

УДК 577.15

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 2,6-ДИМЕТОКСИФЕНОЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗЫ В МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТАХ

В.Д. Телицин¹, М.В. Семенова^{2*}, Д.О. Осипов², А.В. Гусаков¹,
А.П. Сеницын^{1,2}

(¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; ² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; *e-mail: margo@mail.ru)

Разработан экспрессный метод количественного определения содержания полисахаридмонооксигеназы (ПМО) в комплексных ферментных препаратах (ФП) на основе штаммов микроскопических грибов. Метод основан на использовании 2,6-диметоксифенола (2,6-ДМФ) и пероксида водорода в качестве косубстратов для катализируемой ПМО неспецифической реакции, приводящей к образованию хромогенного продукта. Полученные с помощью данного метода значения процентного содержания ПМО в ФП на основе рекомбинантных штаммов гриба *Penicillium verruculosum*, гомологично экспрессирующих ПМО, хорошо коррелируют с данными, полученными путем тонкого хроматографического фракционирования этих препаратов с последующей оценкой их качественного и количественного состава методами электрофореза, масс-спектрометрии и определения концентрации белка во фракциях после хроматографии.

Ключевые слова: полисахаридмонооксигеназа, *Penicillium verruculosum*, целлюлоза, 2,6-диметоксифенол.

Использованные сокращения: ПМО – полисахаридмонооксигеназа, ФП – ферментный препарат, 2,6-ДМФ – 2,6-диметоксифенол, ЦБГ – целлобиогидролаза.

Целлюлоза – наиболее распространенный в природе растительный полимер. Ежегодный прирост растительной биомассы в процессе биосинтеза составляет около $2 \cdot 10^{11}$ т, и примерно треть этого количества приходится на целлюлозу [1]. Цепочки целлюлозы образуют кристаллическую надмолекулярную структуру: несколько десятков молекул целлюлозы связаны между собой водородными связями и силами Ван-дер-Ваальса в микрофибриллу. В микрофибриллах однородные высокоупорядоченные кристаллические зоны чередуются с неоднородными и менее упорядоченными аморфными зонами [2]. Аморфная целлюлоза имеет рыхлую структуру и поэтому более доступна для ферментов. Напротив, кристаллическая высокоупорядоченная целлюлоза гораздо труднее поддается разрушению под действием ферментов [3].

К продуцентам наиболее эффективных многокомпонентных ферментных препаратов (ФП) для деструкции целлюлозосодержащего сырья относятся микроскопические грибы из родов *Trichoderma* и *Penicillium* [4–6]. Их целлюло-

литические комплексы содержат в своем составе «классический» набор гидролаз трех типов: эндоглюканазу, экзо-целлобиогидролазу (ЦБГ) и β -глюкозидазу. Эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы и относительный состав продуктов ее деструкции зависят от сбалансированности состава целлюлозного комплекса и уровня активности отдельных компонентов.

Недавно были открыты литические полисахаридмонооксигеназы (ПМО) – ферменты, осуществляющие окислительную деструкцию целлюлозы и других полисахаридов [7–10]. Это металлозависимые (Cu-зависимые) ферменты, относящиеся к классу оксидоредуктаз (КФ 1.14.99.53–56). ПМО, расщепляющие целлюлозу, как правило, не могут обеспечивать глубокую деструкцию полимера, однако они способны существенно усиливать эффективность действия «классических» (гидролитических) целлюлаз. При действии ПМО целлюлозная цепь окисляется в произвольном месте на поверхности кристалла. При этом образуются новые свободные концы молекул полимера и

олигосахаридов, представляющие собой субстрат для действия ЦБГ. Кроме того, возникающие в результате окисления целлюлозы заряженные группы способствуют ее аморфизации и повышают доступность субстрата для целлюлаз, в особенности для эндоглюканаз [9, 10]. Для функционирования ПМО необходимы молекулы кислорода и донор электронов, в качестве которого могут выступать продукты биodeградации лигнина, аскорбиновая, галлиевая кислоты или другие восстановители, а также фермент целлобиозадегидрогеназа, входящий в состав ферментных комплексов грибов [7–10].

В настоящее время методы определения активности ПМО по начальной скорости ферментативной реакции практически отсутствуют. Это связано с тем, что сами по себе ПМО характеризуются весьма невысокими каталитическими константами. Активность ПМО определяют, идентифицируя продукты окислительной деструкции целлюлозы методом ВЭЖХ или путем масс-спектрометрического анализа [11–13]. Однако для образования хроматографически детектируемого количества окисленных олигосахаридов часто требуются многие часы ферментативной реакции, тогда как масс-спектрометрия, будучи качественным методом, не позволяет рассчитать активность фермента.

Около двух лет назад было показано, что не только свободный кислород, но и пероксид водорода может выступать в качестве косубстрата для ПМО [14]. Метод определения активности ПМО, предложенный в работе [15], основан на пероксидазной активности фермента, при этом вместо целлюлозы используется модельный неспецифический субстрат – 2,6-диметоксифенол (2,6-ДМФ), два радикала которого в присутствии H_2O_2 димеризуются с образованием хромогенного продукта (рис. 1).

Мутантные штаммы гриба *Penicillium verruculosum* – высокоактивные продуценты целлюлаз [5, 6], однако ФП на их основе, как правило, не содержат ПМО в заметном количестве. В предыдущей работе [16] в этом грибе мы обнаружили и секвенировали «молчаливый» ген *lpmo1*, кодирующий ПМО, которая относится к семейству AA9 вспомогательных активностей для гликозидгидролаз (<http://www.cazy.org/AA9.html>). Этот ген был клонирован в ауксотрофный штамм *P. verruculosum* В1-537 под контролем сильного промотора гена *cbh1*, в результате были получены новые рекомбинантные штаммы этого продуцента, способные секретировать комплекс целлюлолитических ферментов с содержанием ПМО до 57% от общего количества белка в культуральной жидкости [16]. Однако при этом для оценки содержания ПМО в ФП пришлось использовать весьма трудоемкий метод, основанный на тонком хроматографическом фракционировании ФП, сопряженном с данными масс-спектрометрии и электрофореза.

Цель нашей работы – создание экспресс-метода определения содержания ПМО в мультиферментных препаратах целлюлаз с использованием H_2O_2 и 2,6-ДМФ [15] в качестве субстратов.

Материалы и методы

Штаммы и ферментные препараты. В работе использованы ФП, которые представляют собой лиофильно высушенные культуральные жидкости, полученные на основе рекомбинантных штаммов гриба *P. verruculosum* с гомологичной экспрессированной ПМО под промотором гена *cbh1* с сигнальным пептидом ЦБГ I (серия sCBH1-8, sCBH1-14, sCBH1-17) или с собственным сигнальным пептидом (серия sLPMO1-1, sLPMO1-4, sLPMO1-8, sLPMO1-9) [16].

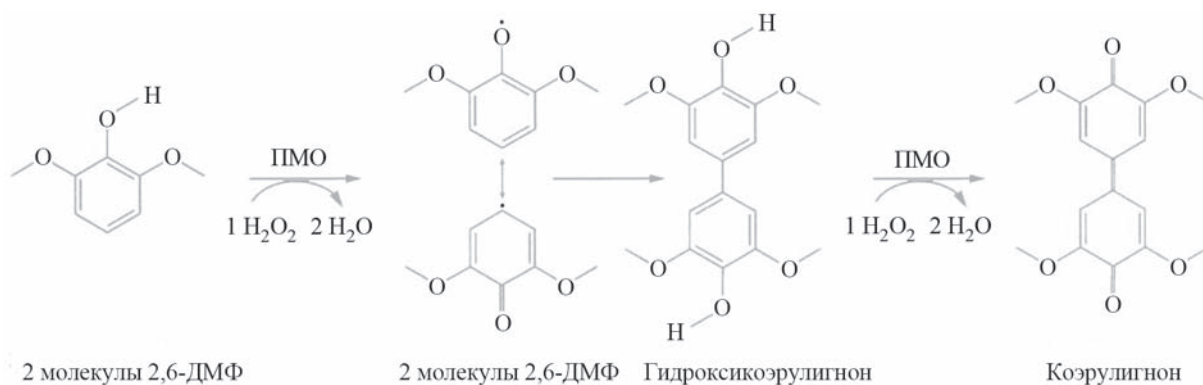


Рис. 1. Окисление 2,6-ДМФ в присутствии пероксида водорода, катализируемое ПМО [15]

Реагенты. Для создания буферных смесей применяли реактивы фирм «Bio-Rad Laboratories» (США), «Panreac» (Германия), «Helicon» и «Реахим» (Россия). В качестве субстратов использовали 2,6-диметоксифенол (2,6-ДМФ, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США) и пероксид водорода (3%-й, «ООО Тульская фармацевтическая фабрика», Россия).

Выделение и очистка ПМО. Фракционирование ФП sLPMO1-9 проводили, используя жидкостную хроматографическую систему NGC Chromatography Systems («Bio-Rad Laboratories», США) со спектрофотометрическим детектором. На первой стадии переосажденный сульфатом аммония ФП (10 мг белка) обессоливали на колонке с Биогелем P4 («Bio-Rad Laboratories», США) и наносили на анионообменную колонку Source 15Q (объем 1 мл, «Pharmacia», Швеция), уравновешенную буфером 0,02 М Bis-Tris-HCl (pH 6,8). Связавшиеся с носителем белки элюировали, используя линейный градиент NaCl от 0 до 0,4 М при скорости потока 1 мл/мин. Во фракцию, содержащую ПМО, добавляли при перемешивании сухой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до концентрации 1,7 М и проводили гидрофобную хроматографию белка на колонке Source 15 Isopropyl (объем 1 мл, «Pharmacia», Швеция), уравновешенной 0,02 М Na-ацетатным буфером, содержащим 1,7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; элюцию вели в обратном градиенте $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от 1,7 до 0 М со скоростью 0,5 мл/мин.

Определение концентрации белка в исходном ФП и во фракциях после хроматографии проводили модифицированным методом Лоури [17]. Для оценки чистоты фермента проводили его электрофорез в 12%-м ПААГ с Na-ДДС на приборе «Mini Protean II» («Bio-Rad Laboratories», США), согласно руководству к прибору.

Определение активности ПМО и концентрации фермента. Активность ПМО с использованием 2,6-ДМФ в качестве модельного субстрата определяли согласно методике, описанной в работе [15]. В пробирке объемом 2 мл смешивали 860 мкл 0,1 М Tris-HCl буфера (pH 7,5), 100 мкл запасного раствора 2,6-ДМФ (10 мМ) в том же буфере, и 20 мкл 5 мМ H_2O_2 , после чего смесь предварительно инкубировали при 30 °С в течение 10 мин. Далее добавляли 20 мкл раствора фермента, разбавленного до предварительно подобранной концентрации, и отмечали начало ферментативной реакции. После 5 мин инкубации реакционной смеси измеряли оптическую плотность ($\lambda = 469$ нм) от-

носительно раствора сравнения, содержащего те же самые вещества, кроме фермента (вместо раствора фермента в реакционную смесь вносили 20 мкл буфера). Концентрацию хромогенного продукта рассчитывали, используя коэффициент экстинкции $53200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [15].

Результаты и их обсуждение

Открытые сравнительно недавно литические полисахаридмонооксигеназы [7–10], которые входят в состав мультиферментных систем, секретируемых микроскопическими грибами и бактериями, проявляют заметный синергизм с целлюлазами гидролитического типа действия, поэтому они стали важной составляющей коммерческих ФП, производимых для применения в процессах биоконверсии целлюлозосодержащего сырья [10, 18]. В нашей лаборатории почти 30 лет проводятся исследования целлюлолитических ферментов, продуцируемых грибом *P. verruculosum* [6, 19]. Несмотря на то, что ФП на основе современных мутантных штаммов этого продуцента обладают высокой эффективностью при гидролизе целлюлозосодержащих субстратов [19], они, как правило, не обладают заметной ПМО-активностью (это относится и к В1-537 – одному из базовых целлюлолитических штаммов *P. verruculosum*). В нашей предыдущей работе [16], используя В1-537 в качестве хоста для клонирования и повышенной гомологичной экспрессии собственного «молчащего» гена *lpmo1*, мы получили новые рекомбинантные штаммы *P. verruculosum*, способные секретировать комплекс целлюлолитических ферментов с содержанием ПМО от 9 до 57% от общего количества белка (таблица). Однако, как уже отмечалось, для оценки содержания ПМО в ФП необходимо использовать весьма трудоемкий метод, включающий тонкое хроматографическое фракционирование ФП. Хотя содержание ПМО можно качественно оценить исходя из электрофоретических данных по интенсивности белковой полосы фермента (рис. 2), в нашем случае определение осложнялось тем, что в этой же полосе присутствовала в некотором количестве эндоглюканаза II *P. verruculosum*, имеющая молекулярную массу, сходную с молекулярной массой ПМО.

Недавно был предложен быстрый и чувствительный спектрофотометрический метод определения неспецифической пероксидазной активности ПМО, основанный на использовании 2,6-ДМФ в качестве субстрата [15]. В настоящей

Активность ФП по отношению к 2,6-ДМФ и содержание ПМО в ФП на основе мутантных штаммов *P. verruculosum*

ФП	Активность (ед./г белка)	Содержание ПМО в ФП (%)	
		расчет по активности	расчет по методу тонкого фракционирования [16]
B1-537	< 1	< 1	< 1
sCBH1-8	6 ± 1	6	9
sCBH1-14	14 ± 1	14	15
sCBH1-17	20 ± 1	19	21
sLPMO1-1	60 ± 4	57	50
sLPMO1-4	64 ± 4	62	48
sLPMO1-8	38 ± 3	37	30
sLPMO1-9	61 ± 4	58	57
Гомогенная ПМО	103 ± 5	–	–

работе мы применили этот метод для оценки содержания ПМО в мультиферментных препаратах *P. verruculosum*.

Контрольный препарат на основе исходного штамма B1-537 не обладал заметной активностью по отношению к 2,6-ДМФ в присутствии пероксида водорода, тогда как в случае ФП, содержащих гомологичную ПМО, активность варьировала в диапазоне 6–64 ед./г белка (таблица). Чтобы на основании этих данных

можно было рассчитать процентное содержание ПМО в ФП, необходимо знать удельную активность чистого фермента без примесных белков. В этих целях мы выделили ПМО из ФП sLPMO1-9 и очистили его до гомогенного состояния. Профиль элюции белка в процессе анионообменной хроматографии на колонке Source 15Q показан на рис. 3, а результаты ПААГ-электрофореза очищенного фермента приведены на рис. 4. Активность гомогенной

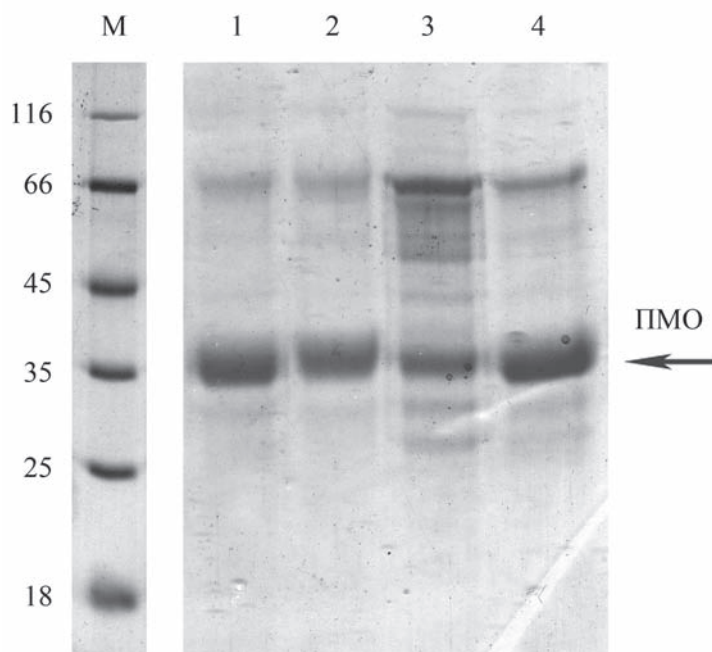


Рис. 2. Электрофорез ФП в ПААГ в присутствии Na-ДДС: 1 – sLPMO1-1, 2 – sLPMO1-4, 3 – sLPMO1-8, 4 – sLPMO1-9. М – маркеры, указана молекулярная масса стандартных белков (кДа). Стрелкой указана белковая полоса ПМО (с некоторой примесью эндоглюканазы II)

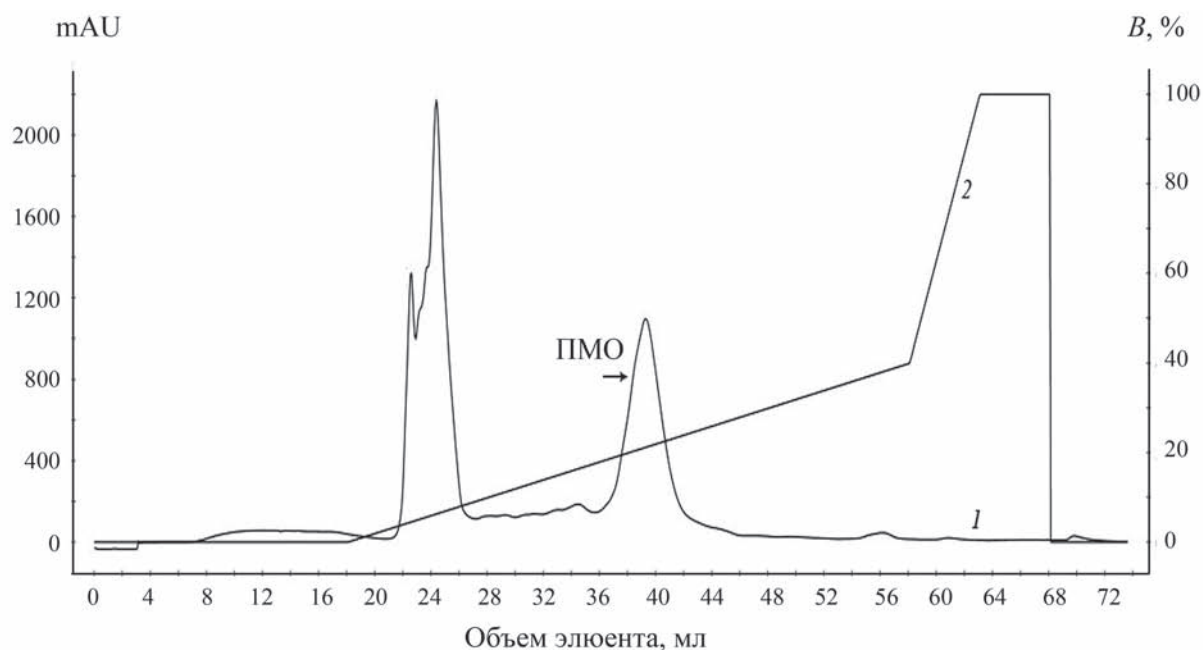


Рис. 3. Фракционирование ФП sLPMO1-9 на анионообменной колонке Source 15Q: 1 – профиль элюции белка, 2 – градиент NaCl (стрелкой указан пик, соответствующий ПМО)

ПМО по 2,6-ДМФ составила 103 ед./г. Содержание ПМО в исследуемых ФП рассчитано как отношение активности ФП к активности гомогенной ПМО (таблица). Полученные новым способом данные хорошо коррелируют с результатами, полученными ранее с использованием

сложной методики определения содержания ПМО в этих же ФП путем их тонкого хроматографического фракционирования с последующей оценкой качественного и количественного состава препаратов методами электрофореза, масс-спектрометрии и определения концентрации белка во фракциях после хроматографии (таблица). Коэффициент корреляции между данными, полученными двумя методами, составил 0,9832 ($R^2 = 0,9667$). Поскольку данные, полученные двумя способами, близки, в дальнейшем можно применять более простой экспресс-метод, основанный на измерении пероксидазной активности ПМО с использованием 2,6-ДМФ в качестве субстрата, для количественного определения содержания этого фермента в мультикомпонентных ФП на основе новых рекомбинантных штаммов *P. verruculosum*, и, вероятно, на основе других микробных продуцентов гликозидгидролаз.



Рис. 4. Электрофорез очищенной ПМО в ПААГ в присутствии Na-ДДС (М – маркеры, указана молекулярная масса стандартных белков, кДа)

Работа выполнена в рамках темы «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды», номер государственной регистрации № АААА-А16-116052010081-5.

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

Дополнительной информации нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тунова Н.А., Кретович В.Л. // Применение целлюлаз. Сб. Целлюлазы микроорганизмов. М., 1981. С. 40.
2. Othmer K. // Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons Inc. 2001. Vol. 13. P. 866.
3. Синуцын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. // Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М., 1995.
4. Cherry J.R., Fidantsef A.L. // Curr. Opin. Biotechnol. 2003. Vol. 14. P. 438.
5. Gusakov A.V. // Trends Biotechnol. 2012. Vol. 29. P. 419.
6. Gusakov A.V. Sinitsyn. A.P. // Biofuels. 2013. Vol. 3. No. 4. P. 463.
7. Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S.J., Liu Z., Zhai H., Sørli M., Eijsink V.G.H. // Science. 2010. Vol. 330. P. 219.
8. Zifcakova L, Baldrian P. // Fungal Ecology. 2012. N 5. P. 481.
9. Kumar G.S., Murthy D. // Biotechnol. Biofuels. 2013 Vol. 6. P. 63.
10. Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G.H. // Biotechnol. Biofuels. 2012. Vol. 5. P. 45.
11. Westereng B., Ishida T., Vaaje-Kolstad G., Wu M., Eijsink V. G., Igarashi K., Samejima M., Stahlberg J., Horn S.J., Sandgren M. // PLoS ONE. 2011. N 6. E27807.
12. Westereng B., Agger J.W., Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Aachmann F.L., Stenstrøm Y.H., Eijsink V.G.H. // J. Chromatogr. 2013. N 1271. P. 144.
13. Bey M., Zhou S., Poidevin L., Henrissat B., Coutinho P.M., Berrin J.-G., Sigoiotta J.-C. // Appl. Env. Microbiol. 2013. Vol. 79. P. 488.
14. Bissaro B., Rohr A.K., Muller G., Chylenski P., Skaugen M., Forsberg Z., Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Eijsink V.G.H. // Nature Chem. Biol. 2017. Vol. 13. P. 1123.
15. Breslmayr E., Hanzek M., Hanrahan A., Leitner C., Kittl R., Santek B., Oostenbrink C., Ludwig R. // Biotechnol. Biofuels. 2018. Vol. 11:79.
16. Semenova M.V., Gusakov A.V., Volkov P.V., Matys V.Y., Nemashkalov V.A., Telitsin V.D., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Mol. Biol. Rep. 2019. Vol. 46. N 2. P. 2363.
17. Peterson G.L. // Anal. Biochem. 1979. Vol. 100. P. 201.
18. Cannella D., Jørgensen H. // Biotechnol. Bioeng. 2014. Vol. 111. P. 59.
19. Sinitsyn A.P., Osipov D.O., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Dotsenko G.S., Sinitsyna O.A., Kondrat'eva E.G., Zorov I.N., Okunev O.N., Nemashkalov V.A., Matys V.Y., Koshelev A.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. Vol. 50. N 8. P. 761.

Поступила в редакцию 10.06.2019
Получена после доработки 12.06.2019
Принята к публикации 14.09.2019

USING 2,6-DIMETHOXYPHENOL FOR DETERMINATION OF POLYSACCHARIDE MONOOXYGENASE CONTENT IN MULTIENZYME COCTAILS

V.D. Telitsin¹, M.V. Semenova^{2*}, A.V. Gusakov¹, A.P. Sinitsyn^{1,2}

¹ Division of Chemical Enzymology, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University; ² Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Science; *e-mail: margs@mail.ru

Express method of quantitative determination of lytic polysaccharide monoxygenase (LPMO) content in the multienzyme preparations produced by mutant strains of filamentous fungi was developed. The method is based on using 2,6-dimethoxyphenol and hydrogen peroxide as cosubstrates for a non-specific reaction catalyzed by LPMO, leading to the formation of a chromogenic product. The obtained values of LPMO percentage content in the multienzyme cocktails produced by *Penicillium verruculosum* recombinant strains, homologously expressing LPMO, well correlated with previously calculated data obtained using a delicate chromatographic fractionation of these preparations followed by estimation of their qualitative and quantitative content by electrophoresis, mass-spectrometry and determination of protein concentration in the chromatographic fractions.

Key words: lytic polysaccharide monoxygenase, *Penicillium verruculosum*, cellulose, 2,6-dimethoxyphenol.

Сведения об авторах: Телицын Вадим Дмитриевич – студент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (vademtel@gmail.com); Семенова Маргарита Викторовна – науч. сотр. ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (margs@mail.ru); Осипов Дмитрий Олегович – науч. сотр. ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (doosipov@gmail.com); Гусаков Александр Васильевич – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, профессор, докт. хим. наук (avgusakov@enzyme.chem.msu.ru); Синуцын Аркадий Пантелеймонович – зав. лаб. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, профессор, докт. хим. наук (apsinitsyn@gmail.ru).