

РЕКОМБИНАНТНАЯ ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ХОЛЕСТЕРИНОКСИДАЗА ИЗ *Nocardioides simplex*

© 2022 В.В. Фокина^{1*}, М.В. Карпов¹, В.В. Коллеров¹, Е.Ю. Брагин¹,
Д.О. Эпиктетов¹, А.В. Свиридов¹, А.В. Казанцев², А.А. Шутов¹, М.В. Донова¹

¹ Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: 2vvfokina@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 05.07.2022

После доработки 01.08.2022

Принята к публикации 01.08.2022

Холестериноксидаза (ХО) – фермент, крайне востребованный в медицине, фармацевтике, сельском хозяйстве, химии и биотехнологии. ХО катализирует окисление 3 β -гидрокси-5- α -фрагмента стероидного ядра с формированием продукта с 3-кето-4- α -структурой и образованием перекиси водорода. Объектом исследования являлась внеклеточная ХО актинобактериального штамма *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д. Зрелая форма ХО *N. simplex* (55,6 кДа) с 6xHis-меткой была получена путём экспрессии в клетках *Escherichia coli* соответствующей нуклеотидной последовательности. Выделение и очистку рекомбинантной ХО *N. simplex* (ХО_{NS}) проводили с помощью аффинной хроматографии. Фермент проявлял активность по отношению к холестерину, холестеранолу, фитостерину, прегненолону и дегидроэпиандростерону. Активность ХО зависела от структуры и длины алифатической боковой цепи при С17 стероида и была ниже для прегненолона и дегидроэпиандростерона. ХО_{NS} проявляла активность в диапазоне рН 5,25÷6,5 с оптимумом рН 6,0. Анализ кинетических характеристик и тестов на стабильность при хранении показал, что показатели ХО_{NS} сравнимы или превосходят таковые для коммерческой ХО из *Streptomyces hygroscopicus* (ХО_{SH}). Результаты расширяют знания о микробных ХО и свидетельствуют о том, что ХО из *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д перспективна для дальнейшего практического применения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: холестерин, холестериноксидаза, актинобактерии, рекомбинантный фермент.

DOI: 10.31857/S0320972522090068, **EDN:** BAVZSL

ВВЕДЕНИЕ

Холестерин (холест-5- α -3 β -ол) играет ключевую роль во множестве биохимических процессов у высших организмов, определение и регуляция уровня холестерина имеют большое значение в медицине. Одним из ферментов, катализирующих на начальном этапе микробной деградации холестерина его превращение в холест-4- α -3-он, является холестерин:кислород-оксидоредуктаза (КФ 1.1.3.6)

Принятые сокращения: АБТС – 2,2-азинодиэтилбенз-тиазолинсульфонат; МЦД – метил- β -циклодекстрин; ХО – холестериноксидаза; ХО_{NS} – рекомбинантная холестериноксидаза *N. simplex*; ХО_{SH} – коммерческая ХО из *Streptomyces hygroscopicus*; SFCA – ацетат целлюлозы без поверхностно-активных веществ.

* Адресат для корреспонденции.

или холестериноксидаза (ХО), которая запускает каскад реакций, приводящих к разрушению стероидного ядра [1].

ХО представляют собой флавопротеиновые ферменты с двойственной функцией: окисления 3 β -гидрокси-фрагмента до 3-оксо-группы и изомеризации двойной связи ($\Delta^{5(6)} \rightarrow \Delta^{4(5)}$) в кольце А стероидного ядра. Реакция изомеризации протекает быстрее, чем высвобождение холест-5- α -3-она из полости ХО, и почти с такой же скоростью, как окисление холестерина [2]. Кофактором фермента является FAD; FADH₂ реагирует с кислородом с образованием перекиси водорода (рис. 1). Цветная реакция с пероксидазой хрена и хромогеном лежит в основе определения холестерина с помощью ХО (рис. 1) [3].

Помимо количественного анализа холестерина в биологических жидкостях, пищевых

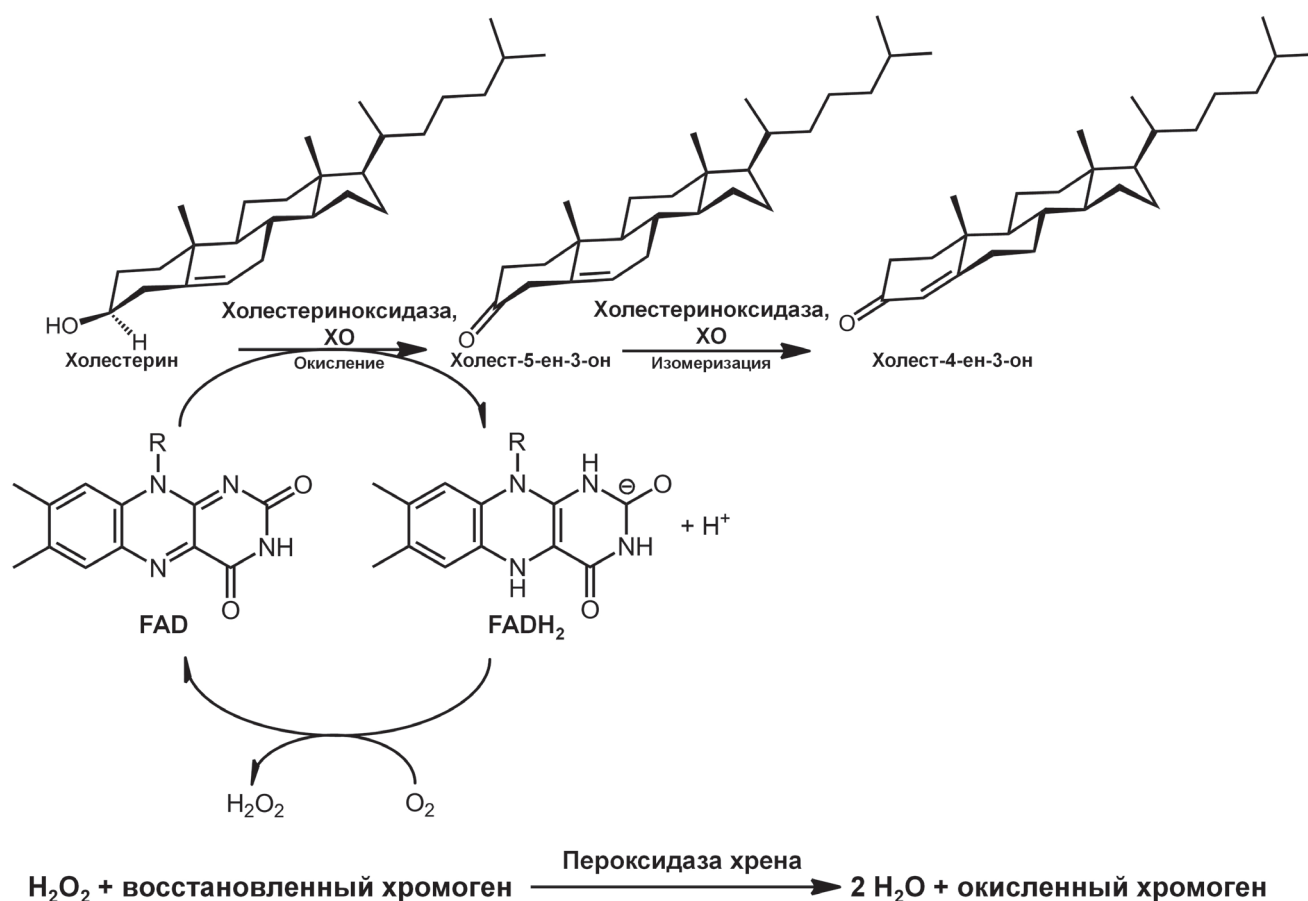


Рис. 1. Окисление холестерина до холест-4-ен-3-она с образованием перекиси водорода холестериноксидазой и цветная реакция перекиси водорода с пероксидазой хрена и хромогеном

продуктах и добавках, ХО широко применяется для биоконверсии стероидных 3 β -спиртов в органическом синтезе фармацевтических стероидов [4]. ХО способны к окислению нестероидных аллильных спиртов [5], обладают инсектицидной активностью [6]. Имеются сведения о противоопухолевой активности ХО, которая характеризуется как перспективное природное противораковое средство [7]. Предполагаемый механизм действия ХО основан на превращении холестерина в холестенон с последующим изменением физической структуры клеточных мембран или их повреждением [8].

Наличие ХО описано для аэробных бактерий различного таксономического положения, в основном актинобактерий родов *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Mycolicibacterium*, *Mycobacterium* [1]. У патогенных видов ХО, предположительно, играют ключевую роль в инфицировании макрофагов хозяина [9]. Ортологи ХО у млекопитающих не выявлены.

Бактериальные ХО, как правило, являются внеклеточными и, в зависимости от микроорганизма, встречаются в секретируемой и/или мембранно-ассоциированной форме.

Секретируемая форма представляет собой растворимый белок, состоящий из двух слиптых доменов: флавин-связывающего и субстрат-связывающего [8]. Наряду с ХО (или вместо ХО) окисление стероидов до соответствующих стенонов у некоторых актинобактерий, таких как *Mycolicibacterium smegmatis* mc²155 или *Mycobacterium tuberculosis*, обеспечивают 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы (3 β -ГСД) [10].

В настоящей работе изучали ХО *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д. Этот промышленно значимый штамм известен главным образом благодаря своей высокой 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназной активности по отношению к различным 3-кето-стероидам [11], в то время как его активность по отношению к 3 β -гидроксистероидам является менее изученной. При росте штамма на холестерине основной интермедиат был идентифицирован как холестенон. В геноме *N. simplex* не обнаружено гена, кодирующего (3 β -ГСД), что позволило предположить, что эту реакцию катализирует ХО [12].

Настоящее исследование направлено на выявление и изучение активности внеклеточ-

ной ХО *N. simplex* Ас-2033Д, получение рекомбинантной ХО (ХО_{NS}) и оценку её свойств в сравнении с коммерческой ХО из *Streptomyces hygroscopicus* (ХО_{Sh}).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Стероиды: холестерин, 5 α H-холестанол, прегненолон, дегидроэпиандростерон, холестенон, прогестерон, андростендион были получены от компании «Steraloids» (США); фитостерин (общее содержание стероидов 95,47%) получен от компании «Jiangsu Spring Fruit Biological Products Co., Ltd.» (Китай). Использовали бромистый этидий («Serva», Германия); метил- β -циклодекстрин (МЦД) («Wacker Chemie», Германия); бактоагар, бактопептон и дрожжевой экстракт («Panreac», Испания); пероксидазу хрена и ХО *Streptomyces hygroscopicus* (ХО_{Sh}) («Sigma», США). Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства, квалификации х.ч. или ч.д.а.

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Штамм *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Штамм культивировали аэробно, как описано ранее [13]. В качестве индукторов оценивали холестерин, фитостерин, дегидроэпиандростерон, которые вносили через 17 ч роста в концентрации 0,02 г/литр в виде метанольного раствора (2 мг/мл).

Штаммы *Escherichia coli* DH5 α и BL21(DE3) выращивали при 37 °С в среде LB [14]. Для селекции рекомбинантных штаммов и поддержания плазмид использовали канамицин (50 мкг/мл). Для приготовления плотных сред использовали бактоагар (1,5%).

Анализ ДНК- и белковых последовательностей. В работе были использованы ДНК- и белковые последовательности ХО *N. simplex* (locus tag: KR76_09550; GenBank: AUY19828.2, UniProt: A0A0A1DTF1). Сравнение идентичности аминокислотных последовательностей ХО *N. simplex* с ХО других штаммов проводили с помощью программного обеспечения BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Построение филогенетических деревьев осуществляли в программе MEGA5 [15] с использованием метода максимального правдоподобия. Для выравнивания последовательностей ХО использовали алгоритм ClustalW. Для предсказания присутствия в белковой последовательности ХО сигнального пептида и расположения протеолитического сайта расщепления использовали сервис SignalP 6.0 [16].

Биоконверсия 3 β -стероидных спиртов бесклеточной культуральной жидкостью *N. simplex*. Клетки *N. simplex*, выращенные в течение 20 ч до поглощения ОП₆₀₀ ~ 6, осаждали центрифугированием (35 мин, 3000 g, 4 °С), далее супернатант фильтровали с использованием шприцевого мембранного фильтра с диаметром пор 0,20 мкм (SFCA, «Sartorius», Германия). Бесклеточный супернатант тестировали на способность к биоконверсии дегидроэпиандростерона, холестерина, фитостерина, прогестерона, 5 α H-холестанола при их концентрации 0,05 г/литр. Стероиды идентифицировали методом ВЭЖХ, структуру 5 α H-холестанола определяли с помощью ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР.

Клонирование ДНК. Клонирование ДНК проводили согласно стандартным протоколам [17] и рекомендациям фирм-производителей.

Клетки *N. simplex*, выращенные в среде Нос до поглощения ОП₆₀₀ ~ 4,5, осаждали центрифугированием (20 мин, 8000 g, 4 °С), 50 мг клеточного осадка использовали для выделения геномной ДНК с помощью набора AllPrep Bacterial DNA/RNA/Protein Kit («Qiagen», США). Амплификацию целевой ДНК-последовательности, кодирующей усечённую зрелую форму ХО *N. simplex* (42-541 АМК), осуществляли с матрицы геномной ДНК *N. simplex* методом ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) в присутствии олигонуклеотидных праймеров Cho-f (5'-CAGTACATATGgcgagcatcggaacggcg-3') и Cho-r (5'-TCATCAAGCTTctagatgtcgtggccaggatg-3'), несущих соответствующие сайты эндонуклеаз рестрикции *Nde*I и *Hind*III (подчёркнуто) (рис. 2).

Для получения плазмиды рЕТCho амплифицированную нуклеотидную последовательность клонировали в вектор рЕТ-28a («MilliporeSigma», США).

Получение и очистка рекомбинантной ХО_{NS}. Плазмиды рЕТCho были перенесены в компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) методом теплового шока. Культуру рекомбинантных клеток *E. coli* выращивали в двух литрах среды LB с канамицином при 37 °С и 200 об./мин до поглощения ОП₆₀₀ ~ 0,5. Биосинтез усечённой зрелой формы ХО *N. simplex* индуцировали внесением в среду ИПТГ (0,5 мМ), дальнейшее культивирование вели при 25 °С в течение 6 ч. Биосинтез рекомбинантных белков контролировали методом электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ в соответствии с протоколом Лэммли [18].

Клетки *E. coli* осаждали центрифугированием (20 мин, 5000 g, 4 °С), промывали и ресуспендировали в 40 мл буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0). Клеточную суспензию гомогенизируют

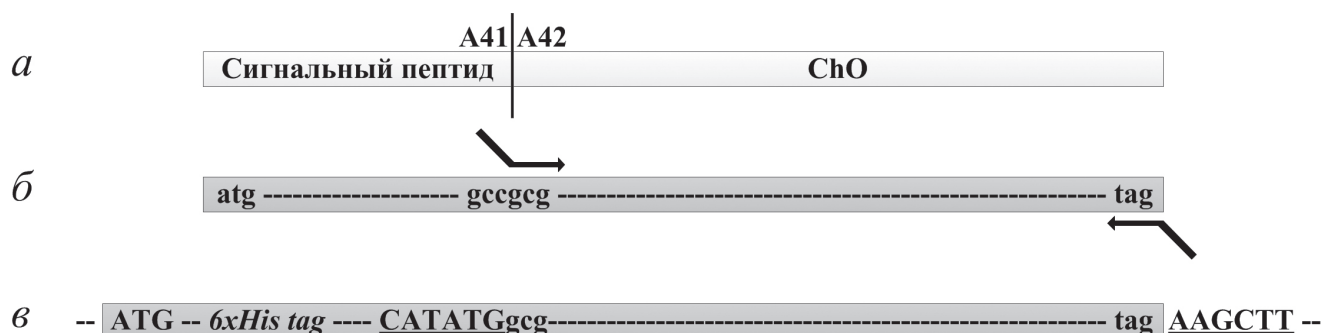


Рис. 2. Последовательности белков и ДНК, использованные в работе: а – полноразмерная аминокислотная последовательность ХО *N. simplex*. Вертикальная линия между остатками аланина А41 и А42 показывает сайт протеолитического расщепления ХО в процессе секреции. б – Нуклеотидная последовательность гена *cho* (*KR76_09550*), кодирующего ХО *N. simplex*. Праймеры изображены стрелками. в – Генетическая конструкция, клонированная в плазмиде pETChO. Сайты узнавания *Nde*I и *Hind*III подчёркнуты

вали на ультразвуковом дезинтеграторе Q500 («Qsonica», США) согласно рекомендациям производителя. Полученный гомогенат обрабатывали препаратом ДНКазы I («Sigma-Aldrich», США), дебрис осаждали (120 мин, 25 000 g, 4 °C), супернатант фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (SFCA, «Sartorius»).

Очистку ХО_{Ns} проводили методом аффинной хроматографии на колонке объёмом 5 мл EconoFit Profinity IMAC («Bio-Rad, США), уравновешенной связывающим буфером (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 20 мМ имидазол). После нанесения пробы колонку промывали шестью колоночными объемами (КО) связывающего буфера; белок элюировали десятью КО буфера для элюирования (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 500 мМ имидазол). Фракции, содержащие основную долю активности ХО_{Ns}, смешивали, диализовали против 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и использовали в дальнейшей работе. Наличие и чистоту фермента в пробах контролировали электрофорезом в 12%-ном Ds-Na-ПААГ. Количество белка в исследуемых препаратах определяли с помощью реактива Брэдфорда («Sigma») в соответствии с инструкцией производителя.

Определение ферментативной активности ХО_{Ns}. Определение ферментативной активности проводили в 2 мл реакционной смеси следующего состава: 50 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7,0), 12% ДМСО, 0,6 г/литр 3β-ОН-5-ен-стероид (холестерин, фитостерин, прегненолон, дегидроэпиандростерон, 5αН-холестанол). Реакцию инициировали добавлением 10 мкл ХО_{Ns} (0,7 мг/мл) или коммерческого препарата ХО_{Sh}, используемого для сравнения. Смесь инкубировали в течение определённого времени при 30 °C, реакцию останавливали кипячением в течение 3 мин. Стероидные продукты анализировали методом ВЭЖХ.

Спектрофотометрически активность ХО_{Ns} определяли в 1 мл реакционной смеси следующего состава: 50 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7,0), 5 мМ МЦД, 0–1 мМ 3β-ОН-5-ен-стероид (холестерин, фитостерин, прегненолон, дегидроэпиандростерон, 5αН-холестанол), 5 Ед. пероксидазы хрена, 1,4 мМ 2,2-азинодиэтилбензтиазолинсульфонат (АБТС). Реакцию инициировали добавлением 5 мкл ХО_{Ns} (35 мкг/мл) или ХО_{Sh} (35 мкг/мл). В качестве контроля использовали аналогичную смесь без внесения препарата ХО. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 420 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 («Shimadzu», Япония).

Определение характеристик ХО_{Ns}. Спектр поглощения препарата ХО_{Ns} записывали в диапазоне длин волн 190–900 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 в кварцевых кюветках, содержащих раствор ХО_{Ns} (1,5 мг/мл, 0,03 мМ) в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,5). Аналогично записывали спектры поглощения эталонного раствора FAD (0,1 мМ) в указанном буфере и препарата 0,03 мМ ХО_{Ns}, инкубированной в течение 10 мин в присутствии 0,5% Ds-Na.

Зависимость активности ХО_{Ns} от концентрации субстрата исследовали спектрофотометрически в реакционных средах с холестерином, фитостерином, прегненолоном, дегидроэпиандростероном, 5αН-холестанолом в диапазоне концентраций 0,05–1 мМ.

Скорость окисления холестерина ХО_{Ns} определяли спектрофотометрически в диапазоне pH 5,0–9,0 с шагом 0,25 единиц в универсальном буфере Бриттона–Робинсона (Britton–Robinson, [19]) и в диапазоне pH 6,0–8,0 с шагом 0,5 единиц – в Na-фосфатном буфере. Реакционная смесь конечным объёмом 1 мл содержала 50 мМ буфер, ферментный препарат ХО_{Ns}, 5 мМ МЦД, 0,5 мМ холестерин,

1,4 мМ АБТС и 15 Ед. пероксидазы хрена. Внешение трёхкратного количества пероксидазы выполнялось для компенсации снижения активности этого фермента при кислых и щелочных значениях рН [20].

Для изучения стабильности ХО_{Ns} при длительном хранении препарата ХО_{Ns} инкубировали в Na-фосфатном буфере (рН 7,0) при 4 и 25 °С. Остаточную активность ХО_{Ns} по отношению к холестерину измеряли спектрофотометрически через известные промежутки времени от начала эксперимента и выражали в процентах от исходной активности.

Активность ХО_{Ns} определяли при различных температурах (20–50 °С) для определения оптимума активности рекомбинантного фермента.

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Стероиды экстрагировали этилацетатом, экстракты наносили на ТСХ-пластинки ALUGRAM SIL G/UV254 («MACHEREY-NAGEL», Германия) и разделяли в системе бензол/ацетон (3/1, (v/v)). 3-Кето-4-ен-стероиды визуализировали в УФ свете при длине волны 254 нм в хемископе CN-15MC UV Darkroom («Vilber Lourmat», Франция).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Аликвоту реакционной смеси разводили в два раза смесью ацетонитрил/изопропанол (50/45, (v/v)), если в качестве субстратов использовали стеринны, или ацетонитрилом, если использовали прегненолон/ДГЭА. Суспензию центрифугировали (10 мин, 12 100 g), надосадочную жидкость использовали для анализа. Анализ проводили на хроматографической системе Agilent 1200 («Agilent Technologies», Германия), колонке Symmetry C18 (5 мкм, 4,6 × 250 мм) с предколонкой Symmetry C18 (5 мкм, 3,9 × 20 мм) («Waters», США) в следующих условиях: скорость потока – 1 мл/мин, температура колонки – 50 °С, детекция при длине волны – 240 нм.

Мобильная фаза: для стенонов – MeCN : iPr-OH : H₂O (50 : 45 : 5; v/v); для андростендиона/прогестерона – MeCN : H₂O : CH₃COOH (60 : 40 : 0,01; v/v). Калибровку проводили методом внешнего стандарта, основанным на сравнении площадей пиков. Результаты обрабатывали с помощью программы ChemStation Rev. B. 04.03 («Agilent Technologies»).

Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 («Bruker», Германия) на частоте 400 МГц. Химические сдвиги измеряли относительно сигналов тетраметилсилана. Приведены только характеристические ¹H-ЯМР-сигналы стероидов.

Статистическая обработка данных. Все измерения проводились не менее чем в 3 пов-

торностях; для каждой выборки вычислялись значения стандартного отклонения и доверительный интервал для нормального распределения при уровне значимости 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биоконверсия стероидных 3β-спиртов бесклеточной культуральной жидкостью *N. simplex*. Полученная при фильтрации супернатанта через бактериальный фильтр культуральная жидкость *N. simplex*, не содержащая клетки, осуществляла биоконверсию таких 3β-спиртов, как холестерин, фитостерин и дегидроэпиандростерон с образованием 3-кето-4-ен-продуктов: холестерона, фистостенонов и андростендиона соответственно (рис. 3, а). При этом было выявлено, что холестериноксидазная активность в культуральной жидкости присутствует вне зависимости от наличия стероидного индуктора.

На основании данных ВЭЖХ и ТСХ-анализа было выявлено (рис. 3, б и в), что предпочтительными субстратами внеклеточной ХО *N. simplex* являлись холестерин и 5αН-холестанол, для которых за минимальное время инкубирования достигалась максимальная полнота конверсии; более низкую активность ХО наблюдали по отношению к стероидам с более короткой боковой цепью при C17, либо не содержащим алифатическую цепь.

Анализ белковой последовательности ХО *N. simplex*. Анализ аминокислотной последовательности ХО *N. simplex* (KR76_09550) позволил выявить высокое сходство с ХО *Rhodococcus equi* (ChoE) (63,2%), *Rhodococcus erythropolis* (ChoE) (59,8%) и *Dietzia cinnamea* P4 (ChoE) (54,7%); умеренное сходство – с ХО *Streptomyces* (47–48%); низкое – с ХО микобактерий: *Mycobacterium leprae* (ChoD), *M. tuberculosis* H37Rv (ChoD), *Mycobacterium marinum* (ChoD) (15–23%) (рис. 4). Ближайшим гомологом ХО *N. simplex* (KR76_09550) является содержащая сигнальный пептид внеклеточная ХО *R. equi* (ChoE) [9, 21, 22], в свою очередь, на 56% идентичная ХО представителей рода *Streptomyces* (рис. 4).

Анализ белковой последовательности ХО *N. simplex*, осуществлённый с использованием сервиса SignalP 6.0 [16], позволил предсказать наличие в ХО *N. simplex* (KR76_09550) 41-аминокислотного N-терминального сигнального пептида (с вероятностью 0,9), который отщепляется в процессе секреции фермента Tat-зависимой системой белкового транспорта (с вероятностью 0,97).

Таким образом, исходя из полученных экспериментальных и биоинформатических дан-

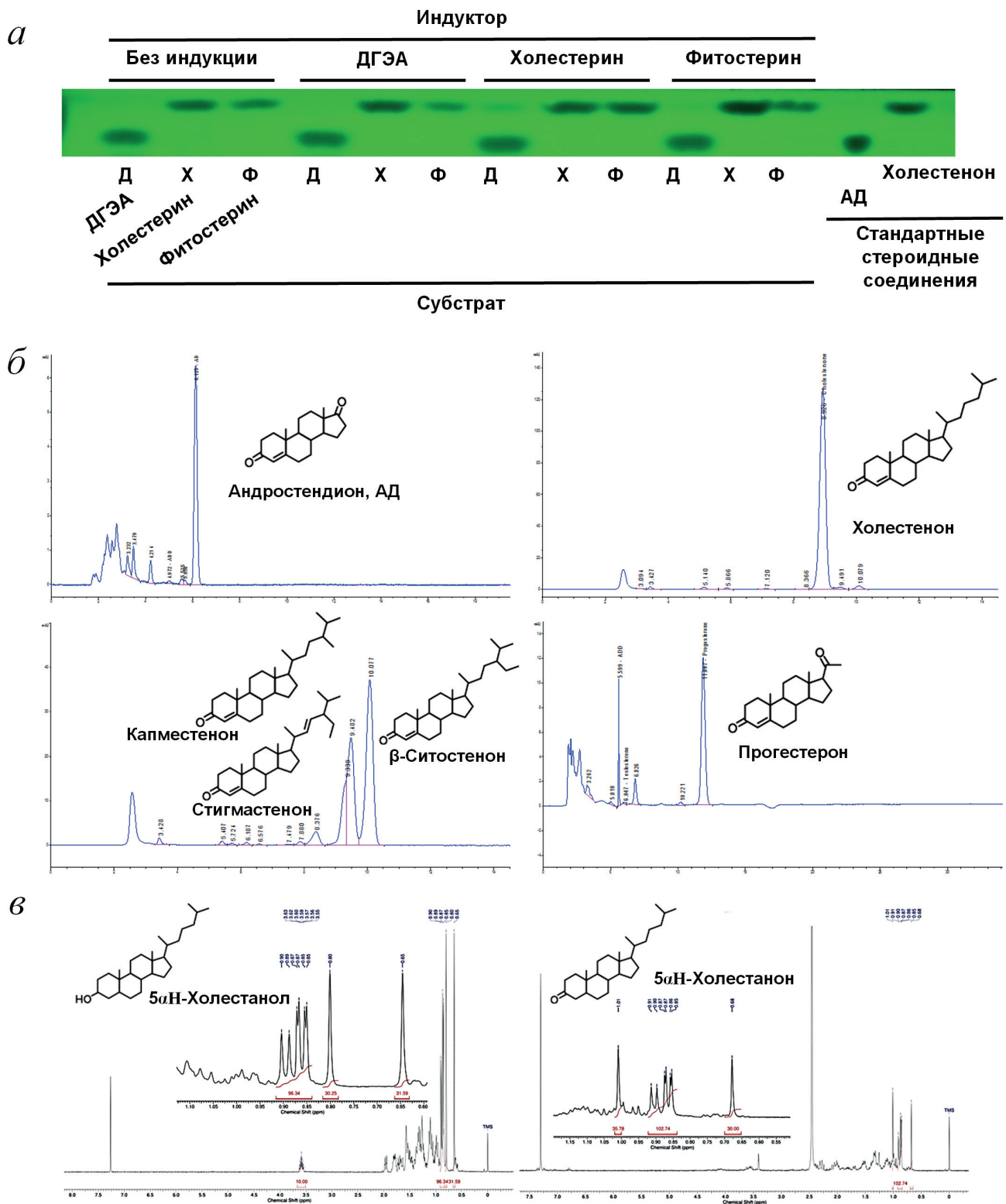


Рис. 3. Анализ стероидных соединений. *а* – ТСХ-Профиль 3-кето-4-ен-продуктов биоконверсии различных 3β-спиртов: дегидроэпиандростерона (ДГЭА), холестерина и фитостерина культуральной жидкостью *N. simplex*, не содержащей клетки, в условиях выращивания без внесения стероидных индукторов и с индукцией дегидроэпиандростероном (ДГЭА), холестерином (Х) и фитостерином (Ф). Стандартные стероидные соединения: аутентичный андростендион (АД); аутентичный холестерин. *б* – ВЭЖХ-Профили продуктов с 3-кето-4-ен-структурой, образующихся при конверсии стероидных 3β-спиртов: дегидроэпиандростерона, холестерина, фитостерина и прегненолона с участием ХО *N. simplex*. *в* – Спектры ¹НЯМР 5αН-холестанола и 5αН-холестанона

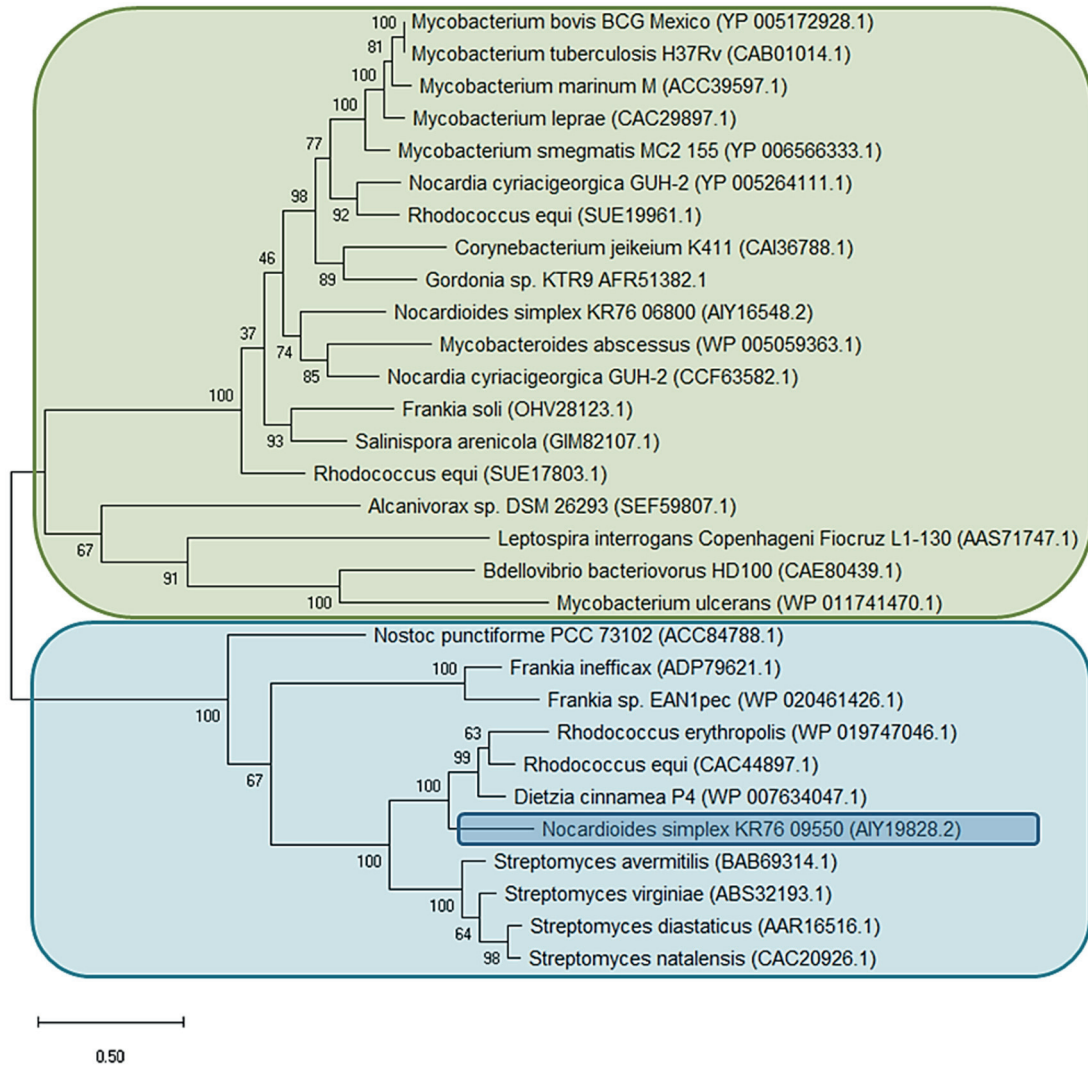


Рис. 4. Филогенетическая дендрограмма, иллюстрирующая положение ХО KR76_09550 актинобактерии *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д относительно некоторых бактериальных ХО

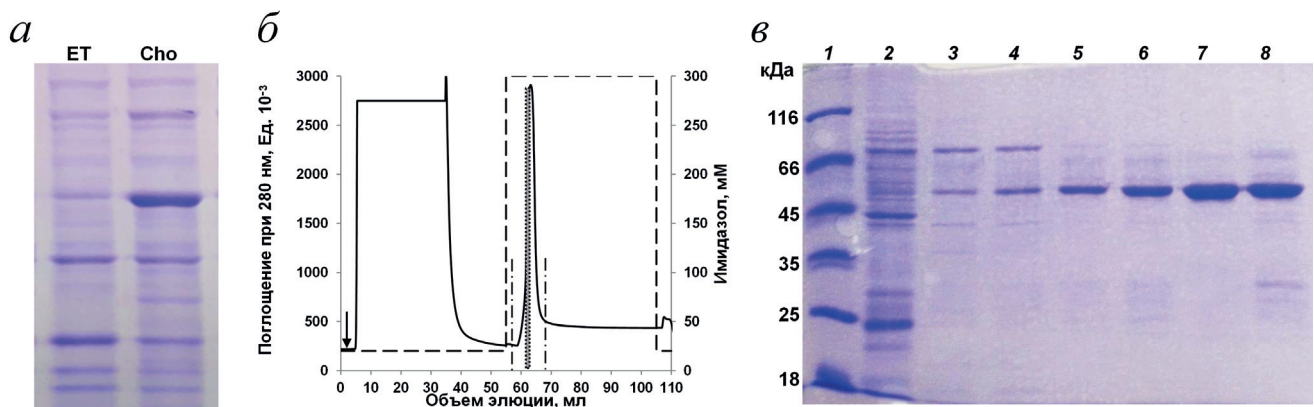


Рис. 5. Выделение и очистка рекомбинантной ХО_{NS}. *a* – 10% Ds-Na-ПААГ-анализ клеточных лизатов рекомбинантных штаммов *E. coli* BL21 (DE3), содержащих вектор pET28a (ET) и плазмиду pETCho (Cho). Индукция ИПТГ при 25 °С в течение 6 ч. Указана молекулярная масса для зрелой формы ХО, маркированной 6xHis. *б* – Профиль элюции ХО_{NS} при аффинной хроматографии. Заштрихована область активного пика, отобранная для исследований. Сплошная линия – оптическое поглощение при 280 нм; штриховая линия – концентрация имидазола; штрих-пунктирная линия – границы активного пика; стрелкой показано нанесение препарата ХО_{NS}. *в* – Денатурирующий электрофорез препаратов, полученных при выделении и очистке ХО_{NS}. Дорожки: 1 – маркеры; 2 – гомогенат; 3 – дебрис; 4 – бесклеточный экстракт; 5 – элюат при нанесении пробы на колонку; 6 – элюат при промывке связывающим буфером; 7 – часть активного пика, отобранная для работы; 8 – плечи активного пика

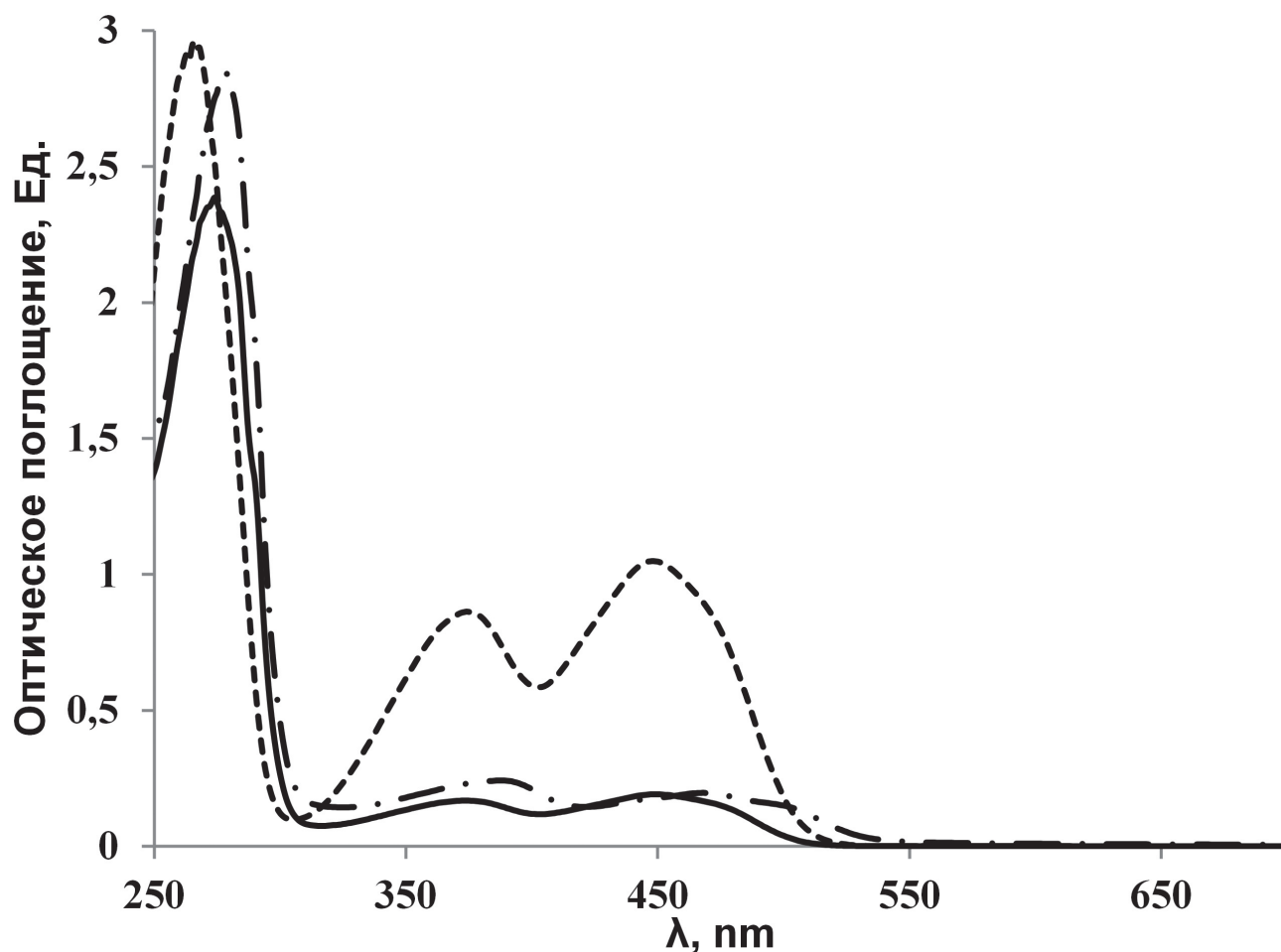


Рис. 6. Спектры оптического поглощения XO_{Ns} . Штриховая линия – FAD; штрих-пунктирная линия – XO_{Ns} ; сплошная линия – XO_{Ns} , обработанная 0,5%-ным Ds-Na

ных, нами сделан вывод о том, что XO *N. simplex* функционирует в виде внеклеточной зрелой формы, представляющей собой белковый продукт гена *cho* без сигнальной лидерной последовательности, удаляемой в процессе белковой секреции.

Выделение и очистка XO_{Ns} . Трансформированные плазмидой pETcho клетки *E. coli* BL21(DE3) продуцировали маркированную 6xHis-меткой зрелую форму XO *N. simplex* (55,6 кДа) без сигнального пептида (рис. 5, а). Применённый подход обеспечил высокий выход фермента на уровне гомогената (рис. 5, б и в).

Методом аффинной хроматографии был получен препарат XO_{Ns} с концентрацией ~5 мг белка в 1 мл, относящийся к центральной части активного пика (рис. 5, б). Ds-Na-ПААГ-Электрофореграмма полученных фракций представлена на рис. 5, в. Выход белка XO_{Ns} составил $4 \pm 0,4\%$.

Спектральные и кинетические свойства XO_{Ns} . Фермент XO_{Ns} имел максимумы поглощения при 385 и 470 нм, характерные для белков,

связанных с FAD (рис. 6). Обработка XO_{Ns} Ds-Na сдвигала максимумы поглощения к 370 и 450 нм, что характерно для растворённого FAD (рис. 6).

Мы использовали в качестве фермента сравнения препарат коммерческой XO_{Sh} , поскольку известно, что XO видов *Streptomyces* обладают высокой активностью и стабильностью [6, 23].

Результаты измерения активности XO_{Ns} в сравнении с коммерческой XO_{Sh} представлены на рис. 7, а–г. Как следует из рис. 7, а и б, ферменты XO_{Ns} и XO_{Sh} демонстрировали сходные зависимости от концентрации холестерина. На основании полученных результатов в дальнейших экспериментах использовали концентрацию стероидного субстрата, равную 0,5 мМ.

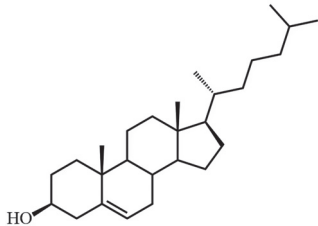
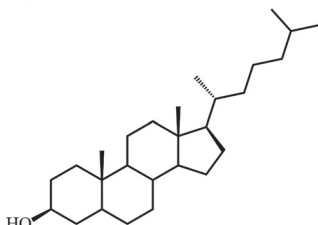
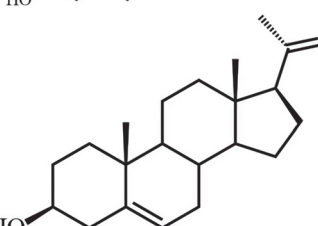
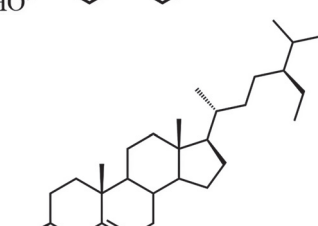
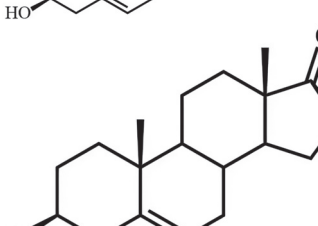
Анализ кинетических характеристик XO_{Ns} в отношении различных стероидов позволил заключить, что предпочтительным субстратом рекомбинантной XO *N. simplex* является холестерин по сравнению с фитостерином или прегненолоном, которые отличаются конфигурацией и длиной боковой цепи. Примеча-

Таблица 1. Кинетические характеристики: константа Михаэлиса (K_M), каталитическая константа (k_{cat}) и каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) XO_{Ns} , а также коммерческой XO_{Sh} в отношении некоторых стероидных 3β -спиртов

Субстрат	Фермент	K_M , мкМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M (с ⁻¹ мМ ⁻¹)
Холестерин	XO_{Sh}	310 ± 1	42,8 ± 0,02	138,53 ± 0,02
Холестерин	XO_{Ns}	610 ± 5	40,1 ± 0,31	65,74 ± 0,32
5 α Н-Холестанол	XO_{Ns}	590 ± 11	23,9 ± 0,04	40,50 ± 0,04
Прегненолон	XO_{Ns}	1030 ± 10	20,9 ± 0,05	20,23 ± 0,06
Фитостерин	XO_{Ns}	1080 ± 7	21,0 ± 0,13	19,47 ± 0,13

Примечание. Концентрация субстрата 0,5 мМ, рН 7,0, температура 30 °С.

Таблица 2. Активность XO_{Ns} в отношении стероидов с различной конфигурацией боковой цепи

Субстрат	Химическая структура	Активность XO_{Ns} , Ед. на 1 мг белка	Эффективность био- конверсии, мол. % (за 1 ч биоконверсии)
Холестерин		22 ± 2	84 ± 7
5 α Н-Холестанол		13 ± 2	н.о.
Прегненолон		9 ± 2	1 ± 0,3
Фитостерин (β -Ситостерин)		8 ± 1	20 ± 3
Дегидроэпиандростерон		2 ± 0,1	1 ± 0,1

Примечание. Концентрация субстрата 0,5 мМ, рН 7,0, температура 30 °С.

мол. % – мольная доля выхода вещества, выраженная в процентах.

н/о – не определена.

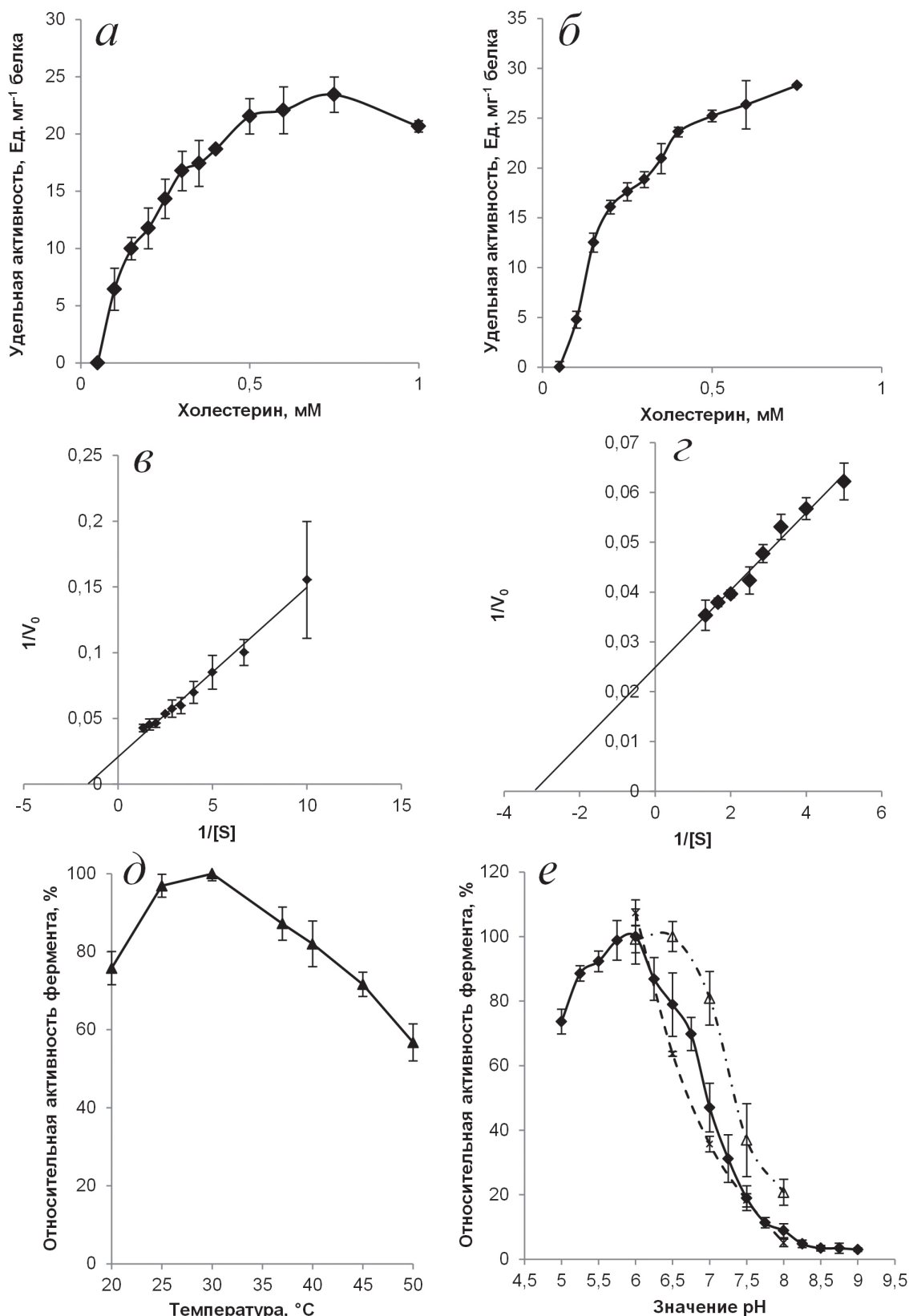


Рис. 7. Зависимость удельной активности XO_{Ns} от концентрации холестерина (*a*) в сравнении с удельной активностью коммерческой XO_{Sh} (*б*). Линеаризация в координатах Лайнуивера–Берка для XO_{Ns} (*в*) и коммерческой XO_{Sh} (*г*). Зависимость активности XO_{Ns} от температуры (*д*). Зависимость активности XO_{Ns} от величины pH среды в сравнении с активностью коммерческой XO_{Sh} (субстрат – 0,5 мМ холестерин) по данным спектрофотометрических измерений (*е*). Сплошная линия – активность XO_{Ns} в буфере Бриттона–Робинсона; штриховая линия – активность XO_{Ns} в Na-фосфатном буфере; штрих-пунктирная линия – активность коммерческой XO_{Sh} в Na-фосфатном буфере. За 100% принята максимальная активность (для XO_{Ns} зарегистрирована при pH 6,0, для коммерческой – при pH 6,5)

тельно, что наличие насыщенной 5(6)-двойной связи в 5 α H-холестаноле оказывало меньшее влияние на активность, чем наличие, длина и конфигурация боковой цепи при C17 стероидного субстрата (табл. 1, 2).

Результаты спектрофотометрического определения активности и эффективности биоконверсии представлены в табл. 2. Фермент ХО_{Ns} производил в 4 раза больше холестерина за 1 час биоконверсии по сравнению с коммерческим ферментом ХО_{Sh} (84 ± 7 мол. % против 20 ± 3 мол. %).

Анализ температурного оптимума показал, что активность ХО_{Ns} сохраняется в диапазоне 20–50 °C с максимумом при 30 °C (рис. 7, д). Фермент ХО_{Sh} имел аналогичную температурную зависимость. Как ХО_{Ns} , так и ХО_{Sh} были активны в диапазоне pH 5–8, но слегка различались по оптимуму pH, который составлял 6,0 для ХО_{Ns} и 6,5 – для ХО_{Sh} (рис. 7, е).

Данные по стабильности при хранении для ХО_{Ns} представлены на рис. 8. Фермент сохранял 10 и 50% активности при хранении более месяца при 25 и 4 °C соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биотехнологически значимый штамм *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д эффективно проводит 1(2)-дегидрирование 3-кето-стероидов [8, 11] и способен окислять холестерин с образованием холестерина [24, 25]. В настоящем исследовании продемонстрирован высокий уровень активности внеклеточной ХО этого штамма в отношении различных 3 β -гидрокси-5-ен-стероидов. Фермент ХО как индуцированных, так и неиндуцированных клеток *N. simplex* катализировал модификацию 3 β -гидрокси-5-ен-фрагмента в 3-кето-4-ен-структуру. Эти результаты согласуются с известными данными о повышении экспрессии гена *cho* в присутствии стероидов [12] и указывают на высокий базальный уровень ХО в *N. simplex*. Индуцибельный характер бактериальных ХО был отмечен для используемых в качестве продуцентов ХО штаммов *Rhodococcus* и *Streptomyces* [2, 9, 21, 26, 27], в то время как высокая конститутивная активность ХО указывалась для мутантов *N. simplex* [28].

Интересно, что у стрептомицетов, не относящихся к стерин-катаболизирующим организмам, ген, кодирующий ХО, находится в центре кластера генов, кодирующих ферменты биосинтеза полиеновых антибиотиков, и регулируется транскрипционным активатором PimR (в случае *Streptomyces natalensis*) [8]. В геноме *N. simplex* не обнаружено ортологов гена, коди-

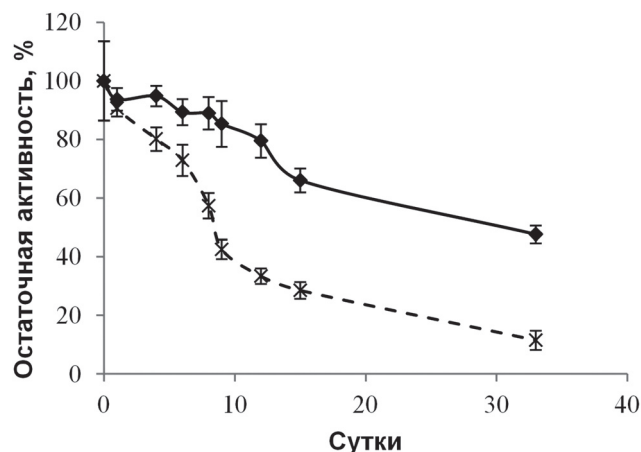


Рис. 8. Стабильность препаратов ХО_{Ns} при хранении в Na-фосфатном буфере (pH 7,0). Сплошная линия – при температуре 4 °C; штриховая линия – при 25 °C

рующего PimR (aj585085). У микобактерий деградация холестерина регулируется транскрипционными репрессорами TetR-типа: KstR и KstR2. В геноме *N. simplex* ген *KR76_09550*, кодирующий ХО, находится вне кластеров катаболизма стероидов, но имеет предполагаемый сайт связывания KstR и, таким образом, может регулироваться KstR-фактором. Другие регуляторы катаболизма стероидов у актинобактерий в настоящее время не известны [8, 12, 29].

Белок ХО *N. simplex* проявляет наибольшее сходство с ХО из *R. equi* (ChoE) [9] и находится в той же филогенетической кладе, что и ХО *Streptomyces*, биохимические свойства и структура которых хорошо изучены [27]. Меньшее сходство ХО *N. simplex* наблюдалось с микобактериальными ХО из *M. leprae*, *M. tuberculosis* H37Rv и *M. marinum*. О другом ферменте *N. simplex* – *KR76_06800* (AIY 16548.2, ChoD) – сообщалось, что он не обладает активностью ХО, но катализирует превращение холестерина в холестерин как дегидрогеназа в присутствии 2,6-дихлорфенолиндофенола и феназинметосульфата [30].

В настоящей работе последовательность *KR76_09550*, кодирующая зрелую форму ХО *N. simplex*, была клонирована в клетках *E. coli*; бхHis-меченый рекомбинантный фермент ХО_{Ns} был выделен и очищен. Насколько нам известно, это первое сообщение о рекомбинантной ХО из *N. simplex* Ас-2033Д. Опубликована только одна работа, в которой сообщалось о генно-инженерной ХО из *N. simplex* и указывалось, что изучалась зрелая форма ХО, укороченная на 10 и 5 аминокислотных остатков с N- и C-концов фермента соответственно [31]. С помощью аффинной хроматографии нами получен электрофоретически гомогенный препарат зрелой формы ХО *N. simplex* (55,6 кДа),

меченный б³His-фрагментом. Концентрация белка в очищенном препарате ХО_{Ns} составляла ~3,7 мг в 1 мл, что соответствует $4 \pm 0,4\%$ от исходного количества белка.

Являясь мономерными белками, бактериальные ХО содержат в качестве простетической группы одну молекулу FAD. Белок ХО_{Ns} в окисленном состоянии имел максимумы поглощения при 385 и 470 нм, которые практически совпали с максимумами поглощения для ХО_{Sh} [32]. Сравнительный анализ спектральных свойств ХО_{Ns} и ХО_{Sh} позволил предположить, что в ХО_{Ns} флаavin находится в анионной форме как в восстановленном, так и в переходном состояниях. Природа связывания FAD у ХО_{Ns} и ХО_{Sh} аналогична и определяется как нековалентное связывание. Известно, что высвобождение нековалентно связанного кофактора возможно, например, при нагревании белка до 90 °C [32].

Особенностью флавиновых белков, способствующей правильному связыванию кофактора, является наличие консенсусной последовательности, состоящей из повторяющихся остатков глицина (GXGXXG) и остатка аспарагиновой или глутаминовой кислоты, отстоящих друг от друга примерно на 20 аминокислотных остатков [32]. В случае нековалентной формы ХО_{Sh} — это последовательность остатков глицина (G17-X-G19-X-G21-G/A22), за которыми следует E40, что предполагает нуклеотид-связывающую укладку белка; в случае ковалентно связанной формы ХО этот консенсус отсутствует, что указывает на вероятное отсутствие у этой формы фермента нуклеотид-связывающей складки [32]. В структуре белка ХО *N. simplex* мы обнаружили последовательность G15-X-G17-X-G19-G20, за которой следовал E38, что укладывается в теорию строения нековалентно связанной формы флавина у этой ХО.

Кинетические характеристики ХО_{Ns} были сходны или незначительно отличались от таковых для ХО_{Sh} по максимальной скорости реакции V_{\max} и величине каталитической константы k_{cat} по отношению к холестерину (табл. 1). Однако K_M для ХО_{Ns} была в два раза выше, чем K_M для ХО_{Sh} и, соответственно, каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) для ХО_{Ns} была в 2 раза ниже, чем у ХО_{Sh} . Измерения активности двух ферментов при высоких концентрациях субстрата (≥ 1 мМ) показали возможное ингибирование субстратом. Помимо холестерина, фермент ХО_{Ns} проявлял активность в отношении 5 α H-холестанола, фитостерина, прегненолона и дегидроэпиандростерона, причём уровень активности зависел от структуры и длины алифатической боковой цепи в положении C17, будучи самым высоким для холе-

стерина и уменьшаясь в порядке холестерин > 5 α H-холестанол > прегненолон > фитостерин > дегидроэпиандростерон (табл. 2). Результаты, полученные для ХО_{Ns} , соответствуют результатам, полученным для фильтрата культуральной жидкости *N. simplex*, и характерны для ХО других бактерий [9, 33]. Примечательно, что самая низкая скорость образования 3-кето-4-ен-стероидов наблюдалась при использовании дегидроэпиандростерона и прегненолона.

Образование 3-кето-4-ен-стероидов из соответствующих 3 β -гидрокси-5-ен-субстратов является подтверждением двойственной функции ХО_{Ns} , обеспечивающей как дегидрирование 3 β -гидроксильной группы, так и изомеризацию двойной связи из положения C5(6) в C4(5). Фермент также окислял субстрат 5 α H-холестанол с насыщенной связью C5(6), но с вдвое меньшей активностью.

Скорость окисления АБТС пероксидазой хрена в сопряжённой реакции с ХО_{Ns} зависела от pH и была максимальной в диапазоне pH 5,75–6,25 (рис. 7, e). Аналогичные результаты были получены в Na-фосфатном буфере и буфере Бриттона–Робинсона. Такой слабнокислый оптимум pH не характерен для бактериальных ХО, но подтверждён в наших экспериментах и для ХО_{Sh} (рис. 7, e). Данные отличаются от результатов, полученных для генно-инженерной ХО из *Pimelobacter simplex* [31], однако согласуются с данными, описанными для внеклеточных и некоторых внутриклеточных ХО из актинобактерий, относящихся к семейству Nocardiaceae [34]. Фермент ХО_{Ns} продемонстрировал высокую стабильность при хранении, что важно для его возможного практического применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе получен электрофоретически гомогенный препарат рекомбинантной ХО *N. simplex* (55,6 кДа). Фермент ХО *N. simplex* относится к оксидазам глюкозо-метанол-холинового семейства и содержит нековалентно связанный кофактор FAD. Сходство ХО *N. simplex* по аминокислотным остаткам с ХО из *R. equi* (ChoE) составляет 63,2%. Показатели рекомбинантного фермента ХО_{Ns} из *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д сопоставимы с таковыми для коммерческого препарата ХО штамма *Streptomyces* даже в неоптимизированных условиях.

Полученные результаты расширяют знания о разнообразии бактериальных ХО и указывают на биотехнологический потенциал внеклеточной ХО из *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д.

Вклад авторов. В.В. Фокина, М.В. Карпов, В.В. Коллеров – концепция и проведение экспериментов; Д.О. Эпиктетов, А.В. Свиридов – проведение экспериментов; Е.Ю. Брагин – биоинформатический анализ; А.В. Казанцев – МС-и ЯМР-анализ; А.А. Шутов – ВЭЖХ-анализ; В.В. Фокина, М.В. Карпов, В.В. Коллеров, А.В. Свиридов – обсуждение результатов исследования и написание текста; М.В. Донова – руководство работой и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00024).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kreit, J. (2017) Microbial catabolism of sterols: focus on the enzymes that transform the sterol 3 β -hydroxy-5-en into 3-keto-4-en, *FEMS Microbiol. Lett.*, **364**, fnx007, doi: 10.1093/femsle/fnx007.
- Lario, P. I., Sampson, N., and Vrielink, A. (2003) Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: What atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity, *J. Mol. Biol.*, **326**, 1635-1650, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00054-8.
- Salè, F. O., Marchesini, S., Fishman, P. H., and Berra, B. (1984) A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts, *Anal. Biochem.*, **142**, 347-350, doi: 10.1016/0003-2697(84)90475-5.
- Doukyu, N. (2009) Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, 825-837, doi: 10.1007/s00253-009-2059-8.
- Heath, R. S., Sangster, J. J., and Turner, N. J. (2022) An engineered cholesterol oxidase catalyses enantioselective oxidation of non-steroidal secondary alcohols, *Chembiochem.*, **23**, e202200075, doi: 10.1002/cbic.202200075.
- Corbin, D. R., Greenplate, J. T., Wong, E. Y., Purcell, J. P. (1994) Cloning of an insecticidal cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria and in plant protoplasts, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4239-4244, doi: 10.1128/aem.60.12.4239-4244.1994.
- El-Naggar, N. El.-A., Soliman, H. M., and El-Shweihy, N. M. (2018) Extracellular cholesterol oxidase production by *Streptomyces aegyptia*, *in vitro* anticancer activities against rhabdomyosarcoma, breast cancer cell-lines and *in vivo* apoptosis, *Sci. Rep.*, **8**, 2706, doi: 10.1038/s41598-018-20786-3.
- Kreit, J., and Sampson, N. S. (2009) Cholesterol oxidase: physiological functions, *FEBS J.*, **276**, 6844-6856, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07378.x.
- Navas, J., González-Zorn, B., Ladrón, N., Garrido, P., and Vázquez-Boland, J. A. (2001) Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*, *J. Bacteriol.*, **183**, 4796-4805, doi: 10.1128/JB.183.16.4796-4805.2001.
- García, J. L., Uhía, I., and Galán, B. (2012) Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria, *Microb. Biotechnol.*, **5**, 679-699, doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00331.x.
- Fokina, V. V., Sukhodol'skaya, G. V., Gulevskaya, S. A., Gavrish, E. Y., Evtushenko, L. I., et al. (2003) The 1(2)-dehydrogenation of steroid substrates by *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D, *Mikrobiologiya*, **72**, 24-29, doi: 10.1023/A:1022265720470.
- Shtratnikova, V. Y., Schelkunov, M. I., Fokina, V. V., Bragin, E. Y., Lobastova, T. G., et al. (2020) Genome-wide transcriptome profiling provides insight on cholesterol and lithocholate degradation mechanisms in *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D, *Genes*, **11**, 1229, doi: 10.3390/genes11101229.
- Текучева Д. Н., Фокина В. В., Николаева В. М., Шутов А. А., Карпов М. В., и др. (2022) Каскадная биоконверсия фитостерина в тестостерон штаммами *Mycolicibacterium neoaurum* ВКМ Ac-1815Д и *Nocardioides simplex* ВКМ Ac-2033Д, *Микробиология*, **91**, 353-363, doi: 10.31857/S0026365622300097.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **62**, 293-300, doi: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 2731-2739, doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., et al. (2022) SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models, *Nat. Biotechnol.*, **03**, doi: 10.1038/s41587-021-01156-3.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
- Britton, H. T. K., Robinson, R. A. (1931) CXCVIII. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal, *J. Chem. Soc.*, 1456-1462, doi: 10.1039/JR9310001456.
- Alshawafi, W. M., Aldahri, M., Almulaiky, Y. Q., Salah, N., Moselhy, S. S. et al. (2018) Immobilization of horseradish peroxidase on nonwoven polyester fabric coated with chitosan. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, **46** (sup3), S973-S981, doi: 10.1080/21691401.2018.1522321.

21. Ladrón, N., Fernández, M., Agüero, J., González Zörn, B., Vázquez-Boland, J. A., et al. (2003) Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 3241-3245, doi: 10.1128/JCM.41.7.3241-3245.2003.
22. Kämpfer, P., Dott, W., Martin, K., and Glaeser, S. P. (2014) *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 755-761, doi: 10.1099/ijs.0.053322-0.
23. Lolekha, P. H., Srisawasdi, P., Jearanaikoon, P., Wetprasit, N., Sriwanthana, B., et al. (2004) Performance of four sources of cholesterol oxidase for serum cholesterol determination by the enzymatic endpoint method, *Clin. Chim. Acta*, **339**, 135-145, doi: 10.1016/j.cccn.2003.10.005.
24. Fokina, V. V., Sukhodolskaya, G. V., Baskunov, B. P., Turchin, K. F., Grinenko, G. S., et al. (2003) Microbial conversion of pregna-4,9(11)-diene-17 α ,21-diol-3,20-dione acetates by *Nocardioideis simplex* VKM Ac-2033D, *Steroids*, **68**, 415-421. doi: 10.1016/S00039-128X(03)00043-6.
25. Sukhodolskaya, G., Fokina, V., Shutov, A., Nikolayeva, V., Savinova, T., et al. (2017) Bioconversion of 6-(*N*-methyl-*N*-phenyl) aminomethyl androstane steroids by *Nocardioideis simplex*, *Steroids*, **118**, 9-16, doi: 10.1016/j.steroids.2016.11.001.
26. Gadda, G., Wels, G., Pollegioni, L., Zucchelli, S., Ambrosius, D., et al. (1997) Characterization of cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum*, *Eur. J. Biochem.*, **250**, 369-376, doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.0369a.x.
27. Yue, Q. K., Kass, I. J., Sampson, N. S., and Vrielink, A. (1999) Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants, *Biochemistry*, **38**, 4277-4286, doi: 10.1021/bi982497j.
28. Jeong, J. M., and Young-Sun, J. (2008) A simple and rapid method for screening of *Nocardioideis simplex* mutant with high cholesterol oxidase activity, *Appl. Biol. Chem.*, **51**, 338-341 doi: 10.3839/jksabc.2008.058
29. Shtratnikova, V. Y., Schelkunov, M. I., Fokina, V. V., Pekov, Y. A., Ivashina, T., et al. (2017) Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in *Nocardioideis simplex* VKM Ac-2033D, *Curr. Genet.*, **62**, 643-656, doi:10.1007/s00294-016-0568-4.
30. Qin, H. M., Wang, J. W., Guo, Q., Li, S., Xu, P., et al. (2017) Refolding of a novel cholesterol oxidase from *Pimelobacter simplex* reveals dehydrogenation activity, *Protein Expr. Purif.*, **139**, 1-7, doi: 10.1016/j.pep.2017.07.008.
31. Qin, H. M., Zhu, Z., Ma, Z., Xu, P., Guo, Q., et al. (2017) Rational design of cholesterol oxidase for efficient bioresolution of cholestane skeleton substrates, *Sci. Rep.*, **7**, 16375, doi: 10.1038/s41598-017-16768-6.
32. Devi, S., and Kanwar, S. S. (2017) Cholesterol oxidase: source, properties and applications, *Insights Enzyme Res.*, **1**, 1, doi: 10.21767/2573-4466.100005.
33. Srisawasdi, P., Jearanaikoon, P., Kroll, M. H., and Lolekha, P. H. (2005) Performance characteristics of cholesterol oxidase for kinetic determination of total cholesterol, *J. Clin. Lab. Anal.*, **19**, 247-252, doi: 10.1002/jcla.20086.
34. Kumari, L., and Kanwar, S. S. (2012) Cholesterol oxidase and its applications, *Adv. Microbiol.*, **2**, 49-65, doi: 10.4236/aim.2012.22007.

RECOMBINANT EXTRACELLULAR CHOLESTEROL OXIDASE FROM *Nocardioideis simplex*

V. V. Fokina^{1*}, M. V. Karpov¹, V. V. Kollerov¹, E. Y. Bragin¹, D. O. Epiktetov¹,
A. V. Sviridov¹, A. V. Kazantsev², A. A. Shutov¹, and M. V. Donova¹

¹ Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences; Federal Research Center "Pushchino Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: 2vyfokina@gmail.com

² Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Cholesterol oxidase is a highly demanded enzyme that is used in medicine, pharmacy, agriculture, chemistry, and biotechnology. The enzyme catalyzes oxidation of 3 β -hydroxy-5-ene to 3-keto-4-ene steroids with the formation of hydrogen peroxide. Extracellular cholesterol oxidase (ChO) of *Nocardioideis simplex* VKM Ac-2033D was the focus of this study. A 6xHis-tagged mature form of *N. simplex* ChO (55.6 kDa) was expressed in an *Escherichia coli* host. The recombinant *N. simplex* ChO (ChO_{Ns}) was isolated and purified using affinity chromatography. The enzyme proved functional towards cholesterol, cholestanol, phytosterol, pregnenolone, and dehydroepiandrosterone. Its activity depended on the structure and length of the aliphatic side chain at C17 of the steroid nucleus, being lower with pregnenolone and dehydroepiandrosterone. The enzyme was active in a pH range of 5.25÷6.5 with a pH optimum at 6.0. Kinetic assays and storage stability tests demonstrated that ChO_{Ns} characteristics are generally comparable with or superior to those of commercial ChO from *Streptomyces hygroscopicus* (ChO_{St}). The results contribute to the knowledge on microbial ChOs and evidence that ChO from *N. simplex* VKM Ac-2033D is promising for further applications.

Keywords: cholesterol, cholesterol oxidase, actinobacteria, recombinant enzyme