (Т2) и два иона меди третьего типа (Т3) (рисунок 1) [27].

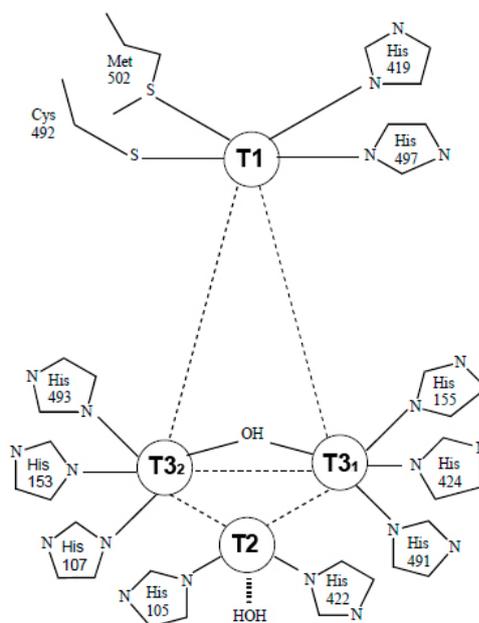


Рисунок 1 - Активный центр лакказы с указанием относительной ориентации медных центров

Медный центр Т1, на котором происходит окисление субстрата, характеризуется сильным сигналом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и интенсивным поглощением в области около 610 нм УФ спектра. Центры Т2 и Т3 близки друг к другу и образуют трехъядерный кластер (один Т2 и два атома меди Т3). После принятия электрона от субстрата на Т1-центре электроны транспортируются по пути, содержащему цистеиновые и гистидиновые остатки, в трехъядерный кластер, который представляет собой сайт восстановления кислорода. Т2-центр невидим на электронных спектрах поглощения, а на спектрах ЭПР характеризуется сверхтонким расщеплением, типичным для ионов меди в тетрагональных комплексах. Т3-центр лакказы – двухъядерный центр, ионы меди которого спарены, в результате чего этот центр является диамагнитным и не детектируется в спектрах ЭПР, но может быть

идентифицирован по наличию плеча в УФ области спектра в районе 330 нм [28,29].

Со стехиометрической точки зрения реакция, катализируемая лакказой, представляет собой четырехэлектронное восстановление кислорода при использовании в качестве донора различных ароматических соединений с образованием соответствующего реакционноспособного радикала и воды в качестве побочного продукта. Т1-центр отвечает за окислительно-восстановительный потенциал фермента и обеспечивает его интенсивную голубую окраску в растворе, за что лакказы часто называют «голубыми» ферментами.

Следует отметить, что в литературе имеются сообщения о существовании так называемых атипичных «желтых» и «белых» лакказ. Сообщается, что структура «желтой» лакказы аналогична структуре «голубой», но характерный пик при 610 нм отсутствует (например, лакказа *T. hirsuta* МТСС-1171) [30–32]. При этом показано, что при твердофазном культивировании гриба *Panus tigrinus* лакказа продуцируется в «жёлтой» форме, а при глубинном - в «голубой» форме [33]. Кроме того, сообщается, что в отличие от «желтых» и «голубых» лакказ, «белые» лакказы содержат только один атом меди, а в активном центре могут присутствовать дополнительные ионы металлов, такие как цинк, железо или марганец [28,34]. Однако из-за отсутствия четкой классификации правомерность отнесения таких ферментов к лакказам остается под вопросом.

1.1.2 Трехмерные структуры лакказ

Первая кристаллографическая структура лакказы, выделенной из базидиомицета *Coprinus cinereus*, была решена в 1998 году, но в ней отсутствовал медный центр типа 2 [35]. В 2002 году были получены трехмерные структуры активных форм лакказ из базидиомицета *Trametes versicolor* [36] и аскомицета *Melanocarpus albomyces* [37] с полным набором медных центров. На сегодняшний день установлено более сотни структур лакказ из различных организмов [38], представленных в базе данных PDB (Protein Data Bank).

Большая часть из них представляет собой лакказы базидиальных грибов, включая *C. cinereus* [35], *Rigidoporus lignosus* [39], *Lentinus* sp. [40], *Cerrena maxima* [41], а также различных видов *Trametes* [16,36,42], *Steccherinum* [43] и др. Большинство из этих структур получено для нативных мажорных лакказ, однако также представлены некоторые структуры рекомбинантных ферментов, например, рекомбинантной лакказы *C. cinereus*, полученной в *Aspergillus oryzae* [PDB: 1A65] [35], лакказы *T. hirsuta*, полученной в *P. canescens* [PDB: 5LDU], а также лакказы базидиомицета PM1, полученной в *Saccharomyces cerevisiae* [PDB: 5ANH] [44].

Молекулы лакказ представляют собой мономеры, состоящие из последовательно соединенных купредоксинподобных доменов, скрученных в глобулу [45]. В природе существуют как двухдоменные, так и трехдоменные лакказы. Первые встречаются только в бактериях, вторые характерны для растений, насекомых, бактерий и грибов [20]. Кроме того, они могут образовывать мультимерные комплексы (рисунок 2).

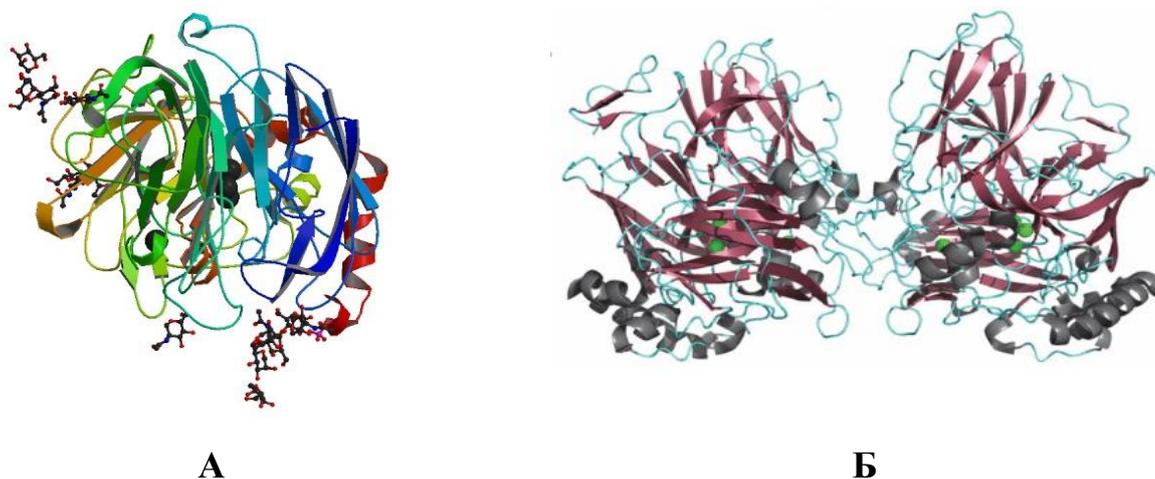


Рисунок 2 – Мономерная лакказа из *T. hirsuta* 072 [16] – А (атомы меди помечены черным цветом); димерная лакказа из *M. albomyces* [37] – Б (атомы меди помечены зеленым цветом).

1.2 Основные характеристики лакказ

В литературе описано большое количество лакказ из различных источников, свойства которых отличаются в той или иной степени. Традиционно

для описания свойств лакказ используют такие характеристики, как ОВП, термо- и рН- оптимумы активности, степень гликозилирования, каталитические константы и субстратная специфичность ферментов.

1.2.1 Окислительно-восстановительный потенциал

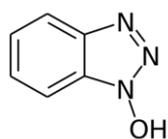
ОВП Т1-медного центра лакказы (E_{T1}) – это одна из наиболее важных характеристик фермента, так как именно он определяет спектр окисляемых субстратов и скорость протекания реакции. Лакказы могут окислять широкий спектр одноэлектронных восстановителей, потенциал ионизации которых не превышает ОВП иона меди Т1-центра лакказы. Согласно литературным данным, диапазон ОВП лакказ различного происхождения колеблется в пределах от 400 до 800 мВ.

По величине ОВП лакказы делят на 3 группы [46]:

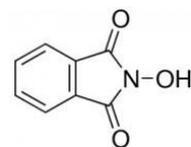
- ❖ низкопотенциальные ($E_{T1} < 450$ мВ),
- ❖ среднепотенциальные ($450 \text{ мВ} < E_{T1} < 720$ мВ),
- ❖ высокопотенциальные ($E_{T1} > 720$ мВ).

К высокопотенциальным относятся лакказы таких грибов, как *T. trogii* [47], *T. hirsuta* [48], *T. villosa* [49], *T. versicolor* [50], *Pleurotus ostreatus* [47] и др. Среднепотенциальные лакказы продуцируются грибами *Rhizoctonia solani* [49], *C. cinereus* [51], *Myceliophthora thermophila* [49]. Растительная лакказа *R. vernicifera* [50] относится к низкопотенциальным.

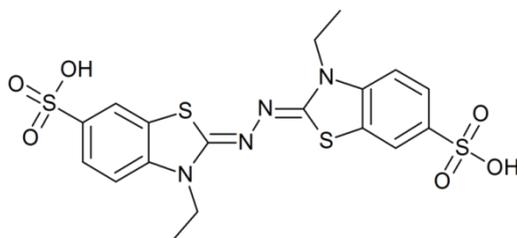
Высокое значение ОВП Т1 центра лакказы позволяет более эффективно катализировать реакцию окисления различных субстратов, окисление которых невозможно для низкопотенциальных лакказ. Однако реакционная способность лакказ может быть расширена путем использования редокс-медиаторов, например, 1-гидроксibenзотриазола (ГБТ), N-гидроксифталимида и 2,2`-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) диаммониевой соли (АБТС) [5] (рисунок 3).



1-гидроксibenзотриазол



N-гидроксифталимид



2,2`-азино-бис-(3-этилтиазолин-6-сульфовая)кислота

Рисунок 3 - Структуры распространенных редокс-медиаторов

Медиаторы представляют собой группу низкомолекулярных органических соединений, которые могут быть окислены лакказой. При этом формируются высоко активные катионные радикалы, способные окислять нефенольные соединения, которые лакказа сама по себе окислять не может (рисунок 4).

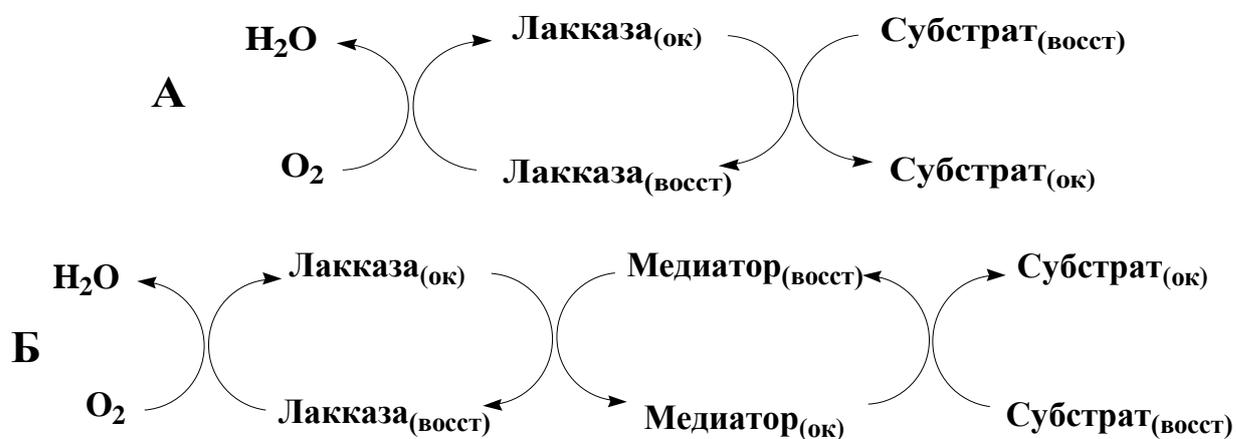


Рисунок 4 - Схема окислительно-восстановительной реакции, катализируемой лакказой в отсутствии (А) и в присутствии (Б) медиатора

Таким образом, в присутствии медиаторов спектр субстратов расширяется, что, в свою очередь, создает возможности для расширения области биотехнологического применения этих ферментов [52].

1.2.2 Термо- и pH- зависимость активности лакказ

Активность ферментов, в том числе лакказ, существенно зависит от температурных условий, в которых проводится ферментативная реакция. Повышение температуры приводит к увеличению активности ферментов, которая затем снижается при дальнейшем повышении температуры вследствие их инактивации. Лакказы также могут инактивироваться при длительном хранении в замороженном состоянии.

Наиболее высокой термостабильностью, как правило, обладают лакказы организмов, обитающих в экстремально высоких температурных условиях (например, лакказа *Caldalkalibacillus thermarum* проявляла наивысшую активность при температуре 70 °С [53], а лакказа *Polyporus* sp. - при 75 °С [54]). При этом размер углеводного фрагмента может существенно влиять на термочувствительность лакказы [55]. Температурный профиль активности является важным критерием при подборе фермента для конкретного технологического процесса, так как обуславливает возможность его эффективного использования.

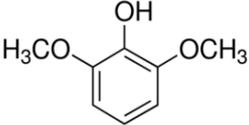
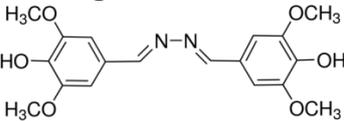
Важной характеристикой лакказы также является диапазон pH, при котором фермент проявляет высокую активность. Высокопотенцильные лакказы (в основном, представленные лакказами базидомицетов) обычно проявляют наибольшую активность по отношению к фенольным субстратам в кислой области pH, тогда как для большинства низкопотенциальных (растительных, бактериальных и лакказ насекомых) pH-оптимум может лежать в нейтральной, или в слабощелочной области [56]. Стоит отметить, что сравнение лакказ между собой в отношении pH-оптимума весьма сложно осуществимо, так как точное определение оптимального pH, например, в щелочной области, может затрудняться неферментативным разложением субстрата. Кроме того, различные исследователи используют разные субстраты при определении pH-оптимумов лакказ, что также затрудняет их сравнение.

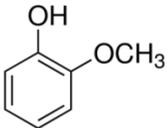
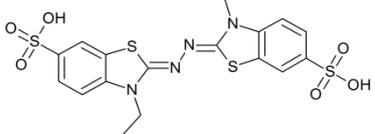
Показано, что значение pH сильно влияет на константу Михаэлиса (K_m) и каталитическую константу (k_{cat}) [27].

1.2.3 Каталитические константы

Каталитические константы K_M и k_{cat} количественно описывают каталитическое действие фермента. Подбирая фермент под конкретный биотехнологический процесс, исследователи, как правило, руководствуются этими характеристиками. Значения этих констант были измерены для большого количества лакказ по различным субстратам, поэтому между ними может наблюдаться довольно большие различия. Данные для некоторых лакказ представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Каталитические константы некоторых лакказ для различных субстратов

Субстрат	Фермент	K_M , мкМ	k_{cat} , с ⁻¹	Ссылка
2,6-ДМФ 	<i>T. trogii</i> POXL3	410	109	[57]
	<i>T. pubescens</i> LAP2	72	24000	[58]
	<i>P. ostreatus</i> POXC	230	430	[34]
	<i>P. ostreatus</i> POXA1	2100	21000	
	<i>P. ostreatus</i> POXA2	740	-	
	<i>P. sajor-caju</i> Lac4	120	58000	[59]
	<i>C. thermophilum</i>	96	-	[60]
	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	26	-	[61]
	<i>Botrytis cinerea</i>	100	-	[62]
<i>M. albomyces</i>	5,2	3400	[63]	
Сирингалдазин 	<i>T. villosa</i> Lcc1	3,9	3000	[64]
	<i>T. pubescens</i> LAP2	6	16800	[58]
	<i>P. ostreatus</i> POXC	20	23000	[34]
	<i>P. ostreatus</i> POXA1	130	28000	
	<i>P. ostreatus</i> POXA2	140	-	
	<i>P. sajor-caju</i> Lac4	280	35000	[59]
	<i>R. solani</i> Lcc4	28	-	[64]

	<i>C. thermophilum</i>	34	-	[60]
	<i>C. cinereus</i> Lcc1	26	180	[65]
	<i>M. thermophila</i>	1,6	2100	[66]
	<i>M. albomyces</i>	1,3	4700	[63]
<p>Гваякол</p> 	<i>T. pubescens</i> LAP2	36	10800	[58]
	<i>T. trogii</i> POXL3	5120	115	[57]
	<i>P. ostreatus</i> POXC	1200	150	[34]
	<i>P. ostreatus</i> POXA2	3100	-	
	<i>P. sajor-caju</i> Lac4	66	6800	[59]
	<i>C. thermophilum</i>	400	-	[60]
	<i>G. graminis</i>	510	-	[61]
	<i>M. albomyces</i>	890	1900	[63]
<p>АБТС</p> 	<i>T. villosa</i> Lcc1	58	2700	[64]
	<i>T. pubescens</i> LAP2	14	41400	[58]
	<i>T. trogii</i> POXL3	30	198	[57]
	<i>P. ostreatus</i> POXA1	90	350000	[34]
	<i>P. ostreatus</i> POXA2	120	-	
	<i>P. ostreatus</i> POXC	280	57000	
	<i>P. sajor-caju</i> Lac4	2500	74000	[59]
	<i>R. solani</i> Lcc4	52	-	[64]
	<i>Chaetomium thermophilum</i>	190	-	[60]
	<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	32	-	[67]
	<i>C. cinereus</i> Lcc1	23	1090	[65]
	<i>Trichophyton rubrum</i>	45	620	[68]
	<i>M. thermophila</i>	290	790	[66]
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	55	-	[69]
	<i>M. albomyces</i>	280	4500	[63]

Из данных таблицы 2 следует, что самые низкие значения каталитических констант были получены при использовании синргалдазина (4-гидрокси-3,5-

диметоксибензальдегида азин), который представляет собой димер двух молекул 2,6-диметоксифенола, связанных азидным мостиком. Либо наличие азидного мостика, либо форма димера, по-видимому, приводит к увеличению аффинности лакказы к этому субстрату. При этом значения K_M , измеренные для мономерного 2,6-диметоксифенола, как правило, выше, чем у сингалдазина. Сравнение значений K_M также показывает, что лакказы из разных организмов имеют разные субстратные предпочтения [51].

Скорость реакций электронного переноса, происходящих внутри фермента после связывания субстрата, описывает k_{cat} [56]. Различия наблюдаются в значениях k_{cat} между разными лакказами по одинаковым субстратам. Константы, приведённые в таблице 2, были измерены при разных значениях pH и температуре с использованием различных концентраций белка. Все эти параметры оказывают большое влияние на результаты. Кроме того, в спектрофотометрических анализах иногда используются различные молярные коэффициенты экстинкции для продуктов окисления, что особенно влияет на численные значения k_{cat} . Поэтому при сравнении каталитических констант, измеренных в разных исследованиях, всегда необходимо учитывать дисперсию в зависимости от условий анализа [70].

1.2.4 Гликозилирование

Большинство используемых в биотехнологии лакказ имеют грибное происхождение. Грибные лакказы представляют собой внеклеточные мономерные глобулярные гликопротеины с молекулярной массой (М.м.) ~60-70 кДа. Они обычно гликозилированы, и степень их гликозилирования, как правило, составляет от 10 до 25% (в нескольких случаях выше 30%) [71]. Существуют и исключения, например, лакказа из *Fomes sclerodermeus* содержит 3% углеводов [72], а лакказа из *Botrytis cinerea* - 91% [73]. В аминокислотной последовательности грибных лакказ обычно присутствует от 3 до 8 сайтов N-гликозилирования. Степень гликозилирования является важным физико-химическим свойством лакказы. Показано, что углеводный фрагмент играет

роль в стабилизации медных центров [74], а также защищает лакказу от влияния внешних факторов. Так, при его удалении у лакказы *T. versicolor* фермент имел меньшую термостабильность, а также быстро инактивировался протеазами разного типа [55]. Однако также показано, что гипергликозилирование лакказы может затруднять доступ субстрата к активному центру фермента [40].

1.2.5 Субстратная специфичность лакказ

Разные лакказы способны окислять химически разнообразные группы субстратов [2,24]. Классическими субстратами грибных лакказ являются различные фенолы и ароматические амины – производные лигнина, который представляет собой сложное полимерное соединение, состоящее из смеси ароматических полимеров родственного строения. В зависимости от преобладания того или иного звена лигнины условно подразделяют на гваяцильные, сиригильные или *n*-оксифенильные. Преобладание того или иного мономерного звена зависит от возраста и типа древесины [75]. Так, например, у хвойных преобладают гваяцильные звенья, лигнины лиственных растений являются смешанными гваяцил-сиригильными в различном соотношении. Поэтому различные виды грибов, произрастая на разных видах древесины, могут иметь разный ансамбль лигнолитических ферментов, отличающихся по своим свойствам.

Активность лакказы может быть определена по многочисленным субстратам, для которых лакказа имеет высокое сродство, например, сиригалдазин и др. Большинство грибных лакказ окисляют ароматические соединения со свободным фенольным гидроксильной группой типа катехина, сиригола, гидрохинона и их производных (например, синапового спирта, феруловой, синаповой кислот), *o*- и *n*-аминофенолов, ароматических *o*- и *n*-диаминов. Ортозамещенные соединения (например, гваякол, кофеиновая кислота, галловая кислота, дигидроксифенилаланин, пирогаллол, *o*-фенилендиамин), как правило, являются более подходящими лакказными субстратами, чем паразамещенные соединения.

Субстратная специфичность бактериальных лакказ существенно отличается от грибных. Например, CueO *E. coli* не окисляет типичные для грибных лакказ субстраты гваякол и сиригальдазин [76]. В работе [24] было показано, что грибные лакказы из *T. versicolor* и *A. bisporus*, а также бактериальные лакказы из *Bacillus sp.*, окисляли 77, 62 и 56% субстратов, использованных в исследовании. Очень узкая субстратная специфичность была обнаружена у некоторых бактериальных лакказо-подобных ферментов *Streptomyces pristinaespiralis*, *Gramella forsetii*, *Marivirga tractuosa* и др. Это позволило предположить, что все они входят в отдельный подкласс лакказо-подобных ферментов.

Широкая субстратная специфичность до недавнего времени являлась одним из основных преимуществ лакказ, так как способность преобразовывать большой спектр нежелательных соединений может существенно удешевить процесс биоремедиации и открывает большие возможности для их применения. Однако в некоторых процессах, например, для удаления нежелательных компонентов из сложных смесей, важно избирательное действие ферментов. Например, при осветлении и стабилизации вина, где требуется избирательное удаление определенных фенольных соединений, более узкоспецифичные ферменты могут иметь большие перспективы [6].

Таким образом, все вышеописанные свойства лакказ обеспечивают потенциал их применимости в различных отраслях биотехнологии. При этом свойства и субстратная специфичность лакказ, по всей видимости, в первую очередь зависят от происхождения фермента и от природы используемого субстрата.

1.3 Разнообразие лакказ в природе и их физиологические роли

Лакказы найдены в различных живых организмах: бактериях, лишайниках, растениях, грибах, насекомых [77], у некоторых зеленых водорослей [78] и беспозвоночных [79]. За всю историю изучения лакказ большое количество исследований было проведено с целью выяснения роли, которую эти ферменты

могут играть в жизнедеятельности организмов [80]. Оказалось, что в растениях лакказы участвуют в процессах гомеостаза цитокинина, полимеризации флавоноидов семенного покрова и образовании нерастворимых полимеров, играющих защитную роль, а также способствуют лигнификации растительных тканей [81–83]. Бактериальные лакказы, например, из *Bacillus* и *Pseudomonas* [84,85], играют важную роль в детоксикации и образовании пигментов, которые защищают споры от таких внешних факторов, как УФ-излучение [86–89]. У лишайников из различных таксономических групп лакказы принимают участие в метаболизме уникальных вторичных соединений – лишайниковых кислот [90]. Важное значение для отверждения кутикулы и пигментации у многих насекомых, таких как *Riptortus pedestris*, *Nysius plebeius* и *Megacopta punctatissima*, имеет окисление кутикулярных катехинов при помощи лакказ [91]. Лакказы насекомых также принимают непосредственное участие в деградации вторичных фенольных соединений и иммунной защите [92,93]. Недавние исследования показали наличие лакказ у морских беспозвоночных, у которых они, по-видимому, также принимают участие в антибактериальной иммунной защите [79]. Поскольку в грибах лакказы представлены наиболее широко по сравнению с другими царствами [94,95], на них следует остановиться более подробно.

1.3.1 Физиологическая роль грибных лакказ

Для низших грибов таких классов, как зигомицеты и хитридиомицеты, лакказы не характерны, однако они обнаружены у различных аскомицетов, таких как *Gaeumannomyces graminis* [61], *Magnaporthe grisea* [96], *M. albomyces* [97], *Neurospora crassa* [98], а также родов *Trichoderma* [99,100] и *Botrytis* [81].

Многие аскомицеты являются распространенными фитопатогенами с широким диапазоном хозяев. Они заражают плоды, цветы и другие ткани, по меньшей мере, 235 видов растений, и выделяют лакказу, которая, вероятно, действует как детоксифицирующий фермент против защитных растительных фенольных соединений [81]. Из-за его полимеризационной активности

детоксикация низкомолекулярных фенольных соединений является еще одной вероятной ролью лакказ почвенных микроорганизмов.

Дейтеромицеты, например, *Myrothecium verrucaria* [101], также являются продуцентами лакказ. Но, все же, центральное место в разнообразии продуцентов лакказ занимают представители базидиомицетов.

Исторически считается, что основная роль базидиальных лакказ заключается в деградации лигнина (делигнификации) и утилизации этого биополимера. При этом большинство изученных грибных лакказ - это секретлируемые ферменты [83], способные проявлять свою активность не только в лигнинсодержащих субстратах, но также в водных средах и почве. Кроме того, базидиальные лакказы участвуют в различных физиологических процессах: в образовании пигментов (меланина у *Lentinula edodes* [102]), синтезе циннабарина (у грибов рода *Pycnoporus* [103]), детоксикации, образовании спор и формировании плодовых тел [2,28,104–107].

В наибольшей степени изучены лакказы базидиомицетов, вызывающих белую гниль [108], таких как *Phlebia radiata* [109], *P. ostreatus* [110], *T. versicolour* [111], *T. hirsuta* [17], *Ganoderma lucidum* [112] и др., причем, сообщается, что практически все виды грибов белой гнили в той или иной степени способны продуцировать лакказу [113]. Помимо вышеописанного спектра физиологических функций, лакказы грибов белой гнили (например, рода *Trametes*), по всей видимости, могут продуцироваться в качестве защиты от микроорганизмов окружающей среды. В работе [114] было исследовано влияние взаимодействий между грибами белой гнили и другими микроорганизмами на активность лакказы *T. versicolor*. Авторы показали, что активность лакказы увеличивалась при совместном культивировании *T. versicolor* с почвенными грибами, бактериями и дрожжами. При этом добавление гифомицетов (микопаразитов) *T. harzianum* к культуре *T. versicolor* увеличивало активность лакказы более чем в 40 раз, а добавление других почвенных грибов или бактерий приводило к 2-25 кратному увеличению активности. Впоследствии

этот результат подтвердился на 16 из 24 изученных видов грибов белой гнили (в т.ч. *T. hirsuta*).

Из вышесказанного можно сделать вывод, что грибные лакказы представляют собой ферменты с широким спектром физиологических функций, что может быть обоснованием наличия у грибов комплекса лакказ с различным физиологическим назначением. Так, в процессе выделения и исследования различных белков выяснилось, что грибы способны продуцировать различные изоферменты лакказ в зависимости от вида, стадии развития и условий окружающей среды. Еще в 1987 году Zouary и соавторы [73] показали, что штаммы аскомицета *B. cinerea* продуцируют лакказу в виде изоферментов. В работе [115] было показано, что во время роста *P. ostreatus* секретировал 4 разных изофермента лакказы. Другие виды грибов, такие как *Marasmius quercophilus*, *T. villosa*, *Coprinopsis cinerea*, *Polyporus brumalis* и *P. corticatus*, также секретировали более одного изофермента лакказы, причем свойства различных изоферментов значительно отличались [2,73]. Наличие разнообразия изоферментов лакказ также было идентифицировано на уровне геномов.

1.3.2 Мультигенные семейства грибных лакказ

Термин «мультигенные семейства» широко используется для описания групп генов из одного организма, высокоомологичных по своим нуклеотидным последовательностям. В последнее время было проведено большое количество полногеномных исследований различных грибов. Они показали, что лакказы, в том числе базидиальные, кодируются мультигенными семействами. Причем у базидиомицетов мультигенные семейства лакказ представлены бóльшим количеством генов, чем у аскомицетов [116–119].

В работе [120] были исследованы 13 различных видов базидиомицетов, большинство из которых являются типичными грибами-лигнолитиками, и для всех исследованных видов было подтверждено наличие мультигенных семейств лакказ. При аннотации генома базидиомицета *C. cinereus* было показано наличие 17 генов лакказ (GenBank *lcc1–lcc17* accession numbers: BK004111–BK004127),

сгруппированных (кластеризованных) в 7 локусах генома [7], причем 9 из них производили белковые продукты (изоферменты). Также была показана экспрессия пяти различных лакказных генов в течение жизненных циклов грибов *T. sanguineus* и *T. villosa* [11,121,122]. Для *P. ostreatus* было обнаружено 12 генов лакказ (*lacc1-12*) [123].

Исследования изоферментов лакказ показывают, что они могут существенно отличаться по своим свойствам (субстратной специфичности, ОВП, рН- и температурному оптимуму, термостабильности и др.). Данные, приведённые в таблице 3 демонстрируют сходства и различия некоторых свойств изученных изоферментов лакказ из различных базидиомицетов.

Таблица 3. Свойства охарактеризованных изоферментов различных базидиомицетов. Активности измеряли по субстратам: ^a-АБТС, ^b-ПКХ, ^c-ДМФ, ^d-ГВ, ^e-о-Тл, ^f-СГЛ; N-нативный фермент, R- рекомбинантный.

Штамм	Лакказа	Про-исхож-дение	Мм, лДа	<i>pI</i>	Топт, °С	pНопт	Термостабильность ($\tau_{1/2}$), min	K_m , μ M	Ссылка
<i>Grifola frondosa</i> AM-1	Lac1	N	71	<3.5	-	2 ^{a,c} ; 3 ^{b,d}	-	13,7 ^a ; 2510 ^b ; 608 ^c ; 531 ^d ;	[124]
	Lac2	R	93	-	-	2 ^a ; 3 ^c ; 4 ^d	-	20,3 ^a ; 410 ^c ; 1330 ^d	[125]
	Lac3	R	96	-	-	2 ^a ; 4 ^c ; 4 ^d	-	117 ^a ; 3180 ^c ; 1700 ^d	
<i>Coprinus cinereus</i>	wt-CcL	N	63	3,7-4	-	4 ^a ; 6-7 ^f	-	-	[65]
	r-CcL	R	66	3,5	-	4 ^a ; 6-7 ^f	-	-	
	CcLCC5I	R	56,8	-	55 ^a	3 ^a	14 ^a (75 °C)	86 ^a ; 17600 ^d	[126]
	CcLCC6	R	57.4	-	40 ^a	3 ^a	8 ^a (80 °C)	149 ^a ; 1520 ^c	[127]
<i>Phlebia radiata</i> 79 (ATCC 64658)	Pr-Lac1	N	58	3.2–3.5		-	-	-	[128,129]
<i>Pleurotus ostreatus</i> HAUCC 162	rLACC6	R	64	-	60 ^a	2,5 ^a	30 ^a (60 °C)	459 ^a ; 238 ^c ; 4586 ^d	[123]
	rLACC9	R	75	-	40 ^a	3,5 ^a	30 ^a (60 °C)	413 ^a ; 722 ^c ; 19405 ^d	
	rLACC10	R	64	-	40 ^a	4 ^a	30 ^a (60 °C)	43 ^a ; 219 ^c ;	
<i>Pleurotus nebrodensis</i> ACCC 50867	Lac1	N	68	-	50-60	3 ^a	35 ^a (60 °C)	160 ^a	[130]
	Lac2	N	64	-	60	3 ^a	115 ^a (60 °C)	550 ^a	
	Lac3	N	51	-	50-60	3 ^a	11 ^a (60 °C)	104 ^a	
<i>Pycnoporus (Trametes) sanguineus</i> CS43	LacI	N	68	4,7	70 ^a	2,5 ^a ; 3,5 ^c ; 4,0 ^d	1080 ^a (60 °C)	6,9 ^a ; 89,2 ^c ; 1484,5 ^d	[121]
	LacII	N	66	4,6	60 ^a	2,0 ^a ; 3,0 ^c ; 4,0 ^d	135 ^a (60 °C)	12,2 ^a ; 191,6 ^c ; 1100,8 ^d	
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CeIBMD001	Lcc	N	68	7.0-7.08	-	-	137 ^a (60 °C)	238.55 ^a ; 693,08 ^d	[131]

Штамм	Лакказа	Происхождение	Мм, кДа	<i>pI</i>	Топт, °С	pНопт	Термостабильность ($\tau_{1/2}$), min	K_M , μM	ссылка
<i>Trametes sanguinea</i> M85-2	-	N	62	3,5	60 ^c	5,0 ^c	-	-	[132]
<i>Pycnoporus coccineus</i> IFO-4923	Lcc	N	70	3,5	-	-	-	-	[133]
<i>Pycnoporus coccineus</i> BRFM 938	-	N	61,8	-	65 ^a	4,5-5,0 ^a ;	200 ^a (65 °С)	26 ^a	[134]
<i>Pycnoporus sanguineus</i> BRFM 902	-	N	62,9	-	65 ^a	4,5-5,0 ^a ;	160 ^a (65 °С)	32 ^a	
<i>Pycnoporus sanguineus</i> BRFM 66	-	N	59,5	-	71 ^a	4,5 ^a	200 ^a (65 °С)	33 ^a	
<i>Polyporus brumalis</i> ibrc05015	PbLac1	N	63,4	-	40 ^a	4,0 ^a	-	20 ^a ; 70 ^c ; 10700 ^d	[135,136]
<i>Polyporus brumalis</i> KFRI20912	-	N	70	-	20 ^e	4,0 ^e	-	685 ^e	[137]
<i>Trametes</i> sp. AH28-2	LacA	N	62	4,2	50 ^d	4,5 ^d	27 ^d (75 °С)	25 ^a ; 25,5 ^c ; 420 ^d	[138]
	LacB	N	74	4	45 ^d	4,7 ^d	14 ^d (60 °С)	177 ^a ; 109,8 ^c ; 1249 ^d	[13]
	LacC	N	64	6,6	55 ^d	5,0 ^d	50 ^d (60 °С)	50 ^a ; 56 ^c ; 1138 ^d	[139]
<i>Trametes</i> (<i>Pycnoporus</i>) <i>cinnabarina</i> ATCC 200478	LCC3-1	N	76,5	3,7	-	4,0 ^d	60 ^d (70 °С)	-	[12,140]
	LCC3-2	N	-	5,4	-	-	-	-	[12]
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> strain ss3.	Lac I	N	70	3,7	-	4,0 ^f	-	55 ^a	[141]
	Lac I	R	70	3,7	63 ^a	2,5 ^a ; 4,0 ^f	100 ^a (65 °С)	55 ^a	[69]
	Lac II	N	86	-	-	-	-	-	[141]

Штамм	Лакказа	Происхождение	Мм, кДа	pI	T _{опт} , °C	pН _{опт}	Термостабильность (τ _{1/2}), min	K _M , μM	ссылка
<i>Trametes pubescens</i> MB 89	Lap2	N	65	2,6	50-60 ^a	<3,0 ^a ; 3,0-4,5 ^b	90 ^a (60 °C)	14 ^a ; 470 ^b ; 72 ^c ; 360 ^d	[58]
<i>Trametes trogii</i> BAFC 463	Lacc1	N	38	-	50 ^a	3,4 ^a	-	-	[142]
	Lacc2	N	60	-	50 ^a	3,4 ^a	-	-	
	Lacc3	R	85-90	-	50 ^a	3,5 ^a ; 4,0 ^c	45 ^a (70°C)	250 ^a ; 2095 ^c	[143]
Basidiomycete PM1	Lac1	N	64	3,6	-	4,5 ^d	-	500 ^d	[144,145]
<i>Trametes trogii</i> B6J	LacI	N	62	4,3	-	2,5 ^a ; 3,0 ^c	-	50 ^a	[145]
	LacII	N	62	4,5	-	2,5 ^a ; 3,0 ^c	-	33 ^a	
<i>Trametes trogii</i> 201	Lcc1 (POXL3)	N	60	3,3	-	2,5 ^a ; 3,5 ^c	-	8,3 ^a ; 195 ^c ; 3073 ^d	[47]
	Lcc1	R	64	-	-	2,5 ^a ; 3,5 ^c	-	9,2 ^a ; 529 ^c ; 4177 ^d	[146]
<i>Trametes vesicolor</i> ATCC 32745	LacIIIb	N	47	-	-	3,6 ^c	-	50 ^a ; 275 ^c	[147]
	LacIIIb	R	52	2,75-3,23	-	3,5-4,0 ^c	-	26 ^a ; 235 ^c	
<i>Trametes vesicolor</i> UAMH 8272	Lac1	R	-	3,0-4,0	-	-	-	-	[148]
	Lac4	R	-	3,6	-	-	-	-	
<i>Trametes versicolor</i> 951022	-	N	97	-	50 ^a	3,0-4,0 ^a	45 ^a (60 °C)	12,8 ^a	[149]

Штамм	Лакказа	Происхождение	Мм, кДа	<i>pI</i>	Топт, °С	pНопт	Термостабильность ($\tau_{1/2}$), min	K_M , μM	ссылка
<i>Trametes versicolor</i> 3086	Lcc α	R	72	4,64-6,76	75 ^a	1,9 ^a	-	22 ^a	[14,150]
	Lcc β	R	72	3,07-3,27	80 ^a	2,3 ^a	-	88 ^a	
	Lcc γ	R	72	4,2	60 ^a	3,1 ^a	-	359 ^a	
	Lac δ	R	72	4,2	45 ^a	3,1 ^a	-	2262 ^a	
<i>Trametes villosa</i> CBS 678.70	LAC1	N	60-70	3,5	-	2,7 ^a ; 5,0-5,5 ^f	-	-	[11,122]
	LAC2	N	60-70	5-6,8	-	6 ^a ; 5,0-5,5 ^f	-	-	
	LAC3	N	60-70	6,2-6,8	-	6 ^a ; 5,0-5,5 ^f	-	-	
<i>Trametes</i> sp. 420	LacE	N	62,8	4,6	50 ^d	2,7 ^a ; 4,3 ^d	78 ^a (60 °С)	35 ^a ; 41 ^c ; 254 ^d ; 5 ^f	[151]
	lacDx	R	77	-	45 ^d	6,0 ^d	2 ^d (60 °С)	427 ^a	[152], [153]
	lacDe	R	78	-	45 ^d	6,0 ^d	2 ^d (60 °С)	604 ^a	[153]
<i>Trametes</i> sp. C30 (ранее идентиф. как <i>Marasmius quercophilus</i>)	Lac1	N	63	3,6	75 ^f	4,5-5,0	-	2,9 ^a ; 71 ^d ; 0,9 ^f	[154,155]
	Lac2	N	65	3,2	55 ^f	5,5-6,0 ^f	-	536 ^a ; 1006 ^d ; 6,8 ^f	[155]
	Lac3	R	75	-	55 ^f	5,5-6,0 ^f	-	280 ^a ; 1600 ^d ; 14 ^f	[156]
<i>Trametes ochracea</i> 92-78	-	N	64	4,7	-	3,7-4,9 ^b	-	110 ^b ; 90 ^d	[48]

Штамм	Лакказа	Происхождение	Мм, kDa	<i>pI</i>	T _{opt} , °C	pH _{opt}	Термостабильность (τ _{1/2}), min	K _м , μM	ссылка
<i>Coriolus hirsutus</i> P04	-	N	73	7,4	45 ^a	2,5 ^a ; 4,0 ^c	-	56,7 ^a ; 39,9 ^b ; 53 ^c ; 10,9 ^d	[157]
<i>Trametes hirsuta</i> Ig-9	-	N	90	4,3	85 ^c	2,4 ^a ; 2,5 ^c	-	70 ^a ; 200 ^c	[158]
<i>Trametes hirsuta</i> Bm2	LacI	N	65	6,4	45-60 ^a	4,5 ^a	-	0,49 ^a	[159]
	LacII	N	65	6,9	40-60 ^a	4,5 ^a	-	0,53 ^a	
	LacIII	N	65	6,6	40 ^a	4,5 ^a	-	0,41 ^a	

По мнению исследователей именно различия в свойствах лакказ объясняют разнообразие их физиологических функций и, как следствие, их широкое распространение в природе. Количество генов, кодирующих изоферменты лакказ, у разных источников варьируется, и тот факт, что, как правило, не все изоферменты детектируются в ростовой среде, повышает интерес ученых к изучению экспрессии лакказных изоферментов. Показано, что для различных лакказ характерна дифференциальная экспрессия генов при культивировании в различных условиях. Например, для гриба *Ph. radiata* на начальных этапах культивирования основным экспрессируемым изоферментом являлся ген *lac1*, в то время как на более поздних этапах (13 сутки) в основном отмечалась экспрессия гена *lac2* [129]. Из этого следует, что в соответствующих условиях экспрессия генов лакказ может быть усилена. Так, достоверно показано, что экспрессия генов лакказ регулируется ионами металлов, в частности меди. Поскольку лакказа в активном центре содержит четыре катиона меди, они были использованы для регулирования транскрипции генов лакказ у грибов, в т.ч. родов *Trametes*, *Pleurotus* и др. Во многих исследованиях были отмечены различия в транскрипционном ответе на присутствие меди, которые проявляют разные гены лакказ в пределах одного вида или семейств генов [10,160]. Было также отмечено, что добавление целлобиозы может вызывать увеличение активности лакказы у некоторых видов *Trametes*. Кроме того, лакказы таких базидиомицетов, как *Fomes annosus*, *Pholiota mutabilis*, *P. ostreatus* и *T. versicolor*, стимулировались добавлением ксилитина [94]. Лакказу (LacB) *Trametes* sp. АН28-2 удалось получить при культивировании с 3,5-дигидрокситолуолом в качестве индуктора [13], другая лакказа (LacC) этого гриба была получена при сокультивировании с культурой *Trichoderma* sp. ZH1 [139]. Также Lac2 *Trametes* sp. С30 (*Marasmius quercophilus*) была получена на среде, содержащей *n*-гидроксибензойную кислоту в качестве индуктора [155].

Подчеркнём, что не всегда удается подобрать такие условия, которые позволяют получить интересующие изоферменты в достаточных для изучения

количествах, поэтому большинство из них не могут быть выделены из природных источников [147,154,161].

1.4 Лакказы базидиомицетов рода *Trametes*

Значительное разнообразие генов лакказ внутри семейства было показано в ходе проведения филогенетического анализа лакказ из грибов рода *Trametes* [10]. Лакказы условно были разделены на 4 функциональных кластера (А, В, С и D). На данный момент исследователям частично удалось охарактеризовать некоторые изоферменты, входящие в эти кластеры, однако данные о свойствах различных изоферментов, секретлируемым одним штаммом, очень ограничены [13,14,17,122,162]. Согласно анализу литературы, наибольшее количество охарактеризованных лакказ базидиомицетов рода *Trametes* относится к кластерам А и В. Это связано с трудностями при получении нативных изоферментов, относящихся к другим кластерам. Было показано, что к кластеру А, в основном, относятся мажорные формы ферментов, которые хорошо продуцируются в стандартных условиях. Такие изоферменты индуцируются катионами меди – одним из наиболее изученных индукторов биосинтеза лакказ, и их довольно легко получить из культуральной жидкости гриба в количестве, достаточном для их характеристики. Поэтому в настоящее время наиболее тщательно изучены именно мажорные формы лакказ. Для лакказ других кластеров имеются лишь отрывочные данные (таблица 4) [10].

Лакказы из кластера А, как правило, характеризуются наличием множественных изоформ со значениями изоэлектрической точки в диапазоне от 2,0 до 4,0. Лакказы из кластера В характеризуются меньшей молекулярной массой и более низкими K_M (для АБТС) по сравнению с лакказами из кластера А. Значения pI для этих ферментов сдвинуто в сторону щелочной области.

Таблица 4 – Основные характеристики лакказ базидиомицетов рода *Trametes* по кластерам

Клас-тер	М.м., кДа	pI	Степень гликозилирования, %	Кол-во сайтов гликозилирования	K _M , мкМ (АБТС)	pH _{опт.} (АБТС)
А	60-70	2,0 - 4,0	10-15	4 - 8	11-88	2,0-4,5
В	58-66	4,5-7,0	10	6-8	<12-20	1,9-2,7
С	65-85	3,2-4,0	25-30	6-13	177-536	5,7
Д	63	6,2-6,8	-	-	-	6,0

Частично охарактеризованы некоторые лакказы кластера С грибов *T. versicolor*, *Trametes sp.* С30, *Trametes sp.* АН28-2, *T. villosa* [11,14,122,155,156,162]. Они имеют более высокие молекулярные массы по сравнению с ферментами из кластеров А и В, а также большее количество потенциальных сайтов гликозилирования и содержание углеводов. Для кластера С не показано образование множественных изоформ в отличие от остальных кластеров. Лакказы кластера С проявляют значительно более низкое сродство к субстрату АБТС по сравнению с лакказами кластеров А и В, а оптимальное значение pH для субстрата АБТС сдвинуто в щелочную область; у лакказ кластера С увеличена степень гликозилирования. Предполагается, что это может быть связано с продукцией данного изофермента на тех стадиях деградации лигнина, когда происходит повышенная выработка протеолитических ферментов. В этих условиях высоко гликозилированные лакказы более устойчивы к протеолизу [163,164]. Для кластера Д на сегодняшний день частично охарактеризована только одна лакказа, входящая в этот кластер. Показано, что фермент имеет несколько изоформ с разными величинами pI, находящимися ближе к щелочной области. Оптимальное значение pH активности относительно субстрата АБТС также смещено в сторону щелочной области [122].

Известно, что грибы *T. hirsuta* потенциально могут производить широкий спектр изоферментов лакказ, включая изоферменты с высоким ОВП. Для *T. hirsuta* 072, например, было показано, что мультигенное семейство лакказ состоит из 7 генов (*lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF* и *lacG*)[15], однако в культуральной среде были обнаружены только белковые продукты генов *lacA* и *lacC*. Причем LacA продуцировался при любых условиях культивирования, а LacC появлялся в небольших количествах только на поздних стадиях культивирования (через 10 дней на синтетических средах и 20 дней на соломе) [10].

Сравнение аминокислотных последовательностей лакказ *T. hirsuta* 072 с последовательностями лакказ различных грибов рода *Trametes* показало, что, по крайней мере, аминокислотные последовательности LacA, LacB, LacC, LacD и LacE имеют более высокое сходство с белковыми последовательностями других лакказ базидиомицетов из рода *Trametes*, нежели между собой. При этом белок LacA был самым близким к лакказам *T. maxima* (PDB ID: 3DIV) и *T. versicolor* (PDB ID: 1KYA) с идентичностью 95 и 89% соответственно. LacB, LacC, LacD и LacE имели наивысшую идентичность 86, 81, 77 и 76% при сравнении с лакказой *T. versicolor* (PDB ID: 1GYC), лакказой В *Trametes sp.* AH28-2 (AAW31597), Lac7 *T. versicolor* FP-101664 SS1 (EIW58136) и лакказой *Trametes sp.* I-62 (AAQ12268) соответственно. Согласно [10], LacA *T. hirsuta* 072 была отнесена к кластеру А, LacB - к кластеру В, LacC - к кластеру С, LacD - к кластеру D. Изоферменты LacF, LacG и LacE не были отнесены ни к одному из кластеров.

Лакказы, принадлежащие к разным кластерам, могут иметь различные физико-химические и каталитические свойства, однако ограниченность знаний о них затрудняет их классификацию. Изучение биохимических свойств различных изоферментов для понимания их функций и перспектив применения в битехнологии является важной задачей современных исследователей. Однако процесс получения белков из нативных источников в количествах, достаточных для их характеристики, осложняется из-за низкого уровня их экспрессии (особенно это касается минорных изоферментов).

Таким образом, переход к другим экспрессионным системам является неизбежным шагом на пути к полной характеристике мультиферментного лакказного комплекса базидиомицетов.

1.5 Системы экспрессии гетерологичных белков

При выборе экспрессионной системы для получения эффективного продуцента целевого белка перед исследователями обычно стоит 3 основные задачи:

- получение целевого белка в необходимом количестве;
- получение целевого белка в активной форме;
- снижение экономических затрат на получение целевого белка (при условии перехода к промышленному производству).

На протяжении многих лет ученые пытаются решить эти проблемы, используя как гомологичные, так и гетерологичные системы экспрессии, в том числе лакказ. В некоторых случаях гетерологичная экспрессия является единственно возможным способом получения целевых ферментов в достаточном количестве. Как правило, для этого используются штаммы, безопасные с экологической точки зрения и способные производить большие количества белка. Однако гетерологичная экспрессия часто ограничивается различиями в экспрессионных системах нативного организма и организма-реципиента.

В настоящее время не существует единого алгоритма получения рекомбинантного функционально активного белка в больших количествах. Имеются только общие рекомендации по выбору экспрессионной системы в зависимости от размеров, структуры белка, его свойств и наличия у него посттрансляционных модификаций. Общей практикой является эмпирический подбор экспрессионной системы для каждого конкретного белка, когда пробуются все имеющиеся в распоряжении исследователя экспрессионные системы. Уровень экспрессии чужеродного гена также зависит от конструкции экспрессионного вектора. Помимо этого, проблемы могут возникать из-за

различий в частоте использования кодонов у нативного продуцента и реципиента [66,165,166]. Для лучшей экспрессии гена на уровне трансляции мРНК желательно приблизить набор кодонов к типичному для клетки-хозяина. Обычно для этого посредством направленных точечных мутаций заменяют «редкие» кодоны на синонимичные «частые», что не сказывается на первичной структуре белка. В результате экспрессия гена в различных системах может быть существенно усилена. Иногда в структурной части генов могут присутствовать какие-либо нежелательные сигнальные последовательности, например, узнаваемые на уровне мРНК ферментами сплайсинга или деградации в случае эукариотической экспрессии, или терминаторы транскрипции для прокариотической экспрессии, сигналы, узнаваемые ферментами модификации на уровне белка. Наличие таких скрытых («криптических») сигналов ведет к резкому снижению экспрессии гена в клетке-хозяине, поэтому их обычно удаляют также путем точечных замен оснований.

Экспериментальные данные показывают, что значительное количество экспрессируемого белка может теряться в процессе секреторного пути из-за неправильного сворачивания белка (например, при недостатке шаперонов) или различий в посттрансляционных модификациях белка (таких как формирование дисульфидных связей или гликозилирование), что приводит к разрушению белка клеточной системой контроля качества [167,168]. Генетические, транскриптомные и протеомные исследования этих механизмов выявили несколько генов и регуляторных схем, активных в этом процессе [169,170]. Это послужило причиной проведения исследования по совместной экспрессии генов целевых белков с генами, кодирующими фолдазы и шапероны, которые потенциально могут увеличить выход целевого белка [171]. Однако в разных работах результаты варьировались от полного отсутствия эффекта до увеличения продукции целевого белка в несколько раз [172,173]. Количество подобных работ небольшое, поэтому сложно сделать достоверные выводы, но предполагается, что улучшение выхода гетерологичных белков грибного происхождения таким способом имеет хорошие шансы [174].

Различные, преимущественно мажорные изоферменты лакказ, были экспрессированы в дрожжевых системах, в аскомицетах, а также в бактериях. При этом для улучшения уровня экспрессии гетерологичных лакказ был предложен ряд стратегий: использовались различные экспрессионные кассеты, содержащие рекомбинантные гены лакказ под различными промоторами, а также различные регуляторные факторы [63,146,156]. Кроме того, в качестве реципиентов были использованы мутанты с дефицитом протеаз для предотвращения протеолитической деградации целевого белка [175].

1.5.1 Бактериальные системы экспрессии

Самым простым и экономически доступным вариантом является экспрессия в бактериальных системах. Однако в прокариотических организмах невозможны посттрансляционные модификации (образование дисульфидных связей, гликозилирование), характерные для эукариотов. Кроме того, эти системы часто не могут проводить правильный фолдинг эукариотических белков, аналогичный нативному. Были предприняты попытки экспрессировать лакказы лигнолитических грибов *Cyathus bulleri* [176] и *R. lignosus* [177] в бактериях. Однако в ходе проведения экспериментов было показано, что при гетерологичной экспрессии лакказ в *E. coli* часто возникала проблема низкого выхода целевого белка, поскольку рекомбинантные ферменты образовывали агрегаты, из которых трудно было выделить их в гомогенном виде [178]. Поэтому бактериальные системы, как правило, используются для гетерологичной экспрессии бактериальных лакказ, например, из *Bacillus* [179–181], *Streptomyces* [182,183] и др.

В работе [179] исследователям удалось улучшить экспрессию гетерологичной лакказы из *B. licheniformis* в *E. coli* с помощью мутагенеза. Другим подходом для улучшения производства лакказы в бактериях являлось использование условий с ограниченным доступом кислорода, что увеличивало включение меди в активный центр фермента. Например, производство лакказы

из *Bacillus sp.* в *E. coli* было увеличено после перехода с аэробных на микроаэробные условия [184,185].

Для производства грибных лакказ главным недостатком бактериальной экспрессионной системы является отсутствие системы гликозилирования у реципиента. Поскольку лакказы являются гликопротеинами, этот процесс является неотъемлемой стадией получения активной формы белка, поскольку гликозилирование – одна из основных модификаций, благодаря которой белки приобретают стабильность, в том числе становятся менее чувствительными к действию протеолитических ферментов [55].

1.5.2 Дрожжевые системы экспрессии

Дрожжевые системы были признаны перспективными для гетерологичной экспрессии различных белков. Они сочетают в себе такие преимущества, как быстрый рост, возможность генетических манипуляций, недорогие среды для культивирования, а также наличие системы гликозилирования. Кроме того, уровень экспрессии белка в дрожжах можно контролировать с помощью многих сильных индуцибельных или конститутивных промоторов, а также подбором условий культивирования, таких как состав и pH среды для роста или температуры [186,187].

Известно, что некоторые штаммы дрожжей имеют свои собственные лакказы [188]. Этот факт может рассматриваться как одно из преимуществ этих объектов для биотехнологического производства востребованных рекомбинантных лакказ эукариотического происхождения. Такие системы, как *S. cerevisiae* и *P. pastoris*, очень популярны при выборе реципиента для производства гетерологичных лакказ. Они способны обеспечивать эффективную секрецию гетерологичного белка, кроме того, такие системы коммерчески доступны [186].

Уровень экспрессии лакказ различается среди видов дрожжевых реципиентов, а также зависит от используемой изоформы фермента. Например, лакказа LCC1 из *T. versicolor* была успешно экспрессирована в *P. pastoris* [189],

но не в *S. cerevisiae* [190]. Однако при использовании *S. cerevisiae* была получена другая изоформа лакказы *T. versicolor*, LCC2. Аналогично лакказы POXC и POXA1b из *P. ostreatus* были получены в *K. lactis* с более высоким выходом, чем в *S. cerevisiae* [191]. С другой стороны, POX3 из того же гриба лучше экспрессировалась в *S. cerevisiae* [192]. В работе [125] два минорных изофермента лакказы гриба *G. frondosa* были экспрессированы в дрожжах *P. pastoris*, это позволило получить изоферменты в достаточных для исследования их свойств количествах. В работе [107] изоферменты лакказы гриба *P. ostreatus* также были гетерологично экспрессированы в дрожжах *P. pastoris*.

Использование дрожжевых экспрессионных систем позволили описать свойства некоторых гетерологичных лакказ, а также изучить трафик меди в клетках. Так, влияние дефицита гликозилирования на активность лакказы изучали с использованием лакказы *Lentinus* sp. и её мутантной формы, также экспрессированной в *P. pastoris* [40]. Экспрессия LAC5930-1 из *Trametes* sp. в *P. pastoris* [193] или LAC2 *Coprinus congregatus* в *S. cerevisiae* [194] увеличивала устойчивость дрожжей к окислительному стрессу.

В отличие от бактериальных экспрессионных систем, главным недостатком дрожжевых систем при экспрессии грибных лакказ является проблема избыточного гликозилирования целевого белка [191,195], поскольку гипергликозилирование может затруднять доступ субстрата к активному центру фермента [40]. По всей видимости, для гетерологичной экспрессии белков грибного происхождения наибольшим потенциалом обладают мицелиальные грибы.

1.5.3 Грибные системы экспрессии

Как уже было сказано, правильный процессинг целевого гетерологичного белка является залогом успеха при получении его активной формы, аналогичной нативному. Лучший способ обеспечить правильный процессинг белка – это использование близкородственной экспрессионной системы. Так, для получения

белков аскомицетов лучше использовать аскомицеты, а использование базидиальных систем рекомендуется для гетерологичной экспрессии базидиальных белков. Однако гетерологичная экспрессия генов в базидиомицетах встречается редко. Это объясняется тем, что для аскомицетов существуют более доступные системы трансформации, в то время как для базидиомицетов таких систем очень мало. Известна система трансформации ауксотрофных мутантов базидиомицета *Phanerochaete chrysosporium* [196], а также несколько систем трансформации базидиомицетов *C. cinerea* [197] и *P. ostreatus* [198], но эффективность этих систем существенно ниже, чем для аскомицетов. Поэтому грибы, относящиеся к классу аскомицетов, являются наиболее привлекательными объектами для рекомбинантной продукции различных белков грибного происхождения. Однако для гетерологичной экспрессии белков используется ограниченное количество видов аскомицетов.

Хорошо зарекомендовали себя экспрессионные системы на основе аскомицетов родов *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Их основными преимуществами являются способность секретировать большие количества белка, быстрый рост биомассы, способность расти на дешевых минеральных средах и наличие развитой системы биосинтеза внеклеточных ферментов [199–202]. Эти качества были улучшены при создании новых систем для производства белков в промышленных масштабах. Для некоторых из этих систем, например, для некоторых видов *Aspergillus* и *Penicillium*, были разработаны системы клонирования, которые позволили повысить активность продуцентов на основе этих штаммов и существенно расширить спектр продуктов, получаемых на их основе.

Поскольку регулирование экспрессии белка для таких организмов происходит в основном на уровне транскрипции, использование высокоактивных областей контроля транскрипции грибов имеет решающее значение при гетерологичной экспрессии. Существует большое количество промоторов, позволяющих обеспечивать высокую экспрессию различных генов, представляющих интерес [203,204]. Большим преимуществом использования

сильных конститутивных промоторов является отсутствие потребности в дорогостоящих индукторах. Например, для экспрессии коммерчески востребованных белков в грибах рода *Aspergillus*, часто используется конститутивный *gpdA*-промотор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [69,205]. Для грибов рода *Penicillium*, в частности *P. canescens*, успешно используют промоторы генов, кодирующих ксиланазу А (*xyIA*), β -галактозидазу (*bgaS*) и арабинофуранозидазу (*abfA*) [206,207]. Эти три промотора обеспечивают индуцибельную гетерологичную экспрессию различных ферментов в клетках гриба, например, термостабильной целлюлазы Cel48S из *Clostridium thermocellum* [208], эндо-1,4- β -глюканазы III, целлобиогидролазы I, II из *P. verruculosum* [209], β -глюкозидазы из *A. niger* [210], с выходом целевых ферментов до 10-11 г/л в зависимости от выбранных условий культивирования.

Кроме того, преимуществом ауксотрофного штамма *P. canescens* [206] является наличие мутации в гене нитратредуктазы, что делает его удобным объектом для гетерологичной экспрессии, так как он может быть трансформирован плазмидной ДНК с целевыми генами совместно с плазмидой, несущей ген нитратредуктазы в качестве маркера для отбора целевых клонов.

На сегодняшний день наибольший выход был достигнут для лакказы *M. albomyces*, экспрессированной в *T. reesei* (до 920 мг/л), в то время как выход этого фермента при гетерологичной экспрессии в дрожжах *S. cerevisiae* составил всего 3 мг/л [63]. Как уже было отмечено, мицелиальные грибы *M. albomyces* и *T. reesei* относятся к одному отделу (аскомицетов), что уменьшает вероятность возникновения проблем при процессинге гетерологичного белка. Однако практически такого же уровня секреции целевого белка (до 840 мг/л) удалось добиться при гетерологичной экспрессии лакказы Lac3 базидиомицета *Trametes sp. C30* в аскомицетах *A. niger* [211]. Этот результат существенно превышал выход, полученный при экспрессии Lac3 в дрожжах *S. cerevisiae* (2 мг/л) [156]. Гетерологичная экспрессия лакказы *lcc1* из *T. villosa* в аскомиците *A. oryzae* также позволила получить рекомбинантный белок [11]. Он был аналогичен нативной лакказе по УФ-спектру, значению pI, и pH-оптимуму. Единственная

разница в биохимических свойствах, наблюдаемая между рекомбинантной и нативной лакказами, состояла в степени гликозилирования (0,5 и 10% для нативной и рекомбинантной форм соответственно). Рекомбинантная лакказа Lcc1 базидиомицета *C. cinereus* была получена с помощью экспрессии в *A. oryzae*, где результаты достигали 135 мг/л [51]. Выход лакказы LacI базидиомицета *P. cinnabarinus* при гетерологичной экспрессии в *A. niger* удалось увеличить в 80 раз [69], причем в данном случае ожидаемого гипергликозилирования, характерного для аскомицетов рода *Aspergillus*, не происходило, так как молекулярная масса полученного рекомбинантного белка совпадала с массой нативного.

Удивительно, что на сегодняшний день практически нет работ по гетерологичной экспрессии лакказ в грибах рода *Penicillium*. Единственная работа по гетерологичной экспрессии базидиальной лакказы в *P. canescens* была успешно проведена в нашей лаборатории совместно с лабораторией оптимизации экспрессии генов ФИЦ Биотехнологии РАН. Ген *lacA*, кодирующий мажорный изофермент LacA *T. hirsuta* 072, был экспрессирован в *P. canescens* [212]. Для получения продуцента гетерологичной лакказы А, авторы использовали плазмиду pBGlac, содержащую ген *lacA* гриба *T. hirsuta* 072 под контролем сильного промотора гена *bgaS* β -галактозидазы *P. canescens*, её лидерный пептид и терминатор транскрипции. В качестве реципиента был использован штамм *P. canescens* PCA-10(niaD⁻) - мутант штамма мицелиального гриба *P. canescens* ВКПМ F-178 по гену нитратредуктазы, не являющегося природным продуцентом лакказы *sensu stricto*. Данная стратегия позволила добиться выхода целевого фермента 10-20 мг/л.

Анализ литературы показал, что большинство проведенных на сегодняшний день исследований, связанных с гетерологичной экспрессией лакказ, заключаются в получении мажорных рекомбинантных изоферментов. Однако, несмотря на то, что в некоторых исследованиях удалось увеличить уровень продукции лакказы, до сих пор не существует такого штамма-продуцента лакказы, который бы удовлетворял потребностям

крупномасштабного производства [166,167,186,213]. Работы по экспрессии минорных изоферментов лакказ встречаются гораздо реже и не всегда имеют положительный результат. Из-за того, что получение большинства минорных изоферментов лакказ с помощью нативных продуцентов практически нереализуемо, единственным способом решения задачи полной характеристики всех членов мультигенного семейства лакказ является переход к гетерологичным системам экспрессии. При этом все вышеописанные результаты по гетерологичной экспрессии лакказ свидетельствуют о том, что аскомицеты, в особенности родов *Aspergillus* и *Penicillium*, являются перспективными объектами для гетерологичной экспрессии базидиальных лакказ.

1.6 Практическое применение лакказ

Лакказы используют кислород в качестве конечного акцептора электронов, а не H_2O_2 , что отличает их от других лигнин-модифицирующих ферментов, таких как лигнин-пероксидазы и марганец-пероксидазы. Это свойство делает лакказы удобными для промышленного применения.

Анализ научной литературы, опубликованной за последние 10 лет, показал постоянный рост потребностей в лакказах для различных областей промышленности (рисунок 5 [214]), причём наблюдается появление новых направлений использования этих ферментов. Преимущество лакказ заключается в простых требованиях к условиям катализа, так как во время реакции потребляется кислород из воздуха и единственным побочным продуктом является вода, поэтому лакказы часто называют «зелеными катализаторами» [4,215]. В последние годы использование лакказ по праву считается наиболее выгодной с экологической точки зрения альтернативой химическому окислению. Это подтверждается постоянным поиском новых лакказ в качестве эффективных биокатализаторов, соответствующих принципам зеленой химии.

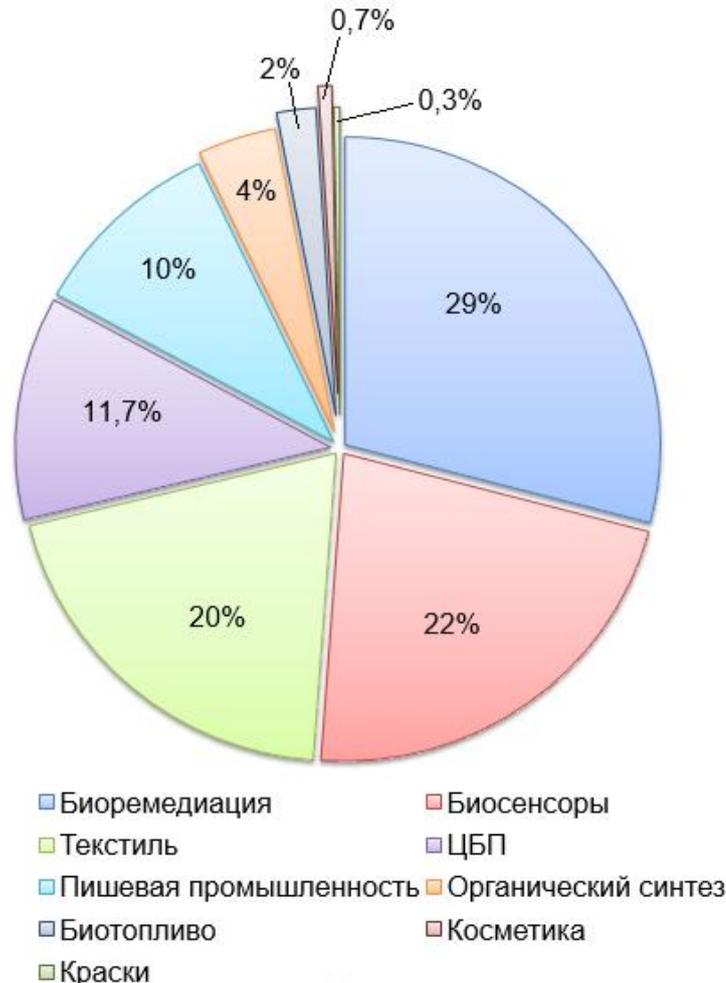


Рисунок 5 – Применение лакказ в различных отраслях промышленности

Целлюлозно-бумажная промышленность (ЦБП)

Большинство предприятий ЦБП до сих пор использует хлор и его соединения для отбеливания древесных волокон, что наносит большой ущерб окружающей среде. Поскольку лакказы способны разлагать лигнин, они успешно могут использоваться в ЦБП для обработки лигноцеллюлозных материалов и демонстрируют многообещающие результаты при отбеливании целлюлозы. Использование микробных лигниназ усиливает отбеливающий эффект химических реагентов, приводя к уменьшению их использования, а также снижению энергопотребления. Поскольку лигноцеллюлоза различных видов древесины имеет различное строение, то деградация лигнина различными видами грибов или ферментов, зависит от мономерного состава этой сложной структуры [75].

Текстильная промышленность

Лакказы были интегрированы в уже существующие процессы, такие как отбеливание и окрашивание волокон в текстильной промышленности [216,217]. Так как лакказы способны обесцвечивать синтетические красители, использование лакказ в этой отрасли постоянно растет, особенно в процессах обработки джинсовой ткани. Во всем мире для её производства в основном используется гипохлорит натрия, преимуществом которого является низкая стоимость. Тем не менее, этот метод имеет ряд недостатков, например, может вызывать желтизну ткани, а также уменьшать ее прочность. Кроме того, данный метод не может быть использован для продукции, содержащей лайкру [218].

Помимо отбеливания, лакказы стали важными «инструментами» для улучшения свойств ткани. Так, лакказы используются для прикрепления функциональных молекул к текстильным волокнам шерсти и хлопка, улучшая их водоотталкивающие свойства, увеличивая устойчивость ткани к усадке, прочность на разрыв и уменьшая сминаемость ткани. Кроме того, показано, что ткани, обработанные лакказой в присутствии феруловой кислоты или гидрохинона, проявляли антибактериальные свойства [219].

Пищевая промышленность

Поскольку многие лакказные субстраты, такие как фенолы и тиолсодержащие белки, являются важными компонентами при производстве различных продуктов питания и напитков, применение лакказ может повысить производительность, эффективность и качество пищевых продуктов. Например, лакказы можно использовать в качестве добавки, уменьшающей воздействие кислорода на сырье, тем самым предотвращая неприятные запахи, вызванные окислением карбоновых кислот, что необходимо при производстве пива [220]. Также лакказы могут быть использованы для стабилизации фруктовых соков, содержащих природные фенолы и продукты их окисления, оказывающие нежелательное влияние на цвет и аромат продукта [6]. Высокая концентрация фенолов и полифенолов, выделяющихся из семян и кожи винограда при получении виноматериала, также может наблюдаться в процессе производства

вина. Окисление полифенолов, происходящее в сусле и вине, вызывает нежелательные изменения вкуса и цвета. Как правило, для предотвращения этих эффектов используют добавки, блокирующие окисление, а также удаляют полифенолы с помощью высоких доз диоксида серы. Исследование [6] показало, что обработка белых вин лакказой может увеличить их сохранность в течение продолжительного времени, однако действие лакказы на полифенолы должно быть селективным, поскольку их неизбирательное удаление может привести к нежелательным органолептическим характеристикам.

Лакказы также можно применять в качестве «сшивающих» ферментов при функционализации дисперсных систем (эмульсии и суспензии) и стабилизации консистенции молочной продукции. Так, уменьшение содержания жира в йогурте часто приводит к ухудшению его текстуры и вкуса, а применение лакказы отдельно или в сочетании с медиаторами улучшает вязкость и упругость массы [221].

Использование лакказы в хлебопекарной промышленности улучшает прочность структуры клейковины, приводит к увеличению объема и увеличению мягкости выпечки, также улучшается обрабатываемость теста из-за повышения его прочности и стабильности и уменьшения липкости. Кроме того, добавление лакказы при использовании муки низкого качества улучшает свойства хлеба [6].

Показано, что лакказа может быть использована при производстве жевательной резинки в качестве добавки для борьбы с галитозом (неприятный запах изо рта, который может появляться из-за развития анаэробных бактерий, заболеваний органов желудочно-кишечного тракта или же на фоне инфекций дыхательных путей) [222].

Деградация микотоксинов

Одной из стратегий обеспечения безопасности продуктов питания и кормов является уменьшение содержания микотоксинов (вторичных метаболитов грибов, которые загрязняют продукты питания и корма, являясь причиной ряда заболеваний пищеварения у людей и животных) посредством их

ферментативной деградации, в том числе с помощью лакказ. Так, например, лакказа из *T. versicolor* способна деградировать афлатоксины [223].

Медицина

Фенольные соединения широко распространены в природе как вторичные метаболиты. Они играют роль в защите организмов от инфекций и влияния негативных условий окружающей среды. Многие продукты ферментативных реакций с участием лакказ являются антимикробными и детоксифицирующими агентами. Потенциальное применение лакказ в области медицины активно привлекает внимание исследователей. Примером возможного применения лакказ в медицине служит лечение аллергических дерматитов, вызванных контактом с ядовитыми растениями рода *Toxicodendron*. Такая реакция вызывается при попадании на кожу урушиола – органического маслянистого токсина, обнаруженного в этих растениях, который является токсичным производным катехола. Лакказа окисляет, детоксифицирует и полимеризует урушиол, тем самым снижая воздействие токсина [224], поэтому препараты на основе лакказы могут быть использованы как средство первой помощи при подобных ожогах.

Также лакказы являются потенциальными биокатализаторами при синтезе биологически активных соединений (БАС). Физико-химические методы, используемые в производстве БАС, обычно многостадийные, энергоемкие, характеризуются низким выходом и связаны с большим количеством отходов, которые оказывают негативное воздействие на окружающую среду. Биокатализ с помощью ферментов экологически безопасен и уменьшает количество этапов при их синтезе. Кроме того, некоторые изоферменты очень специфичны, что имеет важное значение при производстве соединений терапевтической ценности. Так, известны методы биокаталитической трансформации стероидных соединений с применением лакказ для производства лекарственных препаратов, например, гидроксирование стероидов экзогенными лакказами *L. strigosus* и *T. versicolor* в присутствии редокс-медиаторов [225].

Обработка отходов

Ферментативная очистка сточных вод в настоящее время считается наиболее эффективным методом как с экологической, так и с экономической точки зрения, так как требует меньше энергозат по сравнению с химической обработкой. Лакказы являются важными ферментами для детоксикации стоков в различных областях промышленности. Например, в текстильной промышленности используется порядка 10000 различных типов красителей и пигментов, большая часть которых выбрасывается в окружающую среду и тем самым наносит ей непоправимый вред, поэтому для их обезвреживания необходимо использовать безопасные методы обработки отходов, к которым относится ферментативная обработка лакказами. Биохимические методы обесцвечивания и деградации красителя имеют низкую стоимость и высокую эффективность [218]. Внедрение ферментативных мембранных технологий с использованием лакказ открыло новые возможности для детоксикации сточных вод предприятий фармацевтической промышленности. Показана возможность деградации лакказами эстрогенов и различных антибиотиков [226]. Кроме того, иммобилизованные лакказы способны окислять токсичные органические загрязнители, такие как хлорфенолы, полициклические ароматические углеводороды, фосфорорганические соединения, азокрасители, а также различные ксенобиотики, в том числе гербициды [70,89,227].

Биотопливо

Лигноцеллюлозные материалы – наиболее перспективное сырье для производства биотоплива. Их использование зависит от эффективного гидролиза полисахаридов, который требует предварительной обработки биомассы, в том числе удаления лигнина. Лакказы играют ключевую роль в биодеградации лигнина и, следовательно, имеют большой потенциал для применения при производстве биотоплива. Кроме того, они способствуют удалению ингибиторов роста дрожжей (главным образом, фенолов). Так, например, в работе [228] авторы показали, что использование лакказы *T. versicolor* для обработки древесных гидролизатов увеличивало выход биоэтанола в 2-3 раза за счет

детоксификации фенольных производных лигнина. Применение лакказы *G. lucidum* также позволило удалить 84% фенольных соединений, содержащихся в гидролизате кукурузной биомассы, и значительно улучшило рост дрожжей, что впоследствии позволило увеличить выход этанола на 10% [229].

Промышленное значение лакказ привело к резкому увеличению спроса на них, поэтому поиск новых источников этих ферментов и характеристика новых изоферментов со свойствами, подходящими под определенные требования технологических процессов, является важной задачей современной биотехнологии.

1.7 Анализ рынка коммерческих препаратов лакказ

На сегодняшний день существует ряд коммерческих препаратов лакказ, применяемых в различных областях промышленности [52]. Основные препараты, доступные в продаже, представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Коммерческие препараты лакказ

Торговое название препарата	Источник	Производитель
Отбеливание и делигнификация целлюлозы в ЦБП		
Lignozym-process	<i>T. versicolor</i>	Lignozym GmbH (Германия)
Novozym 51003	<i>T. villosa, T. pubescens</i>	Novozymes (Дания)
Отбеливание и отделка ткани в текстильной промышленности		
Bleach Cut 3-S	-	Season Chemicals (Китай)
Cololacc BB	-	Colotex Biotechnology Co. Ltd. (Гонконг)
Denilite	<i>A. niger</i>	Novozymes (Дания)
DeniLite II	Рекомбинантная лакказа <i>M. thermophila</i> экспрессированная в <i>A. oryzae</i>	Novozymes (Дания)
ZyLite	-	Zytex Pvt. Ltd. (Индия)

Торговое название препарата	Источник	Производитель
Americos Laccase P	-	Americos Industries Inc. (Индия)
Americos Laccase LTC	-	Americos Industries Inc. (Индия)
Hypozyme	-	Condor Speciality Products (США)
Easystone E.DUAL/ E.TOP/ E.TP5	-	Prochimica Group (Италия)
Prozyme LAC	-	Sunson Industry Group Co., Ltd. (Китай)
DENIMCOL LAC	-	СНТ/BEZEMA (Италия)
Primagreen Ecofade LT100	-	Genencor Inc. (США) / DuPont
Ecostone LCC10	-	AB Enzymes GmbH (Германия)
IndiStar Active	-	Genencor Inc. (США)
Novoprime Base 268	-	Novozymes (Дания)
Novalite IIS	-	Alfa Kimya Company (Турция)
APCOZYME II-S	-	Apollo Chemical Company (США)
Recombinant Not specified laccase expressed in <i>A. oryzae</i>	Рекомбинантная лакказы, экспрессируемая в <i>A. oryzae</i>	BioSapien (ОАЭ)
Улучшение качества напитков в пищевой промышленности		
Flavourstar	<i>M. thermophila</i>	Advanced Enzyme Technologies Ltd. (Индия)
Laccase Daiwa Y120	<i>T. versicolor</i>	Amano Enzyme USA Co. Ltd. (США)
Laccase M120	<i>T. hirsuta</i>	Amano Enzyme USA Co. Ltd. (США)
Suberase	<i>M. thermophila</i>	Novozymes (Дания)
Обесцвечивание красителя индигокармина		
Trilite II/ Trilite Plus	-	Tri-Tech Co. Inc. (Канада)

Торговое название препарата	Источник	Производитель
Неспецифичные препараты		
Laccase from <i>Agaricus bisporus</i>	<i>A. bisporus</i>	СНЕМОС GmbH (Германия)
Неспецифичная лакказа	-	HUT (Вьетнам)
Laccase <i>T. versicolor</i>	<i>T. versicolor</i>	Jena Bioscience GmbH (Германия)
Tailored bacterial laccase	-	Metgen (Финляндия)
Laccase from <i>A. bisporus</i>	<i>A. bisporus</i>	Sigma Aldrich (США)
Laccase from <i>P. ostreatus</i>	<i>P. ostreatus</i>	Sigma Aldrich (США)
Laccase from <i>R. vernificera</i> L2157	<i>R. vernificera</i>	Sigma Aldrich (США)
Laccase from <i>T. versicolor</i> BioChemika	<i>T. versicolor</i>	Sigma Aldrich (США)

Как видно из таблицы 5, коммерчески доступные препараты лакказ производятся с использованием ограниченного количества источников, несмотря на их разнообразие в природе. В основном, это лакказы из нативных базидиальных продуцентов, преимущественно рода *Trametes*, а также лакказа из лакового дерева *R. vernificera*. Существующие препараты рекомбинантных лакказ представляют собой, как правило, базидиальные лакказы, экспрессированные в мицелиальных грибах, преимущественно аскомицетах рода *Aspergillus*. Главной проблемой коммерциализации лакказ остается отсутствие возможности производить ферменты в больших количествах, что обуславливает их высокую стоимость. Кроме того, большинство препаратов из приведенного выше списка применяются совместно с медиаторами, что обуславливает возникновение дополнительной проблемы токсичности медиаторов или продуктов реакции лакказы с ними.

На рынке представлены препараты лакказ для обработки напитков, лигноцеллюлозы или отбеливания и отделки ткани (многие другие области

применения находятся в стадии разработки). Следует отметить, что для производства коммерческих препаратов лакказ наиболее доступными являются мажорные формы ферментов [214], так как потенциал минорных до сих пор не раскрыт из-за сложности их получения и, как следствие, отсутствия информации об их свойствах.

В последнее время интерес исследователей смещается от изучения мажорных форм лакказ к изучению полного спектра изоферментов, кодируемых мультигенными семействами. Если в качестве примера взять лакказы *T. hirsuta* 072, то из семи генов, кодирующих изоферменты лакказ, в настоящий момент только нативный мажорный изофермент LacA хорошо изучен, поскольку продуцируется грибом в достаточном количестве. Белковые продукты других шести генов являются минорными изоферментами, и их продукция очень низкая или вовсе отсутствует. Поскольку сравнение аминокислотных последовательностей этих изоферментов показало существенные различия [10], представляется интересным сравнительное изучение их свойств. Определение физико-химических и каталитических свойств лакказ, входящих в мультигенное семейство *T. hirsuta*, и их сравнительный анализ позволит не только предположить физиологическую роль, которую играют различные изоферменты в данном организме, но и оценить их потенциал для использования с практической точки зрения. Таким образом, появится возможность выбора фермента со специфическими характеристиками для конкретного биотехнологического применения.

Для изучения свойств этих изоферментов необходимо выбрать экспрессионную систему, обеспечивающую получение белка в достаточном для его характеристики количестве и с пространственной структурой, не отличающейся от нативной. При существующем разнообразии систем экспрессии гетерологичных белков, имеющих как преимущества, так и недостатки, для выбора оптимальной системы экспрессии необходимо

учитывать особенности как нативного продуцента, так и организма-реципиента, так как уровень экспрессии различных типов рекомбинантных белков может значительно варьироваться даже в пределах одного организма-реципиента.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы и коммерческие наборы

- Для работы с нуклеиновыми кислотами использовали следующие реактивы и наборы: эндонуклеазы рестрикции, *Taq* ДНК-полимераза, эквимольная смесь четырех dNTP, ДНКаза I (RNase-free) фирмы Thermo Fisher Scientific Inc. (США) и Евроген (Россия); «PCR Purification Kit», «Plasmid Midi Kit», «Gel Extraction Kit» фирмы QIAGEN (США); «Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit» (Thermo Fisher Scientific Inc., США); для выделения РНК использовали реактив TRIzol Reagent (TriPure Isolation Reagent) фирмы Invitrogen (Великобритания); для синтеза первой цепи кДНК на РНК-матрице использовали набор «MMLV RT KIT» фирмы Евроген (Россия); праймеры для ПЦР были синтезированы фирмой Евроген (Россия); количественную ПЦР в реальном времени проводили с помощью готовой смеси qPCRmix-HS SYBR+ROX Евроген (Россия);
- Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в агарозном геле, с использованием агарозы (Applichem, Германия) и ДНК-маркеров O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., США);
- Для приготовления питательных сред для культивирования были использованы реактивы российских производителей: D-люкоза, пептон ферментативный, дрожжевой экстракт, триптон, NaCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , NaNO_3 , уридин, урацил, L-арабиноза, L-аргинин.
- Для определения ферментативных активностей были использованы субстраты: 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоной кислоты) диаммониевая соль (АБТС) фирмы AppliChem (Германия), пирокатехин, 2,6-диметоксифенол, гваякол, феруловая кислота, синаповая кислота фирмы Sigma-Aldrich (США);

- Для выделения и очистки белков были использованы носители: DEAE-целлюлозная вата (Whatman, Швеция); DEAE-Toyopearl 650M (Toyo-soda, Япония); Superdex-75 (Pharmacia, Швеция); Phenyl Sepharose CL-4B (Sigma-Aldrich, США); Source 15Q, Source 15ISO (GE Healthcare, Uppsala, Швеция);
- Для электрофоретического разделения и изоэлектрофокусирования белков были использованы реактивы следующих производителей: Sigma-Aldrich (США), GEHealthcare (США), ServaElectrophoresis (Германия), Applichem (Германия), BioRad (США), Thermo Fisher Scientific Inc. (США).
- В работе использовали кислоты и щелочи фирмы Sigma-Aldrich (США);
- Все использованные в работе реактивы имели чистоту «ХЧ», «ОСЧ» и «Analytical grade».

2.2 Штаммы микроорганизмов

В работе были использованы следующие штаммы микроорганизмов:

- штамм базидиомицета *T. hirsuta* 072 (син. *T. hirsuta* (Wulfen) Pilat, 1939; *T. hirsuta* LE-BIN072) из коллекции культур ФГБУН Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (ЛЕБИН) [230];
- штамм аскомицета *P. canescens* PCA-10 (niaD⁻) [212];
- штамм аскомицета *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻) (*A. nidulans* (Eidam) G. Winter, AN031) из коллекции "The CBS-KNAW culture collection" (Нидерланды), CBS 129193;
- штамм *E. coli* XL-10 Gold (Stratagene, США).

2.3 Среды и условия культивирования

2.3.1 Культивирование *T. hirsuta* 072

T. hirsuta 072 культивировали поверхностным способом при 25-27°C в темной аэрируемой комнате на агаризованной глюкозо-пептонной (ГП) питательной среде следующего состава (г/л): глюкоза - 10,0; пептон ферментативный - 3,0; K₂HPO₄ - 0,6; ZnSO₄×7H₂O - 0,001; K₂HPO₄ - 0,4; FeSO₄×7H₂O - 0,0005; MnSO₄ - 0,05; MgSO₄×7H₂O - 0,5, CaCl₂ - 0,25 (начальное

значение рН 6,0) [231]. Затем в колбу объемом 750 мл, содержащую керамические бусы и 200 мл питательной среды ГП, вносили кусочки мицелия, выращенного на агаризованной среде, и инкубировали при 26-28°C в течение 6-8 сут. Перед дальнейшим пересевом на глубинное культивирование посевной материал, выращенный поверхностным способом, разбивали керамическими бусами на качалке при 220-250 об/мин в течение 30 минут.

Глубинное жидкофазное культивирование гриба *T. hirsuta* проводили на ГП среде с внесением индуктора биосинтеза лакказ CuSO_4 (0,25 г/л), при постоянном перемешивании (180 об/мин) и температуре 26-28°C в темной аэрируемой комнате.

2.3.2 Культивирование *P. canescens*

Штаммы *P. canescens* культивировали поверхностным способом в течение 7-10 суток при 28°C в термостате на агаризованной минимальной питательной среде (МС) следующего состава: источник азота – 0,53 г/л (NH_4Cl в случае реципиента, и NaNO_3 в случае трансформантов), D-глюкоза - 10 г/л, кукурузный экстракт - 50 г/л, арабиноза - 1,5 г/л, раствор минеральных солей - 20 мл/л. При этом раствор минеральных солей имел следующий состав: KCl - 26 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 26 г/л, KH_2PO_4 - 76 г/л, раствор микроэлементов - 50 мл/л. Раствор микроэлементов включал: $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ - 400 мг/л, $\text{FeSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ - 800 мг/л, $\text{MgSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ - 800 мг/л, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ - 800 мг /л, $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ - 800 мг/ л, $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7$ - 40 мг/ л.

При глубинном жидкофазном культивировании штаммов *P. canescens* использовали жидкую среду МС с концентрацией глюкозы 20 г/л [212]. Водной суспензией конидий засеивали 100 мл среды (4×10^5 конидий/мл). Культивирование проводили на орбитальной качалке в колбах на 750 мл при 240-250 об/мин и 30°C в течение 6 суток (144 ч). По окончании ферментации культуральную жидкость (КЖ) отделяли от мицелия и в супернатанте определяли активность изоферментов.

2.3.3 Культивирование *A. nidulans*

Штаммы *A. nidulans* культивировали поверхностным способом в течение 7-10 суток при 37°C в термостате на агаризованной минимальной питательной среде (ММ) следующего состава: NaNO₃ – 0,53 г/л, D-глюкоза - 10 г/л, раствор минеральных солей - 20 мл/л (см.п. 2.3.2), уридин - 1,1 г/л, урацил - 1,2 г/л, аргинин - 0,21 г/л (при культивировании трансформантов уридин и урацил не добавляли).

Глубинное жидкофазное культивирование штаммов *A. nidulans* проводили в жидкой среде ММ при 37°C аналогично п.2.3.2.

2.3.4 Другие среды, использованные в работе

Для выращивания *E. coli* использовали среду Лурия-Бертани (LB) состава: триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, хлорид натрия – 10 г/л. Для отбора целевых клонов перед использованием в среду добавляли ампициллин до конечной концентрации в среде 50 мкг/мл.

Агаризованные среды, использованные в работе, содержали 2% агара. Раствор для высева протопластов содержал 0,8% агара. Среда LB автоклавировалась в течение 30 мин при 0,8 изб. атм. и хранилась при комнатной температуре. Остальные среды автоклавировали в течение 30 мин при 0,5 изб. атм. Посевной материал получали смывом спор с агаризованной среды стерильной водой.

2.4 Создание продуцентов рекомбинантных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072

2.4.1 Конструирование плазмиды для трансформации в *A. nidulans*

Секвенирование здесь и далее было проведено компанией ЗАО «Евроген» (Россия). Правильность состыковки фрагментов при конструировании плазмидной конструкции *pGPD-lacI-A.n.* по сайтам PaeI/NcoI проверяли секвенированием с использованием праймера:

PCGpd_prom_seq CCCTCTTCCATCCTCCTCCT

Экспрессионный вектор рPCGNX, использованный в работе, был создан ранее на основе плазмиды рPCBG5 [212], содержащей ген β -галактозидазы (*bgaS*) *P. canescens* с сигнальным пептидом. Сайт рестрикции NcoI вводили с помощью сайт-направленного мутагенеза в области иницирующего ATG - кодона гена *bgaS* *P. canescens* с помощью «Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit» (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно инструкции производителя, используя следующие праймеры:

PCG_Nco_dir CGTCGACTTTGCTCACCATGGAGCTTTTGTCTTCTTG

PCG_Nco_rev CAAGAAGACAAAAGCTCCATGGTGAGCAAAGTCGACG

2.4.2 Конструирование плазмид для трансформации в *P. canescens*

Праймеры с введенными сайтами Eco31I, BamHI, XhoI, NcoI, PscI, PagI, Bsp1407I, Pfl23II (Таблица 6) использовали для амплификации генов лакказ. ПЦР с градиентом температур отжига проводили с соответствующими праймерами на гены *lacC- lacG*, а также с праймерами на 5`- область гена *lacB* и на 3`- область гена *lacB*. В качестве матрицы была использована ДНК (0.0025 мкг/20 мкл) и кДНК *T. hirsuta* 072 (2 мкл реакционной смеси, полученной после обратной транскрипции).

Режим амплификации **ПЦР№1**: денатурация 1 мин при 95°C, 5 циклов (95°C - 15 сек, 60°C - 30 сек, 70°C - 120 сек), 15 циклов (94°C - 10 сек, 65°C - 20 сек, 70°C - 140 сек). Соответствующие пробы объединяли и очищали смесь от праймеров с помощью «PCR Purification Kit». Весь объем проб после очистки смеси был использован для ПЦР№2.

Режим амплификации **ПЦР№2**: денатурация 1 мин при 95 °С, 5 циклов (95°C - 15 сек, 50-66°C - 30 сек, 70°C - 120 сек), 15 циклов (94°C - 10 сек, 55-71°C - 20 сек, 70°C - 10 мин).

Для секвенирования полученных плазмид использовались праймеры, представленные в таблице 7.

Таблица 6 - Последовательности праймеров для клонирования генов *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF*, *lacG* с введенными сайтами рестрикции

Название	5'- Последовательность -3'
lacBEcoD1	GCTACTTCGTTGGGTGATCATGCCGA
lacBEcoD2	TTCGTTGGGTCTCTCATGCCGAGAG
lacBBamD	CCCATGGTGGTGTACGACCCTAAG
lacBBamR	ATCGACATCATAGAGATATGCCTGAGGATC
lacBXhoR	TGTTGCACCTCGAGCACGGGAAAAC
lacCNcoD	TATTCGCCTTAAGCCATGGGAAAGCTTCA
lacCXhoR	CTCATTCCTTCCTCGAGACAGCGATTA
lacDPscD	AGACGAAACTCGACATGTCGTCTTGG
lacDXhoR	ACACCTGATGCTCGAGCTTCTACTAGTACGC
lacEPagD	GCGCTATCAAGATCATGACCTTCATTC
lacEXhoR	GCCAGGCTCGAGGGTTACAGGTC
lacFNcoD	GCCTCAAGTACCATGGCCGGGCTTC
lacFBspR	GTAAAGTGGAGTTGTACATCCGTAAGGTCG
lacGNcoD	CTTTTATTTCCCGCCATGGGTTCGGAT
lacGPflR	CAAGAAAATTCGTACGCGCCAGCTG

Таблица 7 - Последовательности праймеров для секвенирования плазмид, содержащих гены лакказ *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF*, *lacG*

Название	5'- Последовательность -3'
BGASD	CAAGCTGCTGAAGCTGAAGCTC
BGASRS	CTCATATTTACCCTGGCATGTCT
lacBSD	ACATTCTGGTACCATAGCCATC
lacBSR	AGTGAACGTCGCGTTGTTGA
lacCSD	GGTACCACAGTCATCTGTCT
lacCSR	GTAGTGATGGGGAACGAAAG
lacDSD	CGACTTCCTGTACAATTTCCAG
lacDSR	CACCGTGCAAATGGAACGG

Название	5'- Последовательность -3'
lacESD	ACCTTCTGGTATCATAGCCATCT
lacESR	GAGTATCTGGAGCAATACGG
lacFSD	GGACGTTCTGGTACCACAGT
lacFSR	GAGGAGAGCCAGGAGCATT
lacGSD	GGTACGTTCTGGTACCACAG
lacGSR	GTGCGTTGGTGGCAGTGATA

2.4.3 Трансформация *E. coli*

Компетентные клетки *E. coli* готовили по методике, описанной в работе [232]. Плазмиды, содержащие необходимые последовательности генов лакказ, были трансформированы по общеизвестной методике [233] в клетки *E. coli* XL-10 Gold с отбором на среде с ампицилином. Клетки выращивали в 50 мл среды LB в колбах в присутствии ампициллина, после чего выделяли плазмидную ДНК, используя «Plasmid Midi Kit» (QIAGEN).

2.4.4 Трансформация *P. canescens* и *A. nidulans*

Трансформацию проводили следующим образом: штамм-реципиент выращивали в течение 24 ч в жидкой среде MC или MM для *P. canescens* и *A. nidulans* соответственно (см.п. 2.3.2, 2.3.3) Отфильтрованный мицелий переносили в раствор FPB (1,2 М MgSO₄, 10 мМ NaH₂PO₄, pH 5,8), после чего добавляли лизирующий фермент *T. harzianum* (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 35 мг/мл и бычий сывороточный альбумин (БСА, Sigma-Aldrich, США) до 2,5 мг/мл. Протопластирование проводили в течение 2 ч при 30°C в условиях перемешивания. Количество протопластов контролировали с помощью их подсчета в камере Горяева под микроскопом. Далее полученную суспензию переносили в центрифужные пробирки и наслаивали 5 мл раствора ST (0,6 М D-сорбит, 10 мМ Трис–HCl, pH 7,5). После центрифугирования при 5000 об/мин, 4°C в течение 10 мин отбирали интерфазу, содержащую

протопласты. Протопласты промывали дважды раствором SCT (1,2 М D-сорбит, 10 мМ Трис -HCl pH 7,5, 10мМ CaCl₂) и ресуспендировали в 720 мМ KCl до концентрации 10⁸ протопластов/мл. В 200 мкл суспензии протопластов вносили 10 мкг трансформируемой ДНК, инкубировали в ледяной бане 20 мин, после чего проводили осмотический шок в течение 5 мин в растворе PCT (50% ПЭГ 4000, 10 мМ CaCl₂, 10 мМ Трис-HCl pH 7,5) и высевали протопласты в верхнем слое 0,8% агара на агаризованную селективную среду, содержащую 720 мМ KCl.

2.4.5 Выделение ДНК

Для выделения ДНК грибной мицелий отделяли от КЖ, растирали в ступке в жидком азоте. К 1 г мицелия добавляли 1/20 объема 10% SDS, перемешивали и инкубировали при 65°C в течение 30 мин. Затем к суспензии мицелия добавляли четверть объема 5 М раствора ацетата калия pH 5,0, перемешивали и инкубировали на ледяной бане в течение 30-60 мин. Далее суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 10000g, надосадочную жидкость отбирали и добавляли к ней равный объем изопропанола, инкубировали 20 мин при температуре -20°C. Центрифугировали в течение 10 мин при 10000g, надосадочную жидкость сливали, осадок промывали 70% этанолом, подсушивали в течение 5 мин при 37°C и растворяли в деионизованной воде.

Такие процедуры, как выделение плазмид из клеток *E. coli*, рестрикцию и электрофорез ДНК, проводили по стандартным методикам, описанным в [233].

2.4.6 Выделение РНК

Выделение РНК проводили с использованием реагента TRIzol Reagent из замороженных образцов мицелия в соответствии с инструкциями производителя. Экстрагированные растворы нуклеиновой кислоты обрабатывали ДНКазой I в течение 30 мин. Целостность и количество РНК

определяли спектрофотометрически на приборе Nanodrop ND-1000 (Lab-Tech International, Великобритания) и электрофорезом в 1% агарозном геле.

2.4.7 Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени

Для обратной транскрипции использовали РНК, выделенную из мицелия после 6 суток культивирования. Синтез кДНК проводили с использованием реагентов «MMLV RT KIT» (Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя, используя олиго (dT). На реакцию использовали 1 мкг общей РНК. Количественную ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием готовой смеси qPCRmix-HS SYBR+ROX согласно инструкции производителя в термоциклере StepOnePlus (Applied Biosystems, США). В реакционную смесь (объемом 20 мкл) вносили 100 нг кДНК, синтезированной из общей РНК, и геноспецифические праймеры (таблица 8) в концентрации 0,3 мкМ каждого.

Таблица 8 - Последовательности олигонуклеотидных праймеров на гены *lacA-lacG* для ПЦР-РВ

Название	5'- Последовательность -3'
<i>lacA.For</i>	AGGGCCGCGCTCCCAGTG
<i>lacA.Rev</i>	AGCGGGCGCGCCGTCATAG
<i>lacB.For</i>	CGTTCCGCGGAAACCCCT
<i>lacB.Rev</i>	CGGGAGCTCCCTTGTACCGTAGAATAG
<i>lacC.For</i>	AACGGTCTGGGCCGCTTT
<i>lacC.Rev</i>	TGCGGAGTTGATCCCGTC
<i>lacD.For</i>	CCCACCTCTGAGCTCGCC
<i>lacD.Rev</i>	ACCCAGTGGCATTGAGGTTCT
<i>lacE.For</i>	CGCTCGAATGGCACTCTCAC
<i>lacE.Rev</i>	TCGTAAGATGGCGGAGTTTACACCT
<i>lacF.For</i>	GGCCGTACGACCACCAACAC

<i>lacF.Rev</i>	CCCGCAAATCCAGTCGTG
<i>lacG.For</i>	GGTTTGGGCCGGTTCAC T
<i>lacG.Rev</i>	TGACACCGCCAGAGAACGA

ПЦР-РВ проводили в трех технических повторностях для каждой пробы в 96-луночных планшетах. Режим амплификации: 10 мин при 95°C, 40 циклов (95°C - 15 сек, 58°C - 20 сек, 72°C - 30 сек). Специфичность праймеров и однородность продукта определяли по кривым плавления. Пороговую линию (Tresholdline) для определения значения Ct выставляли индивидуально для каждого образца, но одинаково для трех повторностей. В качестве отрицательного контроля для каждой пары праймеров использовалась реакционную смесь без матрицы.

Полученные данные обрабатывали по методу Δ Ct. Значения Ct целевых генов были нормализованы по отношению к генам внутреннего контроля (*gpdA*, GenBank: GQ996946 [212], кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу *P.canescens*, и *actA*, GenBank: MH421959, кодирующего актин *P. canescens*) и преобразованы в относительные величины (RQ) с использованием формулы:

$$RQ = 2^{-\Delta Ct},$$

где Δ Ct равно среднему значению Ct по трем повторностям для каждого целевого гена за вычетом среднего значения контрольного гена Ct (для каждого шаблона).

2.5 Определение внеклеточной протеолитической активности

Общую протеолитическую активность (ОПА), т.е. суммарную активность большей части присутствующих в КЖ протеиназ, определяли с помощью белкового субстрата - азоказеина. Реакционная смесь содержала: 150 мкл 0,5 % водного раствора азоказеина, представляющего собой казеин, конъюгированный с азокрасителем, 100 мкл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0) и 50 мкл культуральной жидкости. В качестве контроля использовали смесь, состоящую

из 150 мкл азоказеина и 150 мкл буфера. Образцы инкубировали в термостате при 37°C в течение 12 ч. В процессе гидролиза казеина свободный краситель освобождался в среду. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Затем образцы выдерживали 30 мин в холодильнике при 4°C. Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием со скоростью 10000. об/мин в течение 6-8 мин. Затем отбирали 400 мкл супернатанта и добавляли 400 мкл свежеприготовленного 0,5 М раствора NaOH. Интенсивность окраски продукта гидролиза в полученном растворе измеряли на спектрофотометре при длине волны 440 нм. Реакцию в контрольном образце останавливали 10% ТХУ непосредственно после добавления азоказеина [234–237].

За единицу протеолитической активности принимали такое количество ферментного препарата, которое вызывало увеличение оптической плотности полученного раствора на 0,1 (при измерении против контроля в кювете толщиной 1 см).

Протеолитическую активность кислых протеаз (АКП) определяли модифицированным методом Ансона с помощью раствора гемоглобина. В стаканчике взвешивали 0,22 г гемоглобина и 3,6 г мочевины, тщательно перемешивали палочкой, заливали навеску 8 мл ацетатного буфера рН 5,0 и перемешивали до полного растворения на магнитной мешалке. После растворения доводили рН до значения 4,7 1 н раствором соляной кислоты. В пробирки наливали по 0,3 мл субстрата, помещали в термостат при температуре 30°C и через 1-2 мин, засекая время по секундомеру, вводили в одну пробирку 0,3 мл дистиллированной воды (фон субстрата), а через 10-20 секунд в остальные пробирки - КЖ; смесь встряхивали и оставляли в термостате на 10 мин. Затем добавляли в пробирки по 0,6 мл 10% ТХУ, встряхивали и оставляли еще на 20 мин при 30°C. После этого пробирки центрифугировали при 12000 об/мин в течение 2 мин, отбирали по 0,2 мл супернатанта и добавляли к 1 мл 0,5 М раствора Na₂CO₃, перемешивали и добавляли 0,2 мл реактива Фолина. Снова перемешивали, выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин.

Далее измеряли оптическую плотность при 670 нм. Измерения проводили против фона субстрата.

Для построения градуировочной кривой по тирозину готовили запасной раствор тирозина концентрацией 10^{-3} М, растворяя 18,1 мг чистого тирозина в 100 мл 0,2 н раствора соляной кислоты. Из запасного раствора готовили разведения с молярной концентрацией тирозина от 0,02 до 0,2 мкмоль/мл. Пробы для измерения оптической плотности готовили, как описано выше. По полученным данным строили градуировочный график и вычисляли тирозиновый эквивалент (ТЭ), соответствующий оптической плотности 1 мкМ тирозина в 1 мл стандартного раствора. Активность рассчитывали по формуле:

$$\text{ПЕ} = \frac{\Delta A_{670} \cdot 4 \cdot R}{\text{ТЭ} \cdot 10},$$

где 4 - разбавление ферментного препарата в реакционной смеси после добавления ТХУ (при смешивании 0,3 мл раствора фермента с 0,3 мл субстрата и 0,6 мл ТХУ); R – разбавление ферментного препарата перед его внесением в раствор субстрата; ТЭ – тирозиновый эквивалент (1,5-1,7); 10 - время гидролиза, мин; ПЕ - количество протеазных единиц (ПЕ) в 1 мл.

2.6 Выделение и очистка рекомбинантных изоферментов

Для выделения секретируемых изоферментов лакказ штаммы *P. canescens* выращивали методом глубинного культивирования (см. раздел 2.3.2). КЖ отделяли от биомассы фильтрацией через ватно-марлевый фильтр.

Схема №1 включала следующие стадии: белок из полученного фильтрата КЖ высаливали 80% сульфатом аммония в течение ночи при температуре 4°C и постоянном перемешивании. Осадок собирали фильтрованием через складчатый бумажный фильтр и перерастворяли его в минимальном объеме дистиллированной воды. Затем в течение ночи проводили диализ против H_2O , снова фильтровали через складчатый бумажный фильтр. Далее фильтрат выдерживали с DEAE-целлюлозной ватой в течение 30 мин. Десорбцию

изоферментов rLacC и rLacF проводили 0,2 М КФБ рН 6,5, т.е. в условиях, ранее использованных для получения рекомбинантной rLacA [238]. Изофермент rLacD на этом этапе плохо связывался с носителем, поэтому буферная система была изменена на 20-50 мМ Трис-НСl рН 8,0.

На следующем этапе полученный раствор белка снова высаливали сульфатом аммония в течение ночи при температуре 4°C и постоянном перемешивании, фильтровали через складчатый бумажный фильтр и перерастворили белок в минимальном объеме дистиллированной воды. Полученный раствор белка диализовали против соответствующего буфера (5 мМ КФБ для rLacC и rLacF; 5мМ Трис-НСl рН 8,0 для rLacD), затем фильтровали и наносили на колонку с носителем DEAE-Toyopearl 650M, уравновешенную соответствующим буфером. Элюцию проводили со скоростью 1,0 мл/мин в градиенте (КФБ рН 6,5 с молярностью от 5 мМ до 200 мМ - для rLacC и rLacF; Трис-НСl рН 8,0 с молярностью от 5 мМ до 50 мМ - для rLacD). Активные фракции объединяли и концентрировали. На следующем этапе фермент наносили на колонку с носителем Superdex-75. Элюцию проводили в соответствующем буфере. Активные фракции объединяли, концентрировали и использовали для дальнейшего исследования. Для препарата rLacF была введена дополнительная стадия очистки: раствор белка диализовали против 20 мМ ЦФБ рН 5,0 и наносили на колонку с носителем Phenil Sepharose, уравновешанную 20 мМ ЦФБ+1М (NH₄)₂SO₄ рН 5,0. Элюировали 20 мМ ЦФБ рН 5,0. Наиболее активные фракции объединяли, концентрировали и использовали для дальнейшего исследования.

Схема №2 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 соответствующего буфера (для rLacD использовали 5 мМ Трис-ацетатный буфер, рН 8,0; для rLacF - 5 мМ Bis-Трис рН 6,0), наносили на колонку с носителем Source 15Q, уравновешенную соответствующим буфером. Элюцию проводили в градиенте (для rLacD - 5 мМ

Трис-ацетатный буфер pH 8,0 до 5 мМ Трис-ацетатный буфер+ 400мМ NaCl pH 8,0; для rLacF - 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 буфера pH 5,0, наносили на колонку с носителем Source 15ISO, уравновешенную 1,7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 30 мМ Na-ацетатного буфера pH 5,0. Элюировали 30 мМ Na-ацетатным буфером pH 5,0. Активные фракции объединяли, концентрировали и использовали для дальнейшего исследования.

Таблицы этапов очистки изоферментов представлены в приложении 2.

2.6.1 Определение концентрации белка

Пробы КЖ центрифугировали при 14000 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. В качестве стандарта использовали раствор БСА.

2.6.2 Электрофоретическое разделение белков

Молекулярные массы ферментов определяли методом электрофореза в денатурирующих условиях по методике Лэммли [239]. Электрофорез белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле (SDS-PAGE) на приборе Mini Protean III ("Bio-Rad", США) при постоянном напряжении 200 В. В качестве стандарта использовали смесь белков Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Литва) в диапазоне молекулярных масс 11 – 250 кДа.

Для определения ИЭТ 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).

Окрашивание белков проводили с использованием Coomassie Brilliant Blue R-250 (AppliChem, Германия).

Нативный электрофорез (зимограмма) в полиакриламидном геле проводили в тех же условиях что и SDS-PAGE, но без агентов денатурации (в т.ч. SDS) и восстановителей, а также без кипячения образцов. Затем гели промывали дистиллированной водой, помещали в 100 мМ ацетатный буфер с pH 4,5 и окрашивали 2 мМ АБТС для визуализации их активности. Реакцию останавливали промывкой гелей дистиллированной водой.

Масс-спектрометрическую идентификацию проводили методом MALDI-TOF/TOF MS спектроскопии на спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия). Для этого белковые пятна вырезали из геля после электрофоретического разделения. Образцы гликозилированных и дегликозилированных изоферментов лакказы расщепляли трипсином, полученные пептиды идентифицировали. Последовательности пептидов, индивидуально полученных из данных фрагментации, были проанализированы с помощью BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Дегликозилирование изоферментов лакказ проводили с использованием ферментов Endoglycosidase H *Streptomyces plicatus* и PNGase F *Elizabethkingia meningoseptica* (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции производителя в течение 30 мин.

2.6.3 Определение активности изоферментов

Активность изоферментов определяли спектрофотометрически на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 (США). В качестве хромогенных субстратов использовали растворы АБТС ($\lambda=436$ нм, $\epsilon=29500$ М⁻¹·см⁻¹), ПКХ ($\lambda=410$ нм, $\epsilon=740$ М⁻¹·см⁻¹), ДМФ ($\lambda=470$ нм, $\epsilon=35645$ М⁻¹·см⁻¹) феруловой кислоты ($\lambda=314$ нм, $\epsilon=12940$ М⁻¹·см⁻¹), синаповой кислоты ($\lambda=306$ нм, $\epsilon=14640$ М⁻¹·см⁻¹) и гваякола ($\lambda=464$ нм, $\epsilon=6490$ М⁻¹·см⁻¹).

При изменении pH-оптимумов использовали универсальную буферную систему Бриттона-Робинсона (смесь фосфорной, уксусной и борной кислот с концентрацией 0,1 М каждая). Буферную смесь титровали 0,2 М раствором NaOH до нужного значения pH. Для определения K_m использовали 0,1 М цитрат-

фосфатный буфер с рН 4,5. Во всех остальных случаях измерения проводили в 0,1 М натрий-ацетатном буфере с рН 4,5. За условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 мин. Удельную активность рассчитывали на 1 мг белка.

2.7 Характеристика рекомбинантных изоферментов

2.7.1 Оценка окислительно-восстановительного потенциала изоферментов лакказ

Оценку ОВП изоферментов лакказ проводили с помощью теста на обесцвечивание красителя азура Б [240]. Реакционная смесь содержала 900 мкл 2% азура Б (Sigma-Aldrich, USA), 100 мкл 10 мМ гидроксibenзотриазола (ГБТ, Sigma-Aldrich, США) в качестве медиатора, и 10 мл раствора изофермента с концентрацией 0,1 мг/мл белка. Реакцию проводили в течение 96 ч.

2.7.2 Определение каталитических параметров

Кинетические константы для каждого очищенного изофермента были определены с различными концентрациями субстратов (5-2000 мкМ для АБТС и ДМФ, 50-20000 мкМ для ПКХ, 2,5-200 мкМ для феруловой и синаповой кислот, 125-10000 мкМ для гваякола) в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере с рН 4,5 при 24°C. Начальные скорости образования продукта в реакционных смесях, содержащих изоферменты и различные субстраты, измеряли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра PerkinElmer Lambda 35 (США) на соответствующих длинах волн. Все измерения проводили в трех повторностях. Кинетические константы рассчитывались с использованием программы Origin-Lab (Northampton, MA, USA).

2.7.3 Определение субстратной специфичности изоферментов

Субстратная специфичность изоферментов определялась согласно методике, описанной в [24], со следующими модификациями: для приготовления стоковых растворов субстратов соответствующие соединения

растворяли в минимальном объеме 96% этилового спирта и доводили дистиллированной водой до необходимого объема с концентрацией 10 мМ. Исходные растворы изоферментов с концентрацией белка 0,1 мг/мл были приготовлены в деионизованной воде. Реакционная смесь (200 мкл) содержала 0,1 М натрий-ацетатный буфер (рН 4,5), 20 мкл стокового раствора субстрата (конечная концентрация в пробе 1 мМ, за исключением конго красного и индигокармина, конечная концентрация которых составляла 0,2 мМ) и 10 мкл соответствующего изофермента. В качестве контролей использовали реакцию смесь без фермента, чтобы исключить возможность неферментативного окисления. Поглощение было измерено на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 (США) при длине волны от 230 до 700 нм, после 24 ч и после 96 ч инкубирования при комнатной температуре.

2.8 Оценка потенциала изоферментов к деградации красителей

Эксперимент проводили в 96-луночном планшете. Готовили реакцию смесь (200 мкл), в которую входили: 0,1 М натрий-ацетатный буфер (рН 4,5), раствор красителя с концентрацией 2 мМ, 1 мкг изофермента и 0,1 мМ медиатора (в эксперименте без медиатора вместо него добавляли натрий-ацетатный буфер рН 4,5). В качестве контрольных образцов использовали реакцию смесь без фермента и без медиаторов, а также реакцию смесь с ферментом без медиатора.

Были использованы следующие труднодеградируемые красители: конго красный, индигокармин, бромфеноловый синий и феноловый красный. Стоковые растворы красителей (с концентрацией 10 мМ) готовили в дистиллированной воде. В качестве медиаторов были использованы следующие соединения: АБТС, ГБТ, ванилин, синаповая кислота, феруловая кислота, $K_4Mo(CN)_8$ и $K_4Fe(CN)_6$.

После обработки красителей в течение 24 ч при комнатной температуре изменение поглощения было измерено спектрофотометрически с использованием планшетного ридера Synergy 2 (BioTek Instruments Inc., США)

при следующих длинах волн: для конго красного - $\lambda=490$ нм, индигокармина - $\lambda=630$ нм, бромфенолового синего - $\lambda=630$ нм, фенолового красного - $\lambda=410$ нм.

2.9 Программное обеспечение для анализа данных

Для работы с нуклеотидными последовательностями, моделирования плазмидных конструкций и рестрикционных карт использовалась программа «Vector-NTI», version 10.1.1 Invitrogen Corporation (США).

Для определения частоты использования кодонов для *T. hirsuta* 072 были использованы последовательности CDS, доступные в электронной базе данных GeneBank. Для расчета частоты использования кодонов *P. canescens* использовали последовательности CDS штамма *P. canescens* ATCC 10419, доступные на Fungal Genomic resource MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/Penca1/Penca1.home.html>). Частоту использования кодонов рассчитывали, используя программное обеспечение, доступное на <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Для сравнения частоты использования кодонов с *A. nidulans* были использованы результаты оценки частоты использования кодонов штаммом *A. nidulans*, опубликованные в работе [241]. Полная таблица сравнения частот использования кодонов представлена в приложении 1.

Молекулярные массы и ИЭТ изоферментов рассчитывали по известным аминокислотным последовательностям с помощью сервиса ExPASy (<https://www.expasy.org/>) [242]. Сайты гликозилирования определяли с помощью сервиса NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) [243]. Построение графиков и диаграмм осуществляли в программе OriginPro (OriginLab Corporation, США) и MS Excel2007 (Microsoft Corporation, США). Для построения карты обесцвечивания красителей использовали сервис Heatmapper (www.heatmapper.ca) [244].

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аннотация генома базидиального гриба *T. hirsuta* 072 показала, что мультигенное семейство лакказ этого штамма состоит из семи генов (*lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF*, *lacG*), белковые продукты которых отличаются по предсказанным биохимическим свойствам [10,15]. Однако только два изофермента, а именно LacA и LacC, были обнаружены в культуральной среде при выращивании нативного продуцента. LacA детектировался в среде при любых условиях культивирования и был охарактеризован ранее [16–18], а LacC детектировался только на поздних стадиях культивирования в небольших количествах, недостаточных для его выделения и характеристики. Остальные изоферменты не были обнаружены [10]. Поэтому для изучения минорных представителей мультигенного семейства лакказ базидиомицета *T. hirsuta* 072 было решено получить рекомбинантные изоферменты.

Известно, что низкую продукцию рекомбинантной лакказы, как правило, связывают с нарушениями в ее посттрансляционных модификациях, проблемами включения меди в активный центр и нарушениями процесса фолдинга [167]. Поэтому важным этапом настоящего исследования являлся подбор такой экспрессионной системы, которая бы обеспечивала достаточный выход целевого фермента с правильной конформацией и структурной организацией молекул.

3.1 Выбор системы для экспрессии минорных рекомбинантных лакказ

T. hirsuta 072

Изучение литературы позволило сделать вывод, что существуют две наиболее привлекательные системы для гетерологичной экспрессии базидиальных лакказ. Одной из них являются грибы рода *Aspergillus*. Гетерологичной экспрессии базидиальных лакказ в этих грибах посвящен большой объем литературных данных и во многих случаях авторам удавалось получить успешные результаты [51,69,122,245,246]. Другой перспективной

системой для экспрессии базидиальных лакказ являются грибы рода *Penicillium*. Как отмечалось в обзоре литературы, ранее в нашей лаборатории успешно была проведена работа по гетерологичной экспрессии гена *lacA* базидиомицета *T. hirsuta* 072 в *P. canescens* [212,238].

В связи с этим, на первом этапе работы было решено сравнить эти экспрессионные системы на примере гетерологичной экспрессии мажорного *lacA* и выбрать наиболее подходящую систему для дальнейшего использования с целью получения минорных лакказ *T. hirsuta* 072. Для этого было необходимо получить продуцент гетерологичной LacA в грибах рода *Aspergillus*.

Гетерологичная экспрессия *lacA* в *Aspergillus nidulans*

Для гетерологичной экспрессии *lacA* базидиомицета *T. hirsuta* 072 был использован гриб *A. nidulans*, поскольку штаммы этого вида являются эффективными продуцентами различных гетерологичных белков грибов [204]. В качестве реципиента для получения рекомбинантного LacA был использован штамм *A. nidulans* 031 (*argB2⁻*, *pyrG89⁻*) (син. AN031) - мутант штамма мицелиального гриба *A. nidulans* FGSC #A4. Преимуществом данного штамма является то, что его геном секвенирован [247] и он не содержит гены, кодирующие лакказы *sensu stricto*. Для этого штамма также была отработана эффективная методика трансформации и отбора целевых клонов, где в качестве маркерного гена используются гены *argB* и *pyrG*, комплементирующие мутации *argB2* и *pyrG89* соответственно.

Для получения продуцента гетерологичной LacA в штамме *A. nidulans* была создана плаزمида *pGPD-lac1-A.n* с геном *lacA* (GeneBank: KP027478) базидиомицета *T. hirsuta* 072, кодирующим LacA (без сигнального пептида лакказы), под контролем сильного конститутивного промотора *gpdA* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) с сигнальным пептидом β -галактозидазы *P. canescens* (рисунок 6).

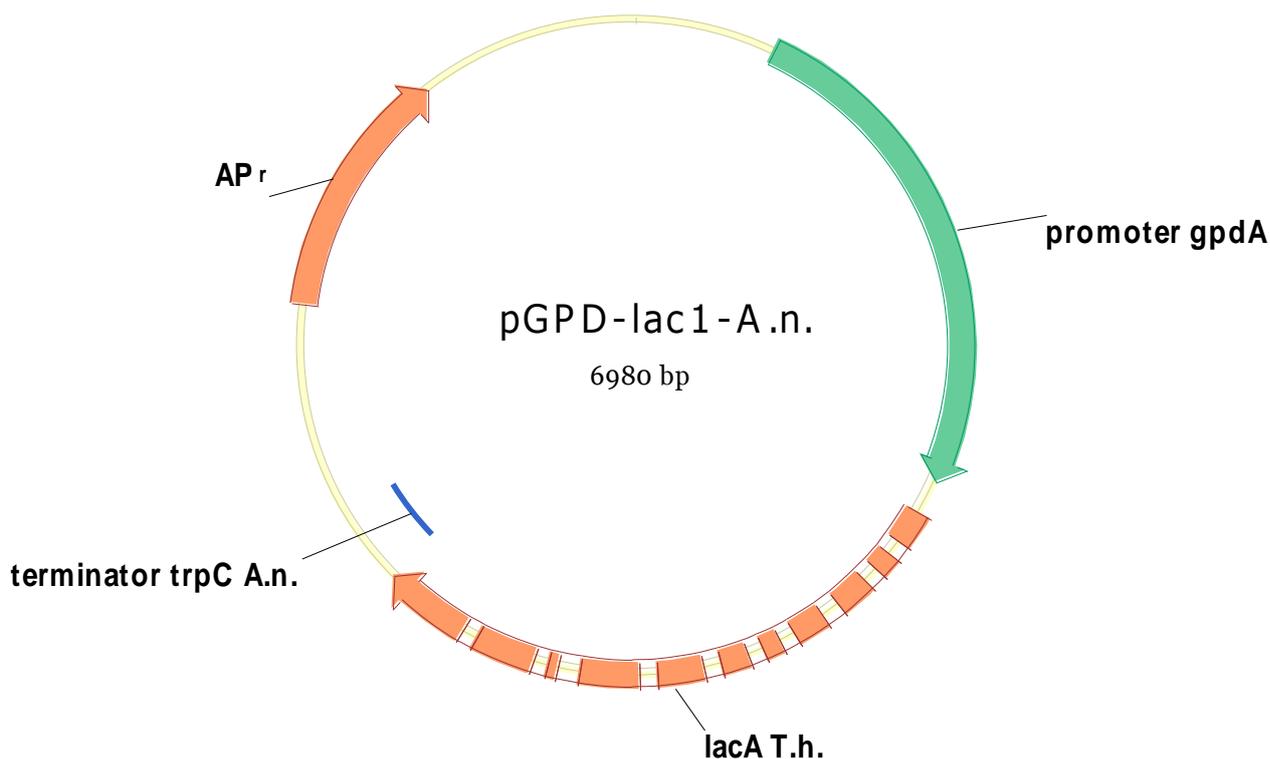


Рисунок 6 - Карта плазмиды *pGPD-lac1-A.n.*

Для этого из плазмиды pBGlac [212] с помощью рестрикции по сайтам AdeI-PaeI был вырезан фрагмент, содержащий ген *lacA T. hirsuta*; из плазмиды pPCGPDPr [248] с помощью рестрикции по сайтам KpnI-PscI был вырезан фрагмент, содержащий последовательность промотора *gpdA*; из плазмиды pPCGNX [212] по сайтам NcoI-PaeI был вырезан фрагмент сигнального пептида BgaS *P. canescens*. Полученные фрагменты лигировали в плазмидный вектор pBlueskript II KS (+) разрезанный по сайтам KpnI-AdeI. 5 мкл полученной лигазной смеси использовали для трансформации компетентных клеток штамма *E.coli* XL10 Gold. Отбор ампициллин-устойчивых клонов осуществляли на среде LB с ампициллином. Правильность сборки плазмидной конструкции проверяли с помощью рестрикционного анализа препаратов плазмидной ДНК по сайтам AdeI-PaeI и KpnI-PaeI. Правильность состыковки по сайтам PaeI/NcoI проверяли секвенированием с помощью олигонуклеотидного праймера **PCGpd_prom_seq** (см. раздел 2.4.1).

Котрансформация штамма *A. nidulans* 031 полученной плазмидой была проведена совместно с плазмидой pJR15 [249], несущей комплиментирующий ген *pyrG* *A. nidulans* с отбором на селективной среде.

Тестирование трансформантов на способность продуцировать лакказу осуществлялось путем их пересева на агаризованную питательную среду, содержащую АБТС в качестве хромогенного субстрата [11,245,250]. Колонии, вокруг которых появлялись окрашенные зоны наибольшего размера, были выбраны в качестве потенциальных продуцентов лакказы (рисунок 7). Всего было отобрано 30 колоний.

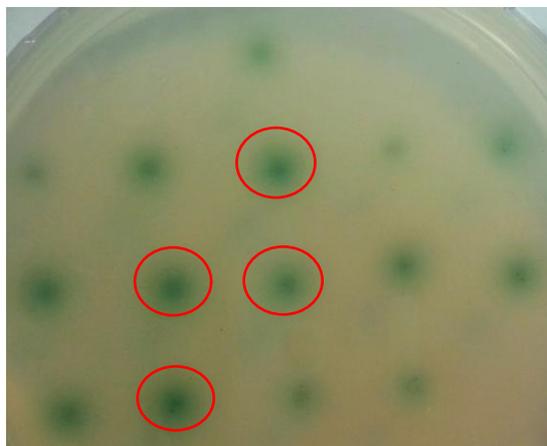


Рисунок 7 - Пример отбора трансформантов *A. nidulans* продуцентов рекомбинантной LacA (чашечный АБТС-тест). Выбранные трансформанты выделены красным

Однако этот метод служил лишь для первичного отбора трансформантов, перспективных для дальнейшего исследования. Поэтому отобранные трансформанты, потенциально продуцирующие лакказу, далее культивировали в жидкой питательной среде ММ (см. раздел 2.3.3). Наличие плазмиды с геном *lacA* у отобранных трансформантов подтверждали ПЦР с геномной ДНК, выделенной из мицелия (рисунок 8).

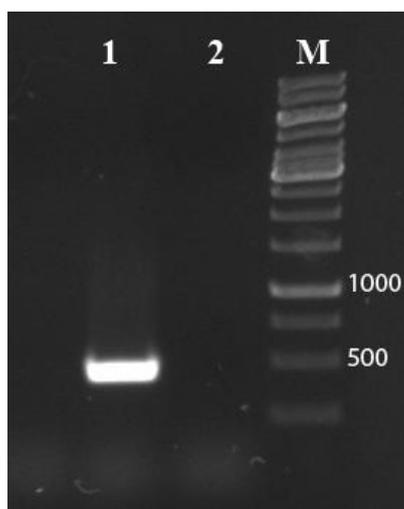


Рисунок 8 - Пример электрофореза ПЦР-фрагмента: 1- трансформант, 2- штамм-реципиент, М-маркер). Для остальных выбранных трансформантов результаты были аналогичны

Активность секретируемой лакказы в КЖ у отобранных трансформантов была низкая, оценить её количественно было возможно только при использовании АБТС в качестве субстрата. По другим характерным для лакказ субстратам (например, пирокатехину и сириггалдазину), активность отсутствовала вовсе. Максимальная активность целевого рекомбинантного фермента (ANrLacA) в КЖ по субстрату АБТС составляла 2 усл.ед./мл. Авторам других работ удавалось добиться бóльшей активности гетерологичной лакказы в грибах *Aspergillus*. Например, активность рекомбинантной лакказы *P. cinnabarinus*, полученной в *A. niger*, составляла 7 усл. ед./мл [69], а активность лакказы *Trametes sp.* С30, экспрессированной в аскомицетах *A. niger*, достигала 42 усл. ед./мл [211]. Таким образом, можно заключить, что активность лакказы, полученной нами в *A. nidulans*, была достаточно низкой. Однако следует отметить, что величина активности лакказы, полученной в вышеописанном эксперименте, соотносилась с активностью рекомбинантной лакказы *T. versicolor*, полученной в *A. niger* (2,7 усл. ед./мл) [245] и активностью рекомбинантной лакказы *T. villosa*, полученной в *A. oryzae* (3 усл. ед./мл) [11] (все приведённые выше данные были получены при использовании АБТС в качестве субстрата).

Следует учесть, что для гетерологичной лакказы *A. T. hirsuta* 072 (rLacA), полученной в нашей лаборатории ранее в *P. canescens*, активность была гораздо выше (до 160 усл. ед./мл КЖ по АБТС). При этом выход белка составлял 10-20 мг/л [212]. Такой выход позволил выделить rLacA в достаточном количестве, получить ее 3D структуру (PDB code: 5LDU) и изучить свойства, что также является преимуществом этой экспрессионной системы. При этом сравнение структур rLacA и нативной LacA (PDB code: 3FPX) [16] показало, что rLacA отличалась лишь меньшей заселенностью ионами меди центра T2 и наличием дополнительного сайта гликозилирования. Сравнение биохимических и каталитических свойств LacA и rLacA показало их сходство [238].

Сравнение структур нативного и рекомбинантного фермента, а также сравнительный анализ их биохимических свойств, на сегодняшний день является одним из самых перспективных подходов для выявления возможных проблем, возникающих при гетерологичной экспрессии белка. Подобный полный анализ был выполнен для лакказы аскомицета *M. albomyces* [37,63,251–253], где нативный и рекомбинантный ферменты также показали похожие свойства и 3D структуры. Но, как уже было отмечено в обзоре литературы, лакказа из аскомицета *M. albomyces* была экспрессирована в *T. reesei*, который также является аскомицетом. Примечательно, что в случае гетерологичной экспрессии базидиальной лакказы *T. hirsuta* в аскомицете *P. canescens* было показано близкое сходство рекомбинантного белка с нативным. Это позволяет сделать вывод, что механизмы фолдинга и посттрансляционных модификаций, свойственных *P. canescens*, подходят для экспрессии изоферментов лакказ *T. hirsuta*. Учитывая тот факт, что при экспрессии *lacA* проверенная система на основе *A. nidulans* не показала лучшего результата по сравнению с системой *P. canescens*, для гетерологичной экспрессии минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 нами был сделан выбор в пользу экспрессионной системы на основе *P. canescens*.

3.2 Создание продуцентов минорных лакказ

3.2.1 Клонирование генов лакказ и создание плазмидных конструкций

На основе известных последовательностей ДНК и мРНК генов, кодирующих изоферменты лакказ *T. hirsuta* 072, была разработана схема клонирования генов *lacB* (GenBank: KP027484.2), *lacC* (GenBank: KP027479.1), *lacD* (GenBank: KP027480.1), *lacE* (GenBank: KP027481.1), *lacF* (GenBank: KP027482.1) и *lacG* (GenBank: KP027483.1), включающая следующие этапы:

1. Получение ПЦР-фрагментов (геномных и кДНК копий) генов *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF*, *lacG*;
2. Обработка полученных ПЦР-фрагментов специфичными эндонуклеазами;
3. Последующее клонирование ПЦР-фрагментов в экспрессионный вектор pPCGNX, расщепленный специфичными эндонуклеазами.

Данная схема позволила соединить ПЦР-фрагменты кодирующих областей генов лакказ с промотором гена *bgaS* β -галактозидазы без изменения нуклеотидной последовательности промоторной области гена *bgaS* и сигнального пептида генов лакказ.

Получение ПЦР-фрагментов генов лакказ

Для амплификации генов лакказ были синтезированы олигонуклеотидные праймеры с введенными сайтами рестрикции Eco31I, BamHI, XhoI, NcoI, PscI, PstI, Bsp1407I, Pfl23II (см. таблицу 6 п. 2.4.2). Была проведена ПЦР с градиентом температур отжига для каждого гена и выбраны оптимальные условия.

Из-за того, что нуклеотидная последовательность гена *lacB* содержала дополнительный сайт рестрикции Eco31I, использованный нами для дальнейшего клонирования в вектор, ПЦР-фрагменты 5'- и 3'- кодирующей области получали отдельно. Затем их обрабатывали эндонуклеазами с последующим одновременным клонированием в экспрессионный вектор pPCGNX.

Для клонирования 5'- области гена *lacB* необходимо было изменить 6 нуклеотидов в 5'-нетранслируемой области. Было решено использовать для

этого две последовательные ПЦР, где часть нуклеотидов изменялась в ПЦР №1, а после очистки смеси от праймеров, проводилась ПЦР №2 с праймером, изменяющим оставшиеся нуклеотиды (см раздел 2.4.2).

Электрофореграммы полученных ПЦР-фрагментов генов лакказ *lacB-G* приведены на рисунке 9. Полученные ПЦР-фрагменты были отсеквенированы. Таким образом, были получены фрагменты, содержащие гены *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF*, *lacG*, как интронированные, так и неинтронированные, в количестве, достаточном для последующего клонирования.

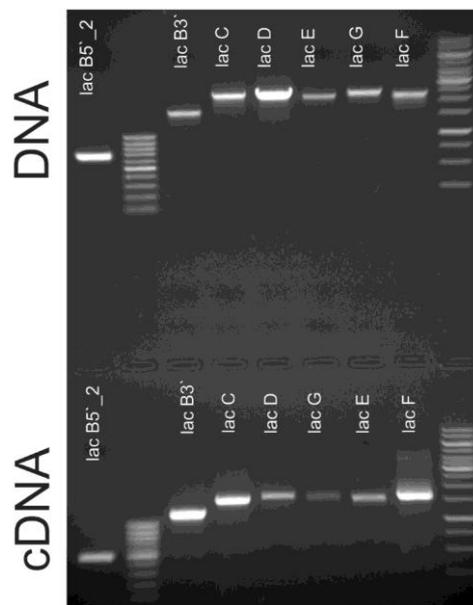


Рисунок 9 – Электрофореграммы ПЦР-фрагментов генов лакказ

Клонирование в вектор pPCGNX и секвенирование

Очищенные с использованием «Gel Extraction Kit» фрагменты были обработаны соответствующими рестриктазами (таблица 9) и клонированы в вектор pPCGNX (рисунок 10), также обработанный соответствующими эндонуклеазами.

Схема клонирования представлена в таблице 10. Лигазная смесь была трансформирована в клетки *E. coli*. По меньшей мере, по 5 клонов для каждого гена были выращены на жидкой среде LB в присутствии селективного антибиотика ампициллина, после чего из них была выделена плазмидная ДНК.

Таблица 9 - Рестрикция ПЦР-фрагментов, полученных с ДНК и с кДНК

ПЦР-фрагмент ДНК, мРНК	Эндонуклеаза 1	Эндонуклеаза 2
5`-lacB, lacBc	Eco31I	BamHI
3`-lacB, lacBc	BamHI	XhoI
lacC, lacCc	NcoI	XhoI
lacD, lacDc	PscI	XhoI
lacE, lacEc	PagI	XhoI
lacF, lacFc	NcoI	Bsp1407I
lacG, lacGc	NcoI	Pfl23II

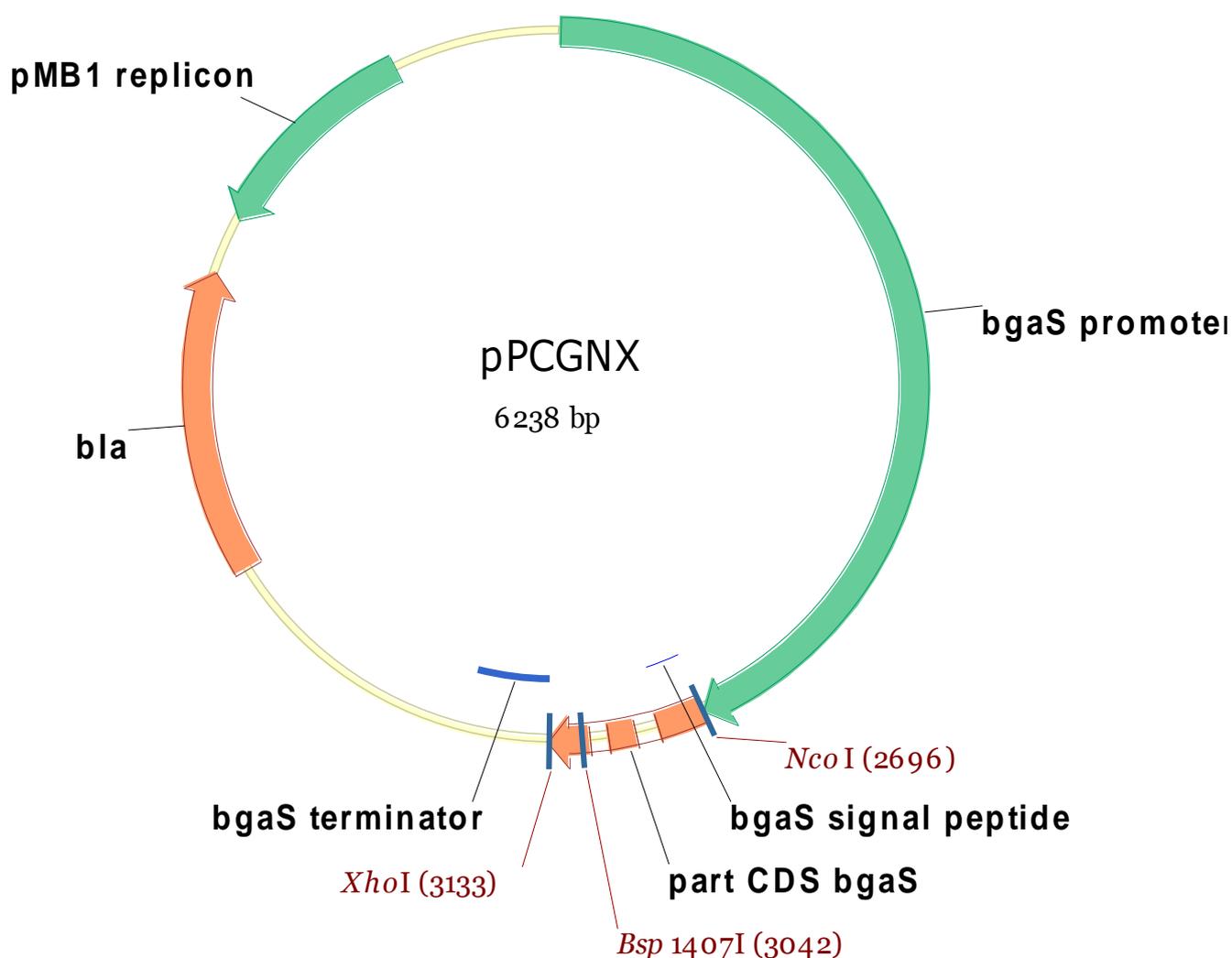


Рисунок 10 - Карта плазмиды pPCGNX

Плазмиды были очищены с использованием «PCR purification Kit» и затем секвенированы с прямого праймера **BGASD** на промотор гена *bgaS* *P. canescens*.

Плазмиды, не имеющие ошибок после первого сиквенса, были секвенированы с обратного праймера **BGASRS**. Далее отобранные плазмиды были секвенированы с праймеров на внутренние области генов лакказ (см. таблицу 7 п. 2.4.2).

Таблица 10 - Схема клонирования генов лакказ в экспрессионный вектор

Фрагмент вектора	ПЦР-фрагмент 1	ПЦР-фрагмент 2	Полученные плазмиды
pPCGNX/NcoI-XhoI	B5' lacB/Eco31I-BamHI (650 пн)	B3' lacB/BamHI-XhoI (1600 пн)	pLacB
pPCGNX/NcoI-XhoI	B5' lacBc/Eco31I-BamHI (450 пн)	B3' lacBc/BamHI-XhoI (1200 пн)	pLacBc
pPCGNX/NcoI-XhoI	lacC/NcoI-XhoI	-	pLacC
pPCGNX/NcoI-XhoI	lacCc/NcoI-XhoI	-	pLacCc
pPCGNX/NcoI-XhoI	lacD/PscI-XhoI	-	pLacD
pPCGNX/NcoI-XhoI	lacDc/PscI-XhoI	-	pLacDc
pPCGNX/NcoI-XhoI	lacE/PagI-XhoI	-	pLacE
pPCGNX/NcoI-XhoI	lacEc/PagI-XhoI	-	pLacEc
pPCGNX/NcoI-Bsp1407I	lacF/ NcoI-Bsp1407I	-	pLacF
pPCGNX/NcoI-Bsp1407I	lacFc/ NcoI-Bsp1407I	-	pLacFc
pPCGNX/NcoI-Bsp1407I	lacG/ NcoI- Bsp1407I	-	pLacG
pPCGNX/NcoI-Bsp1407I	lacGc/ NcoI-Bsp1407I	-	pLacGc

В результате, было отобрано по 2 плазмиды (несущие интронированную и неинтронированную последовательность соответственно) для каждого гена лакказы для дальнейшей трансформации в *P. canescens* (таблица 11).

Таблица 11- Плазмиды, отобранные для дальнейшей трансформации

Название гена	Название плазмиды	
	С интронами	Без интронов
<i>lacB</i>	placB3	placBc2
<i>lacC</i>	placC5	placCc1
<i>lacD</i>	placD4	placDc2
<i>lacE</i>	placE6	placEc2
<i>lacF</i>	placF1	placFc3
<i>lacG</i>	placG8	placGc2

Таким образом, плазмиды, несущие последовательности *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF*, *lacG* соответственно, были сконструированы и далее использованы для трансформации в штамм *P. canescens* PCA-10 (*niaD*⁻).

3.2.2 Трансформация *P. canescens*, анализ активности и уровня экспрессии целевых белков

Плазмиды, представленные в таблице 11, несущие целевые последовательности с промотором гена *bgaS* *P. canescens* и терминатором транскрипции *bgaS* *P. canescens*, были введены в геном *P. canescens* PCA-10 (*niaD*⁻) путем котрансформации в протопласты [254] совместно с плазмидой pSTA10 [255], несущей комплементирующий ген *niaD* *A. niger*. Трансформанты, содержащие соответствующие плазмиды, были отобраны на селективной среде, содержащей нитрат натрия в качестве источника азота.

Тестирование трансформантов на способность продуцировать лакказу осуществляли экспресс-методом (см. раздел 3.1) на агаризованной среде MS, в которую был добавлен АБТС в качестве хромогенного субстрата. Колонии, образующие окрашенную область наибольшего размера, были выбраны в качестве потенциальных продуцентов целевых изоферментов (рисунок 11). Из каждой группы было отобрано 30 трансформантов.

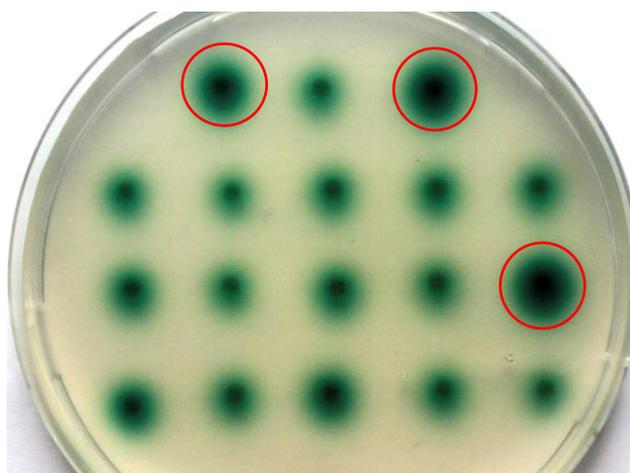


Рисунок 11 - Пример отбора штаммов *P. canescens* продуцентов изоферментов лакказы (чашечный АБТС-тест). Выбранные трансформанты выделены красным

Таким образом, был получен ряд трансформантов, потенциально способных продуцировать изоферменты лакказы *T. hirsuta* 072. Отобранные трансформанты культивировали в жидкой питательной среде MS. Активность целевых изоферментов в КЖ измеряли спектрофотометрически, используя субстраты ПКХ и АБТС. Было показано, что у штаммов, содержащих плазмиды с интронированными последовательностями целевых генов, лакказная активность отсутствовала или была очень низкая по сравнению со штаммами, содержащими плазмиды с неинтронированными последовательностями.

В работе [256], например, при гетерологичной экспрессии лакказы *G. lucidum* также лучший результат был получен при использовании неинтронированной последовательности целевого гена. Таким образом, в настоящем исследовании для дальнейшего изучения были выбраны штаммы, содержащие плазмиды с неинтронированными последовательностями целевых генов. При этом продуценты *rLacC*, *rLacD* и *rLacF* были условно обозначены как «высокопродуктивные» (отбирались по максимальной активности по ПКХ) по сравнению с остальными, «низкопродуктивными» (отбирались по максимальной активности по АБТС, так как активность по ПКХ была очень низкая или отсутствовала) (таблица 12).

Таким образом, для продуцентов rLacC, rLacD и rLacF максимальная активность соответствующих изоферментов была существенно выше по сравнению с активностями продуцентов rLacB, rLacE и rLacG. Следует отметить, что при получении рекомбинантного rLacA наибольшая активность продуцента этого изофермента на данном этапе была на уровне ~4-6 усл. ед./мл по ПКХ.

Таблица 12 - Активность отобранных штаммов. Цветом выделены штаммы, выбранные для дальнейшей работы

Ген	Название штамма	Активность, усл. ед./мл	
		по ПКХ	по АБТС
«Высокопродуктивные»			
<i>lacC</i>	<i>P. canescens</i> Cc1(25)5	3	92
	<i>P. canescens</i> Cc1(25)24	6,1	176
	<i>P. canescens</i> Cc1(25)25	6,5	190
<i>lacD</i>	<i>P. canescens</i> Dc2(6)20	2	78
	<i>P. canescens</i> Dc2(6)22	2,4	89
	<i>P. canescens</i> Dc2(6)23	3,44	104
<i>lacF</i>	<i>P. canescens</i> Fc3(5)2	4,8	72
	<i>P. canescens</i> Fc3(5)22	6,2	144
	<i>P. canescens</i> Fc3(5)27	6,5	150
«Низкопродуктивные»			
<i>lacB</i>	<i>P. canescens</i> Bc2(6)2	0	1
	<i>P. canescens</i> Bc2(6)22	0	1,5
	<i>P. canescens</i> Bc2(6)23	0	1
<i>lacE</i>	<i>P. canescens</i> Ec2(8)13	0	0,1
	<i>P. canescens</i> Ec2(8)22	0	0,25
	<i>P. canescens</i> Ec2(8)28	0	0,2
<i>lacG</i>	<i>P. canescens</i> Gc2(4)9	0,14	4,5
	<i>P. canescens</i> Gc2(4)12	0,12	3,2
	<i>P. canescens</i> Gc2(4)19	0,11	2

Для отобранных трансформантов был проведен качественный анализ транскрипции генов минорных гетерологичных лакказ по наличию ПЦР-продукта с кДНК. Для всех минорных лакказ было показано наличие РНК-продуктов (рисунок 12).

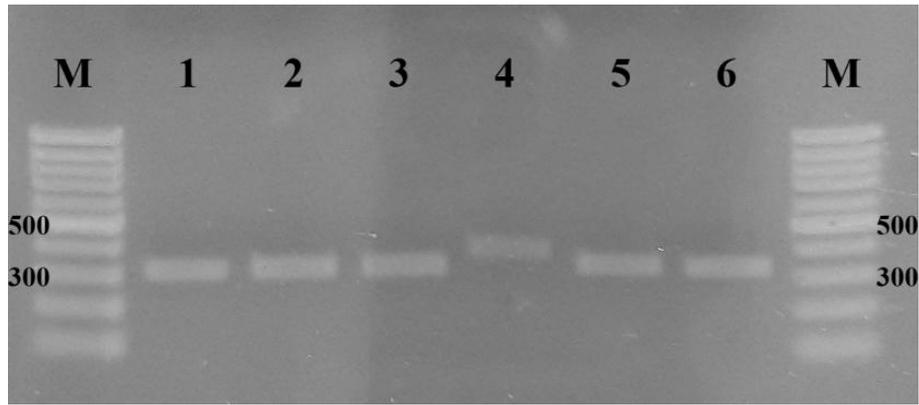


Рисунок 12 - ПЦР-фрагменты с кДНК (1-*lacB*, 2-*lacC*, 3-*lacD*, 4-*lacE*, 5-*lacF*, 6-*lacG*)

Уровень экспрессии генов, кодирующих изоферменты лакказ, был также изучен с помощью количественной ПЦР в реальном времени с применением геноспецифических праймеров (см. таблицу 8 п.2.4.2). Данные нормализованы по отношению к генам внутреннего контроля (рисунок 13).

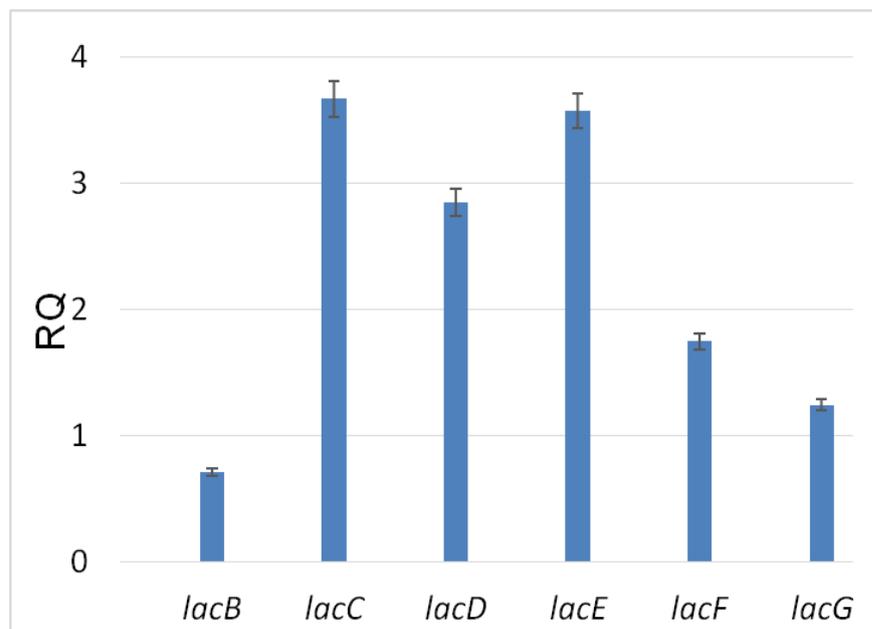


Рисунок 13 - Уровни транскрипции целевых генов, определенные в штаммах *P. canescens* с помощью ПЦР-РВ относительно генов внутреннего контроля.

Была показана экспрессия всех целевых генов, но на разном уровне. Наибольшая экспрессия наблюдалась для генов *lacC* и *lacE*, однако при этом лакказная активность в КЖ продуцента гLacC была существенно выше, чем активность в КЖ продуцента гLacE. Наименьшая экспрессия была показана для

генов *lacB* и *lacG*, причем для продуцентов этих изоферментов также была показана низкая лакказная активность в КЖ.

Таким образом, было показано, что данная экспрессионная система эффективна с точки зрения экспрессии целевых изоферментов (получение мРНК-копий). Однако уровни экспрессии не коррелируют с активностью соответствующего фермента в КЖ.

3.3 Оптимизация условий культивирования трансформантов

Известно, что продукция рекомбинантных белков может зависеть от многих факторов, в том числе от условий культивирования продуцента. Так как в условиях культивирования, использованных ранее для *rLacA* [212], у продуцентов *rLacB*, *rLacE* и *rLacG* по сравнению с остальными выход целевых белков был существенно ниже, было проведено изучение влияния таких факторов, как концентрация ионов меди в среде и исходный pH среды на продукцию целевых ферментов, а также определение оптимального времени культивирования.

3.3.1 Концентрация меди в среде

Одним из простых методов для стимуляции синтеза лакказы и увеличения ее активности является добавление в среду ионов меди [110,257], как правило, в виде CuSO_4 . Однако в слишком высокой концентрации ионы меди чрезвычайно токсичны для микробных клеток, в первую очередь, из-за способности участвовать в образовании гидроксильных радикалов, приводящих к разрушению клеточных структур [258,259]. Поэтому подбор оптимальной концентрации ионов меди в среде является важным этапом оптимизации условий культивирования продуцента лакказы.

В настоящей работе было проведено определение оптимальной концентрации CuSO_4 в среде, чтобы избежать ингибирования роста гриба и одновременно стимулировать продукцию целевых ферментов в активной форме (таблица 13).

Таблица 13 - Активность лакказ в КЖ по субстрату АБТС при разных концентрациях CuSO_4 в среде

Концентрация CuSO_4 в среде, мМ	Активность лакказы, усл.ед/мл					
	rLacB	rLacC	rLacD	rLacE	rLacF	rLacG
0,001	0	65	62	0	51	1
0,25	1	150	88	0	104	2,1
0,5	1,5	190	104	0,25	150	4,5
1	0,5	146	92	0,1	85	1,2
2	0	50	38	0	23	0

Было показано, что максимальная активность всех целевых изоферментов наблюдали при использовании 0,5 мМ CuSO_4 . При бóльших концентрациях CuSO_4 в среде активность штаммов уменьшалась, а при использовании 2 мМ замедлялся рост культуры. При концентрациях менее 0,5 мМ активность фермента падала.

3.3.2 Продолжительность культивирования

Оптимальную продолжительность культивирования штаммов определяли в течение 8 суток. Выбиралось такое время культивирования, чтобы активность секретируемых изоферментов лакказ была максимальная. Для удобства сравнения активностей изоферментов был выбран более «чувствительный» субстрат - АБТС. На рисунке 14 изображен график зависимости ферментативной активности штаммов от продолжительности культивирования. Из рисунка видно, что для rLacC, rLacD и rLacF наблюдалось существенное увеличение активности после 4 суток культивирования вплоть до 8 суток. Однако после 6 суток культивирования у всех штаммов наблюдался интенсивный автолиз клеток, поэтому в качестве оптимального времени культивирования продуцентов для выделения целевых изоферментов было выбрано 6 суток (144 ч). На 6 сутки активность изоферментов rLacC и rLacF в КЖ достигала значений на уровне активности rLacA (160-200 усл.ед./мл по АБТС), активность rLacD была примерно в полтора раза ниже. Для rLacB и rLacE активность сохранялась на низком уровне в течение всего периода

культивирования. Интересно, что для rLacG к 8 суткам культивирования было небольшое увеличение активности (до 19 усл.ед./мл по АБТС), однако этот уровень активности все равно был существенно ниже по сравнению с rLacC, rLacD и rLacF.

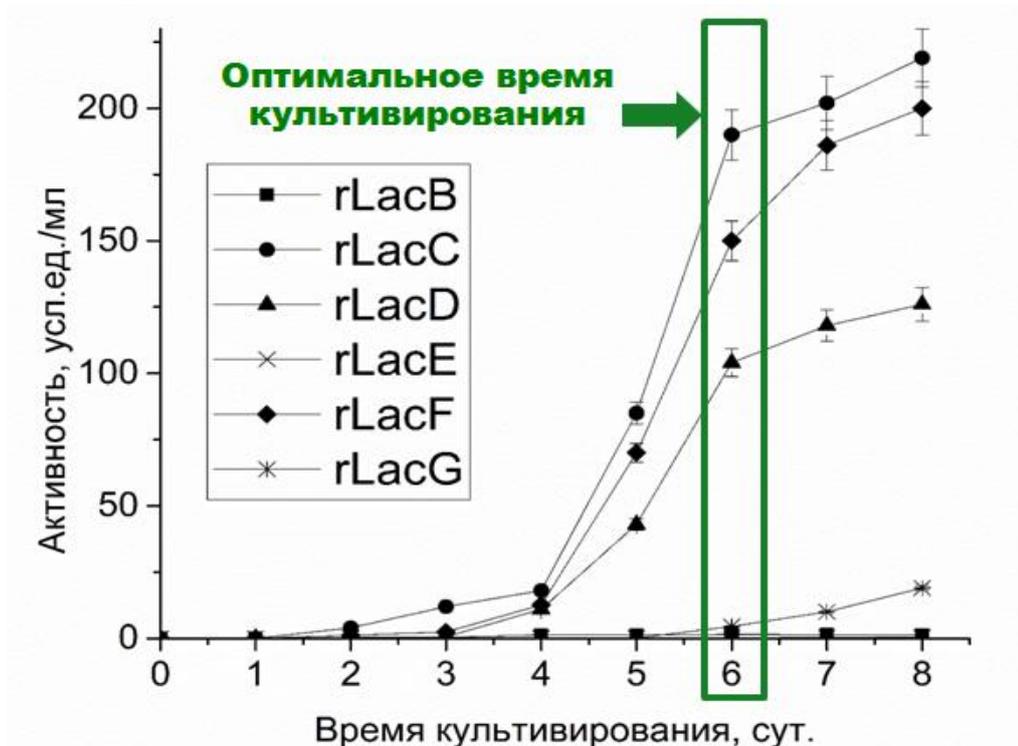


Рисунок 14 - График зависимости ферментативной активности штаммов от времени культивирования. В качестве субстрата использован АБТС

3.3.3 pH среды

Был проведен подбор оптимального исходного значения pH среды для культивирования продуцентов с использованием трех начальных значений pH - 4,6; 5,6; 7,0 (таблица 14).

Таблица 14 - Активности изоферментов в КЖ при разных исходных pH (на 6 сутки культивирования)

Лакказа	Активность лакказы, по АБТС, усл.ед./мл		
	pH 4,6	pH 5,6	pH 7,0
rLacB	1,5	1	0
rLacC	190	152	46
rLacD	104	96	13
rLacE	0,25	0	0
rLacF	150	150	33
rLacG	4,5	1,2	0

Наибольшая активность целевых белков наблюдали при рН 4,6 для всех изоферментов. Этот результат соответствует литературным данным, так как в проведенных ранее исследованиях было показано, что оптимальные значения рН среды для грибных лакказ находятся в диапазоне рН от 4 до 6 [70].

3.4 Поиск факторов, лимитирующих продукцию изоферментов лакказ

3.4.1 Динамика изменения рН в процессе культивирования

Поскольку для трёх изоферментов была показана очень низкая активность в КЖ, для определения наличия корреляции между активностью изоферментов и изменением рН в процессе культивирования было проверено изменение рН среды в процессе культивирования (рисунок 15).

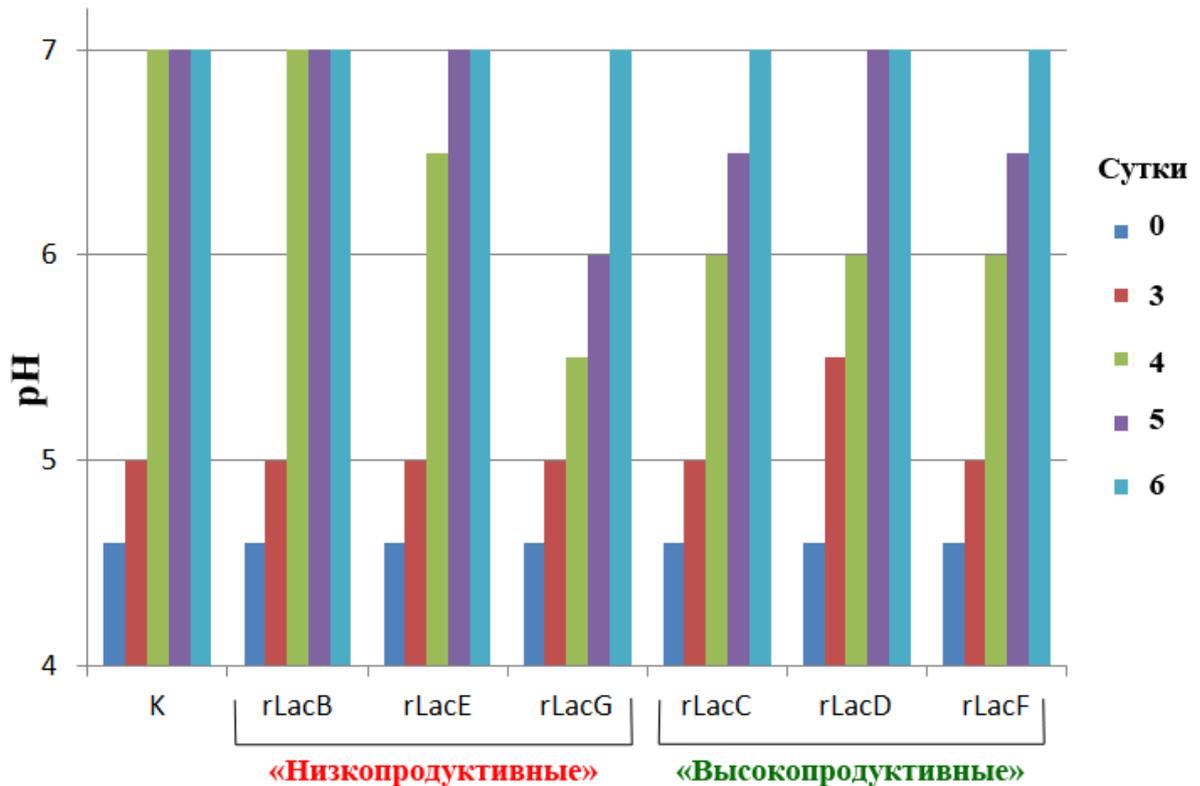


Рисунок 15 - Диаграмма изменения рН среды во время роста культуры (К - отрицательный контроль)

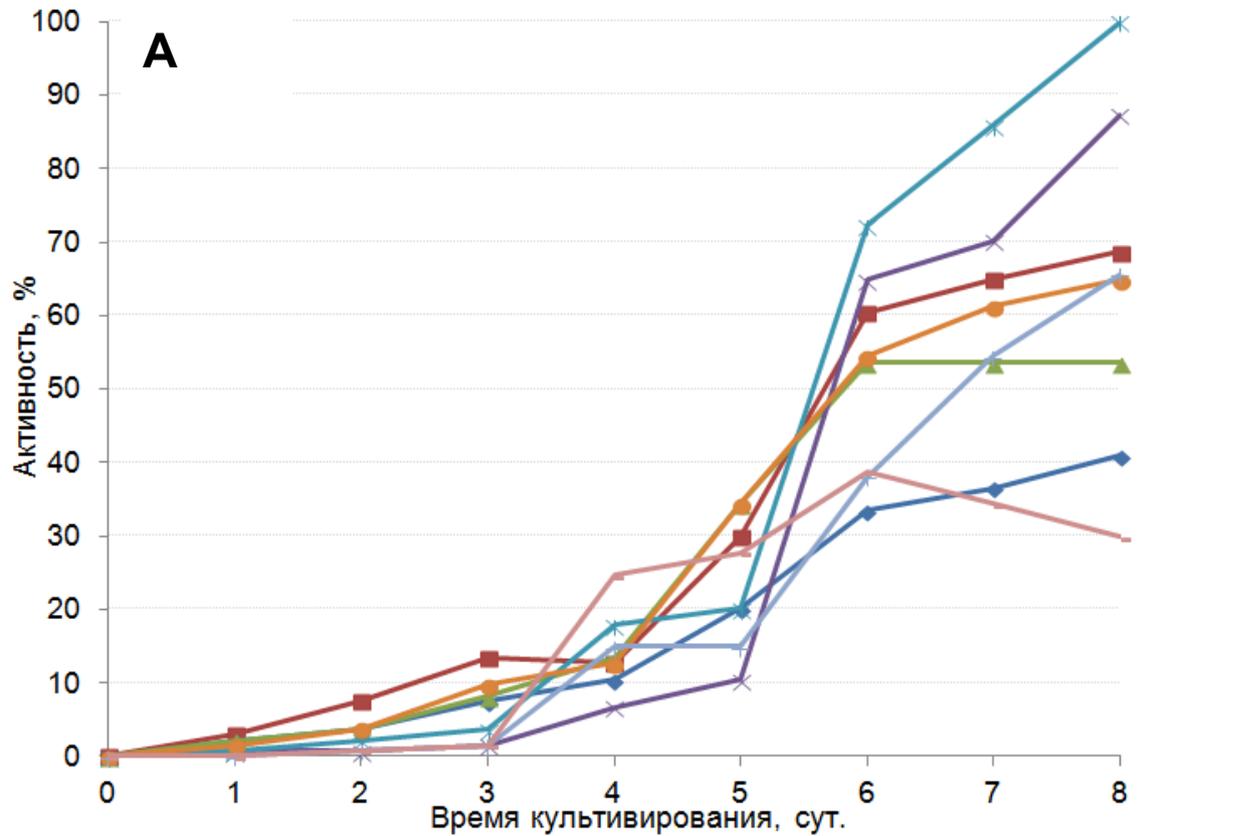
В качестве отрицательного контроля был использован штамм-реципиент, не содержащий генов лакказ, выращенный в тех же условиях, что и продуценты лакказ. Было показано, что у продуцента rLacB динамика изменения рН в процессе культивирования полностью совпадала с контрольным штаммом. Это

может свидетельствовать о том, что в КЖ отсутствует белковый продукт гена *lacB*. Для остальных штаммов наблюдали некоторые различия в скорости увеличения рН, однако к 6 суткам значение рН среды составляло около 7,0 для всех исследуемых штаммов. Интересно, что для продуцента *гLacE* динамика изменения рН во времени была также близка к контрольному штамму (различие было только на 4 сутки на 0,5 ед.) Для этого штамма была также показана низкая активность лакказы. При этом следует отметить, что на 3 сутки культивирования рН КЖ продуцента *гLacD* был на 0,5 единиц выше по сравнению со всеми остальными штаммами, т.е. этот продуцент отличала более высокая скорость защелачивания среды. Известно, что защелачивание среды в процессе культивирования характерно для мицелиальных грибов рода *Penicillium* и связано с дезаминированием аминокислот и последующим образованием аммиака [260].

Таким образом, несмотря на то, что для поддержания рН среды была использована буферная система (цитрат-фосфатный буфер рН 4,6 в нулевой точке), было показано, что в процессе культивирования все штаммы, включая контрольный, защелачивают среду до рН 7,0.

3.4.2 Протеолитическая активность

Одной из основных проблем, которые часто возникают при экспрессии гетерологичных белков мицелиальными грибами, является протеолитическая деградация целевого белка в культуральной среде секретлируемыми протеазами реципиента [261,262]. Поэтому для всех полученных штаммов-продуцентов минорных изоферментов, а также для ранее полученного продуцента *гLacA*, была измерена общая протеолитическая активность (ОПА) и активность кислых протеаз (АКП) в сравнении с реципиентом (рисунок 16).



◆ K ■ LacA ▲ LacB ✕ LacC * LacD ● LacE + LacF □ LacG

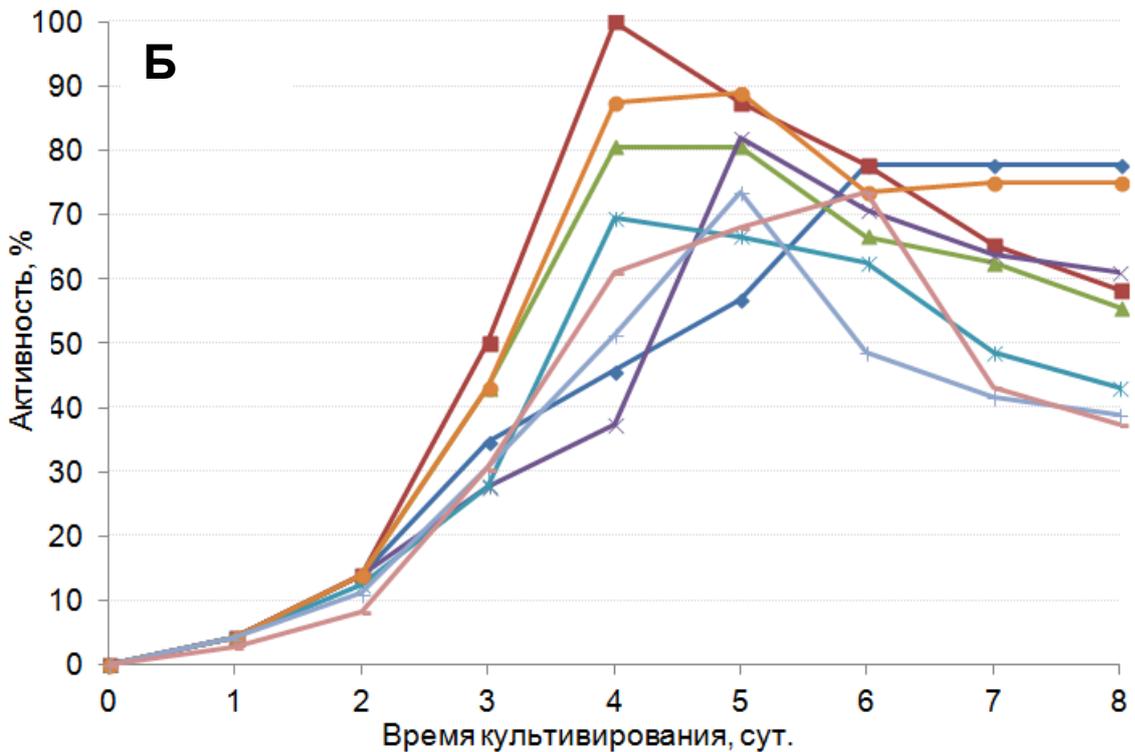


Рисунок 16 – Зависимость общей протеолитической активности (А) и активности кислых протеаз (Б) штаммов *P. canescens* от продолжительности культивирования

Из данных, приведённых на рисунке 16 (А) следует, что для штаммов-продуцентов rLacA, rLacC, rLacD и rLacF наблюдался резкий скачок ОПА между 5 и 6 сутками культивирования (для продуцента rLacA - в 2 раза, rLacC - в 6,5 раз, rLacD - 3,5 раза и rLacF - 2,5 раза). Однако для штаммов-продуцентов rLacB, rLacE и rLacG этот скачок наблюдался значительно раньше: для продуцентов rLacB и rLacE между 4 и 5 сутками культивирования (в 2,6 раз для обоих штаммов), а для rLacG между 3 и 4 сутками (в 16 раз). При этом для всех штаммов, включая реципиент, с увеличением времени культивирования происходило увеличение ОПА (для реципиента наиболее плавно). Исключениями являются штамм-продуцент rLacB, у которого ОПА после 6 суток не изменялась, и штамм-продуцент rLacG, у которого ОПА после 6 суток падала.

Следует отметить, что кривая изменения ОПА для rLacG наиболее близка к кривой изменения ОПА реципиента.

Таким образом, максимальная ОПА на 6 сутки была показана для трех продуцентов с наибольшей лакказной активностью - rLacA, rLacD, rLacC, и двух с наименьшей – rLacB и rLacE. В случае последних двух изоферментов отсутствие лакказной активности в КЖ можно объяснить бóльшей чувствительностью этих изоферментов к протеолитическому разложению белка, поскольку для этих двух изоферментов ранее было предсказано меньше сайтов гликозилирования (6 потенциальных сайтов гликозилирования для обоих изоферментов) по сравнению с остальными изоферментами (8, 11 и 10 для LacA, LacC и LacD соответственно) [10]. Как известно, углеводный фрагмент играет важную роль в защите лакказы от влияния внешних факторов, в т.ч. протеолитических ферментов разного типа [55].

Из данных, приведённых на рисунке 16 (Б) следует, что наибольшая АКП для штаммов-продуцентов rLacA и rLacD наблюдалась на 4 сутки культивирования, для продуцентов rLacB, rLacC, rLacE и rLacF - на 5 сутки культивирования, а для штамма-реципиента и продуцента rLacG - на 6 сутки. Причем для штамма-реципиента и продуцента rLacE после 6 суток АКП не

изменялась, а для остальных штаммов падала. Поскольку рН оптимум кислых протеаз находится в диапазоне 2,0-5,0 ед., падение АКП хорошо согласуется с данными, полученными в ходе изучения динамики изменения рН в процессе культивирования продуцентов, которые показывали, что на 4-5 сутки рН среды всех исследованных штаммов уже больше 5,0. Таким образом, падение АКП обусловлено защелачиванием среды.

Что касается гLacG, то, вероятно, из-за падения ОПА и АКП в КЖ этого штамма после 6 суток нам удалось зафиксировать некоторое увеличение активности лакказы. Однако из-за того, что к этому времени культура была в значительной степени автолизирована, увеличение активности было небольшое.

3.4.3 Изучение частоты использования кодонов для *P. canescens*

Поскольку нам не удалось однозначно выявить лимитирующие факторы на этапе секреции белка и подобрать условия для увеличения продукции (активности) изоферментов гLacB, гLacE и гLacG, было сделано предположение, что одной из возможных причин низкой продукции изоферментов являются проблемы при трансляции белка. Как уже упоминалось в обзоре литературы, некоторые исследователи связывают отсутствие или малое количество целевого белкового продукта при гетерологичной экспрессии лакказ с различиями в частоте использования кодонов у нативного продуцента и штамма-реципиента [166,263–265].

Известно, что частота использования синонимичных кодонов между организмами варьируется. В то же время этот выбор более или менее постоянен в разных генах одного генома. В работе [264] было показано, что выход целевого белка при гетерологичной экспрессии лакказы *T. versicolor* в *Cryptococcus* sp. S-2 был в 143 раза выше, чем при экспрессии в *P. pastoris*. Авторы показали, что у *Cryptococcus* sp. S-2 частота использования кодонов совпадала с *T. versicolor*, в то время как для *P. pastoris* предпочтительными являлись альтернативные кодоны для некоторых аминокислот.

В настоящей работе был проведен анализ частот использования различных кодонов для *P. canescens*. Полученные данные сравнивали с частотами использования кодонов для *T. hirsuta* 072 (полные данные представлены в приложении 1). При анализе полученных данных были выявлены существенные отличия, особенно для генов *lacB* и *lacE*, перечисленные в таблице 15. Больше всего отличий было показано для последовательностей, кодирующих изоферменты LacB и LacE. Для продуцентов этих белков также были показаны наиболее низкие активности лакказы в КЖ.

Таблица 15 - Наиболее часто используемые кодоны для *T. hirsuta* по сравнению с *P. canescens* (частота использования кодонов выражена в процентах от общего количества для всех кодонов, кодирующих конкретную аминокислоту)

А.к.	Ала	Гли	Гис	Глу	Вал	Лей	Лиз	Иле	Тре
<i>P. canescens</i>	GCC	GGC	CAC	CAG	GTC	CTC	AAG	ATC	ACC
<i>T. hirsuta</i>	GCA	GGT	CAT	CAA	GTG	CTA	AAA	ATT	ACA/ACT
<i>lacB</i>	43%	42%	63%	69%	47%	23%	65%	-	-
<i>lacE</i>	37%	36%	53%	-	-	-	-	50%	29%
<i>lacG</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	33%

Известно, что предпочтительные для нативного продуцента кодоны, содержащиеся в последовательности, кодирующей целевой белок, в зависимости от их положения и их количества у реципиента могут вызывать паузы в трансляции [166]. Кроме того, из-за наличия областей, содержащих тандемы редких для *P. canescens* кодонов, эффективность трансляции белка может еще больше снижаться [266]. Таким образом, знание частоты использования кодонов в геноме имеет важное значение для преодоления этих проблем и позволяет проводить изменение последовательности гена путем замены кодонов на предпочтительные для используемого реципиента. Так, например, при гетерологичной экспрессии лакказы *M. thermopila* в *S. cerevisiae* замена кодонов на часто используемые в этой системе улучшила продукцию рекомбинантной лакказы восьмикратно [66].

Несмотря на то, что метод оптимизации кодонов является трудоемким, предполагается, что оптимизация кодонов в последовательностях, кодирующих целевые изоферменты, в дальнейшем может позволить не только получить изоферменты rLacB, rLacE и rLacG, необходимые для полной характеристики всех представителей мультигенного семейства лакказ, но также способствовать увеличению выходов остальных трех изоферментов с перспективой их получения в промышленных масштабах. Однако есть опасения, что в случае успешного увеличения продукции рекомбинантной лакказы после оптимизации кодонов у целевого фермента могут измениться свойства. Так, в работе [267] последовательность, кодирующая лакказу Lac3 *Trametes* sp. C30, была оптимизирована в соответствии с предпочтениями реципиента *S. cerevisiae* и была успешно экспрессирована, однако субстратная специфичность фермента изменилась. Это особенно нежелательно в случае ранее не охарактеризованных ферментов, так как свойства такого рекомбинантного фермента могут не соответствовать свойствам нативного.

Кроме того, есть также риск, что оптимизация кодонов может не дать результатов вовсе или они будут несущественны. Так, в работе [266] мутантный ген лакказы *B. licheniformis* был экспрессирован в *P. pastoris*. После оптимизации кодонов в соответствии с предпочтениями реципиента индекс адаптации кодонов (CAI) целевого гена был повышен с 0,62 до 0,92, а частота предпочтительных кодонов была значительно увеличена. Однако были показаны малые различия в уровне активности продуцируемой лакказы. Это указывает на то, что стратегия оптимизации кодонов не является оптимальной для улучшения продукции целевого фермента.

В ходе исследования мы также сравнили результаты оценки частоты использования кодонов *P. canescens* с частотой использования кодонов для *A. nidulans* [241] - оказалось, что частоты использования кодонов для *P. canescens* и *A. nidulans* очень похожи (см. приложение 1). Поэтому был сделан вывод, что низкая активность рекомбинантной лакказы А, полученная нами при

использовании экспрессионной системы на основе *A. nidulans*, скорее всего связана с посттрансляционными модификациями или фолдингом белка.

Таким образом, только для продуцентов rLacC, rLacD и rLacF была показана сравнительно высокая активность целевых секретируемых изоферментов лакказ в КЖ. Поэтому в дальнейшей работе использовали штаммы *P. canescens* Cc1(25)25, *P. canescens* Dc2(6)23, *P. canescens* Fc3(5)27 для выделения соответствующих изоферментов и исследования их свойств.

3.5 Выделение и очистка минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072

Для выделения изоферментов из КЖ гриба *P. canescens* за основу была взята схема очистки, разработанная ранее для получения нативного изофермента LacA *T. hirsuta* 072, и успешно использованная также для очистки рекомбинантной rLacA из *P. canescens* [238]. Поскольку КЖ продуцента rLacF была более пигментирована, для отделения его от пигментов была введена дополнительная стадия очистки с использованием носителя Phenyl Sepharose (Схема №1, рисунок 17). Данные по стадиям выделения и очистки рекомбинантных изоферментов суммированы в таблице А в приложении 2.

В результате выход по активности гомогенных препаратов рекомбинантных изоферментов при очистке по схеме №1 составил 21,6%, 7,4% и 3% для rLacC, rLacD и rLacF соответственно (от общей активности изоферментов в исходной КЖ). Удельные активности полученных препаратов минорных лакказ составили 260,3 ед/мг, 40 ед/мг и 41 ед/мг для rLacC, rLacD и rLacF соответственно. Стоит отметить, что для ранее полученной rLacA выход по активности составлял 10% с удельной активностью 91,7 ед/мг белка [238].

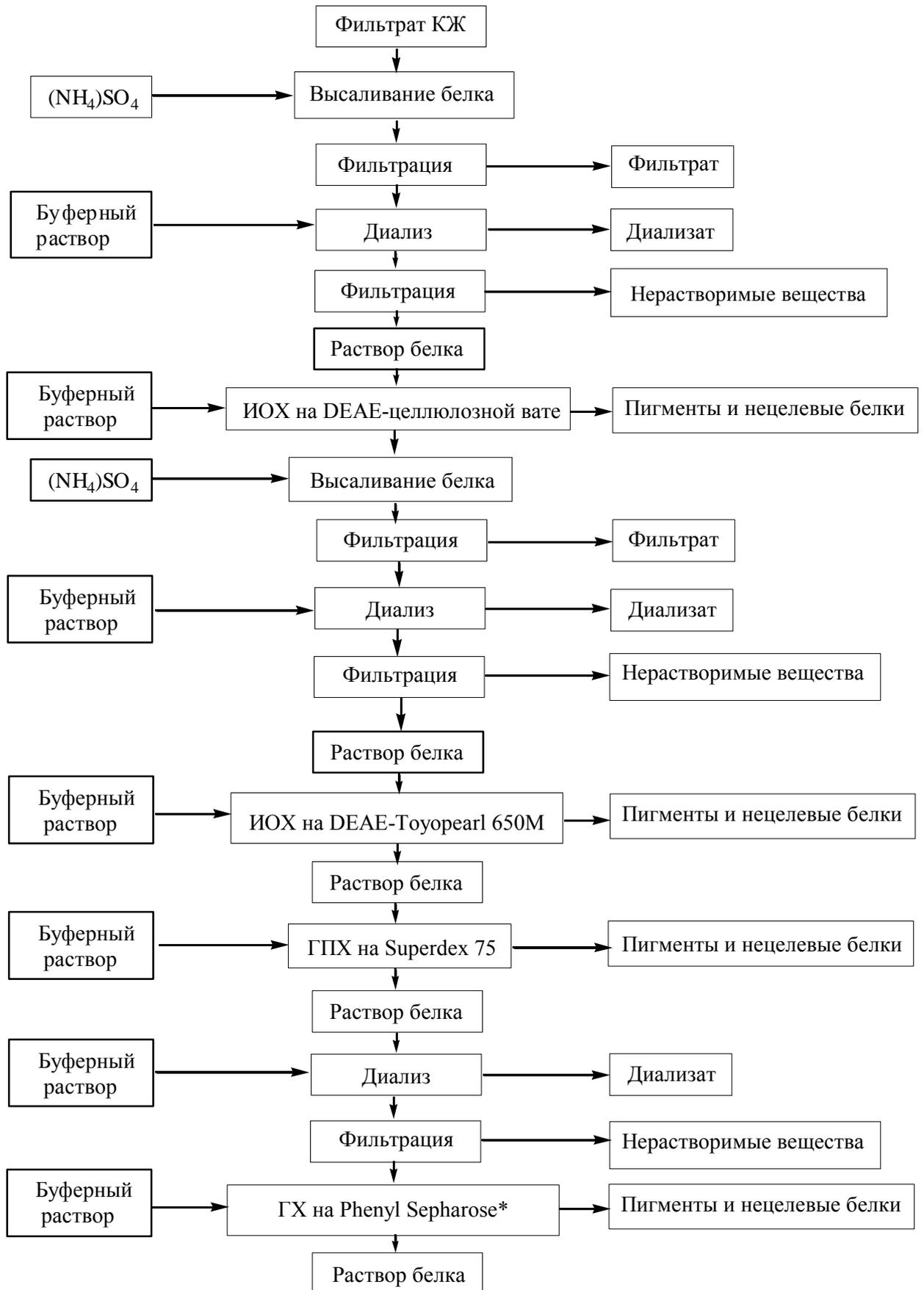


Рисунок 17 - Общая схема №1 выделения и очистки изоферментов лакказ, где ИОХ - ионообменная хроматография, ГПХ - гель-проникающая хроматография, ГХ- гидрофобная хроматография,* - дополнительная стадия

Из таблицы А в Приложении 2 можно видеть, что при очистке изоферментов по схеме №1 после стадии высаливания сульфатом аммония наблюдается существенное падение общей активности изоферментов rLacD и rLacF, а также удельная активность этих ферментов увеличивается незначительно (по сравнению с rLacC). Кроме того, поскольку лакказы часто связаны с пигментами, продуцируемыми грибами в процессе культивирования, предполагается, что они могут частично инактиваться в ходе очистки от этих пигментов. Следовательно, схема №1 не оптимальна для выделения изоферментов rLacD и rLacF. Поэтому для очистки этих двух изоферментов схема очистки была изменена (схема №2, рисунок 18).

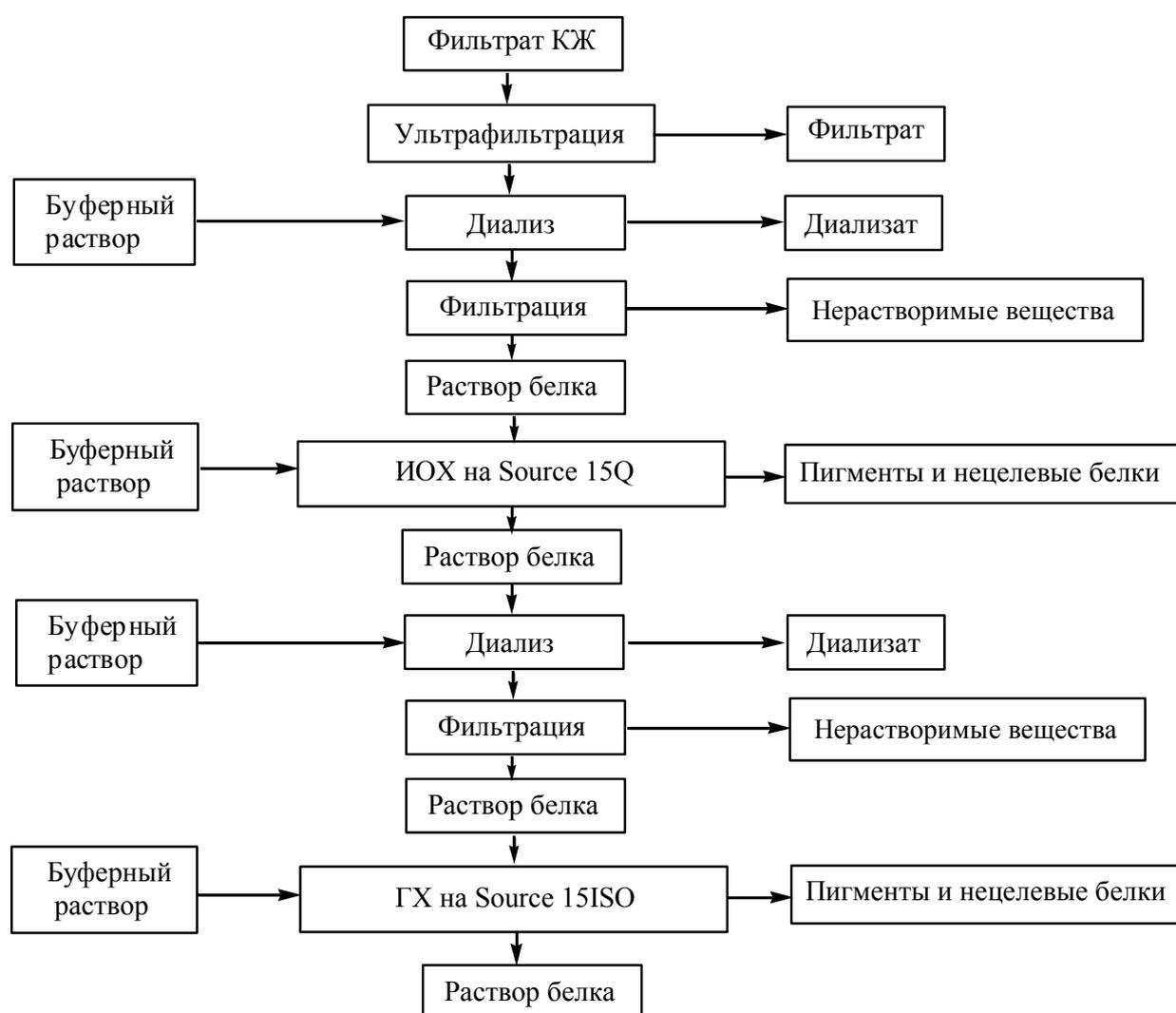


Рисунок 18 - Общая схема №2 выделения и очистки изоферментов лакказы, где ИОХ - ионообменная хроматография, ГИХ - гель-проникающая хроматография, ГХ- гидрофобная хроматография

Вместо высаливания сульфатом аммония была проведена ультрафильтрация в тангенциальном потоке на целлюлозной мембране, ИОХ проводили на носителе Source 15Q, а стадию ГПХ заменили на ГХ на носителе Source 15ISO. Данные суммированы в таблице Б в приложении 2.

Изменение схемы очистки позволило сократить количество стадий очистки изоферментов rLacD и rLacF, при этом их выход увеличился до 13 и 12% (от общей активности изоферментов в исходной КЖ) соответственно. Также удалось повысить удельную активность полученного изофермента rLacD до 63 ед/мг. Удельная активность rLacF не изменилась (по сравнению с ферментом, очищенным по схеме №1). Масс-спектрометрическая идентификация полученных белков подтвердила, что они представляют собой изоферменты rLacC, rLacD и rLacF соответственно. Все полученные изоферменты имели голубую окраску в растворе разной интенсивности, свойственную классическим голубым лакказам [80].

3.6 Спектральный анализ изоферментов

Наличие иона меди первого типа и бинарного медного комплекса третьего типа [28], которые играют определяющую роль при окислении субстратов лакказами, устанавливали спектрофотометрическим анализом препаратов рекомбинантных изоферментов (рисунок 19).

Типичный для лакказы спектр представляет собой ниспадающую кривую в УФ и видимой областях со значительным поглощением в УФ области. При этом спектр должен иметь пик поглощения в районе 610 нм, что свидетельствует о присутствии иона меди первого типа, а также “плечо” при 340 нм, что говорит о наличии двух ионов меди третьего типа, образующих бинарный комплекс [28].

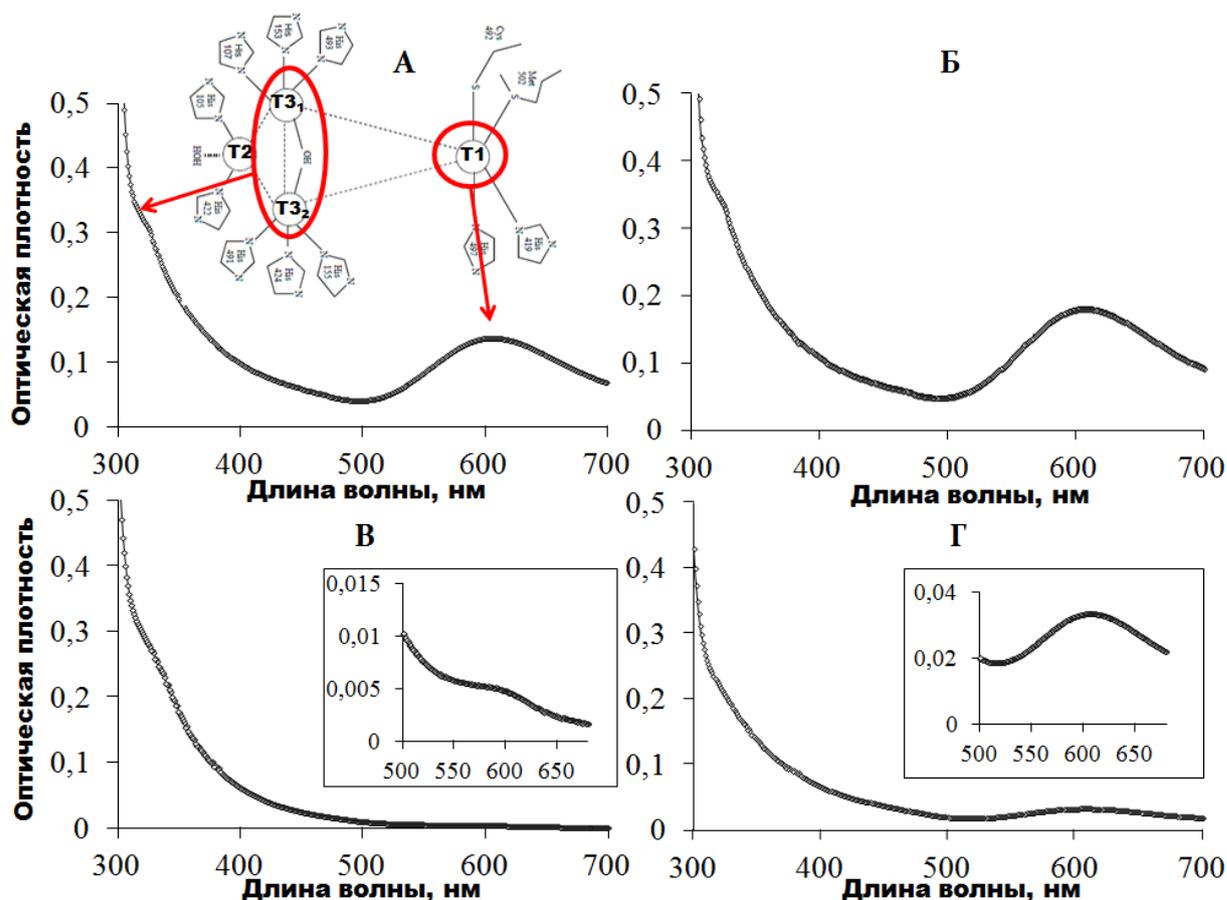


Рисунок 19 - Оптические спектры изоферментов лакказ: А- LacA, Б- rLacC, В- rLacD, Г- rLacF. LacA использовался в качестве препарата сравнения

Из рисунка 19 следует, что рекомбинантные изоферменты rLacC и rLacF, полученные в *P. canescens*, обладают типичными для лакказ оптическими спектрами поглощения, в отличие от спектра rLacD. Аналогично LacA (рисунок 18 А), спектры rLacC и rLacF (рисунок 19 Б,Г) имеют пики поглощения в районе 610 нм и “плечо” при 340 нм, однако для rLacF пик в районе 610 нм менее выражен. Спектр rLacD также имеет “плечо” при 340 нм, однако пик в районе 610 нм практически отсутствует (рисунок 19 В). В работе [11] для одного из изоферментов лакказы *T. villosa* (изоформа 2) было показано отсутствие спектрального максимума в районе 610 нм. Авторы заключили, что подобное отсутствие пика может указывать на то, что молекулы белка частично утрачивают медь I типа в процессе очистки. Однако следует отметить, что характер спектров изоферментов rLacD и rLacF, полученных в нашем исследовании, не изменялся при изменении схемы очистки. Это свидетельствует

о том, что методика очистки в данном случае не влияла на спектральные характеристики изоферментов.

3.7 Характеристика рекомбинантных минорных лакказ

Данные литературы позволяют предположить, что физиологические функции лакказ не ограничиваются лишь деградацией лигнина, и члены мультигенного семейства играют различную физиологическую роль в жизнедеятельности гриба, чем и определяется обширность этого семейства. Изучение физико-химических и каталитических свойств изоферментов может помочь определить, какие функции они выполняют.

3.7.1 Молекулярные свойства лакказ

Определение молекулярных масс (М.м.) изоферментов было проведено с помощью SDS-электрофореза. М.м. изоферментов различались и составляли 67, 75, 70 кДа для rLacC, rLacD и rLacF соответственно (рисунок 20 А). Зимограмма с окрашиванием АБТС представлена на рисунке 20 Б.

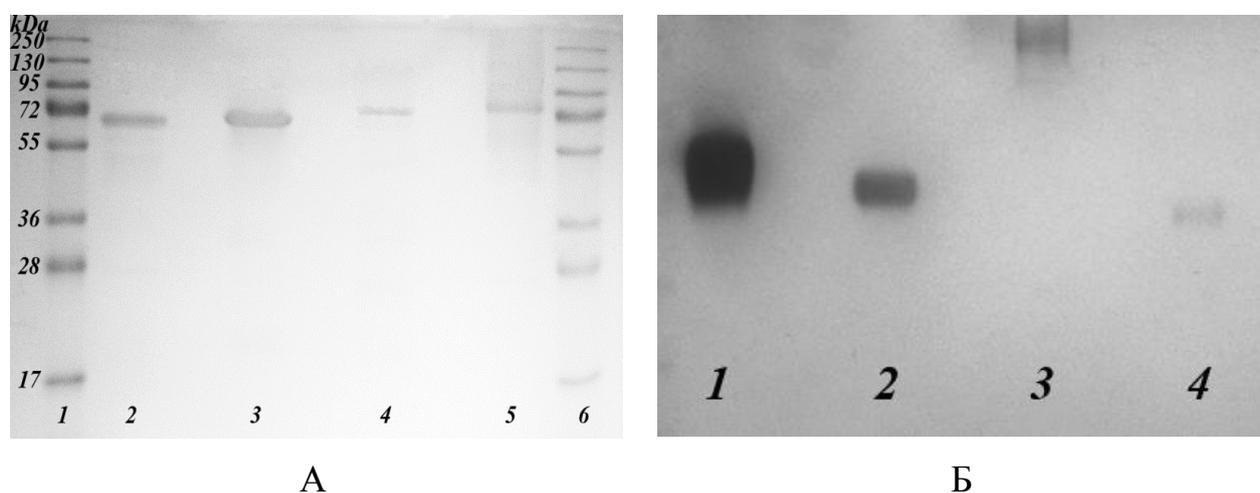


Рисунок 20 – Электрофоретический анализ препаратов лакказ: А- SDS-электрофорез в денатурирующих условиях (1,6-Маркер, 2-LacA, 3-rLacC, 4-rLacF, 5-rLacD); Б - Зимограмма изоферментов с окраской АБТС (1-LacA, 2-rLacC, 3-rLacD, 4-rLacF). Препарат LacA использован в качестве контрольного образца

Также было обнаружено, что изоферменты различаются по величине ИЭТ. Для rLacD ИЭТ лежала в наименее кислой области (pI=6,5) по сравнению с

остальными изоферментами. Для rLacC, наоборот, ИЭТ лежала в наиболее кислой области (pI=3,1), по сравнению с остальными изоферментами. ИЭТ rLacF (pI=4,2) была увеличена по сравнению с LacA (pI=3,7) на 0,5 единиц. Результаты изоэлектрофокусирования представлены на рисунке 21.

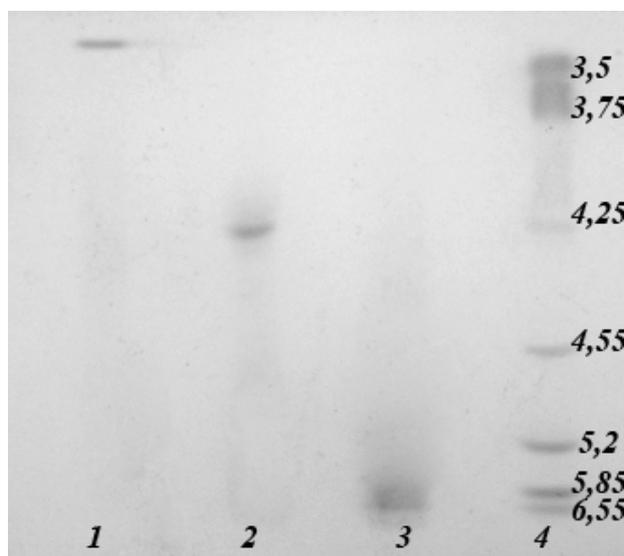


Рисунок 21 - Изоэлектрофокусирование изоферментов лакказ (1-LacC, 2-rLacF, 3-rLacD, 4- маркер).

Учитывая незначительные отличия изоферментов по предсказанным молекулярным массам (таблица 16), можно предположить, что разница в М.м., полученных при электрофоретическом анализе, связана с различным гликозилированием изоферментов. То же касается и ИЭТ изоферментов.

Таблица 16 – Предсказанные и экспериментально полученные свойства изоферментов

Изофермент	М.м.		pI		Количество предсказанных сайтов гликозилирования
	Предсказанная	Полученная	Предсказанная	Полученная	
rLacC	55,6	67	4,4	3,1	11
rLacD	57,6	75	5,72	6,5	10
rLacF	56,3	70	5,01	4,2	5

Расчетная степень гликозилирования минорных изоферментов лакказ составила примерно 17, 23 и 20% для rLacC, rLacD и rLacF соответственно.

Таким образом, было установлено, что рекомбинантные изоферменты rLacD и rLacF имеют бóльшую степень гликозилирования, чем rLacC и изученный ранее rLacA (17%) [238].

Следует отметить, что количество и расположение сайтов N-гликозилирования для исследуемых изоферментов заметно отличалось. В таблице 17 представлены рассчитанные и экспериментально подтвержденные сайты N-гликозилирования изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072. Присутствие сайтов гликозилирования подтверждали по наличию углеводных остатков в пептидах, идентифицированных MALDI-TOF/TOF MS анализом (см.п. 2.6.2).

Таблица 17- сайты N-гликозилирования изоферментов лакказ *T.hirsuta* 072: подчеркиванием выделены предсказанные сайты гликозилирования; знаками *,** - консервативные сайты; красным – подтвержденные сайты; голубым – дополнительный сайт, наличие которого показано для рекомбинантной лакказы А (у нативной отсутствует); синей рамкой обозначены уникальные подтвержденные сайты

Фермент	Сайты гликозилирования			
	*			
LacA	N ⁷² LT <u>NHT</u> MLK ⁸⁰	Y ¹¹⁶ DFQVPDQA ¹²⁴	P ¹⁹⁹ SDDTTAELSVI ²⁰⁹	C ²²⁶ DP <u>NHT</u> FSI ²³⁴
LacF	K ⁷⁶ LT <u>NHT</u> MLK ⁸⁴	Y ¹²⁰ DFHVPGQA ¹²⁸	T ²⁰³ TNTDAEVSVI ²¹³	C ²³⁰ DPAYTFSI ²³⁸
LacC	Q ⁷⁸ LT <u>NST</u> MLK ⁸⁶	Y ¹¹⁸ DF <u>NVT</u> DQA ¹²⁶	T ²⁰¹ GG <u>NST</u> <u>NLT</u> VI ²¹¹	C ²²⁸ DP <u>NHT</u> FSI ²³⁶
LacD	K ⁷² LT <u>NET</u> MLT ⁸⁰	Y ¹¹⁶ NFQVPDQT ¹²⁴	A ²⁰¹ GN <u>P</u> TSELAVI ²¹¹	C ²²⁸ DPRY <u>NFT</u> I ²³⁶
LacA	D ²³⁵ GH <u>NLT</u> IIE ²⁴³	P ²⁸⁴ NFGNVGFD ²⁹²	T ³¹¹ T <u>NOT</u> TSVKPL ³²¹	F ³⁵¹ NF <u>GS</u> NF ³⁵⁸
LacF	D ²³⁹ NHDLTVIE ²⁴⁷	P ²⁸⁸ LFGTTGFA ²⁹⁶	T ³¹⁵ SSQG <u>NST</u> KAL ³²⁵	F ³⁵⁵ SF <u>NGT</u> NF ³⁶²
LacC	D ²³⁷ GH <u>NMT</u> IIE ²⁴⁵	P ²⁸⁶ NTGTTDFA ²⁹⁴	T ³¹³ T <u>NOT</u> TSVAPL ³²³	I ³⁵³ SF <u>NGS</u> AF ³⁶⁰
LacD	D ²³⁷ GH <u>NMT</u> IIE ²⁴⁵	Q ²⁸⁹ NL <u>NAT</u> GFA ²⁹⁷	T ³¹⁶ TQSPNSVAFL ³²⁶	L ³⁵⁶ <u>NFT</u> KGEF ³⁶³
		Asn ³⁹⁸		**
LacA	N ³⁶¹ GASFPVP...LSGAQ ³⁸¹	L ³⁹⁵ PS <u>NAS</u> IEI ⁴⁰³	A ⁴⁵⁴ GD <u>NVT</u> IRF ⁴⁶²	D ⁵¹³ ALDPNDQ ⁵²⁰
LacF	N ³⁶⁵ GATFKPP...LSGAK ³⁸⁵	L ³⁹⁹ PS <u>NAT</u> IEL ⁴⁰⁷	P ⁴⁵⁶ GD <u>NVT</u> IRF ⁴⁶⁴	D ⁵¹⁵ ALDESDQ ⁵²²
LacC	N ³⁶³ DATYTSP...LSGAQ ³⁸³	L ³⁹⁷ PS <u>NST</u> VEL ⁴⁰⁵	A ⁴⁵⁵ GD <u>NVT</u> IRF ⁴⁶³	D ⁵¹⁴ ALGSDSH ⁵²¹
LacD	N ³⁶⁶ <u>NVS</u> FKPP... <u>LNGT</u> L ³⁸⁶	L ⁴⁰⁰ PPYSTIEL ⁴⁰⁸	P ⁴⁵⁹ TD <u>NVT</u> VRF ⁴⁶⁷	D ⁵¹⁶ KAM <u>NIT</u> V ⁵²³

Консервативными для всех 4 изоферментов лакказ являются только 2 сайта гликозилирования (*,**). При этом наличие одного из них (*) экспериментально подтверждено для всех 4 изоферментов. Для лакказ С и D было предсказано наибольшее количество сайтов N-гликозилирования, и подтверждено наличие таких уникальных сайтов как Asn²⁰⁷ для rLacC и Asn²⁹² для rLacD. Следует также отметить, что ранее для рекомбинантной rLacA,

полученной в *P. canescens*, было подтверждено наличие дополнительного сайта N- гликозилирования Asn³⁹⁸ помимо сайтов, подтвержденных для нативного LacA. Присутствие сайта гликозилирования в этой области было экспериментально подтверждено и для rLacF (Asn⁴⁰²).

3.7.2 Физико-химические свойства изоферментов

АБТС является синтетическим нефенольным субстратом, который чаще всего используется для анализа активностей различных лакказ из-за высокого коэффициента молярной экстинкции этого субстрата ($\epsilon_{436} = 29500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и независимости получаемых результатов от значения pH [11,14,157,159,268]. Однако в природе этот субстрат не встречается. Помимо АБТС для изучения активности лакказ часто применяют пирокатехин (ПКХ, 1,2-дигидроксибензол) [124,145,269] – фенольный субстрат ($\epsilon_{410} = 740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, структуры субстратов представлены в приложении 3). Поскольку для субстратов различной природы (фенольные и нефенольные) механизм действия лакказы отличается [270,271], в настоящем исследовании были использованы оба субстрата - АБТС и ПКХ.

Определение оптимального значения pH

Изучение зависимости активности изоферментов лакказ от значения pH для различных субстратов проводили в универсальной буферной системе Бритона-Робинсона в диапазоне pH от 1,8 до 6,5. В качестве препарата сравнения использовали лакказу А. Анализ результатов показал некоторые отличия в значениях pH-оптимумов действия исследуемых изоферментов (таблица 18, рисунок 22).

Таблица 18 - pH-оптимумы изоферментов лакказ

Субстрат	pH-оптиум			
	LacA	rLacC	rLacD	rLacF
АБТС	1,8-3,0	1,8-2,3	2,3-2,8	2,5-3,5
ПКХ	3,8-4,0	5,0-5,3	3,8-4,5	5,0

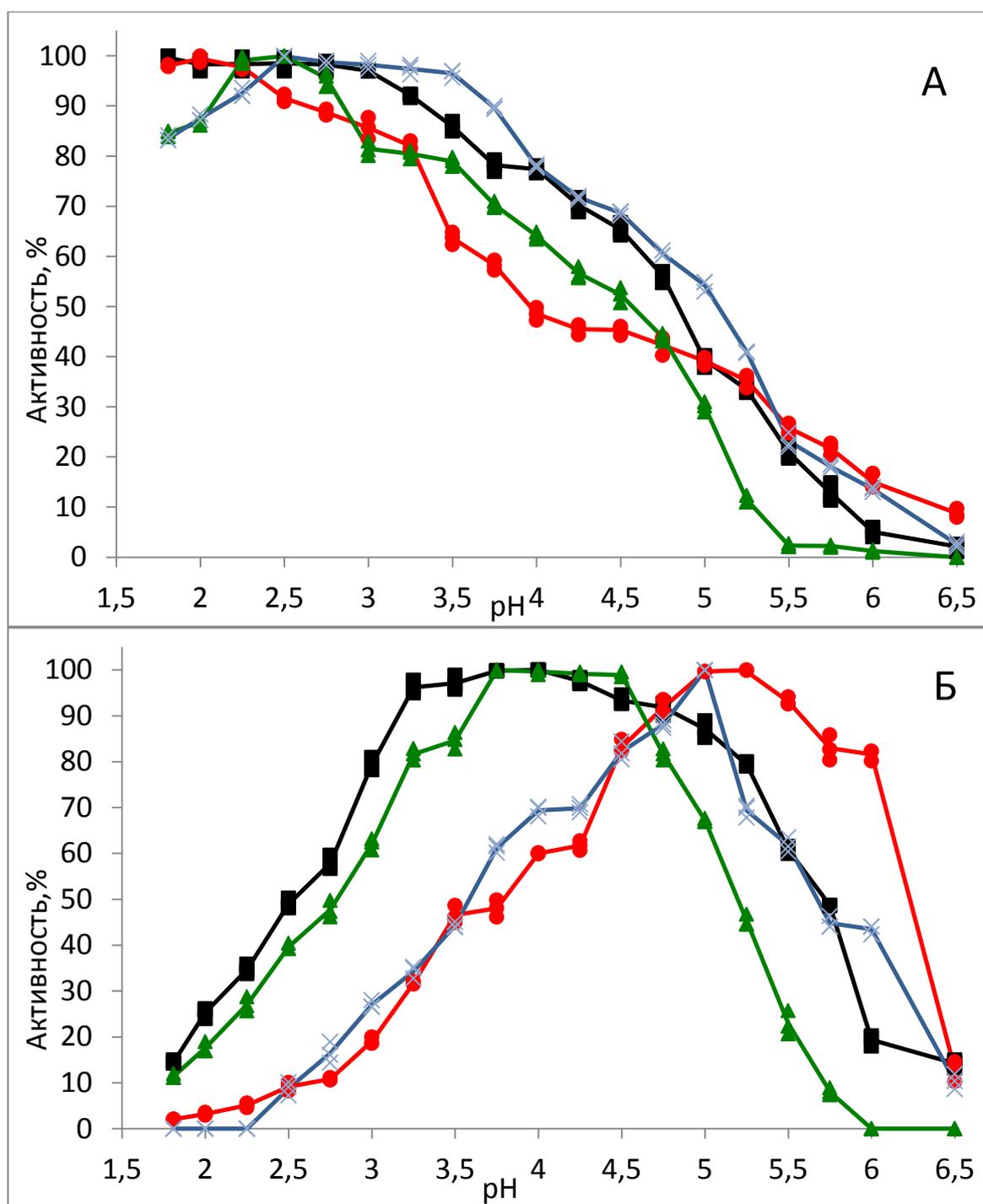


Рисунок 22 - Графики зависимости активности изоферментов лакказ от pH, при использовании в качестве субстрата АБТС (А) и ПКХ (Б).

Обозначения: ■ - LacA, ● - rLacC, ▲ - rLacD, × - rLacF

Для нефенольного субстрата АБТС (рисунок 22 А) диапазоны pH, в которых LacA, rLacC и rLacD проявляют максимальную активность, практически не отличаются (1,8-3,0; 1,8-2,3 и 2,3-2,8 соответственно) и являются характерными для большинства грибных лакказ [2]. Для rLacF диапазон

оптимальных значений рН немного смещен в сторону менее кислой области (2,5-3,5). При этом наиболее узкий диапазон оптимальных значений рН имеет rLacD, а наиболее широкий – LacA.

Для фенольного субстрата ПКХ оптимальные значения рН лежали в менее кислой области (рисунок 22 Б). Наиболее широкий диапазон оптимальных значений рН был показан для rLacD (3,8-4,5), а наиболее узкий – для rLacF (5,0).

Эти результаты хорошо соотносятся с данными, полученными для большинства изученных изоферментов лакказ из разных источников (см. таблицу 3, раздел 1.3.2), оптимум рН которых для фенольных субстратов лежит в области от 2,5 до 5,0. Однако рН оптимум rLacC немного выделяется на общем фоне, так как несколько сдвинут в менее кислую область.

Определение оптимальной температуры

Изучение зависимости активности изоферментов лакказ от температуры для различных субстратов проводили при рН 4,5 в 0,1 М ацетатном буферном растворе. В качестве препарата сравнения использовали лакказу А. Анализ результатов показал существенные отличия в значениях температурных оптимумов действия исследуемых изоферментов (таблица 19, рисунок 23).

Таблица 19 - Температурные оптимумы изоферментов

Субстрат	Температура, °С			
	LacA	rLacC	rLacD	rLacF
АБТС	55-70	65	65-75	65-75
ПКХ	55	60	75	55-70

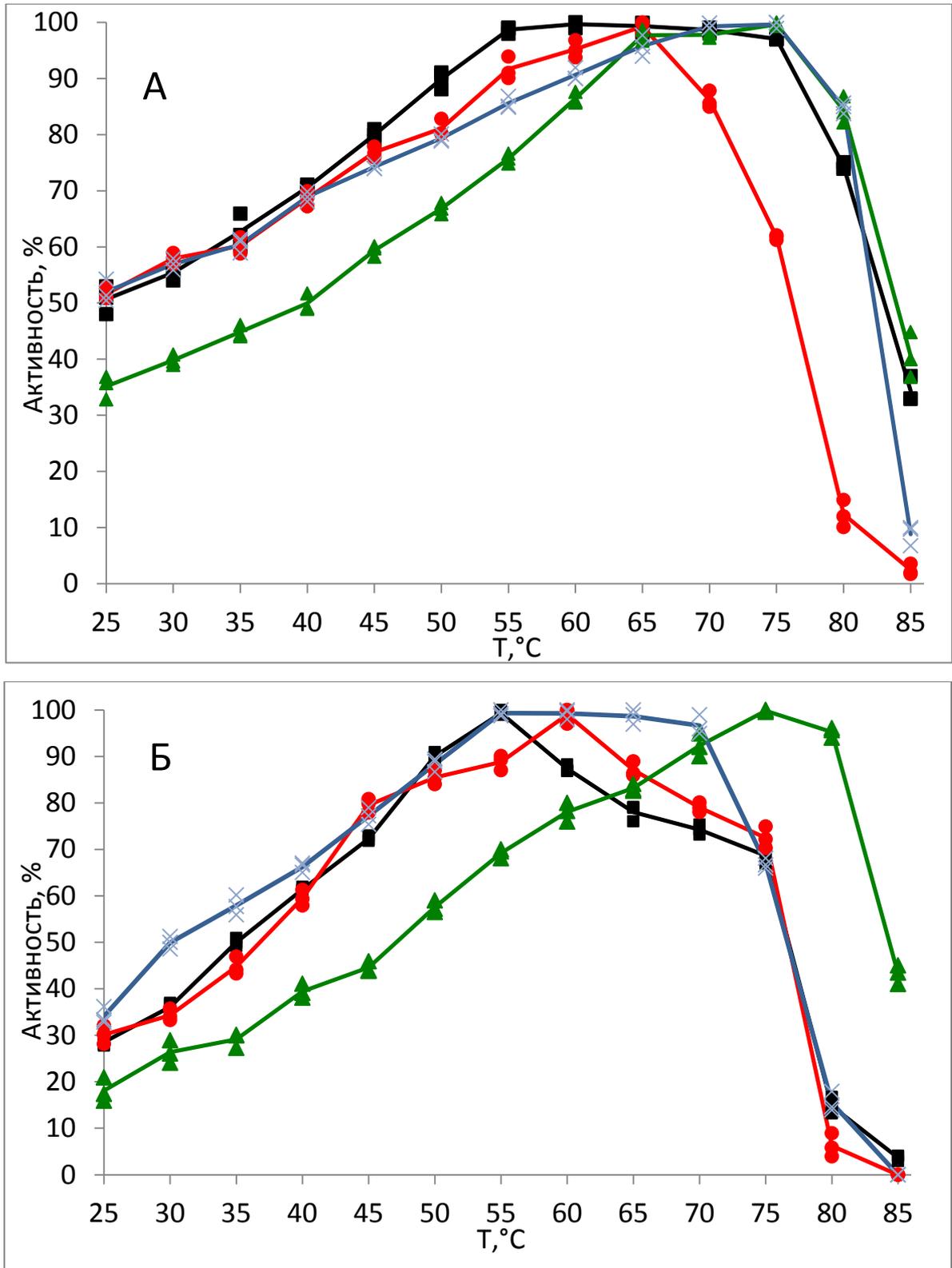


Рисунок 23 - Графики зависимости активности рекомбинантных изоферментов лакказ от температуры, при использовании в качестве субстрата АБТС (А) и ПКХ (Б). Обозначения: ■- LacA, ●- rLacC, ▲- rLacD, ×- rLacF

Исследование показало, что для субстрата АБТС (рисунок 23 А) температурный оптимум активности для изофермента rLacC составил 65°C; температурный оптимум для LacA находился в диапазоне температуры 55-70°C; для изоферментов rLacD и rLacF – в диапазоне 65-75°C.

Для субстрата ПКХ (рисунок 23 Б) максимальный температурный оптимум был показан для изофермента rLacD (75°C); самый низкий температурный оптимум был показан для LacA (55°C).

Изучение литературы показало, что температурные оптимумы, установленные нами для изоферментов LacA и rLacC (для субстрата АБТС), согласуются с данными, полученными ранее для большинства изученных лакказ (Т опт. 40-70°C в зависимости от их происхождения (см. таблицу 3, раздел 1.3.2)). Однако результаты, полученные нами для рекомбинантных rLacD и rLacF, схожи с результатами, описанными для двух рекомбинантных изоферментов лакказ *T. versicolor* 3086 (Lac α и Lac β), полученных в *P. pastoris* [14]. Для них также были показаны более высокие температурные оптимумы - 75 и 80 °C соответственно, по сравнению с двумя другими охарактеризованными лакказами этого гриба (Lac γ и Lac δ). При этом авторы сообщают, что для всех четырех изоферментов лакказ была показана одинаковая степень гликозилирования.

Температурная стабильность изоферментов

Температурную стабильность изоферментов лакказ исследовали в диапазоне температур 60-75°C в 0,1 М ацетатном буфере pH 4,5. Изофермент LacA использовали в качестве препарата сравнения. Результаты представлены в таблице 20 и на рисунках 24, 25.

Таблица 20 - Периоды полуинактивации ($\tau_{1/2}$) изоферментов при температурах 60-75°C (по АБТС)

Температура, °C	$\tau_{1/2}$, МИН			
	LacA	rLacC	rLacD	rLacF
60	12±2	4±2	22±2	12±2
65	7±1	3±1	6±1	7±1
70	2,5±1	<2	3,5±1	3±1
75	<3	<3	<3	<3

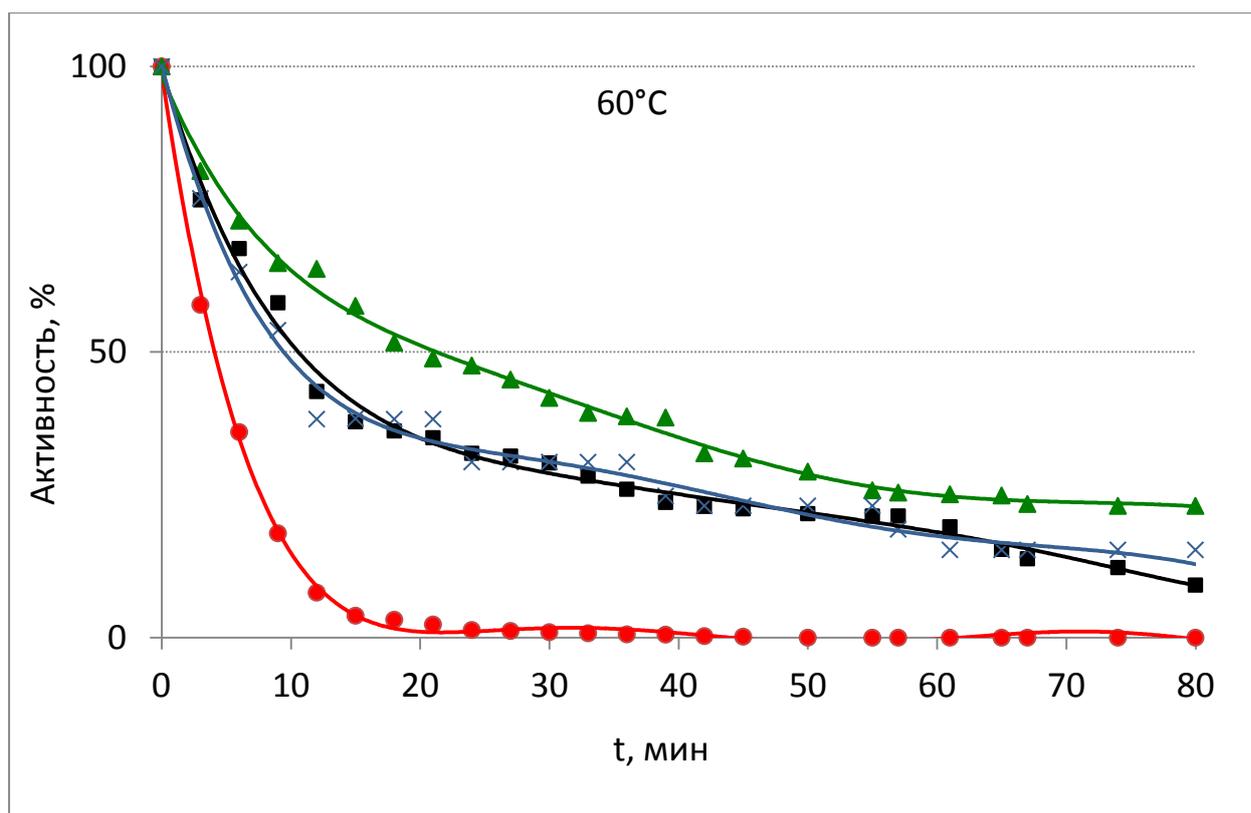


Рисунок 24 – Уменьшение активности изоферментов при температуре 60°C при использовании в качестве субстрата АБТС.

Обозначения: ■ - LacA, ● - rLacC, ▲ - rLacD, × - rLacF

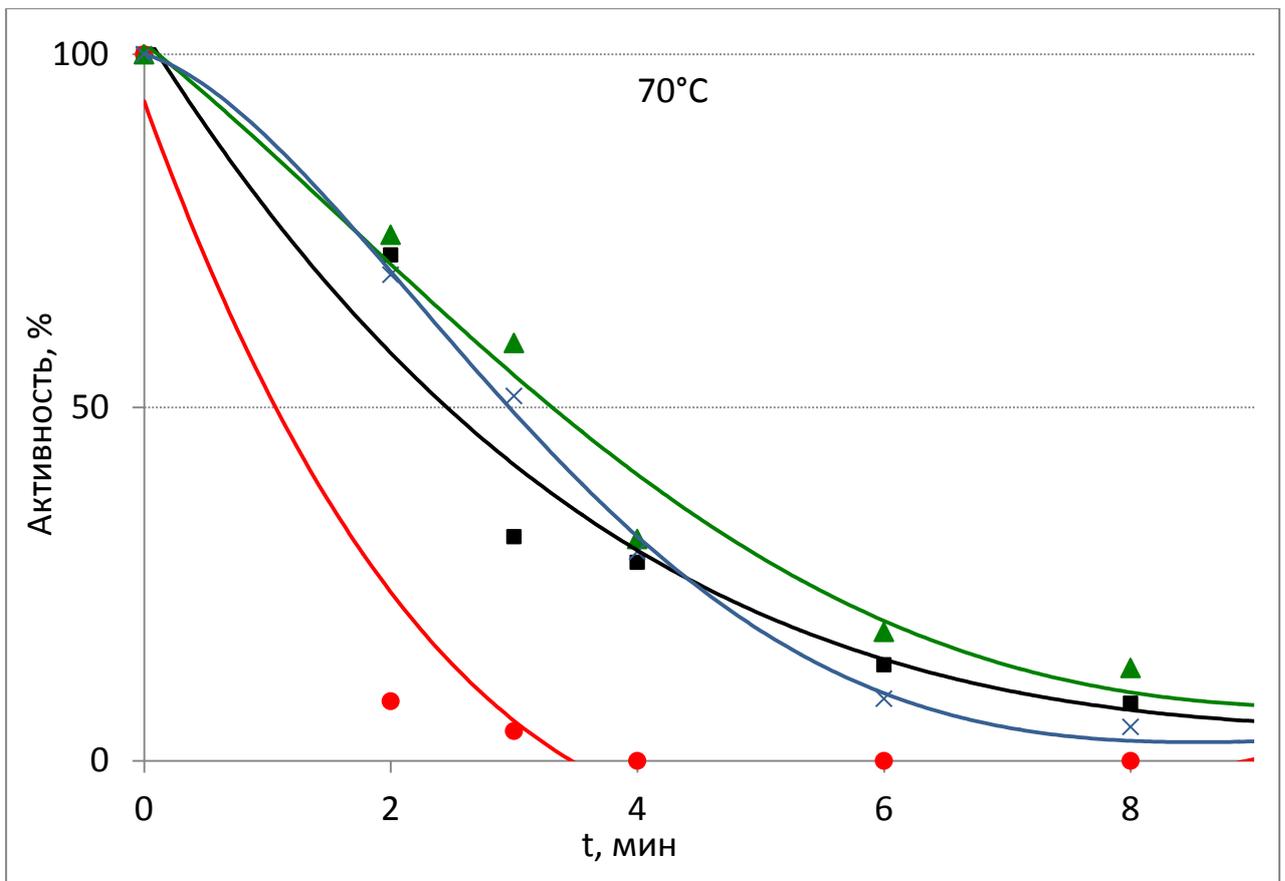
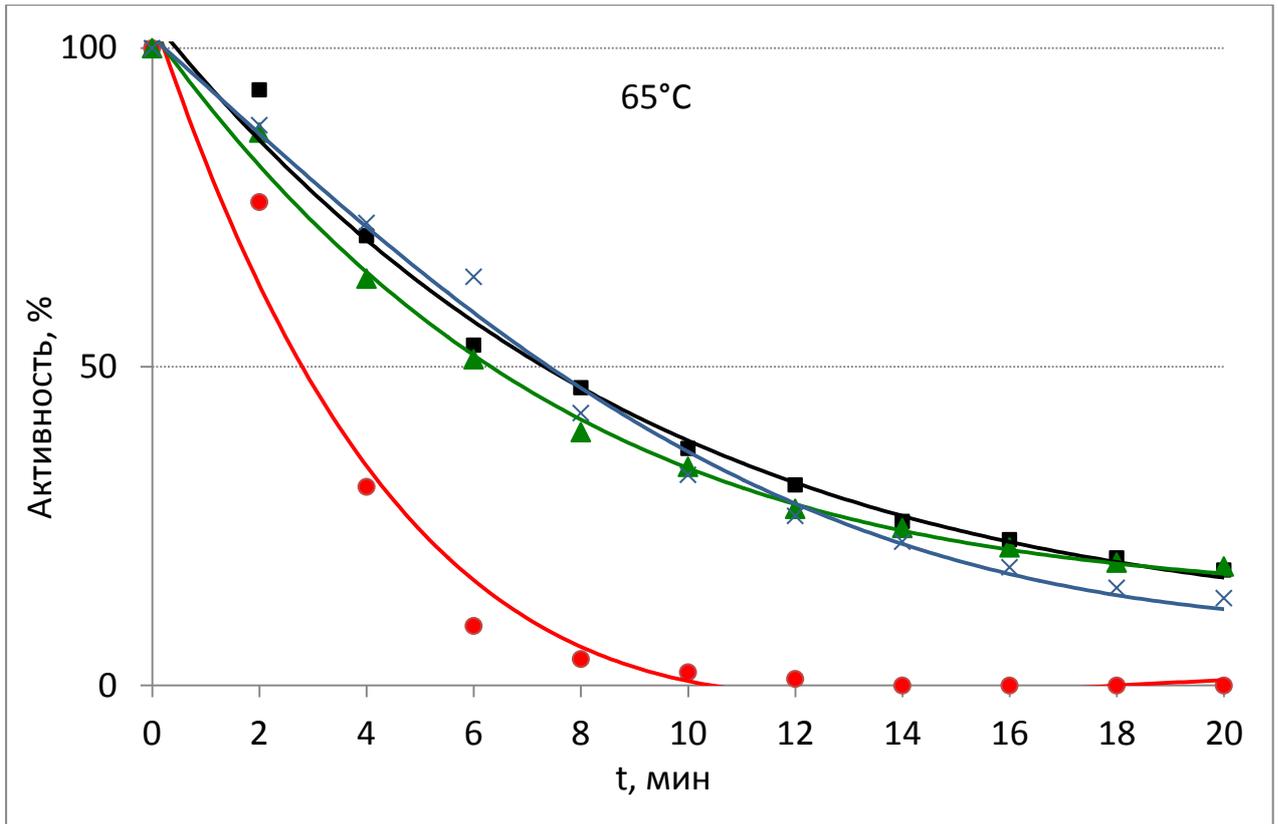


Рисунок 25 – Уменьшение активности изоферментов при температурах 65 и 70 °С при использовании в качестве субстрата АБТС.

Обозначения: ■- LacA, ●- rLacC, ▲- rLacD, ×-rLacF

Изофермент rLacC обладал наименьшей термостабильностью при всех изученных температурных режимах. Однако наибольшая разница в стабильности изоферментов была заметна при температуре 60°C: самым стабильным в этом случае оказался изофермент rLacD, изоферменты LacA и rLacF проявляли меньшую стабильность. При более высоких температурах (65-75°C) стабильность изоферментов LacA, rLacD и rLacF была близка. Отметим, что при инкубации при 75°C в течение первых 3 мин все изоферменты теряли более 50% активности.

Можно предположить, что причиной пониженной термостабильности изофермента rLacC и повышенной термостабильности изофермента rLacD по сравнению с остальными изоферментами могут служить найденные различия в их гликозилировании (см. раздел 3.6.2), поскольку паттерн гликозилирования может влиять на свойства фермента. Так, в работе [143] для лакказы Lac3 *T. trogii* ВАFC 463 была показана высокая термостабильность. Авторы связали это с увеличением углеводного фрагмента изофермента. Отметим однако, что эта закономерность сохраняется не для всех грибов. Например, все 4 охарактеризованных изофермента лакказ *T. versicolor* 3086 имели одинаковую степень гликозилирования, однако один из них обладал повышенной термостабильностью [14].

3.7.3 Окислительно-восстановительный потенциал минорных изоферментов

Ранее в нашей лаборатории было показано, что обесцвечивание красителя азура Б лакказой коррелирует со значением ОВП медного центра T1 этого фермента [240]. Известно, что мажорный изофермент LacA обладает высоким ОВП (780 мВ) и способен полностью окислять краситель азур Б в течение 24 ч в присутствии медиатора ГБТ. Поэтому для оценки ОВП минорных изоферментов мы провели тест на обесцвечивание этого красителя в сравнении с LacA, чей ОВП известен (рисунок 26).

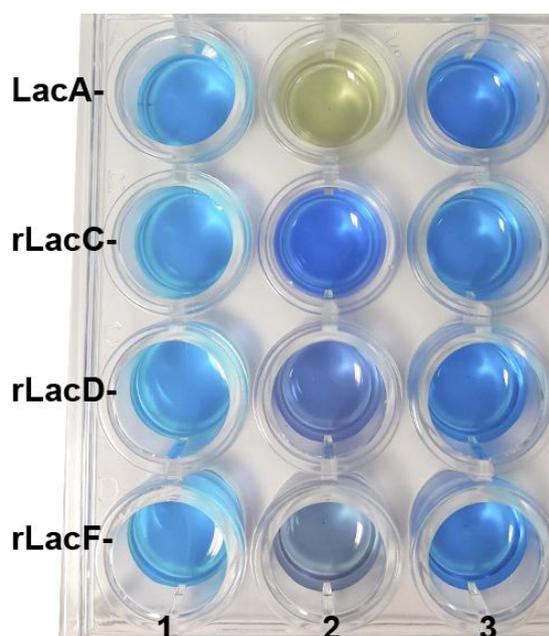


Рисунок 26 - Обесцвечивание красителя азур Б изоферментами в присутствии медиатора ГБТ после 96 ч инкубирования.
1-Азур Б+ГБТ, 2-Азур Б+ГБТ+фермент, 3-Азур Б+фермент

Было установлено, что изменение цвета красителя азур Б при использовании rLacC начиналось только после 72 ч воздействия фермента и оно было несущественным, что свидетельствует о значительно более низком ОВП этого изофермента по сравнению с LacA. Это значит, что этот фермент практически не способен окислять этот субстрат. Значения ОВП rLacD и rLacF занимают промежуточное положение между ОВП LacA и rLacC, так как изменение цвета красителя начиналось между 24 и 48 ч обработки этими изоферментами. Таким образом, ОВП изоферментов лакказы *T. hirsuta* 072 уменьшается в ряду **LacA>rLacF>rLacD>rLacC**. Сопоставляя полученные результаты с данными, описанными в работе [240] при обесцвечивании азур Б базидиальными лакказами *Junghuhnia nitida* и *Steccherinum bourdotii* (средне-редокспотенциальными с ОВП=610 и 640 мВ соответственно) в этих же условиях, можно утверждать, что минорные лакказы *T. hirsuta* 072 имеют ОВП менее 600 мВ, так как обесцвечивание красителя ими происходит медленнее.

Поскольку значения ОВП изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 различались, было интересно проверить, насколько они отличаются по своим каталитическим свойствам.

3.7.4 Каталитические свойства изоферментов

Каталитические константы

В настоящем исследовании для минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 были определены кинетические константы по 6 субстратам. В группу вошли фенольные субстраты – пирокатехин (ПКХ), 2,6-диметоксифенол (ДМФ), феруловая кислота (ФК), синаповая кислота (СинК) и гваякол (ГВ), а также нефенольный гетероциклический субстрат АБТС (таблица 21, структуры субстратов представлены в приложении 3). Значения констант сравнивали со значениями, полученными ранее для LacA.

Аффинность изоферментов к проверенным субстратам уменьшалась в следующем порядке:

- LacA: СинК=АБТС>ДМФ>ФК>ГВ>ПКХ;
- rLacC: СинК>ФК>АБТС>ДМФ>ГВ>ПКХ;
- rLacD: СинК>ДМФ>АБТС>ФК>ПКХ>ГВ;
- rLacF: СинК>ДМФ>АБТС>ФК>ГВ>ПКХ.

Все изоферменты наиболее эффективно окисляли синаповую кислоту. При этом для фенольных субстратов изоферменты LacA, rLacD и rLacF обладали наибольшей аффинностью к субстратам сингильной природы (синаповая кислота и ДМФ), в то время как для rLacC эта закономерность не сохранялась, так как его аффинность к феруловой кислоте (субстрат гваяцильной природы) была больше, чем к ДМФ. Интересно, что аффинность к субстратам сингильного типа у rLacD была даже несколько выше, чем у LacA, хотя бóльшую эффективность окисления (k_{cat}/K_M) сингильных субстратов показывал LacA.

В отличие от LacA, для которого значения K_M для АБТС и синаповой кислоты были одинаковы, а k_{cat}/K_M близки, значения K_M и k_{cat}/K_M для этих субстратов при использовании минорных изоферментов существенно различались - значения k_{cat}/K_M для АБТС были ниже, чем для синаповой

кислоты. Таким образом, можно предположить, что в отличие от мажорного LacA, минорные изоферменты хуже окисляют нефенольный АБТС, нежели фенольные соединения.

Таблица 21 - Каталитические константы изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072

Субстрат	λ , (нм)	ϵ , (M ⁻¹ см ⁻¹)	Константа	Изофермент			
				LacA [18]	rLacC	rLacD	rLacF
АБТС	436	29500	K _M , μM	17 ± 2	534 ± 33	37 ± 2	88 ± 6
			k _{cat} , c ⁻¹	225 ± 17	155 ± 15	1,6 ± 0,1	76 ± 6
			k _{cat} /K _M , c ⁻¹ mM ⁻¹	13235	290	44	860
ПКХ	410	740	K _M , μM	183 ± 16	16299 ± 1719	280 ± 21	3627 ± 566
			k _{cat} , c ⁻¹	302 ± 27	204 ± 2	23,0 ± 0,2	74 ± 6
			k _{cat} /K _M , c ⁻¹ mM ⁻¹	1650	13	82	20
ДМФ	470	35645	K _M , μM	24 ± 2	589 ± 75	17 ± 1	79 ± 10
			k _{cat} , c ⁻¹	128 ± 11	57 ± 5	10 ± 1	36 ± 2
			k _{cat} /K _M , c ⁻¹ mM ⁻¹	5333	97	590	452
СинК	306	14640	K _M , μM	17 ± 2	71 ± 14	5 ± 1	33 ± 9
			k _{cat} , c ⁻¹	324 ± 31	190 ± 18	30 ± 3	123 ± 10
			k _{cat} /K _M , c ⁻¹ mM ⁻¹	19059	2665	5948	3748
ФК	314	12940	K _M , μM	28 ± 3	173 ± 38	78 ± 13	118 ± 16
			k _{cat} , c ⁻¹	270 ± 25	70 ± 6	24 ± 2	72 ± 6
			k _{cat} /K _M , c ⁻¹ mM ⁻¹	9643	403	309	613
ГВ	464	6490	K _M , μM	173 ± 15	15742 ± 337	931 ± 64	2766 ± 368
			k _{cat} , c ⁻¹	162 ± 10	216 ± 18	7,0 ± 0,5	42 ± 4
			k _{cat} /K _M , c ⁻¹ mM ⁻¹	976	14	8	15

Из всех использованных нами субстратов гваякол и пирокатехин окислялись всеми изоферментами лакказ *T. hirsuta* 072 с наименьшей

эффективностью, что характерно для базидиальных лакказ [18]. В целом, значения K_M изоферментов LacA и rLacD были наиболее низкие для всех использованных субстратов, а значения k_{cat}/K_M всех минорных изоферментов были ниже по сравнению с мажорным LacA. Пониженную эффективность окисления всех использованных субстратов минорными изоферментами, по сравнению с мажорным LacA, можно связать с низким ОВП минорных изоферментов. Однако ОВП – не единственный фактор, способный влиять на эффективность окисления субстрата. Большое влияние на взаимодействие субстрата с активным центром фермента также оказывают стерические особенности субстрата и субстрат-связывающего кармана фермента [18,272–275].

Согласно опубликованным данным, для разных охарактеризованных лакказ из разных источников каталитические константы измерены для ограниченного количества субстратов (см. таблицу 3, раздел 1.3.2). При этом для разных лакказ используются субстраты разного типа (например, синрингильного или гваяцильного) и измерения проводят в различных условиях (температурный режим, pH, буферная система), что затрудняет сравнение каталитических констант ферментов между собой. Следует отметить, что интерпретация полученных данных затруднена в связи с ограниченными знаниями о структурах минорных изоферментов лакказ.

Субстратная специфичность

В качестве субстратов для исследования субстратной специфичности изоферментов были использованы 16 соединений синтетического и природного происхождения: ароматические карбоновые кислоты, спирты, альдегиды и амины, а также различные ксенобиотики. Большинство из этих соединений представляют собой стандартные субстраты лакказ [24]. Для некоторых из них была показана индуцирующая способность по отношению к экспрессии лакказ у базидиомицетов, в том числе рода *Trametes* [11,276]. Структуры использованных субстратов представлены в приложении 3. Результаты оценки субстратной специфичности изоферментов представлены в таблице 22.

Все изоферменты способны модифицировать субстраты из каждой группы. Так, галловая кислота, сиреневая кислота, гваякол и бромкрезоловый краситель модифицировались всеми изоферментами с одинаково высокой эффективностью. При этом все изоферменты не модифицировали вератровый спирт и глиин. Однако в каждой группе субстратов были обнаружены соединения, способность к модификации которых отличалась в зависимости от использованного минорного изофермента.

Таблица 22 - Результаты скрининга субстратной специфичности изоферментов. Обозначения: «++» - явные изменения в спектрах относительно контроля; «+» - видимые изменения; «+/-» - умеренные видимые изменения, «-/+» - практически без изменений; «-» - отсутствие изменений.

LacA использован в качестве образца сравнения.

Группа	Субстраты	Изоферменты			
		LacA	rLacC	rLacD	rLacF
Ароматические карбоновые кислоты	<i>n</i> -Кумаровая кислота	++	++	-	++
	Феруловая кислота	++	++	+	++
	Галловая кислота	++	++	++	++
	Сиреневая кислота	++	++	++	++
	Ванильная кислота	++	+	+/-	+
Ароматические спирты	Вератровый спирт	-	-	-	-
	Орцинол	++	+/-	+/-	+
	Гваякол	++	++	++	++
Ароматические альдегиды	Ванилин	++	-/+	+	++
Ароматические амины	2,5-Ксилидин	++	-/+	++	+
	<i>o</i> -Толуидин	++	-/+	+	+
Ксенобиотики	Конго красный	++	-/+	+	+
	Индигокармин	++	+	+	+
	Бромкрезоловый зеленый	++	++	++	++
	Атразин	-/+	-/+	-	-
	Глиин	-	-	-	-

Сходство субстратной специфичности изоферментов LacA и rLacF было очевидно. Однако для 6 субстратов из разных групп (ванильная кислота, орцинол, 2,5-ксилидин, *o*-толуидин, конго красный и индиго кармин) эффективность окисления изоферментом rLacF была ниже по сравнению с LacA, что можно связать с различием в величинах ОВП ферментов (см. раздел 3.6.4).

Для rLacC и rLacD были обнаружены особенные отличия от LacA. Так, изофермент rLacC хуже модифицировал ванильную кислоту, орцинол, индиго кармин, а особенно плохо – ванилин, 2,5-ксилидин, *o*-толуидин и конго красный. Слабая способность rLacC к окислению субстратов, содержащих NH₂-заместитель в структуре, характеризует низкую реакционную способность этого изофермента по отношению к ароматическим аминам.

Отличие rLacD по сравнению с LacA также заключалось в сниженной эффективности окисления ряда субстратов из разных групп (ванильная кислота, орцинол, ванилин, *o*-толуидин, конго красный и индигокармин). Однако особенно интересное отличие rLacD по сравнению с остальными изоферментами заключалось в сниженной способности окислять феруловую кислоту (что подтверждается самым низким значением k_{cat}/K_M для этого субстрата), а также в неспособности модифицировать *n*-кумаровую кислоту, которая является типичным субстратом для грибных лакказ (исключением является лакказа аскомицета *M. thermophila*, которая также не модифицирует этот субстрат [24]). Интересно, что похожими свойствами характеризуются растительные и бактериальные лакказы [24].

Таким образом, было показано, что, помимо часто используемых в литературе субстратов, таких как АБТС, ПКХ и ДМФ, все минорные изоферменты лакказ *T. hirsuta* 072 способны окислять широкий спектр соединений, однако специфичность ферментов существенно различается. Поскольку минорные лакказы имеют более низкий ОВП по сравнению с мажорным LacA, способность окислять тот или иной субстрат может ограничиваться их ОВП. Однако при окислении некоторых субстратов (феруловая и *n*-кумаровая кислоты) фермент с более низким ОВП (rLacC) показывает лучшие результаты по сравнению с изоферментами с более высоким ОВП (rLacD и rLacF соответственно). Поэтому в данном случае величина ОВП является существенным фактором, влияющим на специфичность изоферментов, но не решающим.

Проведённый в нашей лаборатории филогенетический анализ лакказ *T. hirsuta* 072 позволил идентифицировать эволюционно-связанные группы генов лакказ: в первую группу входят гены *lacA*, *lacB*, *lacG* и *lacF*, во вторую – *lacC* и *lacG*. Ген *lacD* занимает отдельную сестринскую ветвь на филогенетическом дереве и находится на максимальном удалении от гена *lacA*. Таким образом, в нашем исследовании нам удалось охарактеризовать 3 минорных изофермента, входящих в разные эволюционные группы внутри мультигенного семейства лакказ бизидиомицета. Полученные данные по субстратной специфичности подтверждают различия между свойствами изоферментов в зависимости от филогенетической близости генов лакказ. Продукты генов *lacA* и *lacF*, находящихся в одной эволюционной группе, проявляют наиболее схожую субстратную специфичность и, по всей видимости, выполняют схожие роли в жизнедеятельности гриба. Продукт гена *lacC*, относящегося ко второй группе, имеет наиболее узкую субстратную специфичность и не предназначен для окисления субстратов, содержащих аминокислоты. Продукт гена *lacD*, лежащего на отдельной ветви филогенетического дерева, вероятно, может выполнять функции, схожие с функциями бактериальных или растительных лакказ, поскольку именно для них не свойственна способность модифицировать *p*-кумаровую кислоту [24].

3.8 Оценка возможностей биотехнологического применения изоферментов лакказ

Предприятия, производящие и использующие токсичные соединения, такие как различные красители (например, в текстильной промышленности), оказывают сильное отрицательное воздействие на окружающую среду из-за выброса технологических отходов [277,278]. Анализ существующей литературы позволяет заключить, что лакказы грибного происхождения широко востребованы для детоксикации сточных вод в разных отраслях промышленности. Поэтому интересно было не только изучить свойства, но и

оценить возможности практического применения новых изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072.

В нашей работе была изучена способность изоферментов лакказ к деградации четырех широко используемых красителей, относящихся к разным группам: конго красный (группа азокрасителей), индигокармин (индигоидная группа), бромфеноловый синий и феноловый красный (трифенилметановая группа) [159,279–281]. Структурные формулы красителей представлены в приложении 3.

Поскольку лакказы в индивидуальном виде не всегда способны эффективно модифицировать ксенобиотики, часто используются лакказо-медиаторные системы (ЛМС), демонстрирующие большой потенциал в сфере обезвреживания подобных соединений. Оптимальные медиаторы и условия их применения интенсивно исследуются [145,282,283].

Для деградации выбранных красителей изоферментами лакказ *T. hirsuta* 072 были выбраны медиаторы, которые, согласно литературным данным, являются наиболее перспективными. В список вошли синтетические (АБТС и ГБТ), фенольные (ванилин, синаповая кислота, феруловая кислота) и неорганические медиаторы (октацианомолибдат калия $K_4Mo(CN)_8$ и ферроцианид калия $K_4Fe(CN)_6$) [145,283–286]. Результаты проведенного эксперимента представлены на рисунке 27. Степень деградации красителя оценивалась по остаточному окрашиванию после его обработки изоферментами в течение 24 ч: 1-25 % – хорошо заметное обесцвечивание, 25-50% – видимое обесцвечивание, 50-75% – небольшое изменение цвета, 75-100% – без существенных изменений.

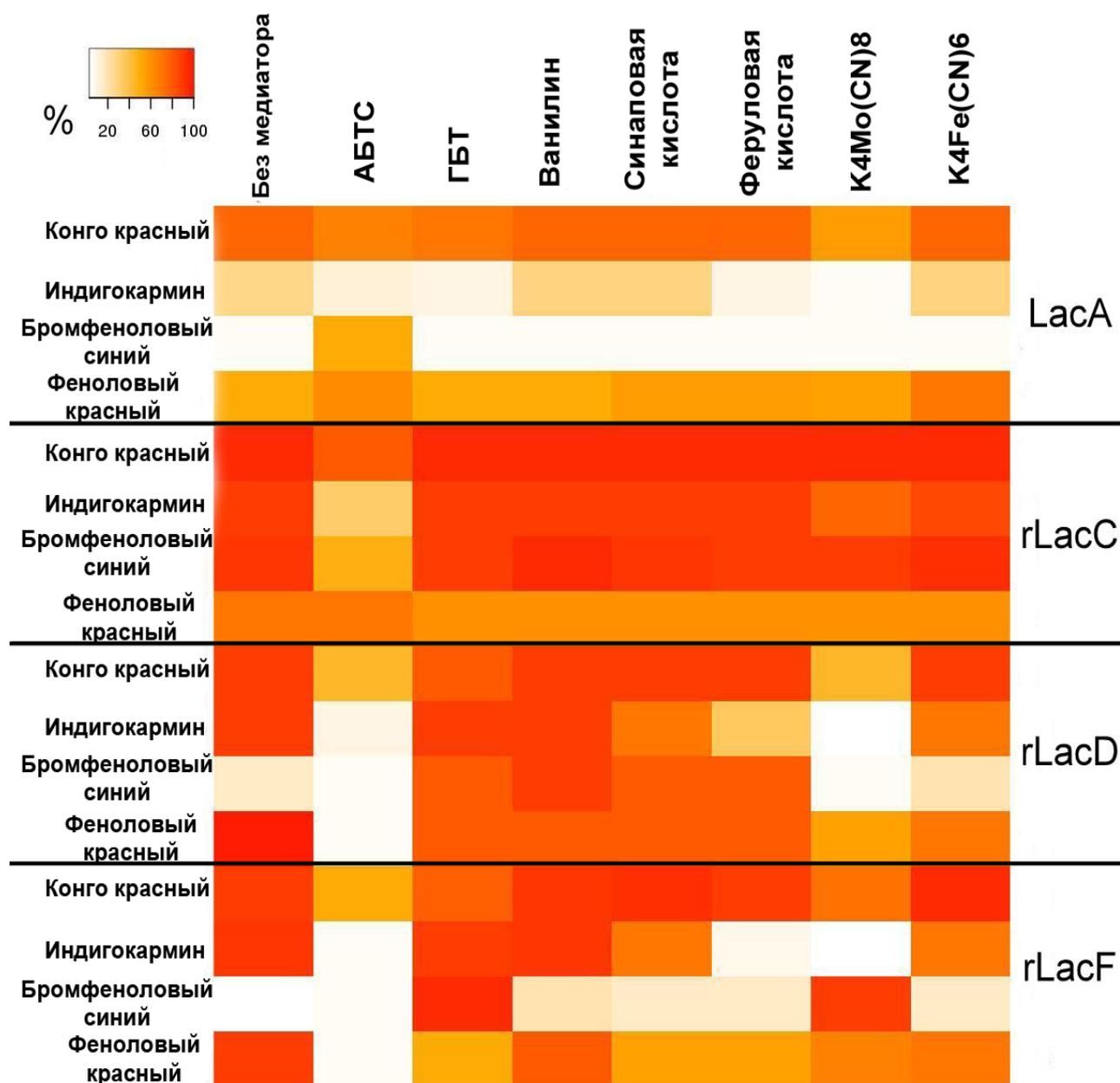


Рисунок 27 – Карта обесцвечивания красителей после 24-часовой обработки изоферментами лакказ *T. hirsuta* 072 с медиаторами и без них

Обесцвечивание конго красного

Было установлено, что для лакказ *T. hirsuta* 072 конго красный является наиболее труднодеградируемым красителем из четырех, изученных в нашем исследовании. В отсутствие медиаторов только изофермент LacA проявлял слабую активность в отношении этого красителя и за 24 ч обесцвечивал его примерно на 25%. Присутствие медиаторов практически не влияло на процесс обесцвечивания красителя изоферментами LacA и rLacC, однако эффект был заметно улучшен для rLacD использованием медиаторов АБТС и K₄Mo(CN)₈, и

для rLacF при использовании в качестве медиатора АБТС, причем в случае rLacD эффект был более заметный (более 50%).

Обесцвечивания индигокармина

Эксперимент показал, что за 24 ч только изофермент LacA может в значительной степени обесцвечивать индигокармин в отсутствии каких-либо медиаторов (до 70%). rLacC заметно обесцвечивал этот краситель только в присутствии АБТС (до 70%). Для rLacD и rLacF практически полное обесцвечивание индигокармина было показано в присутствии АБТС и $K_4Mo(CN)_8$ (до 90-95%). rLacF также эффективно обесцвечивал краситель в присутствии феруловой кислоты. При этом для LacA заметное обесцвечивание красителя было показано в присутствии АБТС, ГБТ, феруловой кислоты и $K_4Mo(CN)_8$.

Обесцвечивания бромфенолового синего

Все изоферменты, кроме rLacC, были способны обесцвечивать бромфеноловый синий в отсутствии медиаторов (до 95%). Для LacA и rLacF ни один из использованных медиаторов не улучшил этот результат. rLacC обесцвечивал этот краситель только в присутствии АБТС (до 50%). Для rLacD наиболее интенсивное обесцвечивание наблюдалось при использовании АБТС и $K_4Mo(CN)_8$. Следует учесть, что АБТС ингибировал действие LacA по отношению к этому красителю, а присутствие ГБТ, ванилина, синаповой кислоты, феруловой кислоты и $K_4Fe(CN)_6$ в разной степени ингибировало обесцвечивание красителя изоферментами rLacD и rLacF. При этом, если для rLacD присутствие $K_4Mo(CN)_8$ улучшало эффективность обесцвечивания, то для rLacF – практически полностью ингибировало.

Обесцвечивание фенолового красного

Было показано, что изоферменты LacA и rLacC способны обесцвечивать этот краситель (до 50%) в отсутствии медиаторов в отличие от rLacD и rLacF,

для которых обесцвечивание не наблюдали. Для LacA и rLacC ни один из медиаторов не оказал влияния (в случае LacA медиаторы АБТС и $K_4Fe(CN)_6$ ингибировали обесцвечивание). Однако применение АБТС существенно повышало эффективность обесцвечивания красителя изоферментами rLacD и rLacF (до 95%).

Известно, что скорость обесцвечивания красителя лакказой зависит как от структуры и ОВП фермента, так и от структуры самого красителя [287]. Наши результаты по обесцвечиванию красителей в отсутствие медиаторов коррелируются со значениями ОВП минорных изоферментов только в случае конго красного и индигокармина. Однако rLacC, имеющий самый низкий ОВП, окислял феноловый красный быстрее, чем более высокопотенциальные rLacD и rLacF. Следует также отметить, что изофермент rLacF, филогенетически наиболее близкий к мажорному LacA, показал бóльшую деградационную способность в отношении бромфенолового красителя в отсутствие медиаторов, чем LacA. При этом применение АБТС и $K_4Mo(CN)_8$ приводило к противоположным эффектам.

Кроме того, для двух красителей из разных групп (индигокарминовый и бромфеноловый) при обесцвечивании изоферментом rLacD одинаковый положительный эффект обеспечивался использованием двух медиаторов – АБТС и $K_4Mo(CN)_8$, в то же время для LacA, rLacC и rLacF такая строгая закономерность не соблюдалась.

В наших экспериментах широко используемый в литературе медиатор ГБТ практически не проявил себя ни для одного красителя при его использовании в сочетании с минорными лакказами. Например, в работе [281] при использовании ГБТ в качестве медиатора лакказа *Paraconiothyrium variabile* за 3 ч обесцвечивала бромфеноловый краситель полностью (100%), а конго красный – на 18,5%. Вероятно, этот медиатор больше подходит для мажорных изоферментов лакказ, что подтверждается нашими (положительными) результатами по обесцвечиванию красителей индигокармина и бромфенолового

синего мажорным LacA в сочетании с этим медиатором. По всей видимости, минорные лакказы имеют структурные особенности, не позволяющие эффективно взаимодействовать с этим медиатором.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что наиболее подходящим медиатором для обесцвечивания красителей изоферментами лакказ *T. hirsuta* 072 является АБТС (в отдельных случаях также хороший эффект достигается применением $K_4Mo(CN)_8$).

Минорный изофермент rLacC меньше всего подходит для обесцвечивания использованных красителей в отличие от изоферментов rLacD и rLacF, которые могут представлять интерес с точки зрения применения их (в составе ЛМС) для защиты окружающей среды или в биотехнологии. Следует отметить, что для обесцвечивания конго красного и фенолового красного результаты, полученные с применением этих минорных изоферментов в составе ЛМС, превышали результаты, полученные с применением мажорного LacA.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования в соответствии с поставленной целью диссертационной работы были получены рекомбинантные минорные изоферменты лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* 072 и проведено сравнительное изучение свойств изоферментов – представителей мультигенного семейства лакказ *T. hirsuta* 072. Исследование включало в себя выбор подходящей экспрессионной системы, получение штаммов-продуцентов рекомбинантных минорных лакказ *T. hirsuta*, выделение целевых рекомбинантных изоферментов и изучение их свойств, а также оценку возможности их применения для обесцвечивания красителей. На основании полученных результатов были сформулированы следующие выводы:

1. Экспрессионная система на основе аскомицетов *P. canescens* является наиболее эффективной для гетерологичной экспрессии изоферментов лакказ базидиомицета *T. hirsuta* 072. С помощью методов генетической инженерии сконструированы плазмиды, несущие последовательности, кодирующие целевые изоферменты лакказ, и созданы эффективные штаммы-продуценты трех рекомбинантных минорных изоферментов лакказ базидиомицета *T. hirsuta* 072 (rLacC, rLacD и rLacF).
2. Рекомбинантные минорные изоферменты rLacC, rLacD и rLacF выделены в гомогенном виде и исследованы их свойства – молекулярные массы, ИЭТ, температурные и рН-профили активности, термостабильность, каталитические свойства, субстратная специфичность, ОВП.
3. Минорный изофермент rLacC обладает наиболее низким среди исследованных изоферментов ОВП, проявляет низкую реакционную способность по отношению к ароматическим аминам, обладает наименьшей термостабильностью, наиболее кислой ИЭТ, а также имеет более узкий диапазон оптимальных значений рН и температуры.
4. Минорный изофермент rLacD обладает наибольшей термостабильностью и наименее кислой ИЭТ по сравнению с остальными изоферментами. Кроме

того, rLacD обладает пониженной способностью к окислению феруловой кислоты и не способен окислять *n*-кумаровую кислоту – типичные для базидиальных лакказ субстраты.

5. Минорный изофермент rLacF является наиболее близким по своим свойствам к мажорному LacA, однако обладает по сравнению с ним более низким ОВП.
6. Минорные члены лакказного семейства способны к деструкции красителей различных групп, причем изоферменты rLacD и rLacF в составе ЛМС эффективны для модификации труднодеградируемых красителей конго красного и фенолового красного и в перспективе могут быть использованы для применения в биотехнологии.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов Ю.С., Никандров А.Б. Технология целлюлозы. Варочные растворы, варка и отбелка целлюлозы // Учебно-практическое пособие. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный технологический университет растительных полимеров. – 2014. – 41 с.
2. Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties // FEMS Microbiol. Rev. – 2006. – Vol. 30. – № 2. – P. 215–242.
3. Have T.R., Teunissen P.J.M. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi // Chem. Rev. – 2001. – Vol. 101. – № 11. – P. 3397–3413.
4. Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry // Trends Biotechnol. – 2006. – Vol. 24. – № 5. – P. 219–226.
5. Gochev V.K., Krastanov A.I. Fungal Laccases (Review) // Bulg. J. Agric. Sci. – 2007. – Vol. 13. – P. 75–83.
6. Minussi R.C., Pastore G.M., Duran N. Potential applications of laccase in the food industry // Trends Food Sci. Technol. – 2002. – Vol. 13. – № 6–7. – P. 205–216.
7. Kilaru S., Hoegger P.J., Kües U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies // Curr. Genet. – 2006. – Vol. 50. – № 1. – P. 45–60.
8. Jia L.D. et al. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica* // J. Basic Microbiol. – 2005. – Vol. 45. – № 3. – P. 190–198.
9. Lorenzo M., Moldes D., Sanromán M.Á. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes // Chemosphere. – 2006. – Vol. 63. – № 6. – P. 912–917.
10. Vasina D. V. et al. The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: Genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction // Biochimie. Elsevier Ltd. – 2015. – Vol. 116. – P. 154–164.
11. Yaver D.S. et al. Purification , Characterization , Molecular Cloning , and Expression of Two Laccase Genes from the White Rot Basidiomycete *Trametes villosa* // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – Vol. 62. – № 3. – P. 834–841.
12. Temp U., Zierold U., Eggert C. Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* // Gene. – 1999. – Vol. 236. – № 1. – P. 169–177.
13. Xiao Y.Z. et al. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2 // Mycologia. – 2004. – Vol. 96. – № 1. – P. 26–35.
14. Koschorreck K. et al. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs // Arch. Biochem. Biophys. – 2008. – Vol. 474. – № 1. – P. 213–219.
15. Pavlov A.R. et al. Draft Genome Sequence of the Fungus *Trametes hirsuta* 072 // Genome Announc. American Society for Microbiology. – 2015. – Vol. 3. – №

6. – P. e01287-15.
16. Polyakov K.M. et al. Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* International Union of Crystallography. – 2009. – Vol. 65. – № 6. – P. 611–617.
 17. Rebrikov D. V. et al. Laccase of the lignolytic fungus *Trametes hirsuta*: Purification and characterization of the enzyme, and cloning and primary structure of the gene // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2006. – Vol. 42. – № 6. – P. 564–572.
 18. Glazunova O. et al. Catalytic Efficiency of Basidiomycete Laccases: Redox Potential versus Substrate-Binding Pocket Structure // *Catalysts.* – 2018. – Vol. 8. – № 4. – P. 152.
 19. Sirim D. et al. The Laccase Engineering Database: A classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases // *Database.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–7.
 20. Kaczmarek M. et al. Laccases – enzymes with an unlimited potential // *Biotechnol. Food Sci.* – 2017. – Vol. 2017. – № 1. – P. 41–70.
 21. Ausec L. et al. Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – № 10.
 22. Hoegger P.J. et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences // *FEBS J.* – 2006. – Vol. 273. – № 10. – P. 2308–2326.
 23. Yoshida H. Chemistry of lacquer (Urushi) part 1 // *J Chem Soc.* – 1983. – № 43. – P. 472–486.
 24. Reiss R. et al. Laccase versus Laccase-Like Multi-Copper Oxidase: A Comparative Study of Similar Enzymes with Diverse Substrate Spectra // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 6.
 25. Valderrama B., Oliver P, Medrano S.A., Vazquez-Duhalt R. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2003. – Vol. 84. – № 4. – P. 289–299.
 26. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. Multicopper Oxidases and Oxygenases // *Chem. Rev.* – 1996. – Vol. 96. – № 7. – P. 2563–2606.
 27. Kunamneni A. et al. Laccases and their applications: a patent review. // *Recent Pat. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 2. – № 1. – P. 10–24.
 28. Forootanfar H., Faramarzi M.A. Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications // *Biotechnol. Prog.* – 2015. – Vol. 31. – № 6. – P. 1443–1463.
 29. Shleev S. et al. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes // *Bioelectrochemistry.* – 2005. – Vol. 67. – № 1. – P. 115–124.
 30. Chaurasia P.K., Yadav R.S.S., Yadava S. Purification and characterization of yellow laccase from *Trametes hirsuta* MTCC-1171 and its application in synthesis of aromatic aldehydes // *Process Biochem.* Elsevier Ltd. – 2014. – Vol. 49. – № 10. – P. 1647–1655.
 31. Mukhopadhyay M., Banerjee R. Purification and biochemical characterization of

- a newly produced yellow laccase from *Lentinus squarrosulus* MR13 // 3 Biotech. – 2015. – Vol. 5. – № 3. – P. 227–236.
32. Wang S.N. et al. An extracellular yellow laccase from white rot fungus *Trametes* sp. F1635 and its mediator systems for dye decolorization // Biochimie. Elsevier Ltd. – 2018. – Vol. 148. – P. 46–54.
 33. Leontievsky A. et al. “Yellow” laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators // FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies. – 1997. – Vol. 413. – № 3. – P. 446–448.
 34. Palmieri G. et al. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus* // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – № 50. – P. 31301–31307.
 35. Ducros V. et al. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution // Nat. Struct. Biol. – 1998. – Vol. 5. – № 4. – P. 310–316.
 36. Piontek K., Antorini M., Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – № 40. – P. 37663–37669.
 37. Hakulinen N. et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site // Nat. Struct. Biol. – 2002. – Vol. 9. – № 8. – P. 601–605.
 38. Hakulinen N., Rouvinen J. Three-dimensional structures of laccases // Cell. Mol. Life Sci. – 2015. – Vol. 72. – № 5. – P. 857–868.
 39. Garavaglia S. et al. The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair // J. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 342. – № 5. – P. 1519–1531.
 40. Maestre-Reyna M. et al. Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus* sp. // PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – № 4. – P. 1–28.
 41. Lyashenko A. V. et al. X-ray structural studies of the fungal laccase from *Cerrena maxima* // J. Biol. Inorg. Chem. – 2006. – Vol. 11. – № 8. – P. 963–973.
 42. Matera I. et al. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate // Inorganica Chim. Acta. – 2008. – Vol. 361. – № 14–15. – P. 4129–4137.
 43. Polyakov K.M. et al. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: Insights into the reaction mechanism // Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol. International Union of Crystallography. – 2017. – Vol. 73. – № 5. – P. 388–401.
 44. Pardo I. et al. Re-designing the substrate binding pocket of laccase for enhanced oxidation of sinapic acid // Catal. Sci. Technol. Royal Society of Chemistry. – 2016. – Vol. 6. – № 11. – P. 3900–3910.
 45. Куликова Н.А. et al. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты (обзор) // Прикладная Биохимия И Микробиология. – 2011. – Т. 47. – № 6. – С. 619–634.
 46. Morozova O. V. et al. Laccase-mediator systems and their applications: A

- review // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2007. – Vol. 43. – № 5. – P. 523–535.
47. Garzillo A.M. et al. Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii* // *J. Protein Chem.* – 2001. – Vol. 20. – № 3. – P. 191–201.
 48. Shleev S. V. et al. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes // *Biochimie.* – 2004. – Vol. 86. – № 9–10. – P. 693–703.
 49. Xu F. et al. Targeted Mutations in a *Trametes villosa* laccase. Axial perturbations of the T1 copper // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 274. – № 18. – P. 12372–12375.
 50. Reinhammar B.R. Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin // *BBA - Bioenerg.* – 1972. – Vol. 275. – № 2. – P. 245–259.
 51. Yaver D.S. et al. Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase Lcc1 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65. – № 11. – P. 4943–4948.
 52. Rodriguez-Couto S. Laccases for Denim Bleaching: An Eco-Friendly Alternative // *Open Text. J.* – 2012. – Vol. 5. – № 1. – P. 1–7.
 53. Ghatge S. et al. A novel laccase from thermoalkaliphilic bacterium *Caldalkalibacillus thermarum* strain TA2.A1 able to catalyze dimerization of a lignin model compound // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 102. – № 9. – P. 4075–4086.
 54. Guo L.-Q. et al. Production, purification and characterization of a thermostable laccase from a tropical white-rot fungus // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 27. – № 3. – P. 731–735.
 55. Yoshitake A. et al. N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor* // *J. Gen. Microbiol.* – 1993. – Vol. 139. – № 1. – P. 179–185.
 56. Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – № 2. – P. 924–928.
 57. Garzillo A.M. V. et al. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 49. – № 5. – P. 545–551.
 58. Galhaup C. et al. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions // *Microbiology.* – 2002. – Vol. 148. – № 7. – P. 2159–2169.
 59. Soden D.M., O'Callaghan J., Dobson A.D.W. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host // *Microbiology.* – 2002. – Vol. 148. – № 12. – P. 4003–4014.
 60. Chefetz B., Chen Y., Hadar Y. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilium* and its role in humification // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64. – № 9. – P. 3175–3179.
 61. Edens W.A. et al. Purification and characterization of a secreted laccase of

- Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – № 7. – P. 3071–3074.
62. Ahmad A.A. et al. Zinc-Laccase Biofuel Cell // IIUM Eng. Journal. Spec. Issue Biotechnol. – 2011. – Vol. 12. – № 4. – P. 153–160.
63. Kiiskinen L.L. et al. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme // Microbiology. – 2004. – Vol. 150. – № 9. – P. 3065–3074.
64. Xu F. et al. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability // Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol. – 1996. – Vol. 1292. – № 2. – P. 303–311.
65. Schneider P. et al. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase // Enzyme Microb. Technol. – 1999. – Vol. 25. – P. 502–508.
66. Bulter T. et al. Functional Expression of a Fungal Laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by Directed Evolution // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69. – № 2. – P. 987–995.
67. Heinzkill M. et al. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae) // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64. – № 5. – P. 1601–1606.
68. Jung H., Xu F., Li K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7 // Enzyme Microb. Technol. – 2002. – Vol. 30. – № 2. – P. 161–168.
69. Record E. et al. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 269. – № 2. – P. 602–609.
70. Viswanath B. et al. Fungal laccases and their applications in bioremediation // Enzyme Res. – 2014. – Vol. 2014. – Epub 2014 May 15. – 2014:163242.
71. Giardina P. et al. Laccases: A never-ending story // Cell. Mol. Life Sci. – 2010. – Vol. 67. – № 3. – P. 369–385.
72. Papinutti L., Martínez M.J. Production and characterization of laccase and manganese peroxidase from the ligninolytic fungus *Fomes sclerodermeus* // J. Chem Technol Biotechnol. – 2006. – Vol. 81. – P. 1064–1070.
73. Zouari N., Romette J.L., Thomas D. Purification and properties of two laccase isoenzymes produced by *Botrytis cinerea* // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1987. – Vol. 15. – № 3. – P. 213–225.
74. Rodgers C.J. et al. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? // Trends Biotechnol. – 2010. – Vol. 28. – № 2. – P. 63–72.
75. Skyba O., Douglas C.J., Mansfield S.D. Syringyl-Rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79. – № 8. – P. 2560–2571.
76. Kataoka K. et al. Structure and Function of the Engineered Multicopper Oxidase CueO from *Escherichia coli*-Deletion of the Methionine-Rich Helical Region Covering the Substrate-Binding Site // J. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 373. – № 1. – P. 141–152.

77. Shraddha et al. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications // *Enzyme Res.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–11.
78. Otto B., Schlosser D. First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aeria* // *Planta.* – 2014. – Vol. 240. – № 6. – P. 1225–1236.
79. Shi L. et al. Identification and characterization of a laccase from *Litopenaeus vannamei* involved in anti-bacterial host defense // *Fish Shellfish Immunol.* Elsevier Ltd. – 2017. – Vol. 66. – P. 1–10.
80. Morozova O. V et al. “ Blue ” Laccases // *Biochemistry (Mosc).* – 2007. – Vol. 72. – № 10. – P. 1136–1150.
81. Mayer A.M., Staples R.C. Laccase: new functions for an old enzyme // *Phytochemistry.* – 2002. – Vol. 60. – P. 551–565.
82. Berthet S. et al. Role of Plant Laccases in Lignin Polymerization // *Advances in Botanical Research.* 1st ed. Elsevier Ltd. – 2012. – Vol. 61. – 145-172 p.
83. Dwivedi U.N. et al. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases // *J. Mol. Catal. B Enzym.* Elsevier B.V. – 2011. – Vol. 68. – № 2. – P. 117–128.
84. Lu L. et al. Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04 // *Bioresour. Technol.* Elsevier Ltd. – 2012. – Vol. 115. – P. 35–40.
85. McMahon A.M. et al. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6 // *Enzyme Microb. Technol.* – 2007. – Vol. 40. – № 5. – P. 1435–1441.
86. Claus H. Laccases and their occurrence in prokaryotes // *Arch. Microbiol.* – 2003. – Vol. 179. – № 3. – P. 145–150.
87. Sharma P., Goel R., Capalash N. Bacterial laccases // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 23. – № 6. – P. 823–832.
88. Singh G. et al. Laccase from prokaryotes: A new source for an old enzyme // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 10. – № 4. – P. 309–326.
89. Chandra R., Chowdhary P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes // *Environ. Sci. Process. Impacts.* – 2015. – Vol. 17. – № 2. – P. 326–342.
90. Lisov A. V. et al. Laccases produced by lichens of the order *Peltigerales* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2007. – Vol. 275. – № 1. – P. 46–52.
91. Futahashi R. et al. Laccase2 is required for cuticular pigmentation in stinkbugs // *Insect Biochem. Mol. Biol.* Elsevier Ltd. – 2011. – Vol. 41. – № 3. – P. 191–196.
92. Dittmer N.T., Kanost M.R. Insect multicopper oxidases: Diversity, properties, and physiological roles // *Insect Biochem. Mol. Biol.* Elsevier Ltd. – 2010. – Vol. 40. – № 3. – P. 179–188.
93. Kramer K.J. et al. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. // *Tetrahedron.* – 2001. – Vol. 57. – P. 385–392.
94. Brijwani K., Rigdon A., Vadlani P. V. Fungal laccases: Production, function,

- and applications in food processing // *Enzyme Res.* – 2010. – Vol. 2010. – P. 1–10.
95. Pezzella C., Guarino L., Piscitelli A. How to enjoy laccases // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2015. – Vol. 72. – № 5. – P. 923–940.
 96. Iyer G., Chattoo B.B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2003. – Vol. 227. – № 1. – P. 121–126.
 97. Kiiskinen L.L., Viikari L., Kruus K. Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 59. – № 2–3. – P. 198–204.
 98. Froehner S.C., Eriksson K.E. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase // *J. Bacteriol.* – 1974. – Vol. 120. – № 1. – P. 458–465.
 99. Hölker U., Dohse J., Höfer M. Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum* // *Folia Microbiol. (Praha)* . – 2002. – Vol. 47. – № 4. – P. 423–427.
 100. Velazquez-Cedeno M.A., Farnet A.M., Ferre E. Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized straw // *Mycologia.* – 2004. – Vol. 96. – № 4. – P. 712–719.
 101. Zhao D. et al. Characterisation of a novel white laccase from the deuteromycete fungus *Myrothecium verrucaria* NF-05 and its decolourisation of dyes // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – № 6.
 102. Nagai M. et al. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: Purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies // *Microbiology.* – 2003. – Vol. 149. – № 9. – P. 2455–2462.
 103. Eggert C. et al. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid // *FEBS Lett.* – 1995. – Vol. 376. – № 3. – P. 202–206.
 104. Thurston C.F. The structure and function of fungal laccases // *Microbiology.* – 1994. – Vol. 140. – P. 19–26.
 105. Youn H., Hah Y.C., Kang S. Role of lactase in lignin degradation by white-rot fungi // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1995. – Vol. 132. – № 95. – P. 183–188.
 106. Shi L. et al. Biochemical and molecular characterization of a novel laccase from selective lignin-degrading white-rot fungus *Echinodontium taxodii* 2538 // *Process Biochem.* Elsevier Ltd. – 2014. – Vol. 49. – № 7. – P. 1097–1106.
 107. Park M. et al. Differential expression of laccase genes in *Pleurotus ostreatus* and biochemical characterization of laccase isozymes produced in *Pichia pastoris* // *Mycobiology.* – 2015. – Vol. 43. – № 3. – P. 280–287.
 108. Kiiskinen L.L., Rättö M., Kruus K. Screening for novel laccase-producing microbes // *J. Appl. Microbiol.* – 2004. – Vol. 97. – № 3. – P. 640–646.
 109. Niku-Paavola M.L. et al. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata* // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 254. – № 3. – P. 877–883.
 110. Palmieri G. et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – № 3.

- P. 920–924.
111. Bourbonnais R. et al. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61. – № 5. – P. 1876–1880.
 112. Hailei W. et al. Overproduction of laccase from a newly isolated *Ganoderma lucidum* using the municipal food waste as main carbon and nitrogen supplement // *Bioprocess Biosyst. Eng.* – 2015. – Vol. 38. – № 5. – P. 957–966.
 113. Hatakka A. Biodegradation of lignin / ed. Hofrichter M., Steinbuchel A. Helsinki: University of Helsinki. – 2001. – 129-179 p.
 114. Baldrian P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2004. – Vol. 50. – № 3. – P. 245–253.
 115. Tlecutl-Beristain S. et al. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform // *Mycol. Res.* – 2008. – Vol. 112. – № 9. – P. 1080–1084.
 116. Tamayo Ramos J.A. et al. The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes // *Microb. Cell Fact.* – 2011. – Vol. 10. – № 1. P. 78.
 117. Tetsch L. et al. Evidence for functional laccases in the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila* and isolation of laccase-specific gene fragments // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – Vol. 245. – № 1. – P. 161–168.
 118. Cázares-García S.V., Vázquez-Garcidueñas M.S., Vázquez-Marrufo G. Structural and Phylogenetic Analysis of Laccases from *Trichoderma*: A Bioinformatic Approach // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 1.
 119. Levasseur A. et al. Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: A functional, phylogenetic and evolutionary study // *BMC Biochem.* – 2010. – Vol. 11. – № 1.
 120. Moiseenko K. V. et al. Laccase multigene families in Agaricomycetes // *J. Basic Microbiol.* – 2016. – Vol. 56. – № 12. – P. 1392–1397.
 121. Ramírez-Cavazos L.I. et al. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals // *J. Mol. Catal. B Enzym.* Elsevier B.V. . – 2014. – Vol. 108. – P. 32–42.
 122. Yaver D.S., Golightly E.J. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: Genomic organization of the laccase gene family // *Gene.* – 1996. – Vol. 181. – № 1–2. – P. 95–102.
 123. Zhuo R. et al. Heterologous expression and characterization of three laccases obtained from *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 for removal of environmental pollutants // *J. Hazard. Mater.* Elsevier B.V. . – 2018. – Vol. 344. – P. 499–510.
 124. Nitheranont T., Watanabe A., Asada Y. Extracellular Laccase Produced by an Edible Basidiomycetous Mushroom *Grifola frondosa*: Purification and Characterization // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2011. – Vol. 75. – № 3. – P. 538–543.
 125. Nitheranont T., Watanabe A., Asada Y. Heterologous expression of two minor

- laccase isozyme cDNAs from the edible mushroom *Grifola frondosa* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2017. – Vol. 81. – № 12. – P. 2367–2369.
126. Lin Y. et al. Purification and characterization of a novel laccase from *Coprinus cinereus* and decolorization of different chemically dyes // Mol. Biol. Rep. – 2013. – Vol. 40. – № 2. – P. 1487–1494.
127. Wang B. et al. Purification and characterization of a laccase from *Coprinopsis cinerea* in *Pichia pastoris* // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 30. – № 4. – P. 1199–1206.
128. Saloheimo M., Niku-Paavola M.-L., Knowles J.K.C. Isolation and structural analysis of the laccase gene from the ligninegrading fungus *Phlebia radiata* // J. Gen. Microbiol. – 1991. – Vol. 137. – № 7. – P. 1537–1544.
129. Mäkelä M.R. et al. Expression and molecular properties of a new laccase of the white rot fungus *Phlebia radiata* grown on wood // Curr. Genet. – 2006. – Vol. 50. – № 5. – P. 323–333.
130. Yuan X. et al. Biochemical characteristics of three laccase isoforms from the basidiomycete *Pleurotus nebrodensis* // Molecules. – 2016. – Vol. 21. – № 2. – P. 1–15.
131. Dantán-González E. et al. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat // Int. Microbiol. – 2008. – Vol. 11. – № 3. – P. 163–169.
132. Nishizawa Y., Nakabayashi K., Shinagawa E. Purification and characterization of laccase from white rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2 // J. Ferment. Bioeng. – 1995. – Vol. 80. – № 1. – P. 91–93.
133. Oda Y. et al. Purification and Properties of Laccase Excreted by *Pycnoporus coccineus* // Agric. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 55. – № 5. – P. 1393–1395.
134. Uzan E. et al. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: From gene cloning to enzyme characterization and applications // J. Appl. Microbiol. – 2010. – Vol. 108. – № 6. – P. 2199–2213.
135. Nakade K. et al. Characterization of an extracellular laccase, PbLac1, purified from *Polyporus brumalis* // Fungal Biol. Elsevier Ltd. – 2010. – Vol. 114. – № 8. – P. 609–618.
136. Ryu S.H., Lee A.Y., Kim M. Molecular characteristics of two laccase from the basidiomycete fungus *Polyporus brumalis* // J. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – № 1. – P. 62–69.
137. Kim H. et al. Decolorization of remazol brilliant blue R by a purified laccase of *Polyporus brumalis* // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2012. – Vol. 166. – № 1. – P. 159–164.
138. Xiao Y.Z. et al. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – Vol. 60. – № 6. – P. 700–707.
139. Zhang H. et al. Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 73. – № 1. – P. 89–94.

140. Eggert C. et al. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – Vol. 62. – № 4. – P. 1151–1158.
141. Otterbein L. et al. Isolation of a new laccase isoform from the white-rot fungi *Pycnoporus cinnabarinus* strain ss3. // *Can. J. Microbiol.* – 2000. – Vol. 46. – P. 759–763.
142. Levin L., Forchiassin F., Ramos A.M. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii* // *Mycologia.* – 2002. – Vol. 94. – № 3. – P. 377–383.
143. Campos P.A., Levin L.N., Wirth S.A. Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC 463 // *Process Biochem. Elsevier Ltd.* – 2016. – Vol. 51. – № 7. – P. 895–903.
144. Coll P.M. et al. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971) // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – Vol. 59. – № 8. – P. 2607–2613.
145. Zouari-Mechichi H. et al. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme // *Enzyme Microb. Technol.* – 2006. – Vol. 39. – № 1. – P. 141–148.
146. Colao M.C. et al. Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. // *Microb. Cell Fact.* – 2006. – Vol. 5. – P. 31.
147. Jolivalt C. et al. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 66. – № 4. – P. 450–456.
148. Fujihiro S. et al. Metabolism of hydroxylated PCB congeners by cloned laccase isoforms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 82. – № 5. – P. 853–860.
149. Han M.J., Choi H.T., Song H.G. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* // *J. Microbiol.* 2005. – Vol. 43. – № 6. – P. 555–560.
150. Necochea R. et al. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – Vol. 244. – № 2. – P. 235–241.
151. Tong P. et al. High production of laccase by a new basidiomycete *Trametes* sp. // *Biotechnol. Lett.* – 2007. – Vol. 29. – № 2. – P. 295–301.
152. Hong Y.Z. et al. Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris* // *Curr. Microbiol.* – 2007. – Vol. 54. – № 4. – P. 260–265.
153. Zhou H.M. et al. High Output of a *Trametes* Laccase in *Pichia pastoris* and Characterization of Recombinant Enzymes // *Chin. J. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 23. – № 6. – P. 1055–1059.
154. Dedeyan B. et al. Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – № 3. – P. 925–929.

155. Klonowska A. et al. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30 // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – Vol. 269. – № 24. – P. 6119–6125.
156. Klonowska A. et al. LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast // *Enzyme Microb. Technol.* – 2005. – Vol. 36. – № 1. – P. 34–41.
157. Shin K.S., Lee Y.J. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – Vol. 384. – № 1. – P. 109–115.
158. Haibo Z. et al. Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta* // *Biotechnol. Lett.* – 2009. – Vol. 31. – № 6. – P. 837–843.
159. Zapata-Castillo P. et al. Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2015. – Vol. 61. – № 3. – P. 252–258.
160. Piscitelli A. et al. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi // *Curr. Genomics.* – 2011. – Vol. 12. – № 2. – P. 104–112.
161. Gu C. et al. Engineering the expression and characterization of two novel laccase isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by fusing an additional ten amino acids tag at N-terminus // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 4.
162. Christensen N.J., Kepp K.P. Setting the stage for electron transfer: Molecular basis of ABTS-binding to four laccases from *Trametes versicolor* at variable pH and protein oxidation state // *J. Mol. Catal. B Enzym. Elsevier B.V.* – 2014. – Vol. 100. – P. 68–77.
163. Kudryavtseva O.A. et al. Fungal proteolytic enzymes: Features of the extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes // *Microbiology.* – 2008. – Vol. 77. – № 6. – P. 643–653.
164. Iandolo D. et al. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 163. – № 1. – P. 40–51.
165. Athey J. et al. A new and updated resource for codon usage tables // *BMC Bioinformatics. BMC Bioinformatics.* – 2017. – Vol. 18. – № 1. – P. 1–10.
166. Cusano A.M. et al. Plasticity of laccase generated by homeologous recombination in yeast // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276. – № 19. – P. 5471–5480.
167. Mate D.M., Alcalde M. Laccase engineering: From rational design to directed evolution // *Biotechnol. Adv. Elsevier Inc.* – 2015. – Vol. 33. – № 1. – P. 25–40.
168. MacKenzie D.A., Jeenes D.J., Archer D.B. Filamentous Fungi as Expression Systems for Heterologous Proteins // *Genet. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 2. – P. 289–315.
169. Pakula T.M. et al. The effects of drugs inhibiting protein secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Evidence for down-regulation of genes that encode secreted proteins in the stressed cells // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – № 45. – P. 45011–45020.
170. Al-Sheikh H. et al. Endoplasmic reticulum stress leads to the selective

- transcriptional downregulation of the glucoamylase gene in *Aspergillus niger* // Mol. Microbiol. – 2004. – Vol. 53. – № 6. – P. 1731–1742.
171. Nevalainen K.M.H., Te'o V.S.J., Bergquist P.L. Heterologous protein expression in filamentous fungi // Trends Biotechnol. – 2005. – Vol. 23. – № 9. – P. 468–474.
 172. Wang H., Ward M. Molecular characterization of a PDI-related gene *prpA* in *Aspergillus niger* var. *awamori* // Curr. Genet. – 2000. – Vol. 37. – № 1. – P. 57–64.
 173. Moralejo F.J. et al. A defined level of protein disulfide isomerase expression is required for optimal secretion of thaumatin by *Aspergillus awamori* // Mol. Genet. Genomics. – 2001. – Vol. 266. – № 2. – P. 246–253.
 174. Nevalainen H., Peterson R. Making recombinant proteins in filamentous fungi – are we expecting too much? // Front. Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–10.
 175. Rodríguez E. et al. Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the *pel3* encoded protein // J. Biotechnol. – 2008. – Vol. 134. – P. 9–19.
 176. Salony et al. Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli* // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. – 2008. – Vol. 1784. – № 2. – P. 259–268.
 177. Nicolini C. et al. Recombinant Laccase: I. Enzyme cloning and characterization // J. Cell. Biochem. – 2013. – Vol. 114. – № 3. – P. 599–605.
 178. Suzuki T. et al. A Thermostable Laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, Characterization, Nucleotide Sequence, and Expression // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2003. – Vol. 67. – № 10. – P. 2167–2175.
 179. Koschorreck K., Schmid R.D., Urlacher V.B. Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site-directed mutagenesis // BMC Biotechnol. – 2009. – Vol. 9. – P. 1–10.
 180. Fathi-Roudsari M. et al. Substrate-dependent expression of laccase in genetically modified *Escherichia coli*: Design and construction of an inducible phenol-degrading system // Prep. Biochem. Biotechnol. – 2013. – Vol. 43. – № 5. – P. 456–467.
 181. Beneyton T. et al. CotA laccase: High-throughput manipulation and analysis of recombinant enzyme libraries expressed in *E. coli* using droplet-based microfluidics // Analyst. – 2014. – Vol. 139. – № 13. – P. 3314–3323.
 182. Machczynski M.C. et al. Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity // Protein Sci. – 2004. – Vol. 13. – № 9. – P. 2388–2397.
 183. Feng H. et al. Expression and Characterization of a Recombinant Laccase with Alkalistable and Thermostable Properties from *Streptomyces griseorubens* JSD-1 // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2015. – Vol. 176. – № 2. – P. 547–562.
 184. Ihssen J. et al. Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli* // Sci. Rep. Nature Publishing Group. – 2015. – Vol. 5. – № November 2014. – P. 1–13.
 185. Durão P. et al. Copper incorporation into recombinant CotA laccase from

- Bacillus subtilis*: Characterization of fully copper loaded enzymes // J. Biol. Inorg. Chem. – 2008. – Vol. 13. – № 2. – P. 183–193.
186. Antořová Z., Sychrová H. Yeast Hosts for the Production of Recombinant Laccases: A Review // Mol. Biotechnol. – 2016. – Vol. 58. – № 2. – P. 93–116.
 187. Bonander N., Bill R.M. Optimising Yeast as a Host for Recombinant Protein Production (Review) // Recomb. Protein Prod. Yeast Methods Protoc. Methods Mol. Biol. / ed. Bill R.M. – 2012. – Vol. 866. – P. 1–9.
 188. Kalyani D. et al. A highly efficient recombinant laccase from the yeast *Yarrowia lipolytica* and its application in the hydrolysis of biomass // PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – № 3. – P. 1–17.
 189. Jönsson L.J., Saloheimo M., Penttilä M. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris* // Curr. Genet. – 1997. – Vol. 32. – № 6. – P. 425–430.
 190. Cassland P., Jonsson L.J. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – Vol. 52. – № 3. – P. 393–400.
 191. Piscitelli A. et al. Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 69. – № 4. – P. 428–439.
 192. Pezzella C. et al. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: Isolation and heterologous expression of new family members // Curr. Genet. – 2009. – Vol. 55. – № 1. – P. 45–57.
 193. Yang Y. et al. Expression of the laccase gene from a white rot fungus in *Pichia pastoris* can enhance the resistance of this yeast to H₂O₂-mediated oxidative stress by stimulating the glutathione-based antioxidative system // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol. 78. – № 16. – P. 5845–5854.
 194. Kim D., Kwak E., Choi H.T. Increase of Yeast Survival under Oxidative Stress by the Expression of the Laccase Gene from *Coprinellus congregatus* // J. Microbiol. Microbiol. Soc. Korea. – 2006. – Vol. 44. – № 6. – P. 617–621.
 195. Madzak C. et al. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* // FEMS Yeast Res. – 2005. – Vol. 5. – № 6–7. – P. 635–646.
 196. Mayfield M.B. et al. Homologous expression of recombinant manganese peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium* // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60. – № 12. – P. 4303–4309.
 197. Kilaru S. et al. Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 71. – № 2. – P. 200–210.
 198. Salame T.M. et al. Predominance of a versatile-peroxidase-encoding gene, *mnp4*, as demonstrated by gene replacement via a gene targeting system for *Pleurotus ostreatus* // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol. 78. – № 15. – P. 5341–5352.
 199. Gusakov A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production //

- Trends Biotechnol. Elsevier Ltd. – 2011. – Vol. 29. – № 9. – P. 419–425.
200. Chekushina A. V., Dotsenko G.S., Sinitsyn A.P. Comparing the efficiency of plant material bioconversion processes using biocatalysts based on *Trichoderma* and *Penicillium verruculosum* enzyme preparations // Catal. Ind. – 2013. – Vol. 5. – № 1. – P. 98–104.
 201. Paloheimo M., Haarmann T., Mäkinen S. Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications. Production of Industrial Enzymes in *Trichoderma reesei* / ed. Schmoll M., Dattenböck C. Springer International Publishing Switzerland. – 2016. – 23-57 p.
 202. Rozhkova A.M. et al. *Penicillium canescens* as a potential tool for production of tailored cellulase cocktails // International Conference «Renewable Plant Resources: Chemistry, Technology, Medicine». Saint Petersburg. – 2017. – P. 145–146.
 203. Moralejo F.J. et al. Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – № 3. – P. 1168–1174.
 204. Fleiner A., Dersch P. Expression and export: Recombinant protein production systems for *Aspergillus* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 87. – № 4. – P. 1255–1270.
 205. Punt P.J. et al. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // Gene. – 1990. – Vol. 93. – № 1. – P. 101–109.
 206. Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. Microorganisms in Biorefineries. *Penicillium canescens* Host as the Platform for Development of a New Recombinant Strain Producers of Carbohydrases / ed. Kamm B. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2015. – Vol. 26. – 1-19 p.
 207. Chulkin A.M. et al. Cloning of the *Penicillium canescens* endo-1,4-beta-glucanase gene *egl3* and the characterization of the recombinant enzyme // Prikl. Biokhim. Mikrobiol. – 2009. – Vol. 45. – № 2. – P. 163–170.
 208. Зоров И.Н. et al. Новый рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Penicillium canescens* cs15, продуцирующий целлюлазу *Clostridium thermocellum*, и способ его культивирования: pat. RU2612158. – 2017.
 209. Bushina E. V. et al. Development of complex enzymatic preparations of pectinases and cellulases for sugar beet marc digestion // Appl. Biochem. Microbiol. – 2012. – Vol. 48. – № 5. – P. 493–499.
 210. Volkov P. V. et al. Isolation and Properties of Recombinant Inulinases from *Aspergillus* sp. // Biochem. – 2012. – Vol. 77. – № 5. – P. 611–621.
 211. Mekmouche Y. et al. Gram-scale production of a basidiomycetous laccase in *Aspergillus niger* // J. Biosci. Bioeng. Elsevier Ltd. – 2014. – Vol. 117. – № 1. – P. 25–27.
 212. Abyanova A.R. et al. A heterologous production of the *Trametes hirsuta* laccase in the fungus *Penicillium canescens* // Appl. Biochem. Microbiol. – 2010. – Vol. 46. – № 3. – P. 313–317.
 213. Iimura Y., Sonoki T., Habe H. Heterologous expression of *Trametes versicolor*

- laccase in *Saccharomyces cerevisiae* // Protein Expr. Purif. Elsevier Inc. – 2018. – Vol. 141. – P. 39–43.
214. Mate D.M., Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology // Microb. Biotechnol. – 2017. – Vol. 10. – № 6. – P. 1457–1467.
215. Polak J., Jarosz-Wilkolazka A. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis // Process Biochem. Elsevier Ltd. – 2012. – Vol. 47. – № 9. – P. 1295–1307.
216. Viswanath B. et al. Production and purification of laccase from *Stereum ostrea* and its ability to decolorize textile dyes // Dyn. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biol. – 2008. – Vol. 2. – P. 19–25.
217. Vantamuri A.B., Kaliwal B.B. Purification and characterization of laccase from *Marasmius species* BBKAV79 and effective decolorization of selected textile dyes // 3 Biotech. Springer Berlin Heidelberg. – 2016. – Vol. 6. – № 2. – P.1-10
218. Iracheta-Cárdenas M.M. et al. A *Pycnoporus sanguineus* laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic commercial formulation // J. Environ. Manage. – 2016. – Vol. 177. – P. 93–100.
219. Silva C. et al. Antimicrobial and antioxidant linen via laccase-assisted grafting // React. Funct. Polym. Elsevier Ltd. – 2011. – Vol. 71. – № 7. – P. 713–720.
220. Osma J.F., Toca-Herrera J.L., Rodríguez-Couto S. Uses of Laccases in the Food Industry // Enzyme Res. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1–8.
221. Struch M. et al. Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators // Int. Dairy J. – 2015. – Vol. 49. – P. 89–94.
222. Strong P.J., Claus H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation // Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. – 2011. – Vol. 41. – № 4. – P. 373–434.
223. Dellafiora L. et al. Degradation of aflatoxins by means of laccases from *Trametes versicolor*: An in silico insight // Toxins (Basel) . – 2017. – Vol. 9. – № 1. – P. 1–13.
224. Cheong S.H. et al. Polymerized urushiol of the commercially available Rhus product in Korea // Ann. Dermatol. – 2010. – Vol. 22. – № 1. – P. 16–20.
225. Khomutov S.M. et al. Laccase-mediated oxyfunctionalization of 3 β -hydroxy- Δ 5-steroids // J. Mol. Catal. B Enzym. Elsevier B.V. – 2016. – Vol. 123. – P. 47–52.
226. Singh J. et al. Laccase grafted membranes for advanced water filtration systems: a green approach to water purification technology // Crit. Rev. Biotechnol. Informa Healthcare USA, Inc. – 2018. – Vol. 38. – № 6. – P. 883–901.
227. Khan R., Bhawana P., Fulekar M.H. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: A review // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. – 2013. – Vol. 12. – № 1. – P. 75–97.
228. Jönsson L.J. et al. Detoxification of wood hydrolysate with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *T. versicolor* // Appl Microb Biotechnol. – 1998. – Vol. 49. – P. 691–697.
229. Fang Z. et al. Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002

- and its application in bioethanol production David Wilson // *Biotechnol. Biofuels.* – 2015. – Vol. 8. – № 1. – P. 2–13.
230. Сивочуб О.А. Каталог культур базидиомицетов Коллекции Ботанического Института им. В.Л. Комарова РАН. – Санкт-Петербург: Наука. – 1992. – 25 с.
231. Koroljova-Skorobogat'ko O. V et al. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1998. – Vol. 28 (Pt 1) . – P. 47–54.
232. Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86. – P. 2172–2175.
233. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – Москва: Мир. – 1984. – 480 с.
234. Peyronel D.V., Cantera A.M.B. A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of proteases using azocasein // *Electrophoresis.* – 1995. – Vol. 16. – № 1. – P. 1894–1897.
235. Morales-Belpaire I., Gerin P.A. Fate of amyloid fibrils introduced in wastewater sludge // *Water Res. Elsevier Ltd.* – 2008. – Vol. 42. – № 17. – P. 4449–4456.
236. Wilson P. Production and characterisation of protease enzyme produced by a novel moderate thermophilic bacterium (EP1001) isolated from an alkaline hot spring, Zimbabwe // *African J. Microbiol. Res.* – 2012. – Vol. 6. – № 27. – P. 5542–5551.
237. Cupp-Enyard C. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate // *J. Vis. Exp.* – 2008. – Vol. 19. – P. 4–5.
238. Логинов Д.С. Сравнительная характеристика нативного и рекомбинантного лигнолитического фермента – лакказы. дис. канд.биол.наук: 03.01.04 / Логинов Дмитрий Сергеевич. Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН. – 2010. – 122 с.
239. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – № 5259. – P. 680–685.
240. Glazunova O.A. et al. White-rot basidiomycetes *Junghuhnia nitida* and *Steccherinum bourdotii*: Oxidative potential and laccase properties in comparison with *Trametes hirsuta* and *Coriolopsis caperata* // *PLoS One.* – 2018. – P. 1–22.
241. Lloyd A.T., Sharp P.M. Codon usage in *Aspergillus nidulans* // *Mol. Gen. Genet.* – 1991. – Vol. 230. – P. 288–294.
242. Wilkins M.R. et al. Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server // *Methods Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 112. – P. 531–552.
243. Gupta R., Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function // *Biocomput.* 2002. – 2002. – Vol. 322. – P. 310–322.
244. Babicki S. et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44. – P. W147–W153.

245. Bohlin C. et al. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger* // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2006. – Vol. 129–132. – P. 195–214.
246. Larrondo L.F. et al. Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns // Microbiology. – 2003. – Vol. 149. – № 5. – P. 1177–1182.
247. Galagan J.E. et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae* // Nature. – 2005. – Vol. 438. – № 7071. – P. 1105–1115.
248. Чулкин А.М. CREA – зависимая углеродная катаболитная репрессия в *Penicillium canescens*. дис. канд.биол.наук: 03.01.03 / Чулкин Андрей Михайлович. ФГУП “ГосНИИГенетика,” . – 2011. – 118 с.
249. Oakley B.R. et al. Cloning, mapping and molecular analysis of the pyrG (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*. // Gene. – 1987. – Vol. 61. – № 3. – P. 385–399.
250. Berka R.M. et al. Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae* // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 63. – № 8. – P. 3151–3157.
251. Hakulinen N. et al. A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase // J. Struct. Biol. – 2008. – Vol. 162. – № 1. – P. 29–39.
252. Kallio J.P. et al. Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from *Thielavia arenaria* - Common structural features of asco-laccases // FEBS J. – 2011. – Vol. 278. – № 13. – P. 2283–2295.
253. Andberg M. et al. Essential role of the C-terminus in *Melanocarpus albomyces* laccase for enzyme production, catalytic properties and structure // FEBS J. – 2009. – Vol. 276. – № 21. – P. 6285–6300.
254. Aleksenko a Y. et al. Integrative and Replicative Transformation of *Penicillium canescens* with a Heterologous Nitrate Reductase Gene // Curr. Genet. – 1995. – Vol. 28. – № 1995. – P. 474–477.
255. Unkles S.E. et al. The *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase: upstream nucleotide and amino acid sequence comparisons // Gene. – 1992. – Vol. 111. – № 2. – P. 149–155.
256. You L.F. et al. Molecular cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris* // J. Basic Microbiol. – 2014. – Vol. 54. – Suppl.1. – P. 1–8.
257. Huber M., Lerch K. The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa* // FEBS Lett. – 1987. – Vol. 219. – № 2. – P. 335–338.
258. Arora D.S., Rampal P. Laccase production by some *Phlebia* species // J. Basic Microbiol. – 2002. – Vol. 42. – № 5. – P. 295–301.
259. Galhaup C., Haltrich D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – Vol. 56. – № 1–2. – P. 225–232.

260. Paveia M.H. Culture medium alkalization by dermatophytes. Influence of time and temperature of incubation // *Mycopathologia*. – 1975. – Vol. 55. – P. 35–40.
261. Wang Y. et al. Isolation of four pepsin-like protease genes from *Aspergillus niger* and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression // *Fungal Genet. Biol.* – 2008. – Vol. 45. – № 1. – P. 17–27.
262. Liu L. et al. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: Strategies and perspectives // *Bioengineered*. – 2013. – Vol. 4. – № 4. – P. 212–223.
263. Gustafsson C., Govindarajan S., Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression // *Trends Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22. – № 7. – P. 346–353.
264. Nishibori N. et al. Comparison of laccase production levels in *Pichia pastoris* and *Cryptococcus* sp. S-2 // *J. Biosci. Bioeng. Elsevier Ltd.* – 2013. – Vol. 115. – № 4. – P. 394–399.
265. Rivera-Hoyos C.M. et al. Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes GLLCC1 from *Ganoderma lucidum* and POXA 1B from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris* // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 1. – P. 1–21.
266. Wang J., Lu L., Feng F. Combined strategies for improving production of a thermo-alkali stable laccase in *Pichia pastoris* // *Electron. J. Biotechnol. Elsevier España, S.L.U.* – 2017. – Vol. 1. – P. 1–7.
267. Lu J.Z. et al. Construction of a Yeast Cell-Surface Display System and Expression of *Trametes* sp. laccase // *Adv. Mater. Res.* – 2011. – Vol. 347–353. – P. 3635–3640.
268. Wong K.S. et al. A Novel *Lentinula edodes* Laccase and Its Comparative Enzymology Suggest Guaiacol-Based Laccase Engineering for Bioremediation // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 6. – P. 1–12.
269. Jolivalt C. et al. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 66. – № 4. – P. 450–456.
270. Gonçalves I., Silva C., Cavaco-Paulo A. Ultrasound enhanced laccase applications // *Green Chem. Royal Society of Chemistry*. – 2015. – Vol. 17. – № 3. – P. 1362–1374.
271. Christopher L.P., Yao B., Ji Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems // *Front. Energy Res.* – 2014. – Vol. 2. – P. 1–13.
272. Tadesse M.A. et al. An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates // *Org. Biomol. Chem.* – 2008. – Vol. 6. – № 5. – P. 868–878.
273. Galli C. et al. How is the reactivity of laccase affected by single-point mutations? Engineering laccase for improved activity towards sterically demanding substrates // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 91. – № 1. – P. 123–131.
274. Frasconi M. et al. Kinetic and biochemical properties of high and low redox

- potential laccases from fungal and plant origin // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. – 2010. – Vol. 1804. – № 4. – P. 899–908.
275. Lahtinen M. et al. The effect of lignin model compound structure on the rate of oxidation catalyzed by two different fungal laccases // *J. Mol. Catal. B Enzym.* – 2009. – Vol. 57. – № 1–4. – P. 204–210.
276. Gorbatova O.N. et al. Increase of the detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2006. – Vol. 42. – № 4. – P. 414–419.
277. Rodríguez E., Pickard M.A., Vazquez-Duhalt R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi // *Curr. Microbiol.* – 1999. – Vol. 38. – № 1. – P. 27–32.
278. Forgacs E., Cserhádi T., Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review // *Environ. Int.* – 2004. – Vol. 30. – № 7. – P. 953–971.
279. Telke A.A. et al. Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT // *Biodegradation*. – 2010. – Vol. 21. – № 2. – P. 283–296.
280. Malhotra K., Sharma P., Capalash N. Copper and dyes enhance laccase production in γ -proteobacterium JB // *Biotechnol. Lett.* – 2004. – Vol. 26. – № 13. – P. 1047–1050.
281. Forootanfar H. et al. Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase // *Res. J. Chem. Environ.* – 2013. – Vol. 17. – № 5. – P. 76–81.
282. Senthivelan T., Kanagaraj J., Panda R.C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* – 2016. – Vol. 21. – № 1. – P. 19–38.
283. Zhang M. et al. Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis* // *Enzyme Microb. Technol.* – 2006. – Vol. 39. – № 1. – P. 92–97.
284. Camarero S. et al. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for decolorization of recalcitrant dye // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – № 4. – P. 1775–1784.
285. Murugesan K. et al. Enhanced transformation of malachite green by laccase of *Ganoderma lucidum* in the presence of natural phenolic compounds // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 82. – № 2. – P. 341–350.
286. Li H.X. et al. In vivo and in vitro decolorization of synthetic dyes by laccase from solid state fermentation with *Trametes* sp. SYBC-L4 // *Bioprocess Biosyst. Eng.* – 2014. – Vol. 37. – № 12. – P. 2597–2605.
287. Nyanhongo G.S. et al. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta* // *Water Res.* – 2002. – Vol. 36. – № 6. – P. 1449–1456.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность своему первому научному руководителю доктору биологических наук, профессору Королевой Ольге Владимировне за вклад в моё развитие как ученого. Также сердечно благодарю своих научных руководителей – кандидата биологических наук Тяжелову Татьяну Владимировну и доктора химических наук, профессора Сеницына Аркадия Пантелеймоновича за чуткое руководство и внимание, проявленное к настоящей работе. Искреннюю признательность выражаю всем сотрудникам лаборатории молекулярных основ биотрансформаций, лаборатории оптимизации экспрессии генов и лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН, в особенности, к.б.н. Васиной Д.В., к.т.н. Федоровой Т.В., к.б.н. Чулкину А.М., Вавиловой Е.А., к.х.н. Рожковой А.М. и к.х.н. Зорову И.Н. за помощь и советы при постановке экспериментов.

Благодарю своих родных и друзей за всестороннюю поддержку, оказанную на протяжении выполнения настоящей работы.

Приложение 1

Таблица частот использования кодонов в реципиенте (*P. canescens*, *P.c.* и *A. nidulans*, *A.n.*) и последовательностях, кодирующих целевые гены лакказ *T. hirsuta* (выражена в процентах от общего количества для всех кодонов, кодирующих конкретную аминокислоту)

в %	Ala				Cys		Asp		Glu		Phe		Gly				His		Ile			Lys	
	GCG	GCA	GCT	GCC	TGT	TGC	GAT	GAC	GAG	GAA	TTT	TTC	GGG	GGA	GGT	GGC	CAT	CAC	ATA	ATT	ATC	AAG	AAA
<i>lacA</i>	39	2	27	33	33	67	19	81	100	0	6	94	9	11	32	48	35	65	6	26	68	56	44
<i>lacB</i>	29	43	14	14	48	52	50	50	64	36	20	80	15	15	42	27	63	38	33	17	50	35	65
<i>lacC</i>	37	18	18	26	53	47	60	40	40	60	40	60	14	33	33	19	67	33	48	30	22	53	47
<i>lacD</i>	26	14	24	36	36	64	32	68	84	16	25	75	23	3	35	40	50	50	13	24	62	62	38
<i>lacE</i>	20	37	17	26	38	63	55	45	69	31	40	60	27	14	36	23	53	47	12	50	38	53	47
<i>lacF</i>	36	7	24	33	33	67	26	74	92	8	33	67	19	17	19	45	38	63	9	24	68	71	29
<i>lacG</i>	29	15	15	42	57	43	42	58	79	21	18	82	7	11	41	41	35	65	7	31	62	55	45
<i>P.c.</i>	17	22	28	33	44	56	52	48	58	42	34	66	15	23	29	34	47	53	11	38	51	67	33
<i>A.n.</i>	18	17	29	36	34	66	46	54	63	37	28	72	14	19	32	35	38	62	9	35	56	73	27

в %	Leu						Met	Asn			Pro				Gln		Arg					
	TTG	TTA	CTG	CTA	CTT	CTC	ATG	AAT	AAC	CCG	CCA	CCT	CCC	CAG	CAA	AGG	AGA	CGG	CGA	CGT	CGC	
<i>lacA</i>	28	2	23	2	7	37	100	6	94	24	7	26	43	90	10	15	0	15	0	15	55	
<i>lacB</i>	21	16	16	23	7	18	100	46	54	37	31	19	14	31	69	14	7	30	20	11	18	
<i>lacC</i>	19	13	21	12	19	16	100	67	33	42	35	10	13	53	47	7	11	35	21	12	15	
<i>lacD</i>	18	8	30	6	14	24	100	31	69	26	15	33	26	67	33	18	0	18	0	32	32	
<i>lacE</i>	19	10	27	20	5	19	100	38	63	41	24	12	22	60	40	14	10	25	17	15	19	
<i>lacF</i>	16	4	14	9	21	36	100	16	84	31	12	33	24	81	19	8	0	24	8	32	28	
<i>lacG</i>	15	4	13	6	21	42	100	17	82	14	14	32	41	76	24	6	0	33	6	28	28	
<i>P.c.</i>	18	5	22	10	19	25	100	42	58	19	26	27	28	57	43	9	11	16	18	18	29	
<i>A.n.</i>	13	6	24	10	20	27	100	29	71	21	21	27	31	64	36	9	10	16	15	21	29	

Приложение 1 (продолжение)

в %	Ser						Thr				Val				Trp	Tyr		End		
	AGT	AGC	TCG	TCA	TCT	TCC	ACG	ACA	ACT	ACC	GTG	GTA	GTT	GTC	TGG	TAT	TAC	TGA	TAG	TAA
<i>lacA</i>	15	20	30	7	7	22	23	7	20	50	21	9	22	48	100	30	70	25	0	75
<i>lacB</i>	5	6	29	28	14	20	29	17	29	26	47	0	20	33	100	33	67	50	25	25
<i>lacC</i>	2	8	24	26	17	24	29	20	25	25	43	17	13	26	100	50	50	62	31	8
<i>lacD</i>	14	28	17	0	24	17	18	6	24	51	35	10	7	47	100	10	90	17	50	33
<i>lacE</i>	3	12	30	17	13	24	28	29	21	22	32	21	16	32	100	25	75	52	22	26
<i>lacF</i>	14	23	20	9	25	9	35	4	30	32	33	5	23	40	100	15	85	25	50	25
<i>lacG</i>	11	29	14	11	18	18	20	18	33	28	21	0	15	65	100	30	70	0	67	33
<i>P.c.</i>	12	17	15	15	19	21	16	24	25	34	26	10	28	36	100	43	57	42	28	31
<i>A.n.</i>	9	16	15	14	20	26	17	21	26	36	20	8	30	42	100	31	69	16	42	42

Приложение 2

Таблица А - Очистка рекомбинантных минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 по схеме №1

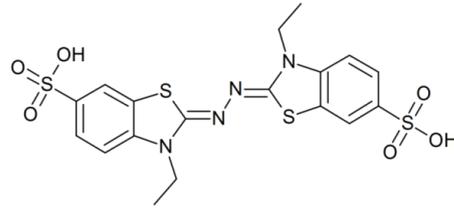
Изофермент	Этап выделения	КЖ	Высаливание сульфатом аммония	ИОХ на носителе DEAE-целлюлозная вата	ИОХ на носителе DEAE - Toyopearl 650 M	ГПХ на носителе Superdex 75	ГХ на носителе Phenyl-Sepharose
rLacC	Общая активность, Ед.	32795	40087	36905	13216	7079	-
	Белок, мг	6900	680	260	54	27,2	-
	Удельная активность, Ед./мг белка	4,8	59,0	141,9	244,7	260,3	-
	Выход, %	100	122,2	112,5	40,3	21,6	-
rLacD	Общая активность, Ед.	19296	12500	12000	2836	1425	-
	Белок, мг	3859	1644	1165,1	144	35,6	-
	Удельная активность, Ед./мг белка	5	7,6	10,3	19,7	40	-
	Выход, %	100	64,8	62,2	14,7	7,4	-
rLacF	Общая активность, Ед.	23690	14460	13410	5005	1506	700
	Белок, мг	3076	1112,3	590,7	206	53,4	17,2
	Удельная активность, Ед./мг белка	7,7	13	22,7	24,3	28,2	41
	Выход, %	100	61	56,6	21,1	6,4	3

Приложение 2 (продолжение)

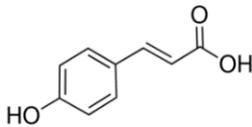
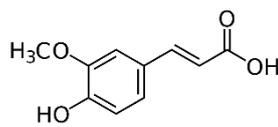
Таблица Б - Очистка рекомбинантных минорных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 по схеме №2

Изофермент	Этап выделения	КЖ	Ультрафильтрация	ИОХ на носителе Source 15Q	ГХ на носителе Source 15ISO
rLacD	Общая активность, Ед.	27890	21700	5500	3745
	Белок, мг	12000	4100	108	59
	Удельная активность, Ед./мг белка	2,3	5,3	51	63
	Выход, %	100	78	20	13
rLacF	Общая активность, Ед.	26640	23200	4776	3240
	Белок, мг	5760	1748	180	80
	Удельная активность, Ед./мг белка	4,6	13,3	26,5	40,5
	Выход, %	100	87	18	12

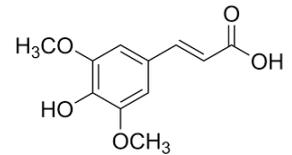
Приложение 3. Структуры основных соединений, использованных в работе

Нефенольный субстрат

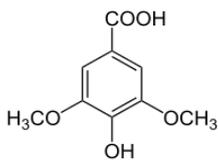
2,2`-азино-бис-(3-этилтиазолин-6-сульфонат)

Ароматические соединения*n*-Кумаровая кислота

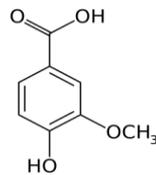
Феруловая кислота



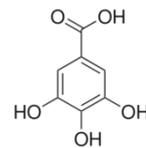
Синаповая кислота



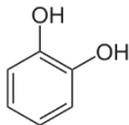
Сиреневая кислота



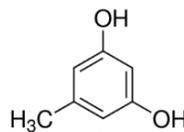
Ванильная кислота



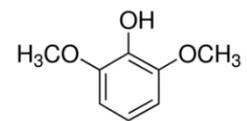
Галловая кислота



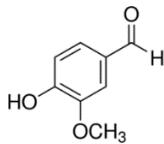
Пирокатехин (ПКХ)



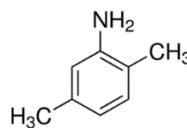
Орцинол



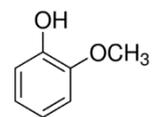
2,6-диметоксифенол



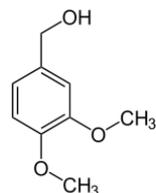
Ваниллин



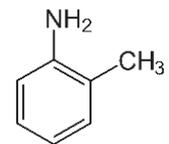
2,5-Ксилидин



Гваякол

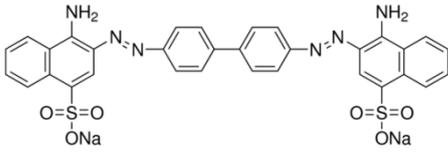


Вератровый спирт

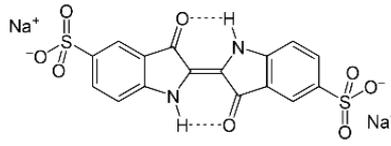
*o*-Толуидин

Приложение 3 (продолжение)

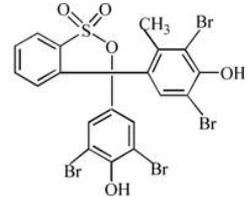
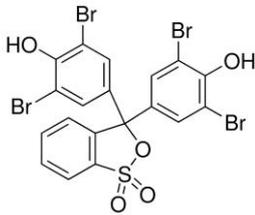
Синтетические красители



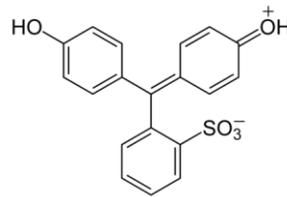
Конго красный



Индигокармин

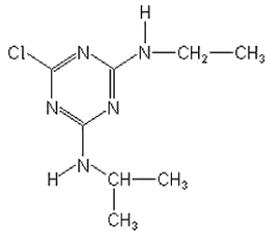
Бромкрезоловый
зеленый

Бромфеноловый синий

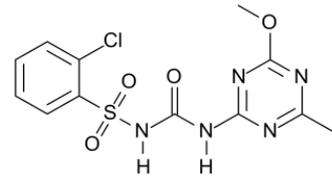


Феноловый красный

Гербициды



Атразин



Глин