

УДК 579.66

СОЗДАНИЕ ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОЙ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ VP2 *Trametes hirsuta* В *Penicillium canescens*

© 2023 г. О. С. Савинова¹*, А. М. Чулкин¹, К. В. Моисеенко¹, Т. В. Федорова¹

¹ Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: savinova_os@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 05.05.2023 г.

Принята к публикации 10.05.2023 г.

Интерес к пероксидазам секретируемого ферментного комплекса базидиальных грибов обусловлен их широкой субстратной специфичностью и способностью участвовать в процессе биodeградации таких трудно деградируемых биополимеров, как лигнин. Однако из-за сложности выделения этих ферментов из нативных источников, их изучение затруднено. В работе были получены экспрессионные векторы, несущие последовательность, кодирующую универсальную пероксидазу VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072, которые были трансформированы в геном штамма *P. canescens*. Скрининг трансформантов показал наличие пероксидазной активности до 1 ед./мл. Целевой белок идентифицирован в культуральной жидкости отобранных трансформантов методом масс-спектрометрического анализа. Впервые получен новый штамм *P. canescens* rVP2D-6 – продуцент рекомбинантной универсальной пероксидазы VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072 и показана способность секретируемого им ферментного комплекса к модификации щелочного лигнина.

Ключевые слова: пероксидаза, лигнолитические ферменты, *Trametes hirsuta*, *Penicillium canescens*, гетерологичная экспрессия, лигнин

DOI: 10.31857/S0555109923060120, **EDN:** CJQZRR

Лигнин – распространенный природный гетерогенный полимер, составляющий до одной трети всей растительной биомассы, источник ценных ароматических соединений [1, 2]. Наиболее значительным потенциалом в отношении его биodeструкции обладают базидиомицеты, в частности грибы белой гнили рода *Trametes*, приспособившиеся в ходе эволюции к включению в свои метаболические пути всех компонентов лигноцеллюлозы [3]. Эта способность обусловлена наличием у грибов белой гнили активного секретируемого мультиферментного лигнолитического комплекса, в состав которого входят пероксидазы (использующие H₂O₂ в качестве окислителя), лакказы (медь-содержащие оксидазы, окисляющие субстраты, восстанавливая кислород до H₂O) и различные вспомогательные ферменты (целлобиозодегидрогеназы, хинонредуктазы, а также оксидазы, генерирующие H₂O₂, такие как арил-алкогольоксидаза) [2, 4–6]. По сравнению с другими пероксидазами и лакказами лигнолитические пероксидазы (ЛП) обладают более высоким окислительно-восстановительным потенциалом, что позволяет им окислять широкий спектр субстратов [7], и привлекают особое внимание исследователей.

Известно, что в геномах базидиомицетов ЛП кодируются обширными мультигенными семействами. Ранее было показано [8], что базидиомицет *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 принимает непосредственное участие в процессе биотрансформации лигнина, и в его геноме было обнаружено 18 генов, кодирующих 9 предполагаемых изоферментов лигнин-пероксидазы (LiP; КФ 1.11.1.14), 7 марганец-зависимых пероксидаз (MnP; КФ 1.11.1.13) и 2 универсальные пероксидазы (VP; КФ 1.11.1.16) [9]. Однако при культивировании этого гриба в различных средах в секретах были детектированы только изоферменты марганецпероксидаз MnP1, MnP2, MnP5, MnP7, лигнинпероксидаза LiP9 и универсальная пероксидаза VP2 [10].

Считается, что LiP базидиомицетов принимают участие в расщеплении преобладающих и наиболее трудно деградируемых нефенольных структур лигнина, тогда как MnP могут участвовать в окислении второстепенных фенольных фрагментов лигнина [11]. Универсальные пероксидазы VP представляют особый интерес благодаря своей способности катализировать процесс деградации соединений, которые другие пероксидазы не способны окислять напрямую. Универсальность этих изоферментов позволяет использовать их в Mn³⁺-

опосредованных или независимых от Mn реакциях с ароматическими соединениями с низким или высоким окислительно-восстановительным потенциалом [12] без применения медиаторов. Однако все еще возникают вопросы о роли универсальных пероксидаз в лигнинолизе. Кроме того, преимуществом этих ферментов является высокая активность в присутствии органических растворителей [13].

На сегодняшний день отсутствие всесторонней характеристики всех членов мультигенного семейства ЛП, в частности гриба *T. hirsuta* LE-BIN072, сильно ограничивает потенциал использования этих ферментов в биокаталитических технологиях (биопереработка, биоремедиация, целлюлозно-бумажная промышленность). К сожалению, выделение и очистка индивидуальных изоферментов пероксидаз является нетривиальной задачей, так как они имеют близкие молекулярные массы и величины изоэлектрической точки, поэтому подробное изучение свойств индивидуальных изоферментов пероксидаз затруднено. Поскольку получение изоферментов с помощью нативных продуцентов трудно реализуемо, единственным способом решения задачи полной характеристики всех членов мультигенного семейства ЛП является переход к гетерологичным системам экспрессии.

Гетерологичной экспрессии секретируемых базидиальных ферментов в разных организмах посвящен большой объем исследований. Так, например, гетерологичная экспрессия пероксидазы *Pleurotus eryngii* в *Escherichia coli* обеспечивает быструю продукцию белка с высоким выходом, однако она ограничена необходимостью посттрансляционных модификаций (фолдинг, включения гема в белок, гликозилирование), которые возможны только у эукариотических организмов [14]. В этом отношении дрожжевые [15] и грибные [16, 17] системы экспрессии имеют явные преимущества. Хорошо зарекомендовали себя системы экспрессии на основе аскомицетов рода *Penicillium* [18]. Для некоторых из них были разработаны системы клонирования, которые позволили повысить активность продуцентов и существенно расширить спектр продуктов, получаемых на их основе. Так, ранее [19, 20] удалось успешно получить и охарактеризовать 4 рекомбинантных изофермента лакказы *T. hirsuta* LE-BIN072 (LacA, LacC, LacD и LacF) в аскомицете *Penicillium canescens*, причем на примере LacA было показано сходство нативного и рекомбинантного ферментов [21]. Таким образом, на основе изученной литературы и собственного опыта коллектива авторов, в качестве перспективного объекта для гетерологичной экспрессии ЛП *T. hirsuta* LE-BIN072 было предложено использовать аскомицеты рода *Penicillium*.

Цель работы – создание продуцента рекомбинантной универсальной пероксидазы VP2 гриба *T. hirsuta* LE-BIN 072 в штамме *Penicillium canescens* и оценка способности секретируемого ферментного комплекса нового штамма к модификации лигнина.

МЕТОДИКА

Материалы. Олигонуклеотиды были синтезированы в “Евроген” (Россия). Щелочной лигнин с низким содержанием сульфонатов приобретен у “Sigma-Aldrich” (США). Другие материалы и реактивы были приобретены у российских производителей, если не указано иное.

Штаммы и условия культивирования. В работе были использованы штамм базидиомицета *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова (Санкт-Петербург, Россия), штамм *Penicillium canescens* PCA10 (*niaD*⁻) [22] и штамм *Escherichia coli* XL-10 Gold (“Stratagene”, США).

Гриб *T. hirsuta* LE-BIN 072 выращивали глубинным способом на орбитальной качалке в колбах объемом 750 мл на глюкозо-пептонной (ГП) среде следующего состава (г/л): пептон – 3.0, глюкоза – 10, KH_2PO_4 – 0.6, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, CaCl_2 – 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, ZnSO_4 – 0.001, FeSO_4 – 0.0005, при 27°C, 180 об./мин в течение 10 сут. Культуральную жидкость (КЖ) отделяли центрифугированием, отбирали образцы мицелия для выделения ДНК и РНК.

Штамм-реципиент *P. canescens* PCA-10 (*niaD*⁻) культивировали 7 сут при 30°C в термостате на агаризованной среде (МС) следующего состава (г/л): NH_4Cl – 0.53, D-глюкоза – 10, агар – 2%, раствор минеральных солей – 20 мл/л. Раствор минеральных солей имел следующий состав (г/л): KCl – 26, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 26, KH_2PO_4 – 76, раствор микроэлементов – 50 мл/л. Раствор микроэлементов включал (мг/л): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 400, $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 800, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 800, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 800, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 800, $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7$ – 40.

Трансформанты *P. canescens* выращивали на агаризованной среде МС, в качестве источника азота использовали NaNO_3 . При глубинном культивировании штаммов *P. canescens* использовали жидкую ферментационную среду (ФС) следующего состава (г/л): свекловичный жом – 30, пептон – 50, KH_2PO_4 – 25, pH 4.5 [23]. Водной суспензией конидий (4×10^5 конидий/мл) засевали 100 мл среды. Культивирование проводили на орбитальной качалке в колбах объемом 750 мл при 240–250 об./мин и 30°C в течение 7 сут.

Выделение ДНК и РНК. ДНК из мицелия *T. hirsuta* выделяли с помощью набора DNeasy

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность
POD17_For	5'-GCGAGGCCCAATCCCCTTA-3'
POD17_Rev	5'-CGGTCTGCTCGAACTTCTG-3'
BGASD	5'-CAAGCTGCTGAAGCTGAAGCTC-3'
BGASRS	5'-CTCATATTTACCCTGGCATGTCT-3'
VP2D	5'-TAGAAG ACCGGGCCACCTGCAGCG-3'
VP2DR	5'-TATCTCGAGTTAAGAGTTGAGGGGGCTAAAATCACA-3'
VP2RR	5'-TATCTCGAGTTAAGAGTTGAGGGGGATGGCC-3'

Plant Mini Kit (“Qiagen”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для быстрого скрининга трансформантов ДНК *P. canescens* выделяли из споровой суспензии методом, описанным в работе [24]. Выделение РНК проводили с использованием реагента TRIzol Reagent (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно инструкции производителя. Количественно ДНК и РНК оценивали на приборе NanoDrop Lite (“Thermo Fisher Scientific”, США), качественно – электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. кДНК получали обратной транскрипцией с использованием обратной транскриптазы Maxima H Minus Reverse Transcriptase (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно рекомендациям производителя.

Конструирование экспрессионных плазмид. С помощью высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (“NEB”, Англия) амплифицировали интронированные и сплайсированные последовательности фрагмента гена, кодирующие зрелую пероксидазу VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072 (GenBank: ON230121.1), с геномной ДНК и кДНК в качестве матрицы соответственно. Использовали праймеры с введенными сайтами рестрикции: *BpiI* в районе отщепления сигнального пептида и *XhoI* после сайта терминации трансляции. Для амплификации интронированного фрагмента гена использовали праймеры VP2D и VP2DR, для сплайсированного – VP2D и VP2RR (последовательности праймеров представлены в табл.1; жирным шрифтом выделены сайты узнавания, подчеркнуты сайты отщепления). Полученные ДНК-фрагменты очищали от реакционной смеси с помощью набора Cleanup S-car (“Евроген”, Россия) и обрабатывали пятикратным избытком эндонуклеаз *BpiI* и *XhoI*. ДНК вектора pPCGMX также обрабатывали избытком эндонуклеаз *BspI20I* и *XhoI*, после чего ДНК разделяли в 0.8%-ном агарозном геле. Группу фрагментов размером около 6 т. п. н. элюировали из геля. Для элюирования и очистки амплифицированных фрагментов использовали набор Cleanup S-car (“Евроген”, Россия).

Обработанные эндонуклеазами ПЦР-фрагменты целевого гена и ДНК фрагмента вектора pPCGMX, несущего промотор гена *bgaS* с после-

довательностью, кодирующей сигнальный пептид гена *bgaS* и терминатор *bgaS*, смешивали в молярном соотношении 3 : 1 и обрабатывали T4 DNA Ligase (“Thermo Fisher Scientific”, США). Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *Escherichia coli* XL-10 Gold (“Stratagene”, США) для наработки генетического материала. Клетки наращивали с последующим выделением плазмидных ДНК с помощью набора Plasmid Miniprep Color (“Евроген”, Россия). Полученные плазмиды проверяли электрофорезом по подвижности в агарозном геле, а также проводили скрининг рестрикцией по сайтам *XhoI* и *BamHI* на присутствие фрагментов нужного размера. Проверку отобранных плазмид на правильность сборки и отсутствие ошибок в процессе ПЦР осуществляли секвенированием с использованием праймеров BGASD и BGASRS (табл.1).

Трансформация полученных конструкций в геном *P. canescens*. Плазмиды, несущие целевые последовательности вводили в геном мутантного по нитратредуктазе штамма *P. canescens* PCA-10 (*niaD*⁻) путем котрансформации в протопласты [22] совместно с плазмидой pSTA10 [25], несущей комплементирующий ген нитратредуктазы (*niaD*) гриба *Aspergillus niger*. Трансформанты, высевали на селективную агаризованную среду следующего состава (г/л): сорбитол – 218.6; агар – 20; глюкоза – 8; раствор микроэлементов – 50 мл/л, а также 10 мМ нитрат натрия в качестве источника азота.

Проверку полученных трансформантов на наличие целевых вставок проводили амплификацией целевых фрагментов с ДНК, полученных из спорных суспензий с применением специфических праймеров POD17_For и POD17_Rev (табл. 1).

Оценка оксидазной активности (ОА). ОА оценивали экспресс-методом при росте трансформантов на агаризованной среде МС, содержащей 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты)диаммониевую соль (АБТС) в качестве хромогенного субстрата (1.1 мг/мл). Трансформанты, образующие в процессе роста зеленое гало считались перспективными для дальнейшего анализа. ОА в КЖ определяли при выращивании

грибов на жидкой среде ФС спектрофотометрически на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 (“PerkinElmer”, США) при длине волны $\lambda = 436$ нм в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, pH 4.5, как описано в работе [19] с использованием раствора АБТС в качестве хромогенного субстрата в присутствии 0.1 мМ H_2O_2 . За 1 условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 мин.

Электрофорез белков. КЖ анализировали методом ДДС-электрофореза по методу Лэммли в 12%-ном полиакриламидном геле на приборе Mini Protean III (“Bio-Rad”, США) с окраской Кумасси бриллиантовым голубым R-250. В качестве стандарта использовали смеси белков Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (“Fermentas”, Литва) в диапазоне 10–200 кДа.

Масс-спектрометрический анализ белков. Полученные белковые пятна анализировали на масс-спектрометре Ultraflex II (“Bruker”, Германия) с матричной лазерной десорбцией/ионизацией на источнике и tandemным времяпролетным масс-анализатором (MALDI TOF/TOF MS/MS). Масс-спектры обрабатывали с помощью пакета программ FlexAnalysis 3.3 (“Bruker Daltonics”, Германия), идентификацию белков – с помощью программы Mascot (www.matrixscience.com). Полученные данные были сопоставлены с базой данных белков *T. hirsuta* LE-BIN 072 (GeneBank: PRJNA271118) [26] и NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Белки-кандидаты с показателем достоверности >76 в базе данных NCBI считались надежными ($p < 0.05$), белки с показателем достоверности >50 считались вероятными.

Биотрансформация щелочного лигнина. КЖ концентрировали ультрафильтрацией на мембране Vivaspin Turbo, 10K MWCO (“Sartorius”, Германия) в 10 раз.

Биотрансформацию проводили как описано в [6] с некоторыми модификациями. Раствор щелочного лигнина (“Sigma-Aldrich”, США) с концентрацией 2 г/л, pH 5.0, разливали по 1 мл в пластиковые пробирки объемом 5 мл. Затем добавляли равный объем концентрированной КЖ. В качестве контроля также готовили образцы, где вместо лигнина добавляли стерильную воду. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 144 ч с перемешиванием на ротационном смесителе ELMi Rotamix RM-1 (Латвия). Обесцвечивание лигнина отслеживали в ходе инкубирования на 24, 72 и 144 ч, измеряя поглощение при 465 нм на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 [27]. Спектры снимали в диапазоне 200–700 нм сразу после добавления лигнина к КЖ, а также через 24 и 144 ч инкубации.

Все измерения проводили в 3 биологических повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием метода дисперсионного анализа. При обнаружении достоверного значения ($p < 0.05$) F-статистики, различия между индивидуальными средними были оценены с использованием теста множественного сравнения Тьюки ($p \leq 0.05$).

Визуализацию плазмидных карт и подбор олигонуклеотидов осуществляли в программе Vector-NTI 10.1.1 (“Invitrogen”, США).

Для определения сайтов отщепления сигнального пептида пероксидазы использовали программное обеспечение SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания продуцента рекомбинантной универсальной пероксидазы VP2 базидиомицета *T. hirsuta* LE-BIN072 в качестве реципиента был использован штамм мицелиального гриба *P. canescens* PCA-10 (*niaD*[–]). Этот штамм обладал следующими преимуществами: быстрый рост биомассы, наличие развитой системы биосинтеза внеклеточных ферментов, сильные промоторы, обеспечивающие высокую экспрессию целевых генов, наличие эффективного метода трансформации целевых плазмид для этого штамма, мутация в гене нитратредуктазы (*niaD*[–]) [28], позволяющая отбирать трансформанты на селективной среде, а также возможность получения целевого белка в активной форме [20, 21].

Создание плазмидных конструкций. Поскольку регулирование экспрессии белка в аскомицетах происходит в основном на уровне транскрипции, использование высокоактивных областей контроля транскрипции грибов имеет решающее значение при гетерологичной экспрессии. При создании плазмид использовали промотор гена *bgaS*, кодирующий β -галактозидазу гриба *P. canescens*, обеспечивающий гетерологичную экспрессию ферментов в клетках гриба с высоким выходом [23, 28]. Ген пероксидазы экспрессировали с использованием сигнальной последовательности гена *bgaS* β -галактозидазы *P. canescens*.

Плазмиды были созданы на основе вектора pPCGMX, содержащего полный ген *bgaS* секретрируемой β -галактозидазы *P. canescens*, имеющего уникальный сайт рестрикции *Bsp*120I в районе отщепления сигнального пептида и сайт *Xho*I перед терминатором транскрипции [29].

Интронированные и сплайсированные последовательности, кодирующие пероксидазу VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072 (GenBank: ON230121.1) были амплифицированы, причем при амплификации в целевые последовательности вводили уникальные сайты рестрикции *Bpi*I и *Xho*I. Для этого олигонуклеотиды были выбраны так, чтобы при последующей состыковке целевых фрагментов с областью,

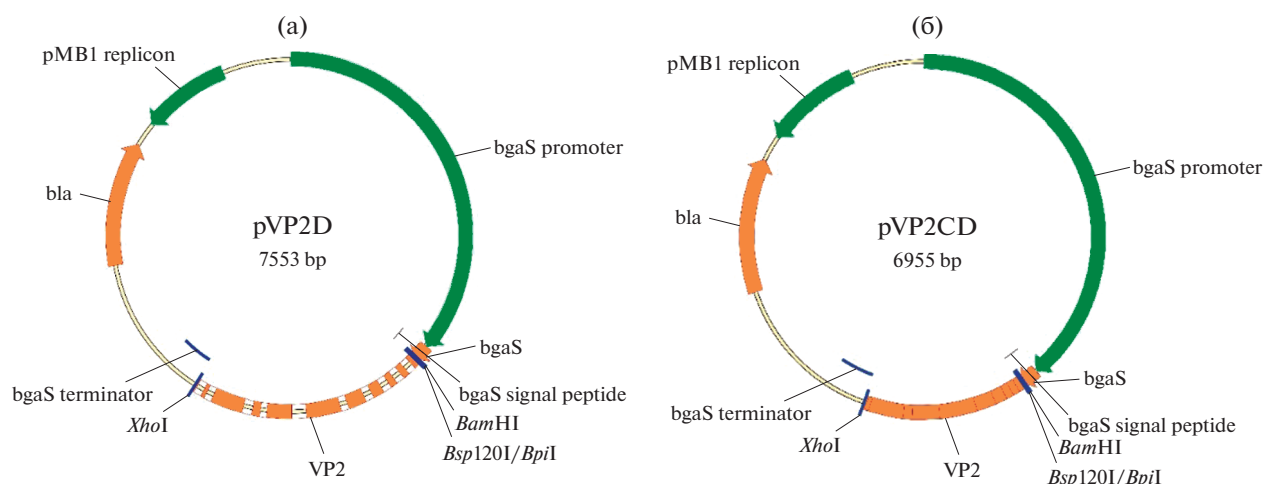


Рис. 1. Карты полученных плазмидных конструкций, несущих интронированную (а) и сплайсированную (б) кодирующие последовательности пероксидазы VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072.

кодирующей сигнальный пептид β -галактозидазы, сохранялась рамка считывания и аминокислотная последовательность в месте соединения. В результате слияния полученных целевых ПЦР-фрагментов с ДНК фрагмента вектора pPCGMX, несущего промотор гена *bgaS*, с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид гена *bgaS* и терминатор *bgaS*, были получены целевые плазмиды. Проверка выделенных плазмид на правильность сборки рестрикцией и последующим секвенированием кодирующих областей пероксидазы позволила отобрать 2 плазмиды – pVP2D и pVP2CD, с правильной интронированной и сплайсированной кодирующей последовательностью соответственно. Карты отобранных плазмид представлены на рис. 1.

Отбор трансформантов. При трансформации полученных плазмид, несущих целевые последовательности пероксидазы, в геном *P. canescens* PCA-10 (*niaD*⁻), было получено не менее 100 трансформантов для каждой плазмиды. Для дальнейшего скрининга из них отбирали по 30 трансформантов для каждой плазмиды.

Выращивание отобранных трансформантов глубинным способом в среде ФС в течение 7 сут показало, что максимальная пероксидазная активность по АБТС в присутствии H₂O₂ (1 усл. ед./мл) была зафиксирована на 5–6 сут культивирования трансформантов. В качестве отрицательного контроля использовали КЖ реципиента. По 10 наиболее активных трансформантов-продуцентов рекомбинантной пероксидазы VP2 было выбрано для обоих штаммов (по 5 с плазмидой pVP2D и по 5 – с pVP2CD).

Для оптимизации процедуры подтверждения присутствия плазмид с целевыми вставками в отобранных трансформантах была проведена

ПЦР-амплификация целевых областей с использованием ДНК, выделенной экспресс-методом из спорных суспензий каждого трансформанта [24]. Применение этого метода позволило ускорить процесс отбора целевых клонов. Результат оценивали методом электрофореза по подвижности в агарозном геле и размеру полученных фрагментов (пример, рис. 2а). По результатам амплификации было выбрано 2 трансформанта-продуцента VP2 – *P. canescens* pVP2D-6 и *P. canescens* pVP2D-8.

Анализ КЖ трансформантов методом ДДС-электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 2б) с последующей масс-спектрометрической идентификацией (MALDI TOF/TOF MS/MS) белков, обнаруженных в диапазоне 30–55 кДа позволил подтвердить наличие VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072 в КЖ отобранных трансформантов *P. canescens* pVP2D-6 и *P. canescens* pVP2D-8.

Необходимо отметить, что в настоящей работе при создании продуцента рекомбинантной VP2 успешнее оказалась конструкция с интронированной кодирующей целевой последовательностью. Подобный результат был показан Абяновой и соавт. [21] при получении рекомбинантной лакказы А *T. hirsuta* LE-BIN072 в этом же реципиенте. Таким образом, можно сделать вывод, что в выбранном штамме *P. canescens* происходит правильный сплайсинг интронов в полном гене VP2 пероксидазы, как и в случае гена *lacA* лакказы базидиального гриба *T. hirsuta*. Однако полученные результаты не исключают наличие особенностей посттрансляционных модификаций и секреции пероксидаз в *P. canescens*, оказывающих влияние на активность целевого фермента. Активность полученной КЖ по АБТС в присутствии H₂O₂ не превышала 1 усл. ед. /мл (рис. 3).

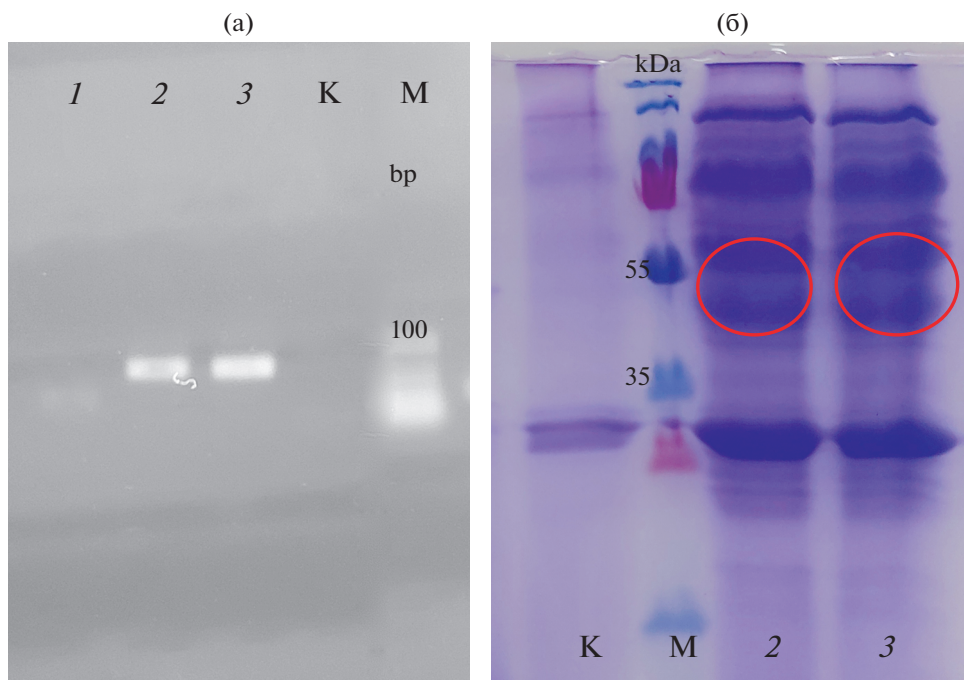


Рис. 2. Электрофорез в агарозном геле ПЦР-фрагментов, полученных в результате амплификации со специфическими праймерами (а); ДДС-электрофорез в ПААГ (б) КЖ *P. canescens* (красным отмечена область, в которой найдены фрагменты VP2): К - реципиент *P. canescens* PCA10 (*niaD*⁻) (отрицательный контроль), 1 – трансформант *P. canescens* pVP2D-3, 2 – *P. canescens* pVP2D-6, 3 – *P. canescens* pVP2D-8, М – маркеры молекулярной массы.

Таким образом, использованную экспрессионную систему можно считать достаточно эффективной с точки зрения получения секретируемого рекомбинантного изофермента пероксидазы VP2. Однако требуются дополнительные эксперименты по оптимизации условий культивирования с целью повышения активности и количества секретируемого белка. В дальнейшей работе использовали штамм *P. canescens* pVP2D-6 как более активный.

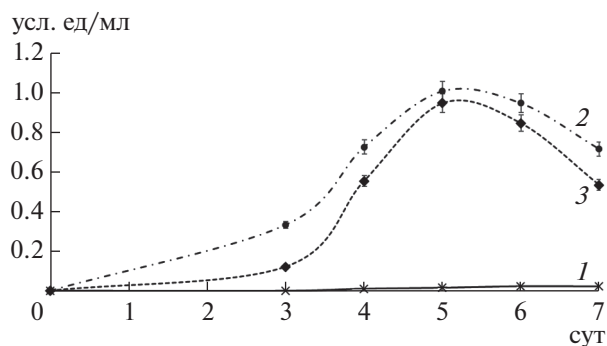


Рис. 3. Динамика активности пероксидазы (по АБТС в присутствии H_2O_2) у отобранных рекомбинантных штаммов: 1 – реципиент *P. canescens* PCA10 (*niaD*⁻) (отрицательный контроль), 2 – трансформант *P. canescens* pVP2D-6, 3 – трансформант *P. canescens* pVP2D-8.

Биотрансформация щелочного лигнина. Поскольку пероксидазам отводят ведущую роль в процессе деструкции лигнина [6, 30], была проведена оценка способности секретируемых ферментов нового штамма *P. canescens* pVP2D-6, включающих пероксидазу VP2 *T. hirsuta*, к модификации щелочного лигнина.

Структура лигнина включает мономерные звенья трех типов – *n*-гидроксифенильные (H-звенья), гваяцильные (G-звенья), и сирингильные (S-звенья), сшитые различными кислород- и углерод-углеродными связями [31]. Хромофорные функциональные группы, содержащиеся в лигнине, включая хиноны и метоксизамещенные фенокси-группы, могут быть сопряжены с двойными связями или карбонильными функциональными группами. Ненасыщенные функциональные группы поглощают видимый свет и придают лигнину коричневый цвет [32]. Обесцвечивание лигнина предполагает его трансформацию [33].

В настоящей работе к концентрированной КЖ, полученной после выращивания нового штамма *P. canescens* pVP2D-6, добавляли раствор лигнина в соотношении 1 : 1 и инкубировали в течение 144 ч. Концентрация лигнина в реакционной смеси составила 1 г/л, при этом реакционная смесь имела насыщенный желто-коричневый цвет (рис. 4, 1). По мере увеличения времени инкубирования наблюдалось обесцвечивание реакционной смеси

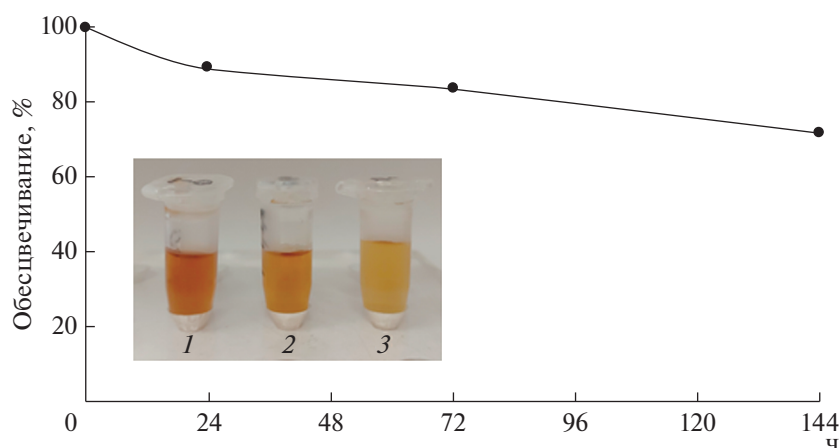


Рис. 4. Обесцвечивание щелочного лигнина в КЖ гриба *P. canescens* pVP2D-8: 1 — исследуемый образец лигнина сразу после добавления концентрата КЖ, 2 — через 24 ч инкубирования, 3 — через 144 ч инкубирования.

(рис. 4 2, 3), которое не наблюдали в контрольном образце (с КЖ реципиента). Уже за сутки происходило обесцвечивание реакционной смеси на 11%, а через 144 ч — на 28% по сравнению с исходным.

Известно, что для различных типов лигнина характерно наличие локального максимума в УФ-спектре поглощения при 280 нм [31]. Изменение поглощения при 280 нм при биотрансформации лигнина, в частности мицелиальными грибами, считается показателем его модификации. Ранее Лара с соавт. [33] показали уменьшение интенсивности поглощения при длине волны 280 нм (гипохромный эффект) в процессе инкубирования синтетического черного щелока, содержание лигнина в котором может составлять до 40%, с мицелием *Trametes elegans* в течение 15 сут, объяснив это “изменениями в молекулах за счет лигнинолитических реакций”.

В настоящем исследовании при увеличении времени инкубации исследуемых образцов с КЖ штамма *P. canescens* pVP2D-6 наблюдалось некоторое изменение поглощения в диапазоне 260–500 нм (рис. 5), однако, несмотря на видимое обесцвечивание реакционной смеси, в спектре при 280 нм вместо ожидаемого уменьшения через 24 ч наблюдалось незначительное увеличение оптической плотности, которое сохранялось до конца инкубации (144 ч). Аналогичные эффекты наблюдали при окислении катехина и кверцетина (полифенольных соединений из группы флавоноидов) рекомбинантной универсальной пероксидазой TvVP2 базидиомицета *Trametes versicolor* [34]. Авторы показали, что инкубация этих флавоноидов с пероксидазой TvVP2 в присутствии пероксида водорода приводила к значительным изменениям оптического спектра. В случае катехина наблюдали значительное увеличение ОП около 400 нм, что свидетельствовало об образовании хи-

нонов, а в случае кверцетина — уменьшение пика при 370 нм и небольшое увеличение поглощения ~290 нм. Последнее, по мнению авторов, могло соответствовать продукции 3,4-дигидроксibenзойной (протокатеховой) кислоты.

Известно, что универсальные пероксидазы грибов белой гнили способны напрямую окислять фенольные и нефенольные структурные единицы лигнина с образованием катион-радикалов, которые затем могут, как подвергаться серии неферментативных реакций, включая расщепление С–С и С–О-связей, так и сочетаться между собой в случайном порядке, приводя к реполимеризации лигнина [11, 30, 35].

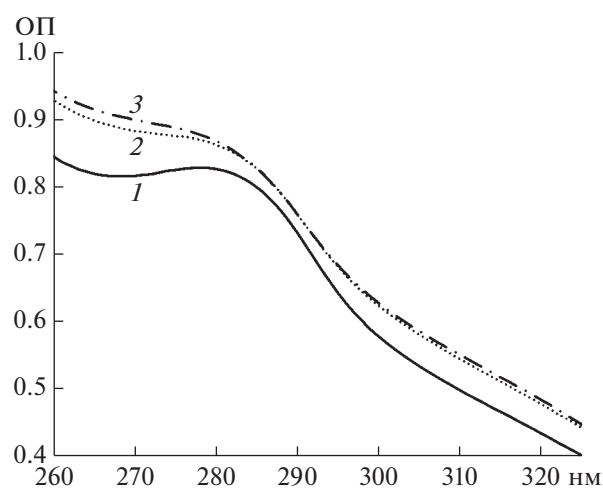


Рис. 5. УФ-спектры поглощения исследуемых образцов в диапазоне 260–320 нм: 1 — исследуемый образец лигнина сразу после добавления концентрата КЖ, 2 — через 24 ч инкубирования, 3 — через 144 ч инкубирования.

В работе [11] авторами было показано, что универсальная пероксидаза базидиомицета *Pleurotus ostreatus* способна расщеплять наиболее частые межзвенные связи в лигнине (β -О-4'), приводя тем самым к деполимеризации лигнина и высвобождению фенольных соединений. Образующиеся при биотрансформации лигнина промежуточные фенольные соединения, такие как ванилин, синаповая кислота, конифериловый спирт и др. [36], могут вносить вклад в интенсивность поглощения реакционной смеси при 280 нм.

В работе [35] было показано, что атака универсальной пероксидазы базидиомицета *P. eryngii* (VPL2, GenBank: AF007222) начинается с наиболее легко окисляемых фенольных фрагментов лигнина, а метилированный и ацетилованный лигнин значительно хуже окислялись ферментом. При этом VP *P. eryngii* была способна модифицировать также и нефенольный лигнин, но значительно хуже, чем содержащий фенольные структуры. Кроме того, VP *P. eryngii* проявляла более высокое сродство в отношении полимерного лигнина, чем к простым ароматическим соединениям [35]. Действительно, ранее было показано, что секрета лигнолитических пероксидаз в процессе роста гриба *T. hirsuta* в среде с добавлением лигнина менялась волнообразно [37]. При этом универсальная пероксидаза VP2 начинала секретироваться на более ранних сроках культивирования и уже на 3–6 сут хорошо детектировалась в культуральной среде. Далее по мере трансформации лигнина в секретоме гриба детектировались и другие лигнолитические пероксидазы (разные изоферменты марганец-пероксидаз).

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты позволили сделать вывод, что рекомбинантная универсальная пероксидаза VP2 гриба белой гнили *T. hirsuta* модифицировала структурные звенья щелочного лигнина, о чем свидетельствовало обесцвечивание реакционной смеси. Однако этот фермент, по всей видимости, подобно универсальной пероксидазе VP базидиомицета *P. eryngii*, окислял в первую очередь фенольные фрагменты лигнина.

Полученный в работе новый штамм *P. canescens* pVP2D-6 — продуцент рекомбинантной лигнолитической пероксидазы VP2 базидиомицета *T. hirsuta* LE-BIN072, планируется использовать для выделения целевого изофермента VP2 и изучения его свойств, что в дальнейшем может помочь более детально установить механизм биоразложения лигнина грибами белой гнили *Trametes* sp., тем самым открыть новые перспективы для направленного применения ферментов лигнолитического комплекса грибов, в частности пероксидаз.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования

“Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-74-00078, <https://rscf.ru/project/22-74-00078>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ponnusamy V.K., Nguyen D.D., Dharmaraja J., Shobana S., Banu J.R., Saratale R.G. et al. // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 271. P. 462–472. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.070>
2. Biko O. D.V., Viljoen-Bloom M., van Zyl W. H. // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. V. 141, 109669. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109669>
3. Kainthola J., Podder A., Fechner M., Goel R. // *Bioresour. Technol.* 2021. V. 321. 124397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124397>
4. Abbas A., Koc H., Liu F., Tien M. // *Curr Genet.* 2005. V. 47. P. 49–56. <https://doi.org/10.1007/s00294-004-0550-4>
5. Dashtban M., Schraft H., Syed T.A., Qin W. // *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 1. P. 36–50.
6. Zhang S., Xiao J., Wang G., Chen G. // *Bioresour. Technol.* 2020. V. 304. 122975. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122975>
7. Liers C., Aranda E., Strittmatter E., Piontek K., Plattner D.A., Zorn H. et al. // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2014. V. 103. P. 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.025>
8. Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Vasina D.V., Zhrebker A.Ya., Kulikova N.A. et al. // *Bioresour. Technol.* 2021. V. 335. 125229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125229>
9. Vasina D.V., Moiseenko K.V., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V. // *PLoS ONE.* 2017. V. 12. № 3. e0173813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173813>
10. Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Fedorova T.V. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. Suppl. 1. P. S113–S125.
11. Fernández-Fueyo E., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez M.J., Romero A., Hammel K.E., Medrano F.J., Martínez A.T. // *Biotechnol. Biofuels.* 2014. V. 7. № 2. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-2>
12. Ruiz-Duenas F.J., Morales M., Garcia E., Miki Y., Martinez M.J., Martinez A.T. // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. № 2. P. 441–452. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern261>
13. Rodakiewicz-Nowak J., Jarosz-Wilkolazka A., Luterek J. // *Applied Catalysis A: General.* 2006. V. 308. P. 56–61.
14. Perez-Boada M., Doyle W.A., Ruiz-Duenas F.J., Martinez M.J., Martinez A.T. // *Enzyme Microb. Technol.* 2002. V. 30. P. 518–524.
15. Majeke B.M., García-Aparicio M., Biko O.D., Viljoen-Bloom M., van Zyl W.H., Görgens J.F. // *Enzyme Microb. Technol.* 2020. V. 139. 109593. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109593>
16. Stewart P., Whitwam R. E., Kersten P. J., Cullen D., Tien M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 3. P. 860–864. <https://doi.org/10.1128/aem.62.3.860-864.1996>

17. Sugano Y., Nakano R., Sasaki K., Shoda M. // Physiology and Biotechnology. 2000. V. 66. № 4. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1754-1758.2000>
18. Chekushina A.V., Dotsenko G.S., Sinitsyn A.P. // Catalysis in Industry. 2013. V. 5 № 1. P. 98–104. <https://doi.org/10.1134/S2070050413010042>
19. Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. // Biochimie. 2017. V. 142. P. 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.013>
20. Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Chulkin A.M., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. 152. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00152>
21. Abyanova A.R., Chulkin A.M., Vavilova E.A., Fedorova T.V., Loginov D.S., Koroleva O.V., Benevolensky S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. № 3. P. 313–317.
22. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // Curr. Genet. 1995. V. 28. P. 474–478.
23. Чулкин А.М., Логинов Д.С., Вавилова Е.А., Абянова А.Р., Зоров И.Н., Курзеев С.А., Королева О.В., Беневоленский С.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 2. С. 163–170.
24. Fraczek M.G., Zhao C., Dineen L., Lebedinec R., Bowyer P., Bromley D., Delneri M. Current Protocols in Microbiology. 2019. V. 54. e89. <https://doi.org/10.1002/cpmc.89>
25. Unkles S.E., Campbell E.I., Punt P.J., Hawker K.L., Contreras R., Hawkins A.R. et al. // Gene. 1992. V. 111. № 2. P. 149–155.
26. Shabaev A.V., Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Fedorova T.V. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 10322. <https://doi.org/10.3390/ijms231810322>
27. Лисов А.В., Заварзина А.Г., Белова О.В., Леонтьевский А.А. // Микробиология. 2020. Т. 89. № 3. С. 300–307. <https://doi.org/10.31857/S0026365620030118>
28. 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. B. Kamm Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2015. V. 26. P. 1–19.
29. Королева О.В., Федорова Т.В., Беневоленский С.В., Вавилова Е.А., Чулкин А.М. // Патент РФ. 2015. № 2538149.
30. Айзеништадт М.А., Боголицын К.Г. // Химия растительного сырья. 2009. № 2. С. 5–18.
31. Ruwoldt J., Tanase-Opedal M., Syverud K. // ACS Omega. 2022. V. 7. P. 46371–46383. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04982>
32. Sadeghifar H., Ragauskas A. // Polymers. 2020. V. 12. № 5. P. 1134. <https://doi.org/10.3390/polym12051134>
33. Lara M.A., Rodriguez-Malaver A.J., Rojas O.J., Holmquist O., Gonzalez A.M., Bullon J., Penaloza N., Araujo E. // International Biodeterioration & Biodegradation. 2003. V. 52. P. 167–173. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00055-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00055-6)
34. Amara S., Perrot T., Navarro D., Deroy A., Benkhelfallah A., Chalak A. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. e02826-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02826-17>
35. Sáez-Jiménez V., Rencoret J., Rodríguez-Carvajal M.A., Gutiérrez A., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez A.T. // Biotechnol Biofuels. 2016. V. 9. P. 198. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0615-x>
36. Silva D., Sousa A.C., Robalo M.P., Martins L.O. // New Biotechnology. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.12.003>
37. Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Vasina D.V., Zhrebker A.Ya., Kulikova N.A., Nikolaev E.N., Fedorova T.V. // Bioresour. Technol. 2021. V. 335. 125229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125229>

The Obtaining of Recombinant Producer of *Trametes hirsuta* Versatile Peroxidase VP2 in *Penicillium canescens*

O. S. Savinova^a, *, A. M. Chulkin^a, K. V. Moiseenko^a, and T. V. Fedorova^a

^a Bach Institute of Biochemistry, Biotechnology Research Center of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: savinova_os@rambler.ru

The interest in peroxidases of the basidiomycetes secreted enzyme complex is due to their wide substrate specificity and the ability of these enzymes to participate in the biodegradation of such difficultly degradable biopolymers as lignin. However, due to the difficulty of isolating these enzymes from native sources, their study is difficult. In this work, expression vectors were created that carried the sequence encoding the *T. hirsuta* LE-BIN072 versatile peroxidase VP2, which was transformed into the genome of the *P. canescens* strain. Screening of transformants showed the presence of peroxidase activity up to 1 U/mL. Fragments of the target protein in the culture liquid of the selected transformants were identified by mass spectrometric analysis. A new strain of *P. canescens* pVP2D-6, a producer of the recombinant universal peroxidase VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072, was obtained for the first time, and the ability of the enzyme complex secreted by it to modify alkaline lignin was shown.

Keywords: peroxidase, lignolytic enzymes, *Trametes hirsuta*, *Penicillium canescens*, heterologous expression, lignin