

*Посвящается памяти
члена-корреспондента АН СССР
Ильи Васильевича БЕРЕЗИНА*

ПРОГРЕСС В ИЗУЧЕНИИ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И МЕХАНИЗМ БИОДЕГРАДАЦИИ ВЫСОКОУПОРЯДОЧЕННЫХ ФОРМ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

© 2000 г. М. Л. РАБИНОВИЧ, М. С. МЕЛЬНИК

Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН

I. Введение. II. Классификация каталитических и целлюлозосвязывающих доменов целлюлаз. III. Целлюлазные системы несовершенных грибов и базидиомицетов. IV. Целлюлазные системы актиномицетов и аэробных бактерий. V. Целлюлазные системы анаэробных микроорганизмов. VI. О механизме разложения упорядоченных форм целлюлозы.

I. ВВЕДЕНИЕ

Последние 10—15 лет ознаменовались стремительным прогрессом в исследовании целлюлолитических ферментов микроорганизмов. Первый всплеск массового интереса к ним пришелся на 70-е годы, когда с целлюлазами связывали большие надежды в производстве моторного топлива из возобновляемого сырья. Нынешний этап определяется постоянно расширяющейся сферой их практического применения в текстильной и целлюлозно-бумажной промышленности, производстве стиральных порошков и диетических пищевых продуктов, животноводстве и лесоводстве, одним словом — везде, где встречается необходимость в обработке целлюлозосодержащих материалов.

Принятые сокращения: КД — каталитический домен, ЦСД — целлюлозосвязывающий домен, Cel — целлюлаза (эндоглюканаза), EG и Eg — эндоглюканаза, CBH и Cbh — целлобиогидролаза, Cip и Cbp — скаффолдин, Man — маннаназа, Opr — белок внешнего слоя клостридиальной клетки, Xup — ксиланаза.

Хотя практический аспект, несомненно, играл центральную роль в стимулировании интереса к микробным целлюлазам во второй половине нынешнего столетия, было бы неверным полностью игнорировать познавательный мотив их изучения. Достаточно напомнить о той работе, которую ежегодно проделывают эти ферменты, обеспечивая круговорот углерода на Земле. Являясь центральным биохимическим звеном углекислотного цикла, целлюлолитические ферменты одновременно демонстрируют поразительное разнообразие форм, созданных различными группами микроорганизмов в процессе конвергентной эволюции.

Настоящий обзор имеет целью продемонстрировать это многообразие через современную классификацию целлюлаз, анализ структуры их основных блоков — каталитических и целлюлозосвязывающих доменов, а также через строение целлюлолитических систем различных типов микроорганизмов — несовершенных грибов и базидиомицетов, аэробных и анаэробных бактерий, актиномицетов. Заключительная часть посвящена загадке, интригующей специалистов—энзимологов на протяжении последних 50 лет [88] — как ферментам, работающим при умеренных значениях рН и температуры, удается разрушать столь прочную надмолекулярную структуру, как целлюлозная фибрилла, которая не расщепляется полностью даже при кипячении в соляной кислоте.

II. КЛАССИФИКАЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ И ЦЕЛЛЮЛОЗОСВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ ЦЕЛЛЮЛАЗ

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

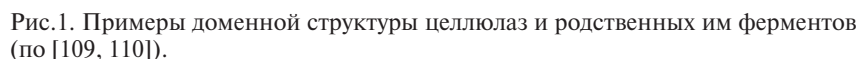
Прежде чем перейти непосредственно к вопросам классификации, необходимо пояснить, что по современным представлениям [68, 109] большинство целлюлолитических ферментов являются мультидоменными белками, содержащими по меньшей мере три функционально различных структурных элемента: каталитический домен, целлюлозосвязывающий домен и соединяющий их линкер. Наличие двух типов доменов впервые удалось продемонстрировать в 70—х гг., когда было установлено, что в процессе аффинной хроматографии на целлюлозе некоторые формы грибных целлюлаз не элюируются растворимым субстратом, а расщепляют его, оставаясь в прочно адсорбированном состоянии. Это показало, что связывание с целлюлозой обеспечивается у них самостоятельным фрагментом молекулы, не входящим в активный центр. Тогда же были обнаружены ферменты, которые, при одинаковом действии

на растворимый субстрат, отличались на 2 порядка по способности к адсорбции на целлюлозе [12, 82]. Позднее КД и ЦСД грибной целлюбогидролазы I удалось разделить с помощью специфического протеолиза связывающего их линкера [113], подобно тому, как это было сделано в конце 70-х гг. для грибной глюкоамилазы [50, 124].

Как правило, один и тот же организм образует несколько типов целлюлолитических ферментов, каталитические а, зачастую, и целлюлозосвязывающие домены которых принадлежат различным семействам. Помимо этих основных фрагментов в структурах целлюлаз различного происхождения могут присутствовать и другие элементы, включая второй КД, фибронектин III-подобные домены, повторяющиеся гидрофобные последовательности т.н. когезин-до-керинового типа и пр. (рис. 1). Мы, в основном, ограничимся рассмотрением первых двух типов доменов, а также кратко коснемся структуры линкеров в связи с тем, что значение этих фрагментов для функционирования целлюлаз на поверхности целлюлозы наиболее очевидно.

Как можно видеть (табл. 1), целлюлолитические ферменты в современной классификации объединены в 13 из более чем 60 известных структурных семейств гликозилгидролаз, причем к ним отнесены и два семейства из многочисленной группы ксиланаз. В семействе 11/F есть ксиланазы со смешанной специфичностью, поэтому такое отнесение формально допустимо. Сложнее обстоит дело с семейством 12/G, объединяющим строго специфичные ксиланазы [33]. С другой стороны, в классификацию целлюлаз по сложившейся традиции не включают, например, семейства 1 и 3, куда входят β -глюкозилгидролазы, расщепляющие короткие целлюлолигосахариды, или семейства 16 и 17, содержащие 1,3(4)- β -глюканазы, хотя по специфичности к 1,4- β -глюкозидной связи эти ферменты ближе к целлюлазам, чем ксиланазы, и, кроме того, имеют сходную с типичными целлюлазами третичную структуру (например, семейства 1, 16, 17, см. табл. 1 и рис. 2).

Можно по-разному относиться к достаточно произвольно сложившемуся выделению упомянутых «целлюлазных» семейств. Следуя принципу классификации по типу расщепляемой связи можно, например, предложить включить в рассмотрение любые гидролазы (КФ 3.2.1.4; 21; 73; 74; 91), способные расщеплять 1,4- β -глюкозидные связи в небольших олигосахаридах, смешанных β -глюканах или ксилоглюканах, действующие на целлоби- — целлопентаозу и их флуорогенные производные либо проявляемые в тесте с растворимым 1,4- β -глюканом и конго красным, и одновременно исключить ферменты, узкоспецифичные к другим типам связи. Можно использовать более строгий критерий — разложение упоря-



Сокращения: Tre – *Trichoderma reesei*, Ppu – *Porphyra purpurea*, Ccv – *Clostridium cellulovorans*, Cfi – *Cellulomonas fimi*, Csa – *Caldocellum saccharolyticum*, Cth – *Clostridium thermocellum*, Cst – *Clostridium stercorarium*, Tsa – *Thermoanaerobacter saccharophilum*, Tfu – *Thermomonospora fusca*, PBP – polysaccharide binding protein, CbpA – cellulose binding protein (скаффолд А мезофильной клостридии).

Таблица 1
Примеры классификации целлюлолитических ферментов
(семейства, выделенные жирным шрифтом) и их место в общей
классификации гликозилгидролаз (согласно [27, 48, 54, 109])

Семейство	Название фермента	Организм	КФ	Источник ¹	Клан	Фолд	Тип катализа
1		3	4	5	6	7	8
1	BGAL	<i>Sulfolobus solfasaricus</i>	3.2.1.23*	P14288	GH-A	ТИМ-бочка	Сохраняющий
	BGLU A	<i>Bacillus polymyxa</i>	3.2.1.21	P22073			
	BGLU A	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	3.2.1.21	P10482			
	BGLU A	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.21	P26208			
	BGLU	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	3.2.1.21	P26206			
	BGLU	Кукуруза	3.2.1.21	X74217			
	BGLU B	<i>Microbispora bispora</i>	3.2.1.21	M97265			
	BGLU	<i>Streptomyces rochei</i> A2	3.2.1.21	X74291			
	BGLU	<i>Thermotoga maritima</i>	3.2.1.21	X74163			
	BGLU1	<i>Trifolium repens</i>	3.2.1.21*	P26204			
	PBGAL	<i>Lactobacillus casei</i>	3.2.1.85	P14696			
	PBGLU	<i>Escherichia coli</i>	3.2.1.86	P11988			
	LPHCT	Человек	3.2.1.62/108	P09848			
	MYRO	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.2.3.1	L11454			
	MYRO	<i>Brassica napus</i>	3.2.3.1	X6783S			
	MYRO	<i>Sinapsis alba</i>	3.2.3.1	P29092			
	BGLU3	<i>Aspergillus wentii</i>	3.2.1.21	P29090			
	BGLUB	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.21	P14002			
	BGLU	<i>Schizophyllum commune</i>	3.2.1.21	P29091			
	BGLU1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	3.2.1.21	P22506			
	BGLU	<i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.21	[53]			
	CEDD	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.2.1.74	X66527			
3						Тот же	

см. продолжение табл. 1

продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8
5/A1	Man Egl CelB CenD CelB EGC Man	<i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Caldocellum saccharolyticum</i> <i>Cellulomonas fimi</i> <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.78 3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1. 3.2.1.78	L35487 M33791 X13602 L02544 X03592 X61299 L25310	GH-A	ТИМ-бочка	Тот же
5/A2	End CelA E5 CelA	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces lividans</i> <i>Thermomonospora fusca</i> <i>Clostridium josui</i>	3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1.4	M38634 M82807 L01577 M37031	Тот же	Тот же	Тот же
5/A3	Exg CelC EXG	<i>Candida albicans</i> <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.2.1.4 3.2.1.4/73 3.2.1.58	X56556 M19422 M34341	Тот же	Тот же	Тот же
5/A4	CelB ManA(N) ² CelC(C) ² CelE CelB ManA	<i>Bacillus lautus</i> <i>Caldocellum saccharolyticum</i> <i>Caldocellum saccharolyticum</i> <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Neocallimastix patriciarum</i> <i>Streptomyces lividans</i>	3.2.1.4 3.2.1.78 3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1.78	M33762 L01257 I301 M22759 Z31364 M92297	Тот же	Тот же	Тот же
5/A5	EGII Egl EGII	<i>Humicola insolens</i> <i>Pseudomonas solanacearum</i> <i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1.4	X76046 M84922 M19373	Тот же	Тот же	Тот же
6/B	Cel3a CbhA CenA Bhomolog CBHII	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Cellulomonas fimi</i> <i>Cellulomonas fimi</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Humicola insolens</i>	3.2.1.91 3.2.1.91 3.2.1.4 3.2.1.? 3.2.1.91	L24519 L25809 M15823 L29377 [95]	Незавершенная ТИМ-бочка	Обращающий	

продолжение табл. 1							
1	2	3	4	5	6	7	8
7/C	EG VI	<i>Humicola insolens</i>	3.2.1.4	[95]			
	CBHII	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	3.2.1.91	[108]			
	Cell	<i>Streptomyces halstedii</i>	3.2.1.4	Z12157			
	CBHII	<i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.91*	M16190			
	E2	<i>Thermomonospora fusca</i>	3.2.1.4*	M73321			
	E3	<i>Thermomonospora fusca</i>	3.2.1.91	[102]			
	CBHI	<i>Humicola insolens</i>	3.2.1.91	[95]	GHSB	β-сэндвич	Сохраняющий
	EGI	<i>Humicola insolens</i>	3.2.1.4	[95]			
	CBHI	<i>Penicillium jantnellum</i>	3.2.1.91	X59054			
	CBHI	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	3.2.1.91	M22220			
8/D	CBHI	<i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.91	P00725			
	EGI	<i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.4	M15665			
	LIC	<i>Bacillus circulans</i>	3.2.1.73	P19254		(αα)-бочка	Обращающий
	EndoK	<i>Bacillus sp.</i>	3.2.1.4	M68872			
	Egl	<i>Cellulomonas uda</i>	3.2.1.4	M36503			
	CeA	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.4	K03088			
	CeY	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	3.2.1.4	M74044			
	CenC	<i>Cellulomonas fimi</i>	3.2.1.4	X57858		Тот же	Тот же
	CeD	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.4*	X04584			
	Cbh3	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.91	X80993			
9/E1	EgA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.2.1.4	X12570			
	Ce11	<i>Streptomyces reticuli</i>	3.2.1.4	X65616			
	E1	<i>Thermomonospora fusca</i>	3.2.1.4	L20094			
	CeA(N) ²	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	3.2.1.4	L32742		Тот же	Тот же
	CeC(N) ²	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	3.2.1.4	[30]			
	CenB	<i>Cellulomonas fimi</i>	3.2.1.4	M64644			
	CeF	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.4	X60545			
	EG	Фасоль	3.2.1.4	P22503			
	E4	<i>Thermomonospora fusca</i>	3.2.1.4	M73322			

продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8
10/F	XynA	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.4/8	P33559	GH-A	ТИМ-бочка	Сохраняющий
	XynA	<i>Bacillus</i> sp.	3.2.1.8	D00087			
	CelB/CBH(N) ²	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	3.2.1.91	X13602			
	XynA	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	3.2.1.8	M34459			
	Cex	<i>Cellulomonas fimi</i>	3.2.1.8/91*	L11080			
	XynZ	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.8*	M67438			
	Xyn	<i>Cryptococcus albidus</i>	3.2.1.8	X12596			
	XylB	<i>Fusarium oxysporum</i>	3.2.1.8	L29380			
	Xyl	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	3.2.1.8	X76919			
	XynA	<i>Penicillium chrysogenum</i>	3.2.1.8	M98458			
	XlnA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.2.1.8*	X15429			
	XynA	<i>Streptomyces lividans</i>	3.2.1.8	M64551			
	Xyn	<i>Thermoanaerobacter saccharolyticum</i>	3.2.1.8	M97882			
	XynA	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	3.2.1.8*	S16927			
	XynA	<i>Thermotoga maritima</i>	3.2.1.8	Z46264			
	CelXyn	<i>Clostridium stercorarium</i>	3.2.1.4/8	D12504			
11/G	XynA	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.8	A19535	GH-C	β-сэндвич	Тот же
	Xyn	<i>Bacillus circulans</i>	3.2.1.8*	P09850			
	XynD	<i>Cellulomonas fimi</i>	3.2.1.8	X76729			
	XynA	<i>Clostridium stercorarium</i>	3.2.1.8	D13325			
	XynC	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	3.2.1.8	U01037			
	Xyl1	<i>Humicola insolens</i>	3.2.1.8	X76047			
	Xyn2	<i>Neocallimastix frontalis</i>	3.2.1.8	X82439			
	XylA	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	3.2.1.8	X65526			
	Xyn	<i>Schizophyllum commune</i>	3.2.1.8	A44597			
	XlnB	<i>Streptomyces lividans</i>	3.2.1.8	M64552			
	XynA	<i>Thermomonospora fusca</i>	3.2.1.8	U01242			
	Xyn1	<i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.8	X69573			

продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8
12/Н	Egl						
	CeS	<i>Aspergillus aculeatus</i>	3.2.1.4*	X52525	GH-C	β-сэндвич	Сохраняющий
	EGIII	<i>Envinia carotovora</i>	3.2.1.4	M32399			
	CeIB	<i>Humicola insolens</i>	3.2.1.4	[95]			
	BGIII	<i>Streptomyces lividans</i>	3.2.1.4	U04629			
		<i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.4*	[115]			
13	AAMY	<i>Aspergillus oryzae</i>	3.2.1.1*	P10529		ТИМ-бочка	Тот же
	AAMY	<i>Bacillus subtilis</i>	3.2.1.1*	P0069			
	AAMY	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	3.2.1.1	P23671			
	AAMY	Дрозифила	3.2.1.1	P08144			
	AAMY	<i>Escherichia coli</i>	3.2.1.1	P25718			
	AAMY	Человек	3.2.1.1	P04746			
	AAMY	Мышь	3.2.1.1	P00688			
	AAMY	Рис	3.2.1.1	P17654			
	AAMY	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	3.2.1.1	P21567			
	AAMY	<i>Streptomyces lividans</i>	3.2.1.1	X70255			
	AGLU	Дрозифила	3.2.1.20	P08144			
	AGLU	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	3.2.1.20	P07265			
	AGLUZ	<i>Escherichia coli</i>	3.2.1.20	P21517			
	AGLU	<i>Bacillus cereus</i>	3.2.1.10	P21332			
	OGLUlich	<i>Escherichia coli</i>	?	P28904			
	GDX	<i>Streptococcus mutans</i>	3.2.1.70	[54]			
	APU	<i>Bacillus acidocidarius</i>	3.2.1.1/41	X62835			
	PUL A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.2.1.41	P07206			
	CDGT	<i>Bacillus circularis</i>	2.4.1.19 *	P30920			
	CDGT	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.4.1.19	P08704			
	G4AMY	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	3.2.1.60	P22963			
	G5AMY	<i>Pseudomonas sp. KO8940</i>	3.2.1.	[54]			
	G6AMY	<i>Bacillus sp. 707</i>	3.2.1.98	P19571			
	IAMY	<i>Pseudomonas amyloclavata</i>	3.2.1.68	P10342			

		продолжение табл. 1						
1	2	3	4	5	6	7	8	
14	NPUL	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	3.2.1.	D13178				
	CDX	<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	3.2.1.54	P29964				
	BAMY	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.2.1.2	P25853		Тот же	Обращающий	
	BAMY	<i>Bacillus cereus</i>	3.2.1.2	S54911				
	BAMY	<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	3.2.1.2	P19584				
	BAMY	<i>Ipomoea. batatas</i>	3.2.1.2*	P10537				
BAMY	Рожь	3.2.1.2	P30271					
15	AMG	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.3	P04064		αα-бочка	Тот же	
	AMG	<i>Aspergillus awamori</i>	3.2.1.3*	P23176				
	AMG	<i>Clostridium sp. G0005</i>	3.2.1.3	P29761				
	AMG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.2.1.3	P08019				
	AGIU	<i>Neurospora crassa</i>	3.2.1.20	P14804				
16	LICM	<i>Bacillus macerans</i>	3.2.1.73*	P23904	GH-B	β-сэндвич	Сохраняющий	
	LIC	<i>Bacillus subtilis</i>	3.2.1.73	P04957				
	LICB	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.73	X63355				
	LIC	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	3.2.1.73	P17989				
	XYN D/LICW	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	3.2.1.8/73	S61204				
	LAMA	<i>Bacillus circulans</i>	3.2.1.39	P23903				
	LAM	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.39	P29716				
	AGAR	<i>Streptomyces coelicolor</i>	3.2.1.81	P07883				
	KAPA	<i>Alceromonas carrageenovora</i>	3.2.1.83	X71620				
	ExoK	<i>Rhizobium meliloti</i>	?	Z17219				
	XET1	<i>Tropaeolum majus</i>	?	X68254				
	EXT	<i>Triticum aestivum</i>	?	D16457				
	meri5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	?	P24806				
	Фактор Ga	Краб-подкова	?	D16623				

продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8
17	LAM	<i>Hordeum vulgare</i>	3.2.1.39*	P15737	GH-A	ТИМ-бочка	Сохраняющий
	LAM	Кукуруза	3.2.1.39	M95407			
	LAM	Табак	3.2.1.39	P23433			
	LAM	Фасоль	3.2.1.39	P23535			
	XLAM	<i>Avena sativa</i>	3.2.1.58	P15703			
	LIC	<i>Glycine max</i>	3.2.1.73	Z15131			
	LIC	<i>Hordeum vulgare</i>	3.2.1.73	M37753			
	LIC	Пшеница	3.2.1.73*	P12257			
	LIC	<i>Bacillus circulans</i>	3.2.1.73	Z22873			
18	CHID	Сахарная свекла	3.2.1.14	P27050			Тот же
	Chil	Табак	3.2.1.14	J03714			
	ChiA	<i>Rhizopus niveus</i>	3.2.1.14	P29060			
	Chi	<i>Saccharomycetes cerevisiae</i>	3.2.1.14	P29025			
	Chi1	<i>Streptomyces lividans</i>	3.2.1.14	P29028			
	ChiC	<i>Trichoderma harzianum</i>	3.2.1.14	D12647			
	Chi	Гевея бразильская	3.2.1.14	L14614			
	Chi	<i>Streptomyces plicatus</i>	3.2.1.14/17*	P23472			
	EndoNAGH	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>	3.2.1.96	P04067			
	exoChi	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>	3.2.1.	X71080			
19	CHI	Диоскорея японская	3.2.1.14	P80052			
	CHI	<i>Hordeum vulgare</i>	3.2.1.14*	P11955			
	CHI	Табак	3.2.1.14	P17513			
	CHI A	Кукуруза	3.2.1.14	P29022			
	Chi	Фасоль	3.2.1.14	P06215			
	CHI 6	Тополь	3.2.1.14	P16579			
	Chi1	Рис	3.2.1.14	P25765			
	CHI 4	Сахарная свекла	3.2.1.14	[53]			
	CHI	Картофель	3.2.1.14	P05315			

окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8
26/I	Man EgH EG	<i>Bacillus</i> sp. <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Bacteroides ruminicola</i>	3.2.1.78 3.2.1.4 3.2.1.4/8	M31797 M31903 M38216			
39	BXYLB BXYL AIDU AIDU	<i>Caldocellum saccharolyticum</i> <i>Thermoanaerobacter B6A</i> Собака Человек	3.2.1.37 3.2.1.37 3.2.1.76 3.2.1.76	P23552 M97883 Q01634 M74715			Сохраняющий
43	XYND BXYL BXYL/ARAF XYLA	<i>Bacillus polymyxa</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacteroides ovatus</i> <i>Clostridium stercorarium</i>	3.2.1.8 3.2.1.37 3.2.1.37/55 3.2.1.37/55	X57094 X05793 U04957 D13268			Обращающий
44/J	CeA Man/EG(C) ¹ CeB	<i>Bacillus lautus</i> <i>Caldocellum saccharolyticum</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1.4	M76588 L01257 U08621			Тот же
45/K	K homologue EGV EGB EgV	<i>Fusarium oxysporum</i> . <i>Humicola insolens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1.4 3.2.1.4	L29381 [95] X52615 Z33381	6β-бочка		Тот же
48/L	CeA(C) ¹ CbhB CeCCF S8	<i>Caldocellum saccharolyticum</i> <i>Cellulomonas fimi</i> <i>Clostridium cellulolyticum</i> <i>Clostridium thermocellum</i> (YS)	3.2.1.4 3.2.1.91 3.2.1.4/91 3.2.1.91	L32742 L38827 M87018 [73]	αα-бочка		
61/M	Avicelase II EgY Cell	<i>Clostridium stercorarium</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Agaricus bisporus</i>	3.2.1.91 3.2.1.4 3.2.1.?	[36] [93] [93]			

* Кристаллизованные белки.

¹ В качестве источника указаны номера аминокислотных последовательностей в базах данных SWISSPROT, EMBL/GenBank и PIR, как они даны в соответствующих обзорных работах (см. заголовки таблиц), либо ссылки на работы, откуда получена соответствующая информация.² Для химерных ферментов *C. saccharolyticum* приведена классификация как N-концевых, так и C-концевых каталитических доменов.

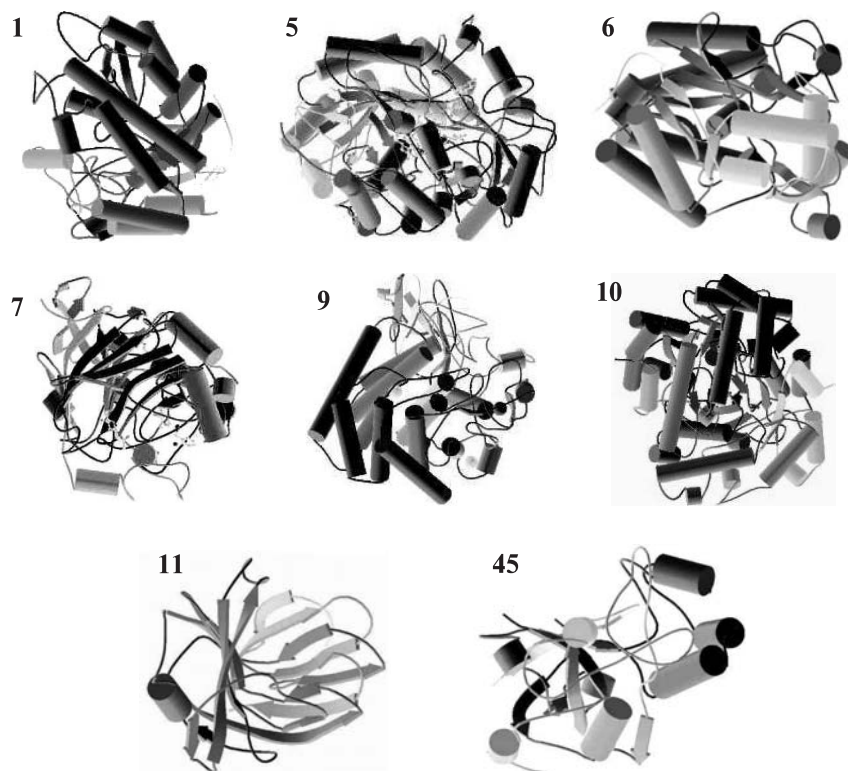


Рис. 2. Укладка каталитических доменов гликозилгидролаз различных семейств.

Семейства: 1 — цианогенная β -глюкозидаза *Trifolium repens* (1cbg); 5 — эндо-глюканаза EI *Acidotherrmus cellulolyticus* (1ece); 6 — целлобиогидролаза II *Trichoderma reesei* (3cbh); 7 — целлобиогидролаза I *Trichoderma reesei* (1cel), 9 — эндо-глюканаза D *Clostridium thermocellum* (1clc), 10 — ксиланаза Z *Clostridium thermocellum* (1xyz), 11 — ксиланаза II *Trichoderma harzianum* (1xnd), 45 — эндо-глюканаза V *Humicola insolens* (1eng) (построены по данным соответствующих PDB файлов Брукхевенской национальной лаборатории [37, 41, 55]).

доченных форм целлюлозы — и на этом основании ограничить рассмотрение только специфическими целлобиогидролазами (КФ 3.2.1.91).

Достаточно очевидно, однако, что под сложившимся интуитивно представлением о том, какие именно компоненты объединять в понятие «целлюлазные системы», имеются весьма серьезные основания. В этой связи сформулируем определение *целлюлазных систем в широком понимании как систем, включающих ферменты, способные расщеплять 1,4- β -глюкозидные связи в полимерных формах целлюлозы, а также ферменты иной специфичности или некатали-*

тические белки, способные действовать на поверхности целлюлозы, т.е. содержащие ЦСД.

При такой трактовке в рассмотрение попадает широкий спектр секретируемых белков, способных гидролизовать полимерные молекулы целлюлозы, либо специфически связываться с ее поверхностью. К ним относятся не только целлобиогидролазы, без которых невозможно разрушить структуру упорядоченной части целлюлозы, но и эндоглюканазы, ксиланазы, маннаназы, другие ферменты, освобождающие поверхность микрофибриллы от сопутствующего аморфного матрикса, а также некаталитические белки целлюлосом скаффолдины, содержащие ЦСД, а следом за ними — любые другие белки, гомологичные КД или ЦСД целлюлаз, и разнообразные структурные элементы, соседствующие в этих белках с КД или ЦСД (рис. 1).

Таким образом, тип катализируемого процесса не является отныне абсолютным критерием для отнесения фермента. Более того, по мере накопления данных о структуре белков последняя все отчетливее выходит на первый план. При таком подходе к систематизации целлюлаз в нее неизбежно попадают и белки, функция которых может быть весьма далека от разложения целлюлозы. Главная ценность структурной классификации состоит в том, что она с высокой вероятностью предсказывает свойства белка, если установлено его семейство, и служит основой для направленного мутагенеза. Кроме того, она позволяет проводить параллели и вскрывать взаимосвязи между далекими, на первый взгляд, явлениями и объектами.

КЛАССИФИКАЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ДОМЕНОВ

Классификация целлюлаз по структурным признакам КД, впервые введенная в конце 80-х — начале 90-х гг. [48, 52] на основе анализа распределения гидрофобных кластеров по полипептидной цепи, позднее легла в основу общей структурной классификации гликозилгидролаз [54]. Используемый принцип включает двумерное представление аминокислотной последовательности в виде развертки продольного сечения цилиндра, образуемого путем гипотетической спиральной укладки цепи. Классификация гликозилгидролаз по принципу гомологии в распределении гидрофобных кластеров объединяет уже более 60 семейств и постоянно пополняется.

Принятая в настоящее время классификация целлюлаз и некоторых сходных с ними типов ферментов частично воспроизведена в табл. 1. Авторы не стремились дать в ней отнесение всех классифи-

цированных последовательностей, известных в настоящее время. Ее целью является демонстрация разнообразия белков, принадлежащих целлюлазным и родственным семействам, а также сравнение целлюлолитических ферментов с другими гликозилгидролазами. КД ферментов, имеющих отношение к деградации целлюлозы, сгруппированы в ней в 13 семейств: 5/A, 6/B, 7/C, 8/D, 9/E, 10/F, 11/G, 12/H, 26/I, 44/J, 45/K, 48/L и 61/M, два из которых — 5/A и 9/E — дополнительно разделены на 5 и 2 подсемейства соответственно. Буквенные обозначения, приводимые через дробь, соответствуют раннему варианту номенклатуры целлюлаз, введенному в 1991 г.

Обилие структурных типов 1,4- β -глюкозилгидролаз, не встречаемое у других сходных ферментов, трудно приписать их лучшей изученности или многообразию организмов, вовлеченных в трансформацию целлюлозы. В этом отношении показательно сравнение целлюлаз и ксиланаз с амилолитическими ферментами [55]. Ксиланазы в природе почти всегда сопутствуют целлюлазам, а их субстрат, сопоставимый с целлюлозой по масштабам воспроизводства, значительно сложнее по химической структуре. Вместе с тем, расщепление ксиланов у эволюционно отдаленных организмов возможно с участием ферментов всего лишь двух семейств (10/F и 11/G, табл. 1). Для амилолитических ферментов вариация структур еще меньше. Так, все α -амилазы помещены в единое семейство 13, независимо от источника (табл. 1).

Если говорить о целлюлазах в более узком смысле, т.е. целлобиогидролазах, то в сравнении с β - или глюкоамилазами (семейства 14 и 15, соответственно) их многообразие также заметно. Целлобиогидролазы можно встретить в 5 семействах: 6/B, 7/C, 9/E(1), 10/F и 48/L. Одной из причин такого разнообразия представляется полиморфность нативной целлюлозы, содержащей по меньшей мере 2 структурные модификации: триклинную I α и моноклинную I β , что требует совместного действия ферментов разных типов в ее разложении до простых сахаров. Поэтому в превращении целлюлозы, как правило, участвует не менее двух целлобиогидролаз, принадлежащих у грибов к семействам 6/B и 7/C, у *C. fimi* — к семействам 6/B, 10/F и 48/L, у клостридий — к семействам 9/E(1) и 48/L.

При этом имеются семейства, включающие целлобиогидролазы только грибного (7/C) или только бактериального (48/L) происхождения, а также и те, и другие (6/B). Это с одной стороны свидетельствует о существовании специфических «грибных» и «бактериальных» механизмов разложения целлюлозы, в отличие от единого механизма разложения ксилана, а с другой показывает возможность

горизонтального переноса генетического материала целлюлаз между отдаленными хозяевами. Наглядный пример приведен в обзоре [109], где отмечается, что эндоглюканаза V грам–отрицательной бактерии *E. chrysanthemi* имеет высокую степень гомологии с эндоглюканазой I грам–положительной бактерии *S. uida*; при этом содержание G + C в гене первой (58%) соответствует его среднему содержанию в геноме (58%), тогда как у второй оно принципиально отлично (61 и 72%, соответственно). Таким образом, заимствование гена данного фермента грам–положительным организмом у грам–отрицательного представляется весьма вероятным.

ОСОБЕННОСТИ УКЛАДКИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ДОМЕНОВ РАЗЛИЧНЫХ СЕМЕЙСТВ

С момента опубликования структуры КД первых представителей целлюлаз — грибной целлобиогидролазы II и клостридиальной эндоглюканазы D — прошло около 10 лет [58, 90]. За это время число расшифрованных структур достигло нескольких десятков. Большинство из них относится к уже известным типам укладки типа иммуноглобулиноподобного «блинчика с джемом», лектиноподобного β –сэндвича, а также $(\beta\alpha)_8$ – и $(\alpha\alpha)_6$ –бочек различных размеров [21]. Отметим некоторые общие черты укладки КД, свойственные конкретным семействам.

В наиболее многообразном семействе 5/A расшифрованы структуры КД клостридиальных эндоглюканаз, относящихся к подсемействам A3 [44] и A4 [89], а также термостабильной эндоглюканазы EI термофильной бактерии *Acidothermus cellulolutycis* [92], принадлежащей к подсемейству A1. Их основа оказалась сходной с хорошо известной триозофосфат–изомеразной структурой (ТИМ–бочка или $(\beta\alpha)_8$ –бочка) (рис. 2).

ТИМ–бочка с активным центром, локализованным на С–конце, является весьма распространенным каркасом для гликозил-гидролаз. В частности, такая же структура найдена у α – и β –амилаз семейств 13 и 14 [55].

Среди представителей семейства 6/B третичная структура КД изучена в деталях на примере СВН II *T. reesei* [90]. Ее структура также родственна ТИМ–бочке с той разницей, что число α –спиралей и β –тяжей составляет 5 и 7. Поэтому она может быть охарактеризована как незавершенная или недостроенная ТИМ–бочка. Данная основа была подтверждена и у другого представителя этого семейства — эндоглюканазы 2 термофильного актиномицета *T. fusca* [99, 102] (рис. 2). Отличия касались, главным образом, положения гибких петель и сказывались на структуре активного центра.

Структура КД ферментов семейства 7/С, согласно исследованиям грибной СВН I [43], подтвержденным на эндоглюканазах I того же семейства [40], представляет собой искаженный β -сэндвич с вогнутой и выпуклой сторонами, состоящими, соответственно, из 7 и 8 антипараллельных β -тяжей, соединенных в отдельных местах короткими α -спиральными участками (рис. 2). У целлобиогидролазы I КД содержит 434 остатка и имеет размеры $40 \times 50 \times 60$ Å. Такая структура, как отмечают авторы, ранее была описана для других углеводсвязывающих белков — лектинов бобовых и бактериальных 1,3;1,4- β -глюканаз, относящихся, согласно классификации, к семейству 16.

Полипептидная цепь КД CelC — целлюлазы мезофильной клостридии, принадлежащего к семейству 8/D, свернута в $(\alpha\alpha)6$ -бочку из 365 аминокислотных остатков [79].

В семействе 9/E укладка КД изучена на примере эндоглюканазы D термофильной клостридии [58], принадлежащей к подсемейству E1. Она тоже представляет собой $(\alpha\alpha)6$ -бочку — правозакрученную тороидальную структуру из 6 почти параллельных внутренних α -спиралей, окруженных 6-ю внешними α -спиралями, идущими в противоположном направлении. Каждая внутренняя спираль соединена с соседней противоположно направленной внешней, по типу мембранных спиральных белков. На C-конце внутренних спиралей 3 длинные соединительные петли, содержащие короткие α -спирали, формируют активный центр. Общая длина полипептидной цепи, составляющей эту часть, составляет около 450 остатков.

К этой структуре у эндоглюканазы D с N-конца жестко прикреплен меньший по размерам иммуноглобулиноподобный домен из 90 аминокислотных остатков, уложенных в 8 β -тяжей, структурно родственной по укладке соединительной части между вариабельной и константной частями антител (укладка типа «блинчик с джемом», содержащая гидрофобное ядро, полностью состоящее из неполярных ароматических и алифатических остатков) (рис. 2). Сходные фрагменты встречаются в каталитической части и некоторых других представителей семейства 9/E, например, у фермента E4 термофильного актиномицета и, как теперь считают, представляют собой ЦСД, ассоциированные с КД [117]. Они жестко связаны с $(\alpha\alpha)6$ -бочкой собственно каталитической части фермента так, что вход в активный центр является продолжением ЦСД и связываемая им целлюлозная молекула напрямую ориентируется в активный центр [117]. По этой причине последовательность этих ЦСД часто включают в последовательность КД семейства 9/E2.

В семействе 10/F структура КД изучена на примере экзоглюканазы—ксилаказы *C. fimi*, а также клостридиальных и стрептомицетных ксиланаз [45, 101, 116]. Их КД также оказались сходными с ТИМ—бочкой с активным центром, локализованным на С—конце. Укладка этих ферментов близка к укладке КД семейства 5/A (рис. 2) [55].

Структура небольших по размеру (185 остатков) КД ферментов семейства 11/G изучена на примере ксиланаз бацилл и грибов р. *Trichoderma* [22, 112]. Она состоит из трех β —листов и одной α —спирали. β —листы почти полностью состоят из антипараллельных тяжей. Листы 1 и 2, содержащие по 5 тяжей каждый, образуют структуру типа «грудной клетки», в которой второй β —лист уложен под углом, антипараллельно по отношению к первому и соединен с ним короткими петлями. Третий лист, состоящий из 6 тяжей, является продолжением второго, но повернут по отношению к нему на 90°. α —спираль лежит поперек основания третьего листа, причем два последних тяжа этого листа уложены поверх одной из сторон спирали. Активный центр растянут между листами 2 и 3 по всей ширине молекулы. При этом, два тяжа третьего листа выпячиваются, образуя «губу» в поперечном активному центру направлении (рис. 2).

В семействе 12/H получены данные о структуре эндоглюканаз грибов *Aspergillus* и *Trichoderma* [76, 115]. Укладка КД ферментов этой группы оказалась сходной с укладкой ферментов группы 11/G, несмотря на отсутствие гомологии между ними [115].

В немногочисленных семействах 26/I и 44/J структура КД пока не выяснена.

Следующая группа целлюлаз, для которой известна структура КД — семейство 45/K. Первым представителем этого семейства с расшифрованной структурой стала эндоглюканаза V термофильного гриба *H. insolens* [41] (рис. 2). Ее КД имеет размеры 40×40×25 Å и состоит из 213 остатков, уложенных в 7 β —тяжей и 6 коротких α —спиралей. Основным структурным мотивом является 6—тяжевая β —бочка, сходная с известной укладкой типа «блинчик с джемом», но построенная как из параллельных, так и антипараллельных β —тяжей. 7—й тяж прикреплен водородными связями к одному из тяжей основной структуры, но формально не может считаться входящим в β —бочку. Отмечено сходство последней с 6—тяжевой β —бочкой, найденной у барвина — защитного белка ячменя, предположительно являющегося хитиназой (заметим в этой связи, что, согласно структурной классификации гликозилгидролаз, все хитиназы, включая растительные, попадают в семейства 18 и 19).

Первым ферментом семейства 48/L, для которого была расшифрована структура КД, стала CelF — процессивная целлюлаза мезофильной клостридии, сочетающая свойства эндо- и экзоглюканазы. Основой ее укладки является $(\alpha\alpha)6$ –бочка, включающая 629 остатков, на N–конце которой расположен активный центр [79].

Наконец, в последнем, недавно открытом семействе грибных эндоглюканаз 61/M третичная структура КД пока не установлена.

Таким образом, анализ укладки КД различных семейств целлюлаз демонстрирует относительно меньшее разнообразие в сравнении с их классификацией, построенной на основе распределения гидрофобных кластеров, а также сходство этих ферментов с другими гликозилгидролазами и углеводсвязывающими белками. Наиболее популярной топологией среди них является полноразмерная или незавершенная ТИМ $\{(\beta\alpha)8\}$ –бочка, встречающаяся у ферментов семейств 5/A, 6/B, 10/F.

Топология $(\alpha\alpha)6$ –бочки свойственна ферментам семейств 8/D, 9/E и 48/L, хотя они сильно отличаются размером (отметим, что такая же топология характерна и для грибной глюкоамилазы семейства 15) [55].

Ферменты семейств 11/G и 12/H имеют топологию укладки КД по типу «грудной клетки». Укладка КД грибных ферментов семейства 7/C характеризуется как β –сэндвич конканавалин А–типа. Эта топология не имеет точных аналогов среди других целлюлаз, но свойственна также бактериальным лихеназам (семейство 16). В целом же структуру КД целлюлолитических семейств 7, 11 и 12 относят к общей категории 12–14–тяжеских β –сэндвичей [55].

Последняя из структур, «закрытая» 6β –бочка семейства 45/K, хотя и является примером более редкого типа укладки, тем не менее, по–видимому, возможна у других гликозилгидролаз (хитиназ) и в определенном отношении сходна со структурой иммуноглобулиноподобных ЦСД.

Наличие близких типов укладки и локализации функциональных групп у ферментов разных семейств способствовало их объединению в суперсемейства или кланы. Среди гликозилгидролаз (GH) выделено 5 таких кланов: GH–A (семейства 1, 2, 5, 10, 17, 30, 35, 39), GH–B (семейства 7 и 16), GH–C (семейства 11 и 12), GH–D (семейства 27 и 36) и GH–E (семейства 33 и 34). Так, ферменты, объединяемые в клан GH–A (иное название — суперсемейство 4/7), характеризуются общей укладкой по типу эллиптической $(\beta\alpha)8$ –бочки с главной осью, проходящей между 1–м и 5–м β –тяжами. При этом функциональные группы, осуществляющие кислотно–основной и нуклеофильный катализ, расположены у них, соответственно, на

конце 4-го и 7-го тяжей, что и определило название суперсемейства [42]. Вероятно, по мере накопления данных о структуре гликозил-гидролаз произойдет объединение их семейств в небольшое число кланов. Вместе с тем, их число, видимо, не будет эквивалентно числу разных топологических структур. Так, в клан GH-A не включены α - и β -амилазы (семейства 13 и 14), также имеющие структуру ТИМ-бочки с активным центром вблизи C-конца, так как они имеют отличное расположение функционально активных групп. Наиболее характерно это отличие проявляется у β -амилаз, которые обращают конфигурацию у C1 в продуктах гидролиза, в противоположность ферментам клана GH-A.

КЛАССИФИКАЦИЯ ЦЕЛЛЮЛОЗОСВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ

ЦСД — второй по значению и распространению элемент белковой структуры, вовлеченный в процесс трансформации целлюлозы. Первые данные об их существовании были опубликованы более 20 лет назад [9, 61, 62]. С тех пор число ЦСД, обнаруженных у ферментов, вовлеченных в деградацию растительных полисахаридов (целлюлаз, ксиланаз, маннаназ), перевалило за полторы сотни, а их классификация по структурным признакам насчитывает уже 12 семейств [35].

Локализация ЦСД (на C-, N-конце или в середине белковой молекулы), присутствие в одной молекуле нескольких идентичных или даже неродственных ЦСД, наконец, наличие негидролитических белков, состоящих только из повторяющихся ЦСД, говорят о высокой степени автономности этих структурных блоков и их самостоятельной функции, а также о том, что их объединение с КД — относительно недавнее эволюционное приобретение.

Таблица 2 демонстрирует классификацию ЦСД, введенную специалистами университета Британской Колумбии (Ванкувер). Она представляет собой модификацию табл. 2 [110], но не претендует на полноту оригинала. Ее цель — показать распространение ЦСД у различных организмов, разнообразие их структурных форм и положения в молекулах различных белков.

Как можно видеть, бактериальные ЦСД необычайно разнообразны по длине полипептидной цепи и образуют около десятка семейств, (семейства II-X), причем семейства II и III дополнительно разделены на подсемейства a и b. Напротив, известные ЦСД эукариот за небольшим исключением высокомолекулярны и составляют единое семейство I. Кроме ЦСД ферментов базидиомицетов, несовершенных и анаэробных грибов, сюда входят ЦСД полисахаридсвязывающего белка водоросли *Porphyris purpurea*, фактически

Таблица 2
Классификация целлюлозосвязывающих доменов (по [110])

Семейство 1	Организм 2	Фермент 3	Положение ¹ 4	Длина ² 5	Укладка 6	Семейство каталитического домена 7	Источник ³ 8
I	<i>Agaricus bisporus</i>	Cell	C	36	Клиновидная, трехтяжевый антипараллельный β-лист	61/M	M86356
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Xyn	N	36		10/F	L29380
	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	XylB	C	33		10/F	S71569
	<i>Humicola insolens</i>	EGY	C	33		45/K	[95]
	<i>Neurospora crassa</i>	CBHI	C	33		7/C	X7778
	<i>Penicillium janthinellum</i>	CBHI		33			X59054
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CBHI		34			M22220
	<i>Porphyra purpurea</i>	PBP	x4	33		Негидролитический белок	U08843
	<i>Trichoderma reesei</i>	CBHI	C	33		7/C	P00725
		CBHII	N	36		6/B	M16190
		EGI	C	33		7/C	M15665
		EGII	N	36		5/A5	M19373
		EGY	C	36		45/K	Z3381
		Man	C	34		5/A1	L25310
	<i>Butirivibrio fibrisolvens</i>	EndI	C	95	10 антипараллельных β-тяжей, 9 образуют β-бочку	5/A4	X17538
IIa	<i>Cellulomonas fimi</i>	CenA	N	106		6/B	M15823
		CenB	C	103		9/E2	M64644
		CenD	C	105		5/A1	L02544
		CbhA	C	106		6/B	L25809
		CbhB	C	104		48/L	L29042
		Cex	C	106		10/F	L11080
	<i>Clostridium cellulovorans</i>	EngD	C	108		5/A4	M37434

см. продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8
	<i>Dictiostelium discoideum</i>	SGSP	C, I	98/106			продолжение табл. 2
	<i>Microbispora bispora</i>	CelA	C	100		?	(синтезируется при про- растании спор)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CelA	C	100		6/B	P26414
		CelB	N	102		9/E1	X12570
		CelC	N	99		45/K	X52615
		CelE	C	100		5/A1	X61299
		XynA	N	101		5/A2	X86798
	<i>Streptomyces lividans</i>	CelA	N	108		10/F	X15429
		CelB	C	106		5/A2	M82807
		ChiC	N	105		12/H	U04629
	<i>Thermomonospora fusca</i>	E2	C	96		18 (хитиназы)	D12647
		E3	N	103		6/C	M73321
		E5	N	103		6/C	U18978
		XynD	x2C	90		5/A2	L01577
	<i>Cellulomonas fimi</i>	Axe	C	86		11/G	X76729
	<i>Streptomyces lividans</i>	XynA	C	86		Ацетилксиланэстераза	[110]
	<i>Thermomonospora fusca</i>	CelA	C	150		11/G	U01242
	<i>Bacillus lautus</i>	Cel	C	133		44/J	M76588
	<i>Bacillus subtilis</i>	CelA	x2I	172		5/A2	X67044
	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	CelB	I	172		9/E2//48/L	L32742
		CelC	x2I	172		10/F//5/A1	X13602
		ManA	x2I	172		9/E2//5/A4	Bergq
	<i>Clostridium cellulovorans</i>	CbpA	N	161		5/A4//44/J	L01257
	<i>Clostridium stercorarium</i>	CelZ	C	133		Скафолдин	M73817
	<i>Clostridium thermocellum</i>	Cbh3	C	132		9/E2	X55299
		CipA	I	156		9/E1	X80993
		Cell	C	150		Скафолдин	L08665
	<i>Erwinia carotovora</i>	CelY	C	156		9/E2	L04735
							X76000

1		2	3	4	5	6	7	8
окончание табл. 2								
IIIb	<i>Cellulomonas fimi</i>	CenB	I	138			9/E2	
M64644								
	<i>Clostridium stercorarium</i>	CelZ		144				X55299
	<i>Clostridium thermocellum</i>	Cell		137				L04735
IV	<i>Cellulomonas fimi</i>	CenC	x2N	148	*блинчик с джемом+ из 2-х β-листов по 5 тяжей		9/E1	X57858
	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	CelE	N	168				
M87018								
	<i>Streptomyces reticuli</i>	Cell		125				L04735
	<i>Thermomonospora fusca</i>	E1		141				L20094
	<i>Myxococcus xanthus</i>	CelA		139			6/B	X76726
V	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	EgZ	C	63	2D-ЯМР		5/A2	Y00540
VI	<i>Bacillus polymyxa</i>	XynD	C	90			?	X57094
	<i>Clostridium stercorarium</i>	XynA	x2C	87/92			11/G	D13325
	<i>Clostridium thermocellum</i>	XynZ	I	92			10/F	
M22624								
	Краб-подкова	GSα	x2C	87			16 (фактор коагуляции)	D16623
	<i>Microbispora bispora</i>	BglA	C	85			?	L06134
VII	<i>Clostridium thermocellum</i>	CelE	I	240			5/A4	
M22759								
VIII	<i>Dictyostelium discoideum</i>	CelA	N	152			9/E2	
M33861								
IX	<i>Clostridium thermocellum</i>	XynX	x2C	174/189			10/F	
M67438								
	<i>Thermoanaerobacterium sp.</i>	XynA		174/187				
M97882								
	<i>Thermotoga maritima</i>	XynA		170/180				Z46264

¹ Указана локализация ЦСД на C, N5конце или в середине (I) молекулы белка; x4 или x2 означает число повторов ЦСД.

² Длина аминокислотных последовательностей ЦСД приведена ориентировочно [110].

³ Источник аминокислотных последовательностей см. примечания к табл. 1.

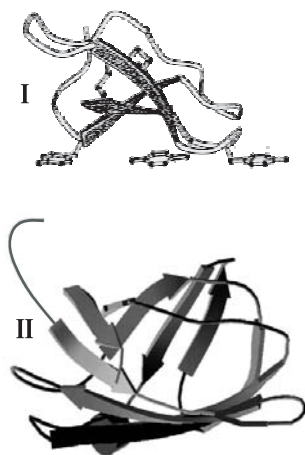


Рис.3. Укладка ЦСД семейств I (целлобиогидролаза I *T. reesei*) и II (экзоглюканаза Cex *C. fimi*).

Показаны важные для связывания с целлюлозой ароматические остатки [110].

Показаны важные для связывания с целлюлозой [67]. При этом топология грибного ЦСД идентична укладке низкомолекулярного ингибитора карбоксипептидаз из картофеля [49], хотя сравнение их последовательностей не выявляет заметной гомологии. В этой связи следует подчеркнуть формальное сходство грибных ЦСД с белковыми ингибиторами протеаз по ряду позиций. Это — высокая или абсолютная консервативность положения цистеинов, видимо определяемая неустойчивостью вторичной структуры этих небольших белков в отсутствие стабилизирующих SS—связей, а также способность к дупликации [7], нашедшая отражение в тетрамере ЦСД — белке красной водоросли. Как и для ЦСД, для белковых ингибиторов протеаз также известно объединение с КД посредством гибкого линкера. Так построена, например, прокариотическая карбоксипептидаза А, содержащая собственный ингибитор [71]. Его отщепление в ходе протеолитической активации профермента формально аналогично отщеплению ЦСД от КД целлюлаз путем специфического протеолиза линкера папаином.

представляющего собой четырехкратный повтор грибного ЦСД. Однако в семействе I нет ни одного представителя ЦСД прокариот.

Все ЦСД семейства I содержат 35—40 аминокислотных остатков; положение на С— или N—концах грибных ферментов определяет их несколько отличающуюся длину и вариабельность N—концевой части, берущей начало от линкера или сигнального пептида, соответственно. Согласно данным 2D—ЯМР для ЦСД целлобиогидролазы I из *T. reesei* они образуют клиновидную структуру с искаженным β —листом из трех коротких антипараллельных тяжей в основании и выраженными гидрофильной и гидрофобной плоскостями. Эта структура стабилизирована по меньшей мере двумя консервативными SS—связями (9—26 и 20—36) (рис. 3), и имеет 4 высококонсервативных ароматических остатка на гидрофильной стороне, не менее трех из которых участвуют в свя-

Высокая степень гомологии ЦСД грибного семейства, их сочетаемость с шестью семействами грибных КД (5/A1,5, 6/B, 7/C, 10/F, 45/K и 61/M) и относительно небольшие размеры позволяют сделать вывод об их высокой эффективности и эволюционном совершенстве.

Семейство II объединяет ЦСД разнообразных бактериальных ферментов, принадлежащих аэробным и анаэробным бактериям, а также актиномицетам. ЦСД наиболее многочисленной подгруппы — семейства IIa — сочетаются с КД семейств 5/A1,2,4; 6/B; 9/E1,2; 10/F; 12/H; 45/K и 48/L. ЦСД подгруппы IIb обнаружены пока в сочетании только с КД семейства 11/G (ксилаказы, не обладающие целлюлазной активностью). ЦСД семейства II встречаются не только у целлюлаз и ксиланаз, но и у других ферментов, вовлеченных в деградацию гемицеллюлоз: арабинозидаз, ацетил-эстераз, а также у хитиназ. Они обнаружены также в белке, синтезируемом при прорастании спор слизевика *Dictiostelium discoideum*, представителя низших форм грибов, и это — одно из редких исключений, когда у эукариот обнаружен ЦСД, не принадлежащий семейству I. В этой связи следует подчеркнуть, что ЦСД семейств I и II отличаются не только принадлежностью к организмам различной сложности. Они проявляют и разную специфичность. Согласно принятой точке зрения грибные ЦСД способны адсорбироваться на целлюлозе, но не связываются с хитином, тогда как у некоторых ЦСД семейства II наряду с этим обнаружена способность связываться с ксиланом или хитином [59]. Это наводит на мысль, что способность связываться с целлюлозой в действительности может быть побочной функцией ЦСД белка миксомицета.

Способность некоторых ЦСД семейства II связываться с хитином позволяет провести параллель с полисахаридсвязывающими доменами глюкоамилаз аспергиллов. Путем ограниченного протеолиза от глюкоамилазы I гриба *A. awamori* var. *kawachi*, сорбирующейся на сыром крахмале и хитине, были отделены небольшие гликопептидные фрагменты, отвечающие за специфическое связывание с каждым из нерастворимых полисахаридов [50, 124]. Хотя их структура тогда не была расшифрована, этот факт заставляет предположить, что грибы и другие эукариоты могут иметь специализированные домены, отвечающие за сорбцию ферментов на хитине клеточных стенок, отличные от специфичных ЦСД семейства I, но сходные с хитинсвязывающими ЦСД других семейств.

ЦСД семейства IIa содержат от 95 до 108 аминокислотных остатков, уложенных, согласно данным 2D-ЯМР для домена из экзоглюканазы — ксиланазы *C. fimi* [122], в 10 антипараллельных

β -тяжей, 9 из которых образуют вытянутую β -бочку размером $40 \times 25 \times 25$ Å, подобную структуре тендамистата, причем β -тяжи вытянуты вдоль наибольшего измерения (рис. 3). В структуре ЦСД обнаружено также коническое углубление с невыясненной функцией, имеющее 7 Å в глубину и 5 Å в основании. Структура доменов данной группы, как правило, стабилизируется дисульфидной связью между остатками цистеина, расположенными вблизи С- и N-концов. В группе IIa высококонсервативны 4 остатка триптофана, 3 из которых (W14, W34, W68) экспонированы в раствор и доступны для связывания с целлюлозой. Сайт-специфический мутагенез показал, что у разных доменов в процесс связывания с поверхностью целлюлозы непосредственно вовлечены W14 и W34 или W68.

ЦСД подгруппы IIb отличаются от основной подгруппы меньшей длиной (86—90 остатков) в результате нескольких небольших делеций. Наиболее важной из них является потеря 8 остатков у С-конца, включая высококонсервативный W68. При этом домены семейства IIb демонстрируют различия в специфичности сорбции: часть из них связывается только с ксиланом, тогда как другие — и с целлюлозой, и с ксиланом, и в этой связи данное подсемейство, вероятно, было бы правильнее называть ксилансвязывающими доменами, у которых сорбция на целлюлозе является побочной функцией. Авторы обзора [110] считают, что различия в специфичности сорбции у представителей семейства II могут объясняться широкими вариациями общего заряда глобулы и его поверхностного распределения. Впрочем, на первый взгляд это должно сказываться при сорбции не на целлюлозе, а на глюкуронооксилане, содержащем отрицательно заряженные заместители в боковой цепи.

Семейство III объединяет ряд относительно крупных ЦСД аэробных и анаэробных бактерий с длиной полипептидной цепи от 131 до 172 остатков. Оно также состоит из двух подгрупп. Основная подгруппа IIIa объединяет ЦСД целлюлаз, КД которых относят к семействам 5/A1,2,4; 9/E1,2; 10/F; 44/J; 48/L. Сюда же входят ЦСД скаффолдинов — каркасных белков клостридиальных целлюлосом. В большинстве своем они располагаются на С-конце зрелого белка, однако у натуральных химер — ферментов бактерии *Caldocellum saccharolyticum*, совмещающих в одной структуре два КД гликозил-гидролаз разных семейств, ЦСД могут располагаться и в середине, причем в виде повтора (табл. 2). У скаффолдинов клостридий они тоже могут располагаться в середине или даже на N-конце молекулы, причем для одного из них показано связывание с хитином.

Отличие ЦСД подсемейства IIIb заключается в том, что ряд консервативных ароматических остатков ЦСД основной подгруппы

в них отсутствует. N—концевой консервативный мотив RY(Y/W)Y ЦСД IIIa редуцирован в них до RYF. Все они встречаются только в центральной части молекулы, в сочетании с КД семейства 9/E2, причем могут соседствовать с ЦСД семейства IIa. В сравнении с ЦСД семейств IIa и IIIa эти ЦСД обеспечивают более слабое связывание с целлюлозой.

Исследование структуры ЦСД семейства III было выполнено на примере разных белков. ЦСД семейства IIIa из скаффолдина термофильной клостридии имеет структуру 9—тяжевого β —сэндвича, связывающего ион Ca^{2+} . Консервативные остатки аминокислот распределяются при этом по двум отдельным поверхностям. На одной из них они образуют неглубокую выемку, назначение которой пока не выяснено. На другой стороне выделяется плоская лента ароматических и полярных остатков, предположительно контактирующих с тремя соседними целлюлозными молекулами на поверхности. Основное взаимодействие с 4—мя глюкозными остатками центральной из трех цепей осуществляется вдоль ленты аминокислотных остатков ЦСД, состоящей из W118, H57, Y67 и солевого мостика между D56 и R112. В дополнение, две группы полярных остатков (N10, N16, Q110 с одной стороны, S12 и S133 с другой) осуществляют взаимодействие с соседними цепями [123].

Представители остальных 7 семейств ЦСД менее распространены. В семейство IV входят ЦСД анаэробных и аэробных бактерий и актиномицетов. Они имеют незначительную гомологию с ЦСД семейства III и такой же размер (139—168 остатков). Эти ЦСД найдены только на N—конце молекул ферментов, в том числе в виде повтора, в сочетании с КД семейств 9/E1, 6/B и 10/F [75]. Уникальной особенностью некоторых из них является способность к связыванию с аморфной (набухшей в фосфорной кислоте), но не микрокристаллической целлюлозой. По данным гетероядерного ЯМР структура одного из представителей этого семейства, ЦСД_{N1} целлюлазы CenC *C. fimi* представляет собой «блинчик с джемом» из двух β —листов, состоящих из 5 тяжей каждый. β —Тяжи с одной стороны образуют вогнутый центр связывания длиной до 6 углеводных остатков, содержащий гидрофобную полосу, ограниченную гидрофильными остатками. В отличие от других ЦСД, у доменов этого типа остатки триптофана не участвуют в связывании [111].

Единственным представителем семейства V является ЦСД эндоглюканазы Z грам—отрицательной бактерии *E. chrysantemi*. Он состоит из 63 остатков и расположен на C—конце фермента, каталитический домен которого принадлежит к семейству 5/A2. 2D—ЯМР не выявил пространственного сходства этого ЦСД с ЦСД

других семейств. Подобно грибным ЦСД, он имеет плоскую поверхность, на которой расположены 2 остатка триптофана и один тирозин, предположительно ответственные за связывание с целлюлозой [24].

Семейство VI объединяет ЦСД клостридиальных ксиланаз семейств 10/F и 11/G, а также β -глюкозидазы А актиномицета. Сюда же отнесен дублицированный домен в специфичном к 1,3- β -глюканазе факторе коагуляции G- α из гемолимфы краба-подковы. Все ЦСД этой группы содержат 85–92 аминокислотных остатка и расположены либо на С-конце, либо в середине полипептидной цепи. Они могут встречаться в виде повтора. Показано связывание одного из ЦСД данной группы как с целлюлозой, так и с очищенным ксиланом.

Семейства VII и VIII содержат по одному представителю ЦСД, для которых установлена способность к связыванию с целлюлозой: соответственно, из клостридиальной эндоглюканазы E (семейство 5/A4 КД) и целлюлазы А слизевика (семейство 9/E2). Первый имеет наибольшую среди всех ЦСД длину — 240 аминокислотных остатков и находится внутри полипептидной цепи фермента, второй аналогичен по размерам ЦСД семейств III и IV (152 остатка) и прикреплен с N-конца.

ЦСД семейства IX обнаружены в виде повтора на С-концах некоторых термостабильных ксиланаз трех типов термофильных анаэробных бактерий, КД которых принадлежат к семейству 10/F. Это относительно большие домены состоящие из 170–189 остатков.

В семейство X вошли небольшие ЦСД из 51–55 остатков, найденные на С-концах или в центральной части полипептидной цепи у бактериальных ферментов (преимущественно из псевдомонад), КД которых принадлежат к семействам 5/A1,2; 9/E1, 10/F, 11/G и 45/K.

В последние годы обнаружены новые типы ЦСД, не укладывающиеся в данную классификацию, которые выделены в семейства XI и XII [35].

Таким образом, ЦСД различных семейств значительно отличаются длиной полипептидной цепи. Наименьшие ЦСД — у грибов. Они в 3–7 раз короче бактериальных ЦСД семейств II, III, IV, VI, VII, IX. Напротив, изученные ЦСД бактерий почти не уступают по размерам небольшим КД некоторых гликозилгидролаз семейств 11/G, 12/H или 45/K. Более того, для ЦСД семейств II, III, IV характерны сходные с семейством 45/K мотивы укладки β -тяжей типа иммуноглобулиновой или «блинчика с джемом». В целом можно отметить некоторую общность двух типов β -гликансва-

зывающих структур — ЦСД и КД гликозилгидролаз: небольшие по размеру домены, где в поддержании общей пространственной структуры и организации сайтов узнавания полисахаридной цепи участвует ограниченное число аминокислотных остатков, имеют каркас из искаженных β -листов преимущественно антипараллельной укладки. Впервые способ организации ароматических и других аминокислотных остатков, связывающих хитогексаозу, на небольшом искаженном β -листе был продемонстрирован более 30 лет назад на примере активного центра лизоцима белка куриных яиц [34]. С тех пор обнаружено много аналогий среди КД и ЦСД целлюлаз. Хотя среди семейств КД целлюлаз имеется и ряд таких, где каркасом служит $(\alpha\alpha)6$ -бочка (8/D, 9/E, 48/L), это, как правило, более крупные структуры, содержащие от 350 до 600 остатков. К тому же, этой структуре часто «помогает» в сорбции 1,4- β -глюкана жестко фиксированный иммуноглобулиноподобный домен, как в случае семейства 9/E. Таким образом, искаженный антипараллельный β -лист, вполне вероятно, является наиболее компактным и эволюционно совершенным каркасом для сорбции 6 и более ангидроглюкозных остатков линейных β -гликанов.

Выше уже отмечалось формальное сходство ЦСД грибов и низкомолекулярных ингибиторов протеаз. Продолжая эту тему, можно отметить, что склонность к дубликации, характерная для ингибиторов, встречается не только у семейства грибных ЦСД. Это явление весьма характерно и для бактериальных ЦСД различных семейств, очень часто присутствующих в составе молекул целлюлаз, ксиланаз, маннаназ в виде повторов. Представляется, что, как и в случае ингибиторов протеиназ [7], олигомеризация может отражать особенности укладки β -структур данных элементов, их способность образовывать устойчивые междоменные связи, обмениваясь гомологичными β -тяжами. Такое явление обнаружено при изучении высоких концентраций ЦСД семейства IIa в растворе методом 2D-ЯМР [122]. В свою очередь, формальное структурное сходство ЦСД и ингибиторов протеаз наводит на мысль о возможной полифункциональности тех и других. Так, для некоторых растительных ингибиторов протеаз известна способность подавлять активность полисахаридгидролаз (амилаз) [7].

Прежде чем перейти к анализу других структурных элементов целлюлаз, кратко остановимся еще на одном аспекте — сравнении взаимодействия КД и ЦСД с 1,4- β -глюканами. В отличие от КД, которые, за исключением семейства 10/F, проявляют достаточно высокую специфичность к структуре глюкозного остатка вблизи расщепляемой связи, отношение к определенному семейству не

определяет специфичности связывания ЦСД. Внутри семейств ЦСД наблюдаются различия в способности к сорбции на 1,4- β -гликанах: целлюлозе, ксилане, хитине.

При этом общей особенностью углеводсвязывающих структур этого типа является значительно более сильное взаимодействие с нерастворимыми полисахаридами в сравнении с их растворимыми олигомерами. Такой характер взаимодействия свидетельствует о главном отличии их от КД гликозилгидролаз: центры их связывания, как правило, плоские или слегка вогнутые, в отличие от глубоких ложбин или туннелей КД гликозилгидролаз. Ароматические остатки Тгр и Туг, играющие важную роль во взаимодействии с углеводами, экспонированы у них наружу, в отличие от КД. Благодаря этому ЦСД способны одновременно взаимодействовать с несколькими соседними молекулами полисахарида на поверхности [123], что принципиально отличает их от КД. За исключением ЦСД_{NI}, специфичного к аморфной целлюлозе, комплексы ЦСД с растворимыми лигандами, широко применяемые для изучения структуры КД в кристалле или в растворе методом 2D-ЯМР, обычно не удается зарегистрировать достоверно даже при высоких концентрациях целлоолигосахаридов. В этом, по-видимому, и заключается объяснение открытого более 20 лет назад феномена неспособности растворимых производных целлюлозы вытеснять целлюлазы из комплекса с нерастворимым субстратом [9, 11]. Как мы отмечали, ЦСД на поверхности, возможно, взаимодействуют не с глюкозным звеном как целым, а с отдельными функциональными группами звеньев соседних цепей, благодаря чему и обеспечивают необходимую прочность связывания [18]. Кроме того, ЦСД, вероятно, не имеют барьерных сайтов, искажающих конфигурацию глюкозного остатка и этим затрудняющих его связывание, что также отличает их от КД, использующих механизм сорбции с искажением субстрата для повышения эффективности катализа.

ЛИНКЕРЫ

В большинстве случаев КД и ЦСД целлюлаз и родственных им полисахаридгидролаз разделены в молекуле белка линкерными последовательностями. Обычно это гибкие неупорядоченные цепочки с высоким содержанием пролина и оксиаминокислот (серина и треонина), а также глицина и аланина — т.н. РТ-линкеры, сходные с экстенсинами растительных клеточных стенок (табл. 3) [48]. Их длина может варьировать в достаточно широких пределах — от 5—6 до сотни, но обычно колеблется в диапазоне от 20 до 50 аминокислотных остатков. Во многих линкерах можно выделить

Таблица 3
Линкерные последовательности некоторых представителей целлюлолитических ферментов и их сравнение с центральной частью последовательностей ЦСД семейства I (по [48,110])

Организм	Фермент	Последовательность	Длина		Pro	Tte+Ser
			3	4		
<i>Bacillus spp.</i>	CelA	T ₂ SDPT ₂ SDPDGEPDGPDPPT ₂ SDP	33	15	7	7
	CelB	(1)P ₂ SDPT ₂ SDPDGEPDPT ₂ SDPGEYP	28	13	5	5
		(2)P ₂ SEPSD ₄ SEPE(PDPGE) ₃ PDPPT ₂ SDPEYP	42	20	5	5
	EglI	T ₂ EPVEPEPVDPE ₂ TR ₂	18	6	3	3
<i>Butyrvibrio spp.</i>	EndI	(PDPTVD) ₄ PDPQPVDPTP	38	17	5	5
	Xyn	PGSFTPQPTTTPQ(PT) ₂ PSGQT	26	7	8	8
<i>Caldocellum saccharo-lyticum</i>	CelB	(1)T ₂ S ₂ (PT) ₄ (VT) ₂₅ VTAT(PT) ₃ PVSPAT	43	14	23	23
		(2)PAPTMTVAPTAT(PT) ₂ LSPTV(TP) ₂ APTQTAT(PT) ₂ LTPN(PT) ₂	44	14	17	17
<i>Cellulomonas fimi</i>	CenA	PT ₂ S(PT) ₄ T(PT) ₇ VTPQPT	33	14	17	17
	CenB	(1)PTGT ₃ DT ₂ R ₂ T ₂ PGTP	17	5	9	9
		(2)T ₂ DT ₂ GETER ₂ T ₂ PGTP	17	4	8	8
		(3)T ₂ A ₂ PVDIVAPTVPGTP	17	4	5	5
	CenC	(4)S ₂ PVTFT ₂ LPVTSTPS	16	3	8	8
		(1)SLT ₂ SATR ₃	10	3	5	5
Cex		(2)PVPTAP	6	3	1	1
		(PT) ₃ T(PT) ₃ T(PT) ₃ S	21	9	12	12

см. продолжение табл. 3

		продолжение табл. 3			
1	2	3	4	5	6
<i>Clostridium spp.</i>	Eg1	T ₂ PTS ₃ PVYTSPITISK _{T₃}	21	3	13
	CelA	PLSDLSGQPTB ₂₂ SNPTPSLR ₂₂	21	8	6
	CelB	TPSVT(PS) ₂₂ ATPSPT ₂₂ ITAP _{T₂₂}	22	7	11
	CelE	PLVS(PT) ₃ LMPTPSPTVT	20	7	8
	CelH	(1)(PT) ₃ WTSTR _{S₃P}	16	6	9
	XynZ	(2)PGTYPSYSPKPSPTPRPTKP ₂ VTP	24	10	7
<i>Erwinia chrysanthemi</i>		(1)TPVPTPSPKP	10	5	3
		(2)TPNPSVTPTQTPIPT	15	6	6
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	CelZ	T ₂ DPSTDT ₂₁ MTB ₂₂ LTNRPQPT	21	5	9
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	CelC	PVS ₃ DMSPTS ₂₂ DAVIDPT _{S₃A₂₂V₂₂} DPST	30	4	13
<i>Microbispora bispora</i>	CelA	P ₂ TYSPSPPTST(PS) ₃ QSDPGS(PS) ₃	30	12	14
<i>Xanthomonas campestris</i>	EngA	T ₂ (PT) ₁₁	24	11	1
<i>Streptomyces sp.</i>	CasA	(1)PRT ₂ (PT) ₂ P	9	4	4
		(2)PA ₂ TGA(SP) ₂₂ ARASPAPSADS	22	7	6
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CelA	(1)S ₁₁ VPVS ₇₂ I ₂₂ PS ₆₆ IQPS ₈₈ MP _{S₈₂V₂₂A₈₅} VS	59	4	44
		(2)S ₄ ASNIN _{S₁₂₂} AIVS _{S₅₅} V _{S₂₂} S ₆₆	37	0	28
	CelB	(1)S ₂ APS ₂₂ VAS _{S₇₂} V _{S₂₂} TPRS _{S₅₃} V _{S₃₃} VPGT _{S₇₇}	42	3	30
		(2)STS ₃ TPLS _{S₆₆} RS ₂₂ VAS _{S₄₄} LS _{S₂₂} AT _{S₃₃} A _{S₂₂} V _{S₂₂}	37	1	28

окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6
	XynA	(1)S ₃ APAS ₂ VPS ₂ IAS ₃ P ₂ 2 ₁ VA ₂ VI ₂ MA ₃ PV ₃ VA ₂ TPGS ₃ (2)S ₆ LS ₄ V ₂ S ₂ IRS ₉	49	5	28
	XynB	(1)SAT ₂ S ₂ VA ₄ TPT ₂ 4 ₄ A ₂ 2 ₂ VAS (2)SV ₅ VQS ₉ A ₂ S	26 26 21	0 1 0	21 19 16
<i>Trichoderma reesei</i>	EGI	PPPPASSTTFSTTRSSSTSSPS	25	6	14
	EGII	PGATTITSTRPPSGPTTTTTRATSTSSSTPPTSS	34	6	21
	CBHI	GNPSGGNPPGTTTTTRRPATTTGSSPGPT	28	6	11
	CBHII	PGAAS ₅ TRAASTTSRVSP ₂ TSRSSSATPPPGST ₃ RVPPVG	44	7	22
Фрагменты 15–26 целлюлозосвязывающих доменов семейства I					
<i>Trichoderma reesei</i>	EGI	SGcKTcTSGTtc	12(3)	0	6
	EGII	SGPTNcAPGSAcST	14(2)	2	5
	CBHI	SGPTVcASGTtc	12(3)	1	5
	CBHII	SGPTCcASGTc	12(3)	1	5
<i>Agaricus bisporus</i>	Cel3a	TGPTTcASGTc	12(2)	1	6
<i>Humicola insolens</i>	EgY	SGcTTcVAGSTcT	13(3)	0	6
<i>Neurospora crassa</i>	CBHI	SGPTTcPEPYtc	12(2)	3	4

Примечание: в разделе, где приведены данные для ЦСД (в колонке, указывающей общую длину), в скобках приведено число остатков цистеина, который в линкерах не встречается.

повторяющиеся 4—7—членные мотивы, куда помимо Р, Т, S могут входить отдельные положительно или отрицательно заряженные, либо гидрофобные остатки. Периодичность при высоком содержании пролинов, вероятно, является основой коллагеноподобной вторичной структуры, свойственной экстенсинам [109], однако обилие треонинов, служащих сайтами О—гликозилирования, в сочетании с повышенной гибкостью богатых глицином участков, не позволяет изучить их структуру в кристалле. Поэтому при кристаллизации линкерную последовательность вместе с ЦСД удаляют путем специфического протеолиза. Последний затрагивает наиболее гибкую часть линкера, вблизи одного из доменов, где присутствуют остатки G и P. Как полагают, участки линкера с жесткой структурой, содержащие большое число оксиаминокислот, защищены от протеолиза гликозилированием.

Табл. 3 демонстрирует также сходство состава грибных линкеров с центральной частью полипептидной цепи грибных ЦСД семейства I (остатки 15—25). В ЦСД эта часть, включающая типичный линкерный мотив GPT с абсолютно консервативным G16 (встречаемый также на N—конце некоторых доменов и заимствуемый у предшествующего линкера), представляет собой петлю между двумя консервативными фрагментами структуры, образующими анти-параллельный β -лист. Главным отличием этого гибкого участка цепи ЦСД от типичной линкерной последовательности является присутствие двух или даже трех цистеинов, которые встраиваются либо между типичными линкерными остатками, либо вместо одного из них (пролина) и прочно фиксируют петлю на β -листе. Это приводит к заключению, что грибные ЦСД образовались при встраивании в линкерную последовательность двух небольших структурно—функциональных блоков из ароматических и других остатков, образующих короткие β -тяжи и β -изгибы, на которых произошло закрепление линкерной петли путем встраивания цистеинов.

Функцией линкеров принято считать пространственное разделение КД и ЦСД, обеспечивающее их автономное функционирование на поверхности субстрата. Разделение в пространстве достигается благодаря жесткой гликозилированной части, а автономность работы обоих доменов обеспечивается гибкой частью, предположительно действующей в качестве шарнира. Уменьшение длины линкера почти не влияет на связывание и слабо влияет на активность ферментов по отношению к нерастворимому субстрату, но до определенного предела. В частности, у мутантных грибных целлюбиогидролаз I удаление шарнира вместе с жесткой частью

линкера мало влияло на сорбцию, но снижало активность к нерастворимому субстрату [103]. Поэтому роль линкеров, в действительности, может заключаться не только в том, чтобы разделять домены в пространстве, но и в том, чтобы обеспечивать согласованную работу частей молекулярной машины на поверхности целлюлозы.

III. ЦЕЛЛЮЛАЗНЫЕ СИСТЕМЫ НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ И БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Целлюлазные системы, синтезируемые аэробными грибами, весьма подробно изучены на примере ферментов pp. *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum* и др. [109]. Число определяемых «целлюлолитических» белков в этих системах иногда исчисляется десятками, однако большинство из них является гомологами или множественными формами ограниченного набора основных компонентов, принципиально отличных по структуре и механизму действия. В составе наиболее изученных комплексов *T. reesei* и *H. insolens* таких компонентов, по имеющимся данным, не менее 7 : 2 целлобиогидролазы (I и II, семейства 6/V и 7/C КД, соответственно) и, по крайней мере, по 5 эндоглюканаз: I (7/C); II (5/A5); III (12/H), IV (61/M; обнаружена у *T. reesei* [93]), V (45/K) и VI (6/B; обнаружена у *H. insolens* [96]). Похожие ферменты найдены и у других грибов. Часть из них, помимо КД, несет ЦСД семейства I, причем у разных грибов ЦСД, видимо, не закреплены за строго определенными семействами КД. Кроме того, в составе целлюлолитической системы грибов обнаруживается ряд ксиланаз (семейства 10/F и 11/G) и маннаназ (5/A1), по крайней мере часть из которых также несет ЦСД. Общее же число генов, вовлеченных в процесс разложения растительного субстрата и более или менее координированно индуцируемых целлюлозой, целлобиозой, лактозой, софорозой или арабитом и репрессиируемых глюкозой, составляет более полутора десятков, причем они разбросаны по разным хромосомам гриба. Помимо *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *egl4*, *egl5*, *xyn1*, *xyn2*, *man1*, соответствующих названным выше ферментам *T. reesei*, это *bgl1* и *bxl1* (β -глюко- и ксилозидаза), *axe1* (ацетилксиланэстераза), *glr1* (β -глюкуронидаза), *arf1* (α -L-арабинофуранозидаза), *agl1*, *agl2*, *agl3* (α -галактозидазы), участвующие в отщеплении заместителей в основных цепях гемицеллюлоз [80]. Однако мы ограничимся рассмотрением лишь тех из них, которые несут ЦСД.

Механизм взаимодействия различных типов целлюлаз в процессе деградации упорядоченной целлюлозы, а также характерное для

целлюлазных систем явление синергизма обсуждается уже более трех десятков лет [120]. Попытки свести все наблюдаемые феномены к эндо—экзо—синергизму, характерному для амилаз при деградации крахмала, встречают многочисленные контрдоводы. В этой связи уместно напомнить о гораздо большем разнообразии структурных типов целлюлаз по сравнению с амилазами. Иногда трудно даже провести параллель между эндо— и экзогидролазами, участвующими в процессах деградации крахмала и целлюлозы. Привычные представления об эндогликаназах, как неупорядоченно действующих ферментах, сохраняющих конфигурацию аномерного центра в процессе гидролиза, и экзогликаназах, как ферментах, обращающих конфигурацию и действующих с невосстанавливающего конца полимерного субстрата, сформулированные на примере α -, β - и глюкоамилаз [19], были существенно скорректированы при изучении целлюлолитических ферментов. Продемонстрируем особенности действия компонентов целлюлолитических систем грибов на примере наиболее изученной системы почвенного гриба *T. reesei*, сопоставляя их, по возможности, с ферментами других грибных продуцентов.

Основным компонентом грибных целлюлазных систем является целлобиогидролаза I. По механизму действия она весьма далека от соответствующей экзогидролазы амилотической системы — β -амилазы. Как и эндоглюканазы, принадлежащие к общему с ней семейству 7/C, грибная целлобиогидролаза I сохраняет конфигурацию расщепляемой связи в продуктах реакции и катализирует процессы трансгликозилирования [63]. Низкомолекулярные субстраты она атакует преимущественно вблизи восстанавливающего конца [23, 104, 114]. В катализе участвуют остатки E212, D214 и E217, аналогичные E35 и D52 лизоцима [43, 104].

Особенностью целлобиогидролазы I является активный центр, представляющий не обычную для эндогликаназ ложбину, а сквозной туннель вдоль вогнутой части β -сэндвича, перекрытый сверху гибкими петлями, сшитыми 9-ю SS-мостиками [43]. Путем изучения структуры комплексов неактивного КД с двумя молекулами целлотетра— или пентаозы в активном центре найдено 10 отдельных субсайтов связывания глюкозных остатков: от -7 до +3. Субсайт -7 расположен вне туннеля и содержит доступный снаружи остаток W40, облегчающий первичный захват цепи субстрата. 3 других субсайта также содержат остатки W, взаимодействующие с гидrofобной частью глюкозных остатков. Субсайт -1 неудобен для нативной конформации пиранозного кольца и в комплексах свободен. Внутри туннеля целлюлозная цепь, по-видимому, повернута

на 180° и ее нативная конформация искажена, причем свободное вращение остатков глюкозы там невозможно [105].

Предполагаемый механизм катализа включает связывание целлононамера на субсайтах от -7 до $+2$, образование целлобиозы на аглюконовых участках $+1$ и $+2$ и карбокатиона гептамера на субсайтах -7 — -1 , его ковалентное связывание с остатком E212, гидролиз гликозилфермента и десорбцию продуктов [118].

Фермент не проявляет абсолютной специфичности к положению 4--OH у углеводного остатка, локализуемого на субсайте -2 : он может действовать на флуорогенные производные как целлобиозы, так и лактозы. Имеется довольно большое число данных о том, что целлобиогидролаза I способна генерировать на поверхности целлюлозы новые концевые группы, что свидетельствует у нее, помимо экзогидролазных, также эндогидролазных свойств [23]. Однако пока совершенно неясно, как это возможно при туннельной структуре активного центра.

Именно целлобиогидролаза I необходима для расщепления нативной целлюлозы, причем в этом процессе участвуют все три ее составные части — КД, С—концевой ЦСД и линкер. Предполагалось, что фермент использует свободную энергию гликозидной связи для разрушения кристаллической структуры субстрата, подобно АТФазе миозина, использующей гидролиз АТФ для сокращения мышц [66], однако как именно она может это делать, неясно.

У другой экзоглюканазы грибов — целлобиогидролазы II активный центр, образуемый двумя устойчивыми поверхностными петлями на жесткой структуре незавершенной ТИМ—бочки (семейство 6/V), имеет форму более короткого туннеля длиной $20 \text{ \AA}$. Внутри него расположены четыре сайта связывания глюкозных остатков: -2 , -1 , $+1$ и $+2$ (нумерация от расщепляемой связи). Кроме того, еще один сайт связывания для остатка $+4$, судя по результатам моделирования, имеется снаружи туннеля. Связывание обеспечивается 4—мя остатками W: 135 (-2), 269 ($+1$), 367 ($+2$) и 272 ($+4$). Такая структура соответствует отщеплению ферментом дисахарида с восстанавливающего конца полимерной молекулы субстрата, аналогично бета—амилазе. Подобно ей данный фермент катализирует гидролиз гликозидных связей с обращением конфигурации у аномерного углерода. В гидролизе, согласно структурным исследованиям и результатам мутагенеза, участвуют остатки D175 и D221, причем последний, очевидно, действует в качестве общего кислотного катализатора. Консервативный Y169 на субсайте -1 также вовлечен в катализ и, предположительно, обеспечивает искажение конформации глюкозного остатка, предшествующего

расщепляемой связи. Он также влияет на протонирование остатка D221 [87].

W135 на субсайте –2, как показано мутагенезом, влияет и на связывание субстрата, и на скорость катализа. Прочная сорбция глюкозного остатка своей более гидрофобной β –плоскостью на этом субсайте необходима для эффективного расщепления гликозидной связи. Это сближает данный фермент с яичным лизоцимом, у которого остаток W на субсайте –2 также необходим для эффективного катализа. С другой стороны, особенностью целлобиогидролазы II является остаток W272 на субсайте +4 снаружи туннеля, важный, как предполагается, для проявления активности фермента по отношению к кристаллической целлюлозе [65]. Фермент содержит N–концевой ЦСД семейства I. Специфичность целлобиогидролазы II узкая – фермент не действует на гетерозидную связь во флуорогенных производных целлолигосахаридов, не расщепляет лактозиды.

Одна из двух основных эндоглюканаз *T. reesei*, эндоглюканаза I, принадлежит тому же семейству, что и целлобиогидролаза I (7/C), и имеет близкую третичную структуру. Однако у нее отсутствуют протяженные петли, формирующие активный центр туннельного типа на вогнутой части β –сэндвича целлобиогидролазы I. Как следствие, фермент имеет лизоцимоподобный активный центр в виде щели. Он также сохраняет конфигурацию у аномерного углерода при расщеплении гликозидной связи. Эндоглюканаза I расщепляет как целлобиозид, так и лактозид 4–метилумбеллиферона, а на ксилане имеет такую же активность, как и при использовании производных целлюлозы [31]. При гидролизе фермент отдает предпочтение внутренним связям в целлотетра– — целлогексаозе, а в присутствии высоких концентраций целлотриозы (12–20 мМ) обладает способностью к трансгликозилированию [31]. На ксилотри– — ксилогексаозе он проявляет специфичность к гидролизу второй от восстанавливающего конца связи, предпочитая более длинные субстраты из этого ряда. У различных грибов фермент может содержать C–концевой ЦСД семейства I (*T. reesei*) или не содержать его (*H. insolens*) [96].

Эндоглюканаза II грибных целлюлазных систем принадлежит семейству 5/A5 с характерной структурой ТИМ–бочки и расположением активного центра на концах 4–го и 7–го β –тяжей. По специфичности и типу действия на целлолигосахариды она заметно отличается от эндоглюканы I. В частности, она строго специфична к производным целлюлозы. Подобно целлобиогидролазе II она не расщепляет гетерозидную связь во флуорогенных

производных целлобиозы, но более специфична к восстанавливающему концу целлотетра- и гексаозы [31]. В пентасахаридах она предпочтительно гидролизует 2-ую от восстанавливающего конца связь. У эндоглюканазы II из *H. insolens* наблюдается выраженное предпочтение к целлоолигосахаридам с длиной цепи не менее 6, тогда как эндоглюканаза I этого гриба почти с одинаковой скоростью расщепляет тетра- — гексаозу [96]. Эндоглюканаза II более эффективно снижает степень полимеризации КМ-целлюлозы [94]. Реакции переноса с участием целлотриозы для нее значительно менее характерны, чем для эндоглюканазы I, хотя и возможны. В ее составе имеется N-концевой ЦСД семейства I [110].

4 упомянутых выше компонента являются основными в ферментной системе *T. reesei* и синтезируются грибом синхронно в соотношении примерно 6 : 1,5 : 1 : 1 [106], хотя их гены расположены на разных хромосомах. На этом основании логично приписать именно этим ферментам основную роль в синергической деградации упорядоченной целлюлозы. Однако помимо них у грибов найдены по меньшей мере 3 минорных типа эндоглюканаз. Не исключено, что они не важны для гидролиза целлюлозы, а, например, нужны для образования индуктора целлюлаз. Однако без их рассмотрения картина ферментных комплексов грибов была бы неполной.

Грибная эндоглюканаза III представляет собой (по данным для *T. reesei* [115]) не содержащий ЦСД небольшой белок из 218 остатков, уложенных в β -сэндвич типа «грудной клетки» (семейство 12/N). В продуктах гидролиза данный тип ферментов сохраняет конфигурацию расщепляемой связи у аномерного гидроксила, подобно эндоглюканазам I и II. У *H. insolens* этот фермент является наименее активным из всех изученных эндоглюканаз, однако имеются предварительные данные, что у гриба *Penicillium verruculosum* он обладает высокой эндогидролазной активностью [1]. Его активный центр, расположенный в глубоком каньоне между β -листами, может вмещать 5 глюкозных остатков. Отмечается его относительно высокая склонность к реакциям трансгликозилирования [96].

Эндоглюканаза IV *T. reesei*, принадлежащая к новому семейству 61/M, охарактеризована сравнительно недавно, и пока нет данных о ее пространственной структуре и механизме катализа. Известно, что фермент содержит C-концевой ЦСД, присоединенный к КД через линкерную последовательность. Аналогичный белок обнаружен и у культурного шампиньона *Agaricus bisporus* [93].

Эндоглюканаза V детально изучена на примере ферментов из *T. reesei* и *H. insolens* и обнаружена у других грибов [97]. Этот фермент

имеет небольшой КД, уложенный в 6β -бочку (семейство 45/К), и ЦСД семейства I на С-конце. Активный центр в виде канала вмещает 6 сайтов связывания глюкозных остатков (от -4 до $+2$). Подобно активному центру яичного лизоцима, он включает трехтяжевый фрагмент в виде β -листа, в среднем тяже которого расположен каталитически активный остаток D121 [41]. Однако в отличие от лизоцима и большинства эндоглюканаз данный фермент обращает конфигурацию у аномерного центра в продуктах гидролиза. Предположительно, обращение происходит за счет атаки гликозидного кислорода молекулой воды, координированной остатком D10. У *H. insolens* фермент имеет наивысшую среди всех эндоглюканаз активность по отношению к КМ-целлюлозе и другим производным целлюлозы. Для аналогичного фермента из *T. reesei* также показана узкая специфичность к производным целлюлозы. Он не расщепляет ксиланы, маннаны и галактоманнаны [100], не действует на гетерозидную связь во флуорогенных производных целлоолигосахаридов.

Особенностью ферментной системы *H. insolens* является не найденная у других грибов эндоглюканаза VI, родственная по структуре целлобиогидролазе II и ряду бактериальных эндоглюканаз семейства 6/V. Фермент не содержит ЦСД. Он является наиболее высокоактивным на целлогексаозе, сохраняя по отношению к пента- и тетрамеру в 15 и 300 раз меньшую активность, соответственно. Подобно целлобиогидролазе II фермент предпочтительно расщепляет вторую с невозстанавливающего конца гликозидную связь, обращая конфигурацию у аномерного центра [96].

Приведенные данные говорят о принципиальных различиях в строении амилолитической и целлюлолитической ферментных систем у грибов. Если у амилаз эндоферменты (α -амилазы) относятся к общему семейству 13 (ТИМ-бочка) и сохраняют конфигурацию у аномерного центра в процессе гидролиза, то эндоцеллюлазы из одного и того же источника имеют самые разнообразные структуры. При этом ферменты, имеющие структуру ТИМ-бочки (семейство 5), β -сэндвича (семейство 7), «грудной клетки» (семейство 12), сохраняют конфигурацию при C1, тогда как эндоферменты семейств 6 (незавершенная ТИМ-бочка) и 45 (β -бочка) обращают ее. Функция экзоферментов у амилаз и целлюлаз грибов также существенно различается. Грибным амилолитическим системам свойственно присутствие глюкоамилаз: ферментов, несущих полисахаридсвязывающий домен и КД семейства 15 со структурой ($\alpha\alpha$)6-бочки, катализирующий расщепление гликозидной связи с обращением конфигурации при аномерном центре продукта реак-

ции — глюкозы. У грибных целлюлаз функцию экзогидролаз выполняют целлобиогидролазы, формально аналогичные образующим дисахарид (мальтозу) растительным и бактериальным β -амилазам (семейство 14), причем аналогия распространяется только на целлобиогидролазы II (семейство 6), обращающие конфигурацию при C1 и имеющие сходную (но не идентичную) с β -амилазами укладку в виде незавершенной ТИМ-бочки. Основная грибная экзоцеллюлаза — целлобиогидролаза I (семейство 7) — сохраняет конфигурацию при C1 и имеет укладку типа бактериальных 1,3(4)- β -глюканаз, т.е. не имеет аналогий в амилолитических системах. Вероятно, принципиально разные типы КД и механизмов действия основных экзогидролаз (глюкоамилазы в амилазных и целлобиогидролазы I в целлюлазных системах грибов) отражают адаптацию микроорганизмов к особенностям укладки надмолекулярных структур спирализованных 1,4- α -глюканов с одной стороны и линейных 1,4- β -глюканов — с другой.

В контексте состава целлюлазной системы грибов упомянем также те из более чем десятка грибных гемицеллюлаз [57], которые несут ЦСД и, следовательно, вовлечены в реакции на поверхности целлюлозы. Известны, по крайней мере, 2 типа таких ферментов — это ксиланаза *Fusarium oxysporum* (семейство 10/F) [39] и β -манназа *T. reesei* (семейство 5/A1). Упоминается также о наличии ЦСД и линкерной последовательности в составе ацетилксилаэстеразы *T. reesei* [46]. Не исключено, что эти ферменты участвуют в деградации той части ксиланов и маннанов, которая тесно ассоциирована с поверхностью целлюлозы и потому имеет более упорядоченную надмолекулярную структуру [107]. Мы рассмотрим только грибные ксиланазы семейств 10/F и 11/G, как наиболее распространенные.

Эти ферменты отличаются по характеру действия на метилглюкуроноксила и родименан (1,3(4)- β -ксила). Более высокомолекулярные ферменты семейства 10 образуют из этих субстратов в качестве минимальных фрагментов альдотетрауроновую кислоту и $(\text{Xyl})_3$ с центральной 1,3- β -связью, соответственно. Низкомолекулярные ферменты семейства 11 из *T. reesei* и стрептомицетов образуют, соответственно, пентамер и $(\text{Xyl})_4$. Это означает, что субстрат-связывающий участок активного центра у ксиланаз семейства 10 меньше, чем у семейства 11, несмотря на больший размер КД со структурой ТИМ-бочки. Ферменты семейства 10 также более толерантны к C5-замещению в пиранозном кольце, предшествующем расщепляемой связи, и некоторые из них превращают соответствующие β -глюкозиды, а не только ксилозиды, чего не наблюдали у ферментов семейства 11 [39]. Показана способность

некоторых ферментов семейства 10 отщеплять ароматический хромо— или флуорофор от β —целло— или —ксилобиозидов. Сходные укладка (ТИМ—бочка) и строение активного центра у ферментов семейств 10 и 5 клана GH—A (куда входят, в частности, эндоглюканаза II и β —маннаназа *T. reesei*), делают возможным их эволюцию от общего прещественника [33].

Оба семейства ферментов (10 и 11) сохраняют конфигурацию при аномерном центре. Ферменты семейства 10, по—видимому, более предпочтительно действуют вблизи восстанавливающего конца полимера, подобно грибной эндоглюканазе II. Их активный центр имеет форму расщелины и состоит, по данным [38] из 6 сайтов связывания пиранозных остатков: $-2, -1, +1, +2, +3, +4$. Протяженность агликоновой части активного центра согласуется со способностью ферментов к трансгликозилированию при низких концентрациях акцептора.

Небольшие по размерам ксиланазы II грибов, принадлежащие к семейству 11, видимо, не сочетаются с грибными ЦСД семейства I, как и грибные эндоглюканызы III семейства 12, входящие в тот же структурный клан GH—C. Однако их целесообразно рассмотреть в общем контексте, т.к. у аэробных бактерий аналогичные ферменты могут содержать ЦСД семейства IIb (табл. 2). Активный центр в виде ложбины образован у них завернутыми краями β —сэндвича и содержит два каталитически активных остатка E86 (предположительно нуклеофил) и E177 (предположительно общий кислотно—основной катализатор). В процессе катализа активный центр претерпевает значительные конформационные изменения, в ходе которых изменяется положение остатков Y137 и L164. В конформации, подготовленной для связывания субстрата, активный центр открыт, затем при связывании он захлопывается, причем каталитически активный остаток E177 в этих условиях меняет положение в зависимости от pH. Наконец, в т.н. «ослабленной» конформации активный центр частично приоткрыт, что делает возможной диффузию отщепленной части субстрата [91]. В связывании остатков ксилозы участвуют по меньшей мере 2 консервативных остатка W, один из которых расположен ближе к N—, а второй — к C—концу полипептидной цепи, в области активного центра [70].

Завершив на этом анализ грибных целлюлазных систем и перейдем к ферментам аэробных бактерий и актиномицетов, имеющих с ними ряд общих черт.

IV. ЦЕЛЛЮЛАЗНЫЕ СИСТЕМЫ АКТИНОМИЦЕТОВ И АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Эти ферменты наиболее изучены у бактерий *Cellulomonas fimi* и *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* и актиномицета *Thermomonospora fusca*.

Грам-положительная бактерия *C. fimi* образует эндоглюканазы CепА, В, С и D, целлобиогидролазы CbhА и В, экзоглюканазу-ксиланазу Сех и ксиланазы XynD1 и XynD2 [59,109]. Их молекулы являются модульными, имеют длину полипептидной цепи от 400 до почти 1100 остатков и различную степень сложности. CепА имеет КД семейства 6/В и N-концевой ЦСД типа Па, разделенные линкером. CепВ — большой мультидоменный белок с КД семейства 9/Е2 и жестко связанным с ним ЦСД типа IIIb, а также С-концевым ЦСД типа Па. Между обоими ЦСД лежат разделенные линкерами три повтора фибронектин III-подобного домена, предположительно отвечающие за связывание фермента на клеточной мембране либо за образование внеклеточного мультисубъединичного комплекса ферментов. CепС имеет КД семейства 9/Е1 и N-концевой повтор ЦСД типа IV, разделенные линкером. Этот тип ЦСД специфичен к аморфной, но не кристаллической целлюлозе. КД CепD относится к семейству 5/А1, а С-концевой ЦСД — к семейству Па; между ними расположены два фибронектин III-подобных домена.

Среди экзогидролаз *C. fimi* необычной субстратной специфичностью обладает Сех семейства 10/Е, расщепляющая как целлюлозу, так и ксилан. Фермент имеет С-концевой ЦСД семейства Па, как и другие экзогидролазы этого организма — Cbh А и В. Последние являются типичными целлобиогидролазами, содержащими каталитические домены семейств 6/В и 48/Л, соответственно. Особенностью ЦСД Сех является его способность к прочной сорбции не только на кристаллической целлюлозе, но и на хитине, и более слабая сорбция на аморфной целлюлозе. Сех проявляет определенное сходство с целлобиогидролазой I грибов, в частности, в локализации ЦСД на С-конце и в образовании продукта-дисахарида с сохранением β-конфигурации при аномерном центре. Однако она действует с невозстанавливающего конца полимерного субстрата, в противоположность грибной целлобиогидролазе I. В ее активном центре на расстоянии 5,5 Å локализованы 2 остатка глутаминовой кислоты, выполняющие роль кислотно-основного (Е127 в паре с Н205) и нуклеофильного (Е233) катализаторов [72].

ЦСД типа Па эндоглюканазы CепА стал первым примером, на котором удалось независимо подтвердить наши данные [82] о способности ЦСД целлюлаз к некаталитическому диспергированию

целлюлозы. Авторам работы [59] удалось показать, что отщепление ЦСД от CенА вызывает повышение активности фермента к аморфной и растворимой КМ—целлюлозе при одновременном значительном снижении ее по отношению к микрокристаллической целлюлозе. Изолированный ЦСД обладал способностью образовывать мелкие частицы из более крупных частиц целлюлозы при полном отсутствии гидролиза, причем добавление его вместе с КД CенА значительно усиливало действие последнего на микрокристаллическую целлюлозу. Таким образом, получили подтверждение наши данные о том, что ЦСД не только удерживает КД на поверхности, но и непосредственно участвует в разрушении целлюлозы [60].

У *S. fimi* охарактеризованы также две специфичные ксиланазы семейства 11/G, отличающиеся положением ЦСД типа IIb — на С—конце или в середине полипептидной цепи.

Относительно более простая целлюлазная система термофильного актиномицета *T. fusca* содержит 6 компонентов E1—E6, содержащих ЦСД семейства II. У E3 (семейство КД 6/B), E5 (5/A2) и E6 (48/L) он расположен на N—, а у E1 (9/E1), E2 (6/B) и E4(9/E2) — на С—конце. Два фермента, E3 и E6 являются экзоцеллюлазами, причем первый действует с невосстанавливающего, а второй — с восстанавливающего конца полимера. Три фермента, E1, E2 и E5 являются эндоцеллюлазами, тогда как E4 по типу действия имеет промежуточные свойства и способен усиливать действие как эндо—, так и экзоцеллюлаз. Сходство этой системы с системой *S. fimi* объясняют конвергентной эволюцией, т.к. за исключением E4 и CенB, имеющих 80%—ную гомологию, у целлюлаз обоих организмов вряд ли были общие предшественники [117].

Помимо глюканаза, в состав целлюлазной системы актиномицета входит также высокотермостабильная ксиланаза A, относящаяся к семейству 11/G и несущая ЦСД семейства IIb.

Среди других актиномицетов строение целлюлазной системы наилучшим образом изучено у *S. lividans*. Система ферментов этого организма весьма напоминает систему *T. fusca*. У стрептомицетов найдены также целлюлазы семейств 5/A2, 6/B, 9/E1 и содержащая ЦСД типа IIb ксиланаза семейства 11/G. Вместе с тем, у них пока не найдены ферменты, аналогичные экзоглюканазе E6 и ферменту E4 термофильного актиномицета. Зато дополнительно обнаружены маннаназа (5/A4), ксиланаза (10/F), не содержащие ЦСД, а также ацетилксиланэстераза и хитиназа, несущие ЦСД семейств IIb и IIa, соответственно. Обнаружена также эндоглюканаза семейства 12/G, причем, в отличие от аналогичных грибных эндоглюканаз III, у стрептомицетов фермент данной группы содержит ЦСД [110].

Целлюлазные системы *C. fimi* и актиномицетов можно рассматривать как переходные между системами грибов и бактерий. Хотя у них нет характерных для грибов целлобиогидролазы I и эндоглюканазы I, принадлежащих семейству 7/C, их роль выполняют аналогичные ферменты других семейств, в частности, действующая с восстанавливающего конца экзогидролаза семейства 48/L. Общим же является наличие ферментов семейства 6/V, родственных грибной целлобиогидролазе II. У *T. fusca* и *C. fimi*, как и у термофильного гриба *H. insolens* имеются как экзо— так и эндоглюканазы этого семейства ферментов, специфичных к невосстанавливающему концу и обращающих конфигурацию при аномальном центре.

Незавершенная ТИМ—бочка эндоглюканазы E2 термофильного актиномицета *T. fusca* отличается от аналогичной структуры грибной целлобиогидролазы II тем, что у нее укорочены петли, перекрывающие туннель активного центра, из—за чего последний имеет форму ложбины [117]. Данная эндоглюканаза имеет высокую активность по отношению к растворимой КМ—целлюлозе и аморфной целлюлозе, но слабо расщепляет кристаллический субстрат. Высказано предположение, что активность по отношению к последнему может лимитироваться его проникновением в активный центр [125]. Для проверки этой гипотезы получены мутанты E2 по аминокислотным остаткам, расположенным у входа в активный центр и предположительно принимающим участие в связывании углеводов. Хотя ни одна из мутаций не привела к изменению скорости гидролиза кристаллической целлюлозы, выяснилось, что остаток W16 на поверхности глобулы важен для гидролиза аморфной целлюлозы. Кроме того, удалось показать, что ограничение подвижности петли, накрывающей активный центр, в мутанте G87A вызывает наибольшее снижение активности фермента (в 25 раз), хотя и не влияет на связывание субстратов. Таким путем впервые удалось продемонстрировать прямую связь между движением петель полипептидной цепи и активностью фермента. В активном центре этого обращающего конфигурацию фермента идентифицирован ряд важных для катализа карбоксильных групп, в частности, протон-донорный остаток D117 и остаток D156, предположительно повышающий его рК. На роль общего основного катализатора претендует карбоксилат—анион D79 [119], тогда как мутация D265 полностью исключает связывание лигандов в активном центре. Мутация углеводсвязывающего остатка E263 снижает сродство к субстрату, но повышает активность фермента по отношению к растворимой КМ—целлюлозе, что показывает его участие в непродуктивном связывании субстрата. Разрушение же водородной связи между Y73

и глюкозным остатком на субсайте —1, искажающем нативную конформацию пиранозного кольца, напротив, увеличивает сродство к субстрату, но снижает скорость его превращения.

Фермент E4 *T. fusca*, относящийся к семейству 9/E2, не имеет аналогов среди грибных целлюлаз. Его КД представляет собой ($\alpha\alpha$)6-бочку, у которой петли на С-конце внутренних спиралей формируют активный центр. С N-конца к ней жестко прикреплен иммуноглобулиноподобный ЦСД из 90 остатков, уложенных в 8 β -тяжей. При этом вход в активный центр является продолжением ЦСД. Таким образом, активный центр состоит как бы из двух частей — относительно плоской, характерной для ЦСД, и щелевидной, свойственной КД.

Бактерия *P. fluorescens subsp. cellulosa* образует целлюлолитическую систему, еще менее сходную с системой грибов. В нее входят по меньшей мере 3 эндоглюканазы, целлодекстриназа, 5 ксиланаз и 4 маннаназы, в дополнение к широкому спектру ферментов, отщепляющих боковые группы в гемицеллюлозах. Все эндоглюканазы и целлодекстриназа, выявленные у этого микроорганизма, помимо КД, принадлежат семействам 5/A1 (CelC), 5/A2 (CelE), 9/E1 (CelA) и 45/K (CelB), содержат также ЦСД семейства IIa (на N-конце у CelB,C, на С-конце у остальных) и дополнительно небольшой внутренний ЦСД семейства X. Единственная изученная маннаназа содержит только КД редкого семейства 26/I. В противоположность ей 5 изученных ксиланаз имеют сложное строение. Ксиланаз А принадлежит семейству 10/F, действует, очевидно, с восстанавливающего конца и способна к трансгликозилированию при относительно низких концентрациях субстрата. Особенностью ее структуры является наличие Ca^{2+} -связывающего сайта, формируемого седьмой петлей ТИМ-бочки КД [121]. Она несет N-концевой ЦСД семейства IIa и внутренний ЦСД семейства X, как и эндоглюканазы. В отличие от нее XynB/C и XynD, принадлежащие тому же семейству 10/F, имеют только N-концевой ЦСД типа IIa, а XynE семейства 11 — только С-концевой ЦСД типа X. Некоторые ксиланазы также содержат второй КД, гомологичный ризобияльному NodB-белку и выполняющий функцию ацетилксиланэстеразы [47]. Эстераза и арабинофуранозидаза также содержат ЦСД типа II и еще один домен неизвестного назначения.

Отметим сходство двух ферментов псевдомонад — эндоглюканазы семейства 5/A5 *P. solanacearum* и CelB *P. fluorescens* (семейство 45/K) — с типичными ферментами грибов — эндоглюканазами II и V *T. reesei* и *H. insolens*. Однако этими ферментами сходство с грибами исчерпывается.

Еще более удалены от грибных ферментные системы бацилл и фитопатогенных бактерий р. *Erwinia*. У хорошо изученных бацилл найдены эндоглюканазы семейств 5/A1,2,4; 8/D и 44/J, ксиланазы семейств 10/F и 11/G, маннаназа семейства 26/I, причем 2 типа ферментов (5/A2; 44/J) имеют С–концевые ЦСД типа IIIa. С–концевой ЦСД типа VI найден у неклассифицированной бациллярной ксиланазы [109, 110]. У *Erwinia* охарактеризованы сходные с бациллярными эндоглюканазы семейств 5/A2, 8/D и эндоглюканаза семейства 12/G, подобная эндоглюканазам III грибов и, так же как и они, лишенная ЦСД. Ферменты семейства 5/A2 у разных родов *Erwinia* могут нести разные С–концевые ЦСД – типа IIIa как у бацилл, либо уникального типа V, встречающегося только у CelZ *E. chrysanthemi*. Уникальность структуры ЦСД V, вероятно, связана не только с его прямой функцией, но и с предполагаемой ролью в секреции CelZ [24].

Подчеркнем, что в ферментных системах псевдомонад, бацилл и *Erwinia* не найдены целлюлозгидролазы. Поэтому их функция, вероятнее всего, не сводится к трофической. Некоторые из ферментов, видимо, участвуют в фитопатогенезе, облегчая проникновение микроорганизма в клетку хозяина, либо образуя сигнальные молекулы—олигосахарины, регулирующие фитоиммунные реакции [8]. В этой связи особый интерес представляет структурное сходство отдельных эндоглюканаз и ксиланаз сапрофитных грибов и фитопатогенных бактерий, возможно, проливающее свет на истинную функцию многочисленных компонентов целлюлолитической системы. Напомним и о структурном сходстве ЦСД и растительных ингибиторов протеиназ, участие которых во регуляции взаимоотношений растения и патогена считается доказанным.

В завершение рассмотрим примеры, которые можно считать переходными от неассоциированных ферментных систем аэробных организмов к агрегированным системам анаэробов. Речь пойдет о белках, объединяющих несколько КД. Наличие в одной полипептидной цепи нескольких модулей со сходными или различными, иногда сопряженными ферментативными функциями весьма распространено у бактерий, у которых организация генов родственных ферментов в кластеры упрощает дупликацию или слияние генов. Так, у анаэробной бактерии *Fibrobacter succinogenes* ксиланаза С состоит из двух КД семейства 11/G и третьего домена невыясненной природы [70]. Первый из доменов активен по отношению к ксилану, второй – к арабиноксилану. У другого анаэроба *Ruminococcus flavefaciens* ксиланаза А состоит из N–концевого домена семейства 11/G, образующего ксилоолигосахариды при гидролизе

ксилана, и С—концевого домена семейства 10/F, образующего ксилозу. Ксиланаза D содержит тот же N—концевой домен, но присоединенный к С—концевой 1,3(4)— β —глюканазе. Еще одним примером являются ксиланазы псевдомонад, NodB—подобные домены которых выполняют роль сопряженного фермента — ацетилксилан-эстеразы [47], воплощенной у грибов в виде отдельного белка [32].

Особенно характерно образование натуральных химер для бактерии *C. saccharolyticum* [30]. Помимо мономерных ксиланаз А (семейство 10/F) и Е этот организм синтезирует ферменты, КД которых организованы попарно (маннаназа 5/A4 — эндоглюканаза 44/J; эндоглюканаза 9/E2 — целлобиогидролаза 48/L; ксиланаза 10/F — эндоглюканаза 5/A1; эндоглюканаза 9/E2 — маннаназа 5/A4) и разделены мономерным, а чаще — дублицированным ЦСД типа IIIa [110]. Образование бактерией химерных белков наряду с секрецией мономерных ферментов, возможно, означает согласованное функционирование эволюционно закрепленных пар на поверхности целлюлозы.

V. ЦЕЛЛЮЛАЗНЫЕ СИСТЕМЫ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.

Среди анаэробных бактерий — продуцентов целлюлаз наиболее изучены термо- и мезофильные клостридии. Бактерия *C. thermocellum*, интенсивно изучаемая в последние 20 лет, разлагает целлюлозу с помощью высокомолекулярных внеклеточных агрегатов, названных целлюлосомами. Последние содержат от 15 до 25 различных целлюлаз и гемицеллюлаз, объединяемых некаталитическим белком, получившим название интегрирующего целлюлосому белка А (CipA) или, иначе, скаффолдина («вешалки»). Связывание обеспечивают консервативные гидрофобные повторы (2×24 остатка), т.н. докерины I и комплементарные им рецепторы скаффолдина, т.н. когезины I [25]. Важную роль в когезин—докеринном взаимодействии играют ионы Ca^{2+} [73]. Когезиновые домены уложены в виде 9—тяжелых β —бочек, подобных по структуре ЦСД семейств II и III [21], несмотря на полное отсутствие гомологии [26]. Помимо 9 когезинов типа I скаффолдин несет ЦСД семейства III, а также особый тип докерина на С—конце (тип II), несколько отличающийся структурой от гидрофобных повторов каталитических субъединиц и не взаимодействующий с когезинами типа I. Когезины типа II для этого докерина содержатся в белках, предположительно принадлежащих S—слою бактериальной клетки (OlpX, рис. 4) т.к. все они содержат специфические для S—слоя SLH—до-

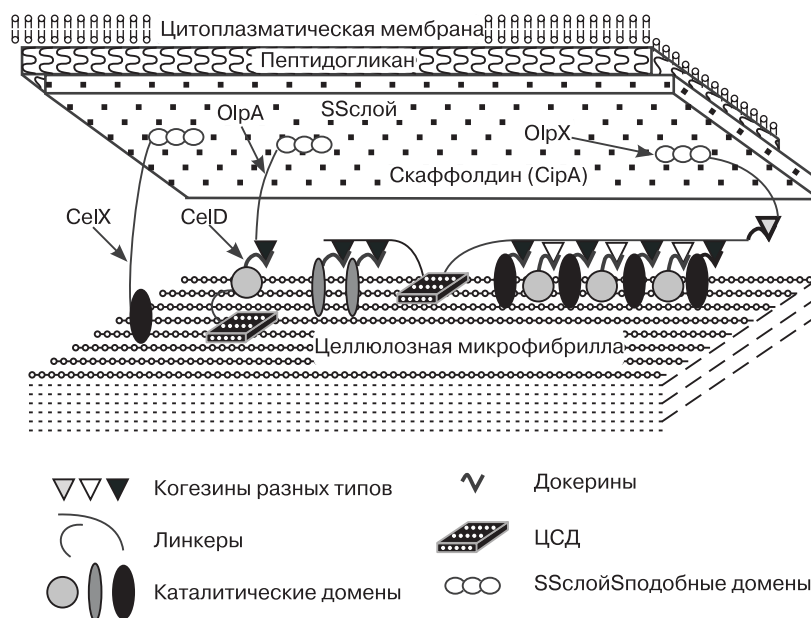


Рис.4. Предполагаемый механизм действия целлюлосомных и нецеллюлосомных клостридиальных ферментов на поверхности целлюлозы (по [56, 109]).

мены. Таким образом, скаффолдин содержит необходимые структурные фрагменты, во—первых, для сборки целлюлосомы из отдельных ферментов, во—вторых, — для ее фиксации на поверхности клетки и, в третьих, — для прикрепления к целлюлозному субстрату [28].

На примере эндоглюканазы D, входящей в целлюлосому, показано, что активность клостридиальных ферментов, не имеющих автономно функционирующего ЦСД, по отношению к микрокристаллической целлюлозе многократно возрастает при фиксации на нативном или мутантном скаффолдине, несущем ЦСД и только одну копию когезина I. Напротив, мутантные скаффолдины, не содержащие ЦСД, никак не стимулируют ферментативную активность по отношению к нерастворимому субстрату [28].

Важность объединения ферментов клостридии в надмолекулярное образование для деградации кристаллической целлюлозы показали и эксперименты по диссоциации целлюлосомы в неденатурирующих условиях [74]. Смесь целлюлосомных ферментов с близкой нативной целлюлосоме эффективностью гидролизовала

растворимые и аморфные формы целлюлозы, но значительно уступала ей в расщеплении кристаллической целлюлозы.

C. cellulolyticum – еще один представитель анаэробных бактерий, целлюлосома которого изучена в деталях. Помимо скаффолдина в ее составе присутствует, как минимум, 6 целлюлазных ферментов (CelA–CelF), связанных с каркасным белком когезин–докериновыми комплексами [29]. Однако этот тип взаимодействий является видоспецифичным: когезины ферментов термофила не узнают докерина мезофила и наоборот.

Среди ферментов, фиксированных в целлюлосоме, обнаружены как эндоглюканазы различных семейств, так и целлобиогидролазы [5, 73]. Наиболее известна из них целлобиогидролаза CelS (S8), принадлежащая семейству 48/L. В этом семействе расшифрована пространственная структура CelF – т.н. процессивной эндо–экзоглюканазы мезофильной клостридии. N–концевой каталитический домен данного фермента имеет структуру ($\alpha\alpha$)6–бочки, с активным центром в виде туннеля, уходящего вглубь примерно на 2/3 длины внутренних спиралей со стороны их N–конца. Снаружи туннель переходит в открытую ложбину, что позволяет ферменту проявлять свойства как экзо–, так и эндоглюканазы. Общая протяженность активного центра составляет не менее 8 ангидроглюкозных остатков [79].

Однако целлюлосомные ферменты не исчерпывают многообразия целлюлаз, найденных у клостридий. Данный род вообще отличается обилием идентифицированных структурных форм целлюлаз и гемицеллюлаз, представляющих 11(!) из 18 (включая подсемейства) классификационных групп этих белков. Клостридиальные ферменты можно встретить в семействах 5/A1–4, 8/D, 9/E1,2, 10/F, 11/G, 26/I, 48/L. Значительная их часть в семействах 5/A4, 9/E1,2, 10/F, 11/G, в т.ч. еще одна целлобиогидролаза Cbh3 семейства 9/E1, несет собственный ЦСД семейств II, III, IV, VI, IX, причем некоторые – по два ЦСД одного семейства. Кроме того, обнаружены ферменты, не содержащие ни ЦСД, ни докериновых доменов, например, эндоглюканаза С *C. thermocellum* (семейство 5/A3) [3, 4, 6, 81]. Такое разнообразие, возможно, свидетельствует о наличии у клостридий альтернативных путей деградации растительных субстратов. Не исключено и то, что некоторые ферменты (в частности, эндоглюканаза С) нужны для гидролиза 1,3(4)– β –глюканов, а не целлюлозы.

Рисунок 4 иллюстрирует современные представления о механизме действия целлюлазной системы клостридий на кристаллическую целлюлозу. На нем показаны как ферменты, функцио-

нирующие в составе целлюлосомного ансамбля и фиксированные на скаффолдине специфической когезин–докериновой парой, так и отдельные ферменты двух разных видов. Один из них, представленный на рис. 4 как CelD, имеет собственный ЦСД и специфический когезин типа II, позволяющий этому ферменту одновременно взаимодействовать с поверхностью целлюлозы и с белком внешней поверхности клетки OlpA подобно скаффолдину. Другой (CelX) представляет собой аналог фермента, найденного у термофильного анаэроба *T. saccharophilum* (см. рис. 1). Он содержит характерные для Olp–белков домены S–слоя – поверхностного слоя бактериальной клетки и, предположительно, не нуждается в когезин–докериновой паре для фиксации на поверхности микроорганизма. Однако в какой степени этот фермент, не несущий ЦСД известных семейств, участвует в процессах, протекающих на поверхности целлюлозы, пока неясно.

У анаэробных фикомицетных грибов pp. *Neocallimastix*, *Pirromyces*, *Sphaeromyces*, *Orpinomyces*, заселяющих рубец жвачных животных вместе с анаэробными бактериями и открытых лишь в середине 70–х гг. [77, 78], в результате конвергентной эволюции выработались ферментные системы, сходные с системами анаэробных бактерий. Все они являются большими белковыми агрегатами из более чем 10 компонентов с активностями эндоглюканаз, ксиланаз, маннаназ, целлобиогидролаз и ферулоилэстераз. Все ферменты имеют модульную структуру и содержат один или более КД, соединенных с некаталитическими модулями четко выраженными линкерами. Ксиланаза A из *N. patriciarum* содержит 2 идентичных КД семейства 11, разделенные линкером, и некаталитический С–концевой повтор из 36 остатков, подобный докериновым структурам кlostридиальных ферментов. Подобные повторы в виде одной, двух или трех копий содержатся в CelB – эндоглюканазе нехарактерного для аэробных грибов семейства 5/A4, маннаназе ManA, целлобиогидролазах A и B и ферулоилэстеразе EstA данного продуцента, а также ряде аналогичных ферментов *Orpinomyces*. Ни один из этих ферментов не содержал собственного ЦСД, столь характерного для целлюлаз аэробных грибов. В составе белкового агрегата, однако, найден некаталитический белок массой около 100 кДа, проявляющий сродство к «докеринам» гриба и, вероятно, аналогичный каркасным кlostридиальным скаффолдинам. Вместе с тем, у одной из ксиланаз *N. patriciarum*, XylB, принадлежащей семейству 10, показано наличие ЦСД грибного семейства I [51].

Разные типы организации целлюлолитических и сопутствующих активностей у аэробов и анаэробов можно объяснить сообра-

жениями экологического плана. Аэробы секретируют ферменты в небольшой объем тонкой водной пленки, покрывающей клетку продуцента и прилегающий субстрат. Отсутствие конвекции допускает, при наличии у ферментов собственных ЦСД, их иммобилизацию на субстрате вблизи клетки—продуцента и создание в пленке жидкости между субстратом и колонизирующим его организмом (или заселенном им капилляре внутри растительной клетки) устойчивого компартмента с эффективным диффузионным транспортом продуктов гидролиза в микробную клетку. У анаэробов, функционирующих в большом объеме жидкости, аналогичная секреция ферментов неизбежно привела бы к потере их продуцентом и разобщению необходимого набора активностей конвективными токами. Поэтому у них целлюлолитическая система упакована в целлюлосомы и полицеллюлосомы, связанные с поверхностью клетки. Таким образом обеспечивается транспорт продуктов гидролиза от субстрата к прикрепленной клетке микроорганизма. При этом, как у строгих анаэробов встречаются компоненты «разобщенных» ферментных систем, так и аэробные микроорганизмы могут иметь ферменты, в структуре которых, наряду с ЦСД, встречаются модули типа фибронектин III—связывающих доменов, отвечающие за связывание с клеткой и/или образование белковых ассоциатов на поверхности целлюлозы.

VI. О МЕХАНИЗМЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕГРАДАЦИИ УПОРЯДОЧЕННЫХ ФОРМ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

В предыдущих разделах был рассмотрен впечатляющий материал, накопленный в последние 10—15 лет при изучении строения целлюлазных систем микроорганизмов и структуры отдельных ферментов. Однако было бы преувеличением говорить о кардинальном продвижении в понимании механизма ферментативной деградации упорядоченной целлюлозы за это время.

На рис. 5 без каких—либо изменений воспроизведена схема механизма ферментативного гидролиза целлюлозы, опубликованная в материалах советско—финского симпозиума (Ташкент, 1983) [82]. Данная схема была сформулирована нами на основании исследования более десятка ферментных систем различных грибов [10, 60, 61].

Как видно из рис. 5, уже в начале 80—х гг. стало очевидным, что в гидролизе кристаллической целлюлозы принимают участие эндоглюканазы, отличающиеся наличием дополнительного центра связывания с целлюлозой — сорбционного центра, за которым позд-

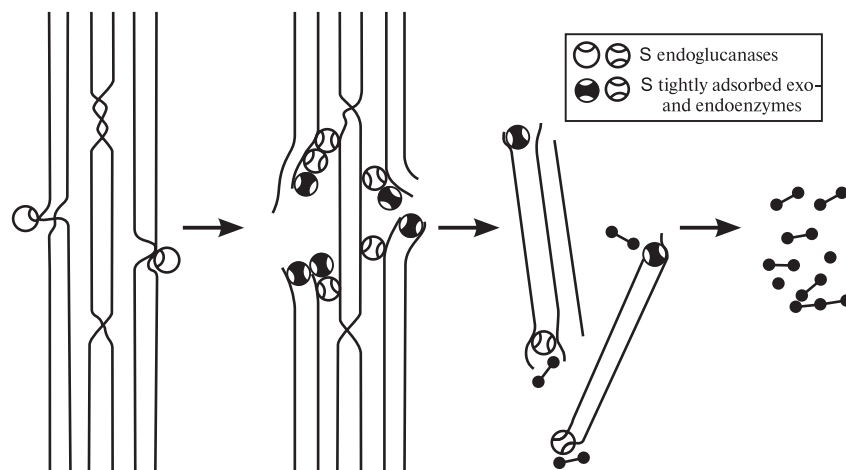


Рис.5. Механизм разложения упорядоченных форм целлюлозы неассоциированными ферментными системами, каким он представлялся в начале 80-х гг.

Показано наличие двух типов эндоглюканаз (светлые кружки) — слабо (выделен один сегмент, соответствующий активному центру) и прочно сорбирующихся на целлюлозе (выделены два сегмента, соответствующие активному и сорбционному центру (ЦСД)). Целлобиогидролазы (темные кружки) отнесены к прочно сорбирующимся ферментам с обособленными активным и сорбционным центрами (выделены два отдельных сегмента).

Воспроизведено из [82].

нее закрепилось название ЦСД. Слабо сорбирующиеся эндоглюканызы наиболее активно гидролизуют внешние аморфные области, но не затрагивают упорядоченную часть целлюлозы [10—12]. Они были найдены в минорных количествах в полноценных целлюлазных комплексах типа *T. reesei* (как теперь показано, это эндоглюканаза III семейства 12/H), но доминировали там прочно сорбирующиеся белки, эквивалентные эндоглюканазам I и II, а также целлобиогидролазам I и II с pI соответственно 4,8; 5,3; 4,2 и 5,9 [15], которым и отводилась центральная роль в разложении кристаллической целлюлозы (рис. 5). Позднее структурные исследования коллектива специалистов VTT (Финляндия) подтвердили наличие ЦСД в этих ферментах *T. reesei* [63].

Способность ЦСД—содержащих ферментов перемещаться от одной частицы субстрата к другой, установленная нами при совместном применении обычной и помеченной красителем целлюлозы [13, 14, 16, 62, 84], также получила независимое подтверждение [69].

Подтвердились и наши данные об отсутствии наиболее прочно связывающихся с целлюлозой эндоглюканаз в целлюлазных комплексах ряда аспергиллов (*A. niger*, *A. foetidus*), не расщепляющих упорядоченную целлюлозу. Действительно, эндоглюканазы аспергиллов можно найти преимущественно среди грибных ферментов семейства 12/H, не имеющих ЦСД [109]. Важность отдельного сорбционного центра (в нынешней номенклатуре — ЦСД) при гидролизе нерастворимых форм целлюлозы не оспаривается уже никем из авторитетных специалистов.

В работе [82] был впервые предложен механизм действия сорбционного центра, позволяющего целлюлазам, во-первых, концентрироваться и прочно удерживаться в местах нарушения упорядоченной структуры целлюлозы и, во-вторых, вызывать физическое расклинивание и диспергирование пучков микрофибрилл. Данный эффект, присущий только прочно сорбирующимся эндоглюканазам и целлобиогидролазам, был обнаружен нами в условиях подавления гидролиза при ингибировании ферментативной активности. Гипотеза о некаталитической функции ЦСД стала весьма популярной [63, 69] и была успешно подтверждена на индивидуальном бактериальном ЦСД типа II [59]. Причина того, что на грибном ЦСД типа I не удалось подтвердить найденный нами эффект, видимо, заключается в различии методик, т.к. мы наблюдали селективное диспергирующее действие грибных ЦСД—содержащих ферментов при специальной ультразвуковой обработке целлюлозных субстратов.

Анализ динамики концевых групп на поверхности микрокристаллической целлюлозы в процессе гидролиза [17] позволил также предположить, что в упорядоченных областях ферментативное разложение целлюлозы под действием эндо- и экзоферментов происходит только с конца полимерной цепи, причем мы полагали, что разные ферменты действуют с разных концов (с восстанавливающего или с восстанавливающего) (рис. 5). Это предположение подтвердилось открытием у целлобиогидролазы I предпочтения к восстанавливающему, а у целлобиогидролазы II — к восстанавливающему концу субстрата. Наконец, обнаружение эндогидролазных свойств у грибных целлобиогидролаз [23], а также «процессивных» бактериальных целлюлаз семейства 48/L, имеющих переходный между эндо- и экзогидролазами активный центр [86], позволяют говорить о подтверждении всех основных положений механизма, изображенного на рис. 5.

На нынешнем этапе мультидоменная структура целлюлаз должна, очевидно, рассматриваться в контексте согласованного действия

частей фермента как молекулярной машины при отрыве концевого фрагмента индивидуальной молекулы субстрата от поверхности элементарной целлюлозной фибриллы и переводе ее в более гидратированное состояние. Ясно, что одними структурными методами такую задачу решить не удастся.

Ниже представлено одно из возможных объяснений уникальной во многих отношениях способности грибной целлобιοгидролазы I к деградации упорядоченной целлюлозы. Вполне очевидно, что собственно ферментативный гидролиз гликозидной связи не является лимитирующей стадией этого достаточно медленного процесса. Вероятнее всего, процесс сдерживается необходимой для действия фермента гидратацией целлюлозных молекул. Последняя, в свою очередь, может происходить в несколько этапов.

Начальный этап (сорбция ЦСД) приводит к повышению степени гидратации молекул поверхностного слоя благодаря эффекту некаталитического диспергирования пучков микрофибрилл. Последующие стадии связаны с согласованным действием основных структурных элементов фермента — ЦСД, КД и линкера. Очевидно, что наиболее прочная сорбция фермента с нерастворимым субстратом соответствовала бы оптимальному связыванию и ЦСД, и КД. Однако такой тип связывания не оптимален для катализа, т.к. процесс будет лимитироваться распадом получаемого сверхпрочного комплекса. Более вероятным представляется последовательное «перетекание» фермента вдоль координаты реакции через ряд менее прочных комплексов, имеющих близкие константы диссоциации (т.н. «катерпиллерный катализ»), причем разность свободных энергий между оптимальным (наиболее прочным) и реальным (частично ослабленным) связыванием обоих доменов направляется молекулярной машиной для гидратации звеньев расщепляемой молекулы целлюлозы.

Это может происходить следующим образом. После быстрого связывания с поверхностью через ЦСД фермент образует первый тип комплекса с участием КД. Такой непродуктивный комплекс включает как связывание гидрофобной плоскости ЦСД I с несколькими поверхностными молекулами целлюлозы, так и захват восстановливающего конца одной из цепей субсайтами —7 — —5 активного центра.

Дальнейшее продвижение цепи может, по нашему мнению, объясняться исключительно высоким сродством фермента к изолированной цепи субстрата в растворе при непродуктивном связывании ее на участках —5 — —2 активного центра (константы диссоциации порядка 10 нМ) [2, 84, 85]. Этот тип непродуктивного

комплекса с частично изолированным восстанавливающим концом цепи должен, по—видимому, приводить к напряжениям в жесткой части междоменного линкера и нарушению планарного связывания ЦСД. Это следует из оценок констант десорбции адсорбированного фермента с поверхности целлюлозы, имеющих тот же порядок 10 нМ. При этом именно упругость жесткой части линкера, препятствующая одновременной реализации наиболее оптимального связывания обоих доменов, может являться «приводом» для освобождения очередного звена цепи от водородных связей с матрицей. В свою очередь, при ослаблении связи молекулы целлюлозы с поверхностью и ее дальнейшем продвижении на субсайты -1 , $+1$ и $+2$, т.е. образовании продуктивного фермент—субстратного комплекса, планарное связывание ЦСД может ослабляться настолько, что он десорбируется. Гидролиз и десорбция целлобиозы из активного центра могут вновь приводить к образованию устойчивого непродуктивного комплекса с частичным связыванием обоих доменов на поверхности и напряженным положением линкера, и отсюда начинается новый каталитический цикл.

Таким образом, через образование серии близких по энергетике промежуточных комплексов фермента и нерастворимого субстрата по пути $(\text{ЦСД}^{***}-\text{КД}) \rightarrow (\text{ЦСД}^{**}-\text{КД}^*) \rightarrow (\text{ЦСД}^*-\text{КД}^{**}) \rightarrow (\text{ЦСД}-\text{КД}^{***}) \rightarrow (\text{ЦСД}^{**}-\text{КД}^*)$ и т.п. может осуществляться последовательный отрыв звеньев целлюлозной цепи от поверхности и перемещение вдоль нее КД целлобиогидролазы I (число звездочек у соответствующего домена здесь условно означает прочность его связывания с целлюлозой).

Рассмотренный выше механизм катерпиллерного катализа пока не выходит за рамки гипотетического. Однако можно полагать, что характер действия конкретного фермента на поверхности целлюлозы в значительной степени определяется такими показателями как протяженность и форма активного центра, степень фиксации образующих его петель и степень ограничения свободного вращения внутри него полимерной молекулы субстрата, прочность связывания отдельных звеньев субстрата на различных сайтах активного центра, расположение ЦСД по отношению к КД и прочность его связывания с поверхностью, длина и степень конформационной жесткости междоменного линкера, наличие в структуре фермента иных доменов, предположительно участвующих в образовании белок—белковых комплексов на поверхности. Так как процесс носит выраженный топохимический характер, структурные данные необходимо анализировать с позиций кинетики и термодинамики гетерофазной реакции, а также эволюции фермент—субстратных

взаимодействий в процессе гидролиза [14, 20]. Такие работы уже начинают появляться [66, 69, 98, 125], но загадка C_1 -фермента, сформулированная 50 лет назад Элвином Рисом [88], еще ждет своего разрешения.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Inco Copernicus (Project No IC15—CT98—0103 (DG 12—MZCN)).

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Х.А. // Исследование тополитических эндоглюканаз и ксиланаз ферментных комплексов *Penicillium verruculosum* и *Trichoderma reesei*. Дисс... канд.хим.наук. М.: Химический ф—т МГУ. 1999. 26 с.
2. Гернер М.Л., Мельник М.С., Рабинович М.Л. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 1204—1213.
3. Мельник М.С., Рабинович М.Л., Клесов А.А. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 284—291.
4. Мельник М.С., Капков Д.В., Могутов М.А., Рабинович М.Л., Клесов А.А. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 387 — 395.
5. Мельник М.С., Рабинович М.Л., Возный Я.В. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 1787—1797.
6. Мельник М.С., Гернер М.Л., Рабинович М.Л. // Прикл. биохим. микробиол. 1999. Т.35. С. 616—623.
7. Мосолов В.В., Валуева Т.А. // Растительные ингибиторы протеолитических ферментов / Ред. В.Л.Кретович. М.: Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН. 1993. 207 с.
8. Озерецковская О.Л., Леонтьева Г.В., Чаленко Г.И., Роменская И.Г., Караваева К.А., Клыков С.А., Переход Е.А., Гернер М.Л., Мельник М.С., Рабинович М.Л. // Прикл. биохим. микробиол. 1993. Т. 29. С. 757—764.
9. Рабинович М.Л. // Кинетические аспекты действия карбогидраз (лизоцим и целлюлолитические ферменты). Дисс... канд.хим.наук. М.: Химический ф—т МГУ. 1977. 16 с.
10. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А., Нгуен Ван Вьет, Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 260. С. 1481—1486.
11. Рабинович М.Л., Нгуен Ван Вьет, Клесов А.А. // Биохимия. 1982. Т. 47. С. 465—477.
12. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 369—377.
13. Рабинович М.Л., Клесов А.А., Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. С. 758—763.
14. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Бадалов А.Б., Клесов А.А., Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. С. 1013—1017.
15. Рабинович М.Л., Новикова Т.В., Клесов А.А., Березин И.В. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. С. 1343—1347.
16. Рабинович М.Л., Савицкене Р.Ю., Герасимас В.Б., Мельник М.С., Новикова Т.В., Степанавичус Ю.Ю., Денис Г.Й., Клесов А.А. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. С. 1330—1342.
17. Рабинович М.Л., Нгуен Ван Вьет, Клесов А.А. // Прикл. биохим. микробиол. 1986. Т. 22. С. 70—79.
18. Рабинович М.Л. // Микробиология и биохимия деградации растительного сырья / Ред. Г.К.Скрябин, Е.Л.Головлев и др. М.: Наука. 1988. С. 70—108.

19. Хорлин А.Я. // Структура и функция активных центров ферментов. М.: Наука. 1974. С. 206—224.
20. Юлдашев Б.Т., Рахимов М.М., Рабинович М.Л. // Прикл. биохим. микробиол. 1993. Т.29. С. 58—68.
21. Alzari P. M., Tavares G., Souchon H., Lascombe M.B. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 33
22. Arase A., Yomo T., Urabe I., Hata Y., Katsube Y., Okada H. // FEBS Lett. 1993. Vol. 316. P. 123—127.
23. Barr B.K., Hsieh Y.—L., Ganem B., Wilson D.B. // Biochemistry. 1996. Vol. 35. P. 586—592.
24. Barras F. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 37.
25. Bayer E.A., Morag E., Lamed R., Shoham Y. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 11.
26. Bayer E.A., Shimon L.J.W., Frolow F., Morag E., Lamed R., Tormo J., Yaron S., Shoham Y. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 75.
27. Beguin P. // Annual Review of Microbiology. 1990. Vol. 44. P. 219—265.
28. Beguin P., Chauvaux S., Chaverroche M.—K., Guglielmi G., Kataeva I., Leibovitz E., Matuschek M., Miras I. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 7.
29. Belaich J.P. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 8
30. Bergquist P. L., Gibbs M. D., Saul D. J., Te'O V. S. J., Dwivedi P. P., Morris D. // Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation / Eds. K.Shimada, K.Ohmiyn et al. Uni Publishers. Tokyo. 1993. P. 276—285.
31. Biely P., Vrsanska M., Claeysens M. // Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases / Eds. P.Suominen, T.Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation. Helsinki. 1993. P. 99—108.
32. Biely P., Cote G.L., Kremnický L., Tenkanen M., Greene R.V. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 5.
33. Biely P., Vrsanska M. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 3
34. Blake C.C.F., Koenig D.F., Mair G.A., North A.C.T., Phillips D.C., Sarma V.R. // Nature. 1965. Vol. 206. P. 757—763.
35. Boraston A., Brun E., Creagh A.L., Gilkes N.R., Guarna M.M., Haynes C.A., Jervis E., Johnson P., Kay L., Kormos J., McIntosh L., McLean B.W., Rose D.R., Tomme P., Warren R.A.J., Kilburn D.G. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 11.
36. Bronnenmeier K., Riicknagel K. P., Staudenbauer W. L. // Eur. J. Biochem. 1991. Vol. 200. P. 379—390.
37. Campbell R., Rose D., Wakarchuk W., To R., Sung W., Yaguchi M. // Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases / Eds. P.Suominen, T.Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation. Helsinki. 1993. P. 63—72.
38. Charnok S.J., Spurway T.D., Xie H., Beylot M.—H., Hazlewood J.P., Gilbert H.J. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 58.
39. Christakopoulos P., Nerinckx W., Kekos D., Macris B., Claeysens M. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 9.
40. Davies G., Tolley S., Wilson K., Schulein M., Dodson G. // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 228. P. 970—972.
41. Davies G. J., Dodson G. G., Hubbard R. E., Tolley S. P., Dauter Z., Wilson K.S., Hjort C., Mikkelsen M.J., Ras-mussen G., Schulein M. // Nature. 1993. Vol. 365. P. 362—366.
42. Davies G., Henrissat B. // Structure. 1995. Vol. 3. P. 853—859.

43. Divne C., Stahlberg J., Reinikainen T., Ruohonen L., Pettersson G., Knowles J.K.C., Teeri T.T., Jones T.A. // Science. 1994. Vol. 265. P. 524—530.
44. Derewenda U., Swenson L., Green R., Wei Y., Morosoli R., Shareck F., Kluepfel D., Derewenda Z. S. // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 20811—20819.
45. Dominguez R., Souchon H., Alzari P. M. // Proteins: Structure, Function and Genetics. 1994. Vol. 19. P. 158—163.
46. Eyzaguirre J., Gutierrez R., Peirano A., Jornvall H., Ghosh J., Duax W. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 60.
47. Gilbert H. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 38.
48. Gilkes N.R., Henrissat B., Kilburn D.G., Miller Jr. R.C., Warren R.A.J. // Microbiol. Rev. 1991. Vol. 55. P. 303—315.
49. Hass G.M., Hermodson M.A., Ryan C.A., Gentry L. // Biochemistry. 1982. Vol. 21. P.762—766.
50. Hayashida S., Yoshioka H. // Agric. Biol. Chem. 1980. Vol. 44. P. 481—487.
51. Hazlewood G., Gilbert H. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 36.
52. Henrissat B., Claeysens M., Tomme P., Lemesle L., Mornon J.-P. // Gene. 1989. Vol. 81. P. 83—92.
53. Henrissat B., Bairoch A. // Biochem. J. 1993. Vol. 293. P. 781—789.
54. Henrissat B., Bairoch A. // Biochem. J. 1996. Vol. 316. P. 722—726.
55. Himmel M.E., Karplus P.A., Sakon J., Adney W.S., Baker J.O., Thomas S.R. // Applied Biochem. Biotechnol. 1997. Vol. 63—65. P. 315—325.
56. Fujino T., Beguin P., Aubert J.-P. // J. Bacteriol. 1993. Vol. 175. P. 1891—1897.
57. Ilmen M., Margolles—Clark E., Penttila M. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 40.
58. Juy M., Amit A. G., Alzari P. M., Poljak R. J., Claeysens M., Beguin P., Aubert J.-P. // Nature. 1992. Vol. 357. P. 89—91.
59. Kilburn D. G., Assouline Z., Din N., Gilkes N. R., Ong E., Tomme P., Warren R. A. J. // Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases / Eds. P.Suominen, T.Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation. Helsinki. 1993. P. 281—290.
60. Klyosov A.A., Rabinovich M.L. // Enzyme Engineering: Future Directions. / Eds. L.B. Wingard, I.V. Berezin et.al. Plenum Press. N.—Y., London. 1980. P. 83—165.
61. Klyosov A.A., Rabinovich M.L. // Materials of the II Int.Symp. on Bioconversion and Biochem. Engineering. New Dehli: Scylark Printers. 1980. P. 53—56.
62. Klyosov A.A., Rabinovich M.L. // Tricel 89. Technical University. 1989. Vienna. L. 11.
63. Knowles J., Teerei T.T., Lehtovaara P., Penttila M., Saloheimo M. // Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation / Eds. J.—P.Aubert, B.Beguin, et al. Acad. Press. Paris. 1988. P. 153—169.
64. Knowles J.K.C., Lehtovaara P., Murray M., Sinnott M.L. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1988. P. 1401—1402.
65. Koivula A., Kinnari T., Harjunpaa V., Ruohonen L., Claeysens M., Jones T.A., Teeri T. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 12.
66. Konstantinidis A.K., Marsden I., Sinnott M.L. // Biochem. J. 1993. Vol. 291. P. 883—888.
67. Kraulis P.J., Clore G.M., Nigles M., Jones T.A., Pettersson G., Knowles J.K.C., Gronenborn A.M. // Biochemistry. 1989. Vol. 28. P. 7241—7257.

68. Kubicek C.P. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. / Ed. A. Fiechter. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. 1992. Vol. 45. P. 1—27.
69. Linder M., Teerei T.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 12251—12255.
70. McAllister K.A., Clarke A. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 59.
71. McFallen C.A., Svendsen I., Jonassen I., James M.N.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82. P. 7242—7246.
72. Monem V., Rose D.R., Withers S. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 65.
73. Morag E., Bayer E. A., Hazlewood G. P., Gilbert. H. J., Lamed R. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1993. Vol.43. P. 147—153.
74. Morag E., Yaron S., Lamed R., Shoham Y., Bayer E. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 76.
75. Nordberg—Karlsson E., Bartonek—Roxa E., Holst O. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 67.
76. Okada H. // Microbial Utilization of Renewable Resources / Eds. S.Kinoshita, A.Bhumiratana. Internat. Center of Cooperative Research in Biotechnology. Japan. 1991. P. 1—7.
77. Orpin C.G. // J. Gen. Microbiol. 1976. Vol. 91. P. 249—262.
78. Orpin C.G., Letcher A.J. // Curr. Microbiol. 1979. Vol. 3. P. 121—124.
79. Parsiega G., Juy M., Haser R. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 34.
80. Penttila M., Ilmen M., Saloheimo A., Aro N., Margolles—Clark E. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 23.
81. Petre J., Millet J., Longin R., Beguin P., Girard H., Aubert J.—P. // Biochimie. 1986. Vol. 68. P. 687—697.
82. Rabinovich M.L. // Materials of Soviet—Finland Seminar on Bioconversion of Plant Raw Materials by Microorganisms. Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms. Pushchino. 1984. P. 31—48.
83. Rabinovich M.L. // XVI FEBS Conference. Moscow. 1984. Abstracts. P. 393.
84. Rabinovich M.L., Klyosov A.A., Melnick M.S. // Anal. Biochem. 1986. Vol. 156. P. 489—494.
85. Rabinovich M.L., Melnick M.S., Herner M.L. // 207th ACS National Meeting and Exposition Program. San Diego. CA. 1994. P. 44.
86. Reverbel—Leroy C., Pages S., Belaich A., Belaich J.—P., Tardif C. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 17.
87. Ruohonen L., Koivula A., Reinikainen T., Valkeajarvi A., Teleman A., Claeysens M., Szardenings M., Jones T.A., Teeri T. // Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases / Eds. P.Suominen, T.Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation. Helsinki. 1993. P. 87—96.
88. Reese E. T., Siu R. G. H., Levinson H. S. // J. Bacteriol. 1950. Vol. 9. P. 485—495.
89. Roig V., Fierbode H.—P., Ducros V., Czjzek M., Belaich A., Gaudin C., Belaich J.—P., Haser R. // J. Mol. Biol. 1993. Vol. 223. P. 325—330.
90. Rouvinen J., Bergfors T., Teeri T., Knowles J. K. C., Jones T. A. // Science. 1990. Vol. 249. P. 380—386.
91. Rouvinen J. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 30.
92. Sakon J., Adney W.S., Himmel M.E., Thomas S.R., Karplus P.A. // Biochemistry. 1996. Vol. 35. P. 10648—10660.
93. Saloheimo M., Nakari—Setälä T., Tenkanen M., Penttilä M. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 48.
94. Sandelin M., Tenkanen M., Siika—aho M., Viikari L. // Tricel 97. Prog

- ram and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 31.
95. Schou C., Rasmussen G., Kalløft M. B., Henriksat B., Schulein M. // Eur. J. Biochem. 1993. Vol. 217. P. 947—957.
 96. Schulein M., Tikhomirov D.F., Schou C. // Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases / Eds. P.Suominen, T.Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research. Helsinki. 1993. P. 109—116.
 97. Schulein M. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 16.
 98. Sild V., Stahlberg J., Pettersson G., Johansson G. // FEBS Lett. 1996. Vol. 378. P. 51—56.
 99. Spezio M., Wilson D. B., Karplus P. A. // Biochemistry. 1993. Vol. 32. P. 9906—9916.
 100. Siika-aho M., Karlsson J., Gerber P., Tenkanen M. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 18.
 101. Souchon H., Spinelli S., Beguin P., Alzari P. M. // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 255. P. 1348—1356.
 102. Spezio M., Irwin D., Karplus P. A., Zhang S., Taylor J., Wilson D. B. // Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation / Eds. K.Shimada, K.Ohmiya et al. Uni Publishers. Tokyo. 1993. P. 308—317.
 103. Srisodsuk M., Reinikainen T., Teeri T.T. // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 20756—20761.
 104. Stahlberg J., Divne C., Koivula A., Piens K., Claeysens M., Teeri T.T., Jones T.A. // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 264. P. 337—349.
 105. Stahlberg J., Divne C., Kleywegt G., Zou J., Claeysens M., Teeri T.T., Jones T.A. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 29.
 106. Teeri T.T., Penttilä M., Keranen S., Nevalainen H., Knowles J. K. C. // In «Biotechnology of Filamentous Fungi» / Eds. D.B.Finkelstein, C.Ball. Butterworth—Heinemann. London. 1991. P. 417—444.
 107. Tenkanen M., Siika-aho M. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 19.
 108. Tempelaars C., Birch P. R. J., Sims P. F. G., Broda P. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. Vol. 60. P. 4387—4396.
 109. Tomme P., Warren R.A.J., Gilkes N.R. // Adv. Microbial Physiol. 1995. Vol. 37. P. 1—81.
 110. Tomme P., Warren R.A.J., Miller R.C., Jr., Kilburn D.G., Gilkes N.R. // Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates / Eds. J.Sadler, M.Penner. ACS. Washington D.C. USA. 1995. P. 1—12.
 111. Tomme P., Creagh A.L., Haynes C.A., Johnson P.E., Kormos J., McIntosh L.P., Kilburn D.G. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 71.
 112. Torronen A., Rouvinen J. // Biochemistry. 1995. Vol. 34. P. 847—855.
 113. Van Tilbeurgh H., Tomme P., Claeysens M., Bhikhabhai R., Pettersson G. // FEBS Lett. 1986. Vol. 204. P. 223—227.
 114. Vrsanska M., Biely P. // Carbohydr. Res. 1992. Vol. 227. P. 19—27.
 115. Ward M., Wu S., Dauberman J., Weiss G., Larenas E., Bower B., Rey M., Oarkson K., Bott R. // Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases / Eds. P.Suominen, T.Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research. Helsinki. 1993. P. 153—158.
 116. White A., Withers S. G., Gilkes N. R., Rose D. R. // Biochemistry. 1994. Vol. 33. P. 12546—12554.
 117. Wilson D.B., Sakon J., Irwin D., Zhang S., Wolfgang D., Barr B., Karplus A. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. L. 32.

118. Wohlfahrt G., Divne C., Zou J.-Y., Teleman O., Jones T.A., Teeri T.T. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 21.
119. Wolfgang D.E., Salminen O.M., Nicholson L.K., Wilson D.B. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 69.
120. Wood T. M., McCrae S. I. // Biochem. J. 1978. Vol. 171. P. 61—71.
121. Xie H., Charnock S., Spurway T., Morland K., Hazlewood G., Hilbert H. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 73.
122. Xu G.-Y., Ong E., Gilkes N.R., Kilburn D.G., Muhandiram D.R., Harris-Brandts M., Carver J.P., Kay L.E., Harvey T.S. // Biochemistry. 1995. Vol. 34. P. 6993—7009.
123. Yaron S., Morag E., Bayer E., Lamed R., Tormo J., Shoham Y. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 74.
124. Yoshino E., Hayashida S. // J. Ferment. Technol. 1978. Vol. 56. P. 289—295.
125. Zhang S., Wilson D.B. // Tricel 97. Program and Abstracts. Ghent. Belgium. 1997. P. 70.