

БУЛАХОВ
Александр Глебович

**СВОЙСТВА ЛИТИЧЕСКИХ
ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗ ИЗ НИЗШИХ
ГРИБОВ**

03.01.04 Биохимия
03.01.06 Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2018

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Гусаков Александр Васильевич

**Официальные
оппоненты:** **Мирошников Константин Анатольевич**
доктор химических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биоорганической
химии им. академиков М.М.Шемякина и
Ю.А.Овчинникова Российской академии наук,
руководитель лаборатории молекулярной
биоинженерии

Лавров Константин Валерьевич
кандидат биологических наук,
НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика,
старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии и
физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина
Российской академии наук

Защита состоится «___» _____ 2018 года в _____ часов на заседании
Совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора
наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального
государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу:
119071, Москва, Ленинский проспект, д 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической
литературы Российской академии наук по адресу: 119071 Москва, Ленинский
проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2018 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Орловский А.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В результате деятельности деревообрабатывающей, целлюлозно-бумажной, пищевой промышленности, а также сельского хозяйства накапливается огромное количество целлюлозосодержащего сырья (ЦСС), которое можно конвертировать в полезные продукты. Современные технологии переработки целлюлозосодержащих отходов основываются на ферментативной деструкции полисахаридов клеточной стенки растений под действием высокоэффективных препаратов ферментов-карбогидраз до моно- и олигосахаридов. Получаемые сахара могут быть конвертированы с помощью микроорганизмов в спирты, amino- и органические кислоты, которые в свою очередь могут быть использованы в химической, фармацевтической, пищевой промышленности, а также в сельском хозяйстве.

Биоконверсия растительных отходов осуществляется под действием ферментных комплексов на основе мутантных штаммов низших грибов с применением как нативных, так и рекомбинантных белков. Сегодня в развитых зарубежных странах уже существуют предприятия по ферментативной переработке сельскохозяйственных отходов, однако подобные биотехнологии пока еще не являются достаточно рентабельными. Основными препятствиями являются необходимость предобработки ЦСС и недостаточная эффективность ферментных комплексов. Таким образом, разработка высокоэффективных ферментных препаратов с улучшенными свойствами для гидролиза целлюлозосодержащей растительной биомассы является важной и актуальной задачей.

До недавнего времени считалось, что основными компонентами ферментных комплексов для деструкции ЦСС являются гидролитические ферменты, такие как целлобиогидролазы (ЦБГ), эндоглюканазы (ЭГ), β -глюкозидазы (БГЛ). Однако несколько лет назад (в 2010-2011 гг.) было обнаружено, что и ферменты, осуществляющие окислительный разрыв полимерной цепочки целлюлозы, литические полисахаридмонооксигеназы (ПМО), также принимают участие в деструкции данного компонента ЦСС и других полисахаридов. В литературе и более ранних исследованиях лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН было показано, что введение небольших количеств ПМО в состав целлюлазного комплекса способно заметно усиливать его способность к деструкции ЦСС. Однако, несмотря на большой интерес в мировом научном сообществе к новому классу ферментов, до последнего времени не существовало метода определения активности ПМО в режиме начальных скоростей реакции, и литературные данные о биохимических и кинетических свойствах ПМО были крайне скудны. Кроме того, закономерности взаимодействия ПМО с отдельными компонентами целлюлазного комплекса также были исследованы недостаточно.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы явилось исследование свойств ПМО из низших грибов (*Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* и *Myceliophthora thermophila*), изучение синергизма между ПМО и целлюлазами при ферментативной деструкции ЦСС, а также получение нового грибного штамма-

продуцента, секретирующего рекомбинантную ПМО в культуральную жидкость при сохранении в целом базового целлюлазного комплекса. В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи**:

- Выделить рекомбинантные ПМО *T. terrestris* и *T. reesei* из лабораторных ферментных препаратов на основе генетически модифицированных штаммов *Penicillium verruculosum*, осуществляющих гетерологичную экспрессию указанных ПМО. Выделить нативную ПМО из ферментного препарата на основе *M. thermophila*.
- Разработать метод измерения активности ПМО и определить с его помощью кинетические и биохимические параметры изучаемых ферментов. Идентифицировать продукты деструкции целлюлозы под действием ПМО.
- Изучить влияние ряда доноров электронов различного происхождения на эффективность катализа ПМО.
- Исследовать влияние очищенных ПМО на эффективность деструкции ЦСС как индивидуальными целлюлазами, так и комплексом целлюлолитических ферментов в целом.
- Разработать методами генетической инженерии новый штамм-продуцент на основе гриба *P. verruculosum*, осуществляющего экспрессию рекомбинантной ПМО *T. reesei* под контролем промотора гена глюкоамилазы вместе с базовым целлюлазным комплексом в составе культуральной жидкости, и исследовать свойства ферментного препарата.
- Получить химерный фермент, состоящий из ПМО *T. terrestris* и целлюлозо-связывающего модуля (ЦСМ) ЦБГ I *P. verruculosum*, и исследовать его свойства.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Разработан новый оригинальный метод определения активности ПМО, основанный на измерении скорости потребления кислорода (СПК) в ходе ферментативной реакции с помощью высокочувствительных флуоресцентных сенсоров на кислород, используемых в анализаторе Seahorse XFp (Agilent, США). С помощью этого метода определены кинетические параметры (число оборотов) действия рекомбинантных ПМО из *T. terrestris* и *T. reesei*, а также нативной ПМО из *M. thermophila* на аморфную целлюлозу в присутствии аскорбиновой кислоты в качестве донора электронов, pH-оптимумы активности ферментов (pH 7,0–8,0), а также изучена их субстратная специфичность. Установлено, что ПМО из *T. terrestris* обладает, помимо активности к целлюлозе, активностью по отношению к ксилоглюкану и бета-глюкану, а ПМО из *T. reesei* – активностью по отношению к ксилоглюкану. В режиме реального времени исследована инактивация ПМО под действием ЭДТА с последующим восстановлением активности фермента путем введения в реакционную смесь избытка ионов Cu^{2+} . Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии определена температурная стабильность выделенных ПМО. Показано, что после извлечения атома меди из активного центра ПМО с помощью ЭДТА температура плавления белка существенно снижается. Исследовано взаимодействие ПМО с целлюлазами при деструкции

микрористаллической целлюлозы (МКЦ) и лигноцеллюлозного субстрата (измельченной осиновой древесины). Показано, что ПМО проявляют синергизм как с индивидуальными целлюлазами (ЦБГ и ЭГ), так и с целлюлазным комплексом в целом. Методами генетической инженерии сконструирован химерный белок, N-домен которого представляет собой ПМО *T. terrestris*, а С-домен – ЦСМ ЦБГ I *P. verruculosum*. Установлено, что в результате присоединения ЦСМ активность ПМО по отношению к целлюлозе и ксилоглюкану существенно возрастает, при этом фермент расширил субстратную специфичность, приобретя способность расщеплять ксилан и карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ). Эти результаты имеют важное значение для понимания связи между структурой и функцией мультидоменных ферментов (в том числе и ферментов, относящихся к новому семейству оксидоредуктаз, – литических ПМО), катализирующих расщепление природных полисахаридов.

Практическая значимость работы. Получен новый штамм-продуцент *P. verruculosum*, секретирующий под контролем промотора гена глюкоамилазы гетерологичную ПМО *T. reesei* при сохранении в целом базового состава целлюлазного комплекса. Установлено, что при гидролизе измельченной осиновой древесины полученный на основе этого продуцента ферментный препарат hLPMO обеспечивает увеличение выхода глюкозы на 10–43% по сравнению с контрольными препаратами на основе исходного штамма *P. verruculosum* B1-537. Использование препарата hLPMO в смеси с высокоэффективным препаратом hBGL2 на основе штамма *P. verruculosum*, осуществляющего гетерологичную экспрессию БГЛ из *Aspergillus niger* под тем же промотором, позволило в тех же условиях повысить выход глюкозы на 56% по сравнению с контролем. Эти результаты, а также указанные выше данные по влиянию ЦСМ на активность ПМО в составе химерного белка создают перспективы для дальнейшей разработки новых грибных штаммов и высокоактивных ферментных препаратов на их основе для применения в процессах биоконверсии возобновляемого ЦСС.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан новый оригинальный метод измерения активности ПМО, который позволил определить кинетические параметры действия гомогенных ПМО из грибов *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila*, изучить ряд их свойств (субстратную специфичность, pH-зависимость активности, влияние различных доноров электронов на катализ ПМО), а также впервые осуществить мониторинг в режиме реального времени процессов инактивации ПМО под действием ЭДТА с последующей реактивацией за счет введения в реакционную смесь ионов Cu^{2+} .
2. Методом ДСК определены температуры плавления выделенных ПМО и показано, что ион меди в их активном центре оказывает существенное стабилизирующее влияние на термостабильность ферментов.
3. Путем комбинации хроматографического и масс-спектрометрического анализа продуктов деструкции целлюлозы под действием ПМО показано, что наряду с окислением глюкозидных остатков целлюлозы по C1 атому углерода с

образованием олигосахаридов, несущих остаток альдоновой кислоты на конце, выделенные ПМО также способны осуществлять окисление полимерной цепи по С4 атому глюкозидного остатка с образованием 4-кето-альдоз, причем это свойство более выражено в случае ПМО *T. reesei* и *M. thermophila*.

4. Показано, что при действии на целлюлозные субстраты ПМО проявляют эффект синергизма как с индивидуальными целлюлазами (ЦБГ и ЭГ), так и с целлюлазным комплексом в целом.
5. Получен новый штамм-продуцент *P. verruculosum*, осуществляющий гетерологичную экспрессию ПМО *T. reesei* при сохранении базового целлюлазного комплекса *P. verruculosum* в составе культуральной жидкости. Показано, что ферментный препарат на основе этого штамма способен к более эффективной деструкции лигноцеллюлозного субстрата (измельченной осиновой древесины).
6. Получен химерный белок, состоящий из ПМО *T. terrestris* и ЦСМ от ЦБГ I *P. verruculosum*. На основании исследования свойств химерной ПМО-ЦСМ показано, что присоединение ЦСМ способствует увеличению активности ПМО по отношению к целлюлозе и ксилоглюкану, а также расширяет субстратную специфичность фермента.

Личный вклад диссертанта. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и выполнение экспериментов, обработку данных, оформление и публикацию результатов.

Степень достоверности. Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов определяется использованием большого количества современных физико-химических методов исследования и выполнением экспериментов на сертифицированном оборудовании.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, школах и конгрессах: Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни» (Москва, Россия, 2014), Международная научная конференция «Биотехнологии в химико-лесном комплексе» (Архангельск, Россия, 2014), XXVII зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, Россия, 2015), VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2015), II Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, Беларусь, 2015), V съезд физиологов СНГ и V съезд биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), XI молодежная школа-конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия, 2016), Ежегодная научная конференция ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва, Россия, 2017), IX Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2017).

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

Связь работы с государственными программами. Работа финансировалась из средств Госзадания «Создание высокоактивных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз, а также ферментов негидролитической природы, усиливающих гидролитическое действие карбогидраз, для превращения в сахара, спирты и органические кислоты углеводсодержащих отходов промышленности и сельского хозяйства» (номер госрегистрации 01201351359).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 141 ссылку. Диссертация изложена на 145 страницах печатного текста, включает 49 рисунков и 7 таблиц.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Выделение, очистка и идентификация исследуемых ферментов

Выделение и очистку рекомбинантных ПМО *T. terrestris* и *T. reesei* проводили из лабораторных ферментных препаратов, полученных на основе генетически модифицированных штаммов *P. verruculosum*, осуществляющих экспрессию целевых белков под контролем промотора гена *cbh1* данного гриба в составе культуральной жидкости. Указанные штаммы и ферментные препараты были разработаны и получены ранее коллегами по лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН. Нативную ПМО *M. thermophila* выделили из ферментного препарата G7B11, любезно предоставленного компанией Dyadic Nederland B.V. (Нидерланды). Из коммерческого препарата NCE L600 (Dyadic Int., США) также была выделена целлобиозодегидрогеназа (ЦДГ1) *M. thermophila*, которая была использована в ряде экспериментов в качестве донора электронов, необходимого для функционирования ПМО. Схемы выделения и очистки ферментов включали стадии обессоливания ферментных препаратов, анионообменную хроматографию на колонке MonoQ, гидрофобную хроматографию на колонке Source 15Iso и гель-фильтрацию на колонке Superose 12 (все колонки фирмы GE Healthcare, Великобритания). На рис. 1 приведена электрофореграмма полученных белков.

В результате были выделены белки высокой степени чистоты. Идентификацию ферментов проводили методом пептидного картирования путем расщепления белков, содержащихся в соответствующих полосах геля после электрофореза, трипсином с последующей МАЛДИ масс-спектрометрией полученных смесей пептидов. В результате поиска с помощью онлайн сервиса MASCOT в базе данных NCBIнг выделенные ферменты были идентифицированы как ПМО и ЦДГ1 из соответствующих микроорганизмов (Табл. 1).

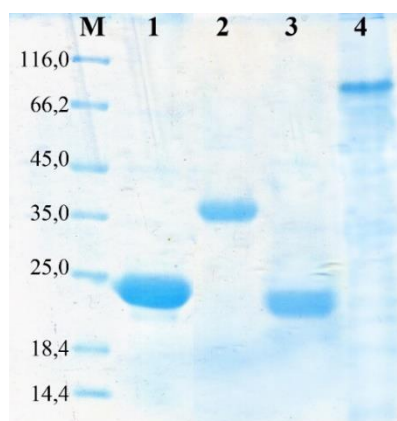


Рис. 1 - Ds-Na-ПААГ-электрофорез выделенных ферментов: ПМО *T. terrestris* (1), ПМО *T. reesei* (2), ПМО *M. thermophila* (3), ЦДГ1 *M. thermophila* (4). М – белки-маркеры с различной молекулярной массой (в кДа – слева от М).

Таблица 1 - Идентификация ферментов по данным МАЛДИ масс-спектрометрии их трипсиновых гидролизатов.

Фермент	Код GenBank	MASCOT score	Кол-во совпавших пептидов (пиков)	Степень покрытия, %
ПМО <i>T. terrestris</i>	АЕО71030	170	10 (17)*	83*
ПМО <i>T. reesei</i>	САА71999	33	6	30
ПМО <i>M. thermophila</i>	АЕО61304	75	11 (14)*	87*
ЦДГ1 <i>M. thermophila</i>	ААС26221	309	36	46

* С учетом дополнительно найденных модифицированных пептидов, содержащих метилированный N-концевой остаток гистидина, а также гликозилированного пептида в случае ПМО *T. terrestris*.

2. Определение и мониторинг активности ПМО по скорости потребления кислорода (СПК)

Согласно механизму, предложенному Филиппсом с соавторами (2011), при расщеплении β -1,4-гликозидной связи в целлюлозе ПМО расходуют одну молекулу кислорода. Для определения активности ПМО мы разработали метод, основанный на измерении скорости потребления кислорода (СПК) в ходе окислительного расщепления целлюлозы под действием ПМО, используя анализатор Seahorse XFp (Agilent, США). Анализатор определяет СПК в реакционной смеси с помощью высокочувствительных флуориметрических сенсоров на растворенный кислород.

Краткое описание метода. В ходе эксперимента прибор периодически измеряет в восьми лунках планшета изменение концентрации растворенного кислорода (в герметичных микрокамерах объемом 2 мкл, образуемых в результате опускания в лунки флуориметрических сенсоров) в течение 3 мин, исходя из чего автоматически рассчитывалась СПК, а также стандартное отклонение для данной

величины. После каждого измерения сенсоры поднимались, и смеси в лунках перемешивались встряхиванием, в результате чего концентрация растворенного кислорода по всему объему раствора суспензии возвращалась к первоначальному равновесному значению. На рис. 2 показаны данные прибора, на основании которых рассчитывалась Δ СПК (активность ПМО по потреблению кислорода). Первоначально (до отметки 50 мин) в 6-ти лунках планшета (две остальные лунки содержали 50 мМ Na-ацетатный буфер, pH 5,0, для измерения фонового СПК прибора) находилось по 200 мкл суспензии аморфной целлюлозы (5 мг/мл) в 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5,0, после чего во все лунки вводилось по 25 мкл раствора аскорбиновой кислоты – донора электронов для ПМО (Инъекция 1), чтобы ее финальная концентрация в реакционной смеси составила 0,4 мМ. В результате спонтанного (фонового) окисления аскорбиновой кислоты наблюдался всплеск СПК. На отметке 127 мин в три лунки планшета, отмеченные зеленым цветом, вносилось по 25 мкл буфера (Инъекция 2), а в три другие лунки, отмеченные фиолетовым цветом, – по 25 мкл раствора ПМО *T. terrestris* (до ее финальной концентрации в реакционной смеси 8 мкМ), запуская таким образом ферментативную реакцию окисления целлюлозы. Далее, на основании разницы СПК для ферментативной реакции и СПК для фонового образца (спонтанного окисления аскорбиновой кислоты), рассчитывали Δ СПК, отражающую активность ПМО.

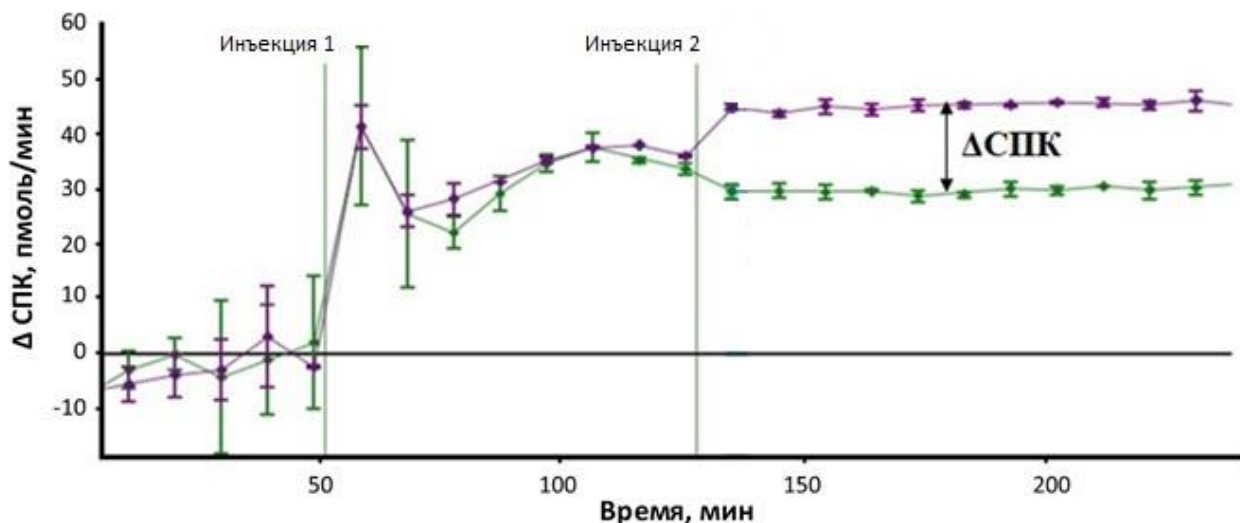


Рис. 2 - Расчет Δ СПК для ферментативной реакции, катализируемой ПМО *T. terrestris*, 37°C, pH 5,0. Зеленая линия и точки – СПК для фонового окисления аскорбиновой кислоты, фиолетовая линия и точки – СПК для ферментативной реакции. Условия и комментарии к рисунку даны в тексте.

Как правило, для расчета использовали 8 временных точек на протяжении примерно 1 ч реакции. Погрешность среднего значения Δ СПК определяли исходя из стандартного отклонения для каждого из измерений и разницы Δ СПК среднего и Δ СПК_i по методу Стьюдента для $\alpha=0,95$.

По разработанной методике были определены активности трех исследуемых ПМО по отношению к аморфной целлюлозе. Δ СПК для ПМО из *T. terrestris*, *T. reesei*, *M. thermophila* (8 мкМ) составила $9,6 \pm 1,2$, $13,4 \pm 0,8$ и $9,4 \pm 0,2$ пмоль/мин (37°C , pH 5,0). На основании данных Δ СПК также были рассчитаны кинетические параметры реакций (число оборотов для указанных ферментов) – соответственно 1,20, 1,68 и 1,18 мин⁻¹ (0,020, 0,028, 0,019 с⁻¹), что в целом соотносится с литературными данными, согласно которым число оборотов для различных ПМО, в том числе воздействующих на хитин и различные растворимые олигосахариды, находится в диапазоне 0,017–0,11 с⁻¹. Разница в значениях кинетического параметра варьирует в пределах одного десятичного порядка, несмотря на то, что в работах других авторов число оборотов для ПМО определяли совершенно другими методами и при других условиях (температура, pH, вид и концентрация донора электронов и т.д.).

Исследование процесса инактивации ПМО с последующей ее реактивацией. ПМО содержат в активном центре атом Cu^{2+} , координированный с двумя строго консервативными остатками гистидина, один из которых представляет N-концевой остаток фермента. Согласно литературным данным, воздействие хелатирующих агентов, в частности ЭДТА, ведет к извлечению ионов меди из активного центра, что вызывает потерю активности фермента. Последующее введение в раствор фермента избытка ионов Cu^{2+} восстанавливает его активность. Однако проследить за изменением активности в режиме реального времени ранее не удавалось.

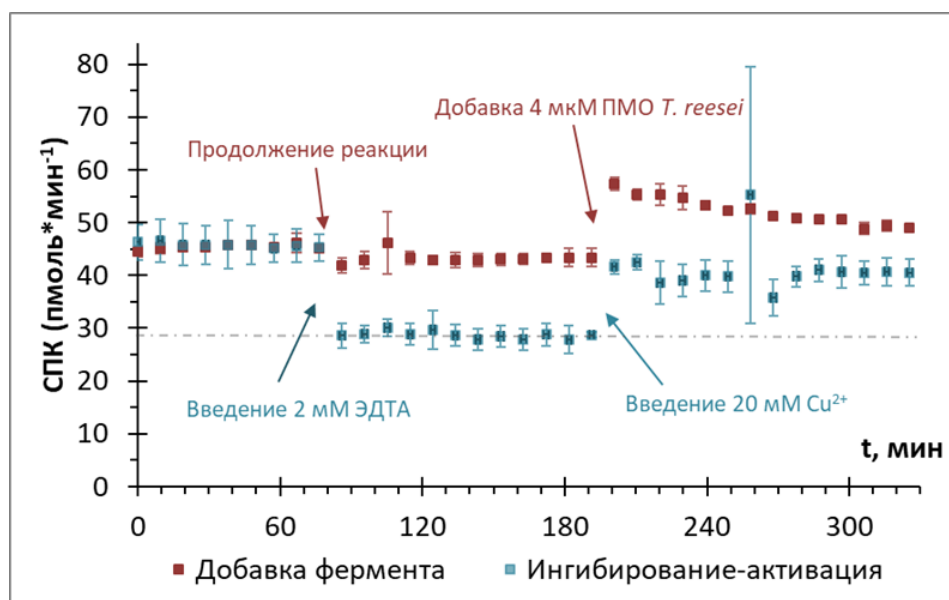


Рис. 3 - График зависимости СПК при деструкции аморфной целлюлозы (4 мг/мл) под действием ПМО *T. reesei* (4 мкМ) в присутствии 0,4 мМ аскорбиновой кислоты, pH 5,0, 37°C . Время введения 2 мМ ЭДТА – 80 мин, 20 мМ CuSO_4 (либо дополнительной порции фермента) – 198 мин. Серой пунктирной линией изображено изменение скорости потребления кислорода в фоновом образце (субстрат + аскорбиновая кислота).

С помощью описанного выше метода мониторинга катализируемой ПМО реакции по СПК нам удалось в режиме реального времени осуществить контроль как за инактивацией фермента под действием ЭДТА, так и его последующей реактивацией путем введения в реакционную смесь избытка ионов Cu^{2+} (рис. 3, данные, показанные голубым цветом). На рис. 3 также показано (данные, отображенные коричневым цветом), как влияет добавка дополнительной дозы ПМО на СПК в ферментативной реакции.

pH-Оптимумы активности ПМО. С помощью метода измерения СПК при действии ПМО на аморфную целлюлозу было изучено влияние pH на активность выделенных ферментов. ПМО *T. terrestris* и *M. thermophila* проявляли наибольшую активность в нейтральной среде (при pH 7,0), тогда как ПМО *T. reesei* – в слабощелочной области pH (при pH 8,0). Однако, поскольку при биотехнологическом применении ПМО предполагается их использовать в качестве добавок к целлюлазным препаратам, а pH-оптимумы гидролитической активности грибных целлюлаз (в том числе из *P. verruculosum* и *T. reesei*) находятся в диапазоне pH 4,5-5,5, дальнейшие исследования, касающиеся действия ПМО, мы проводили при pH 5,0. Исследуемые ПМО проявляли при этом значении pH от 30 до 70% своей максимальной активности.

Влияние различных доноров электронов на ΔСПК. Прямые подходы определения окислительно-восстановительного потенциала ПМО не дают результатов из-за низкой скорости ферментативной реакции. Однако мы сравнили возможность использования различных химических соединений, характеризующихся различным окислительно-восстановительным потенциалом, в качестве донора электронов для ПМО *T. terrestris* при ее действии на аморфную целлюлозу. На рис. 4 приведены полученные значения ΔСПК, а также по вспомогательной оси отложены окислительно-восстановительные потенциалы исследуемых соединений. Из полученных данных видно, что скорость ферментативной реакции не коррелирует с окислительно-восстановительным потенциалом химического соединения. Максимальная активность фермента была зарегистрирована при использовании в качестве донора электронов аскорбиновой кислоты. Для некоторых соединений заметного изменения концентрации растворенного кислорода зафиксировано не было, либо данные по ΔСПК были сравнимы с погрешностью эксперимента; в таком случае активность ПМО отображена на рис. 4 как нулевая. Однако заметная активность ПМО по данным СПК была также обнаружена при использовании 2,5-диметил-*n*-бензохинона, эллаговой и галлиевой кислоты. Эти результаты согласуются с литературными данными (Frommhagen et al., 2016), согласно которым наряду с аскорбиновой кислотой наибольшие выходы окисленных сахаров в случае трех различных ПМО из *M. thermophila* получали при использовании в качестве донора электронов соединений на основе бензоди- и бензотриолов. Стоит также отметить, что эти соединения схожи по строению со структурными элементами лигнина.

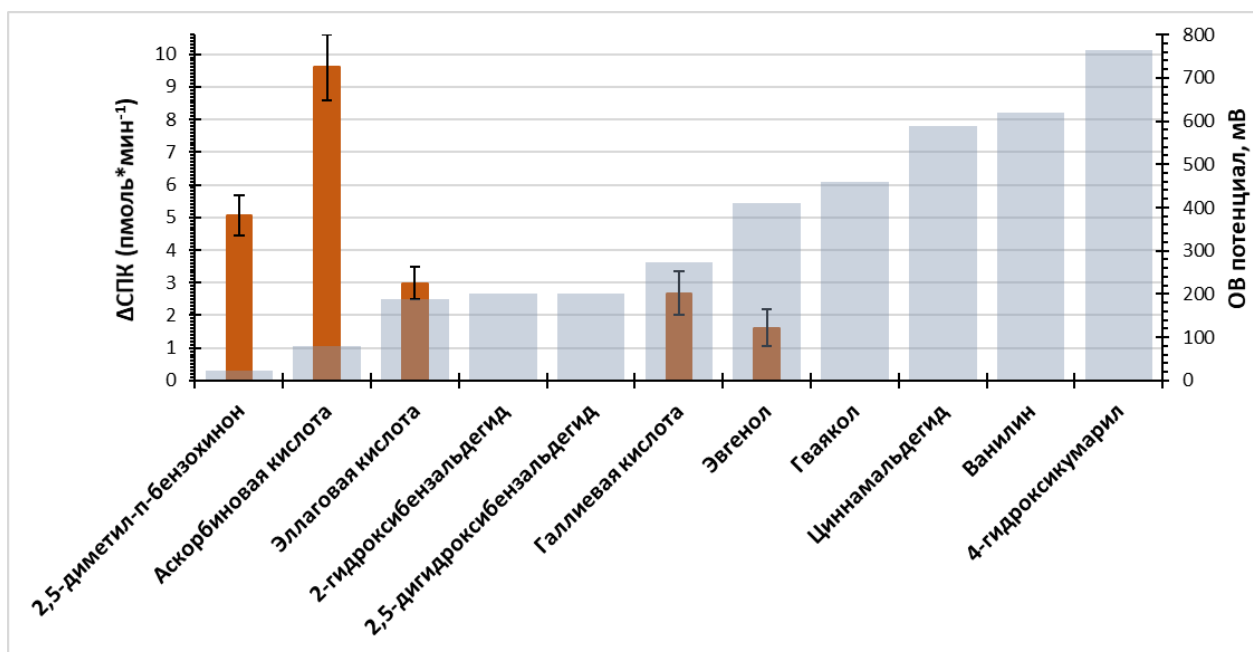


Рис. 4 - Влияние различных химических соединений (0,4 мМ) на ΔСПК в ферментативной реакции расщепления аморфной целлюлозы под действием ПМО *T. terrestris*, pH 5,0, 37°C. Оранжевым цветом показаны значения ΔСПК, серым цветом показаны окислительно-восстановительные потенциалы соединений.

3. Температурная стабильность ПМО

Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) была определена термостабильность исследуемых ПМО в 10%-ном Полибуфере 96 (pH 7,0) при концентрации белка 0,7-0,9 мг/мл. Все выделенные ферменты являлись достаточно термостабильными. Для рекомбинантной ПМО *T. terrestris* температура плавления составила 82,2°C, что на 2,6°C выше, чем для нативного фермента из *M. thermophila* (79,6°C). Для рекомбинантной ПМО *T. reesei* температура плавления составила 70,1°C. Подобная разница с двумя первыми ферментами закономерна, так как *T. terrestris* и *M. thermophila* являются термофильными микроорганизмами в отличие от мезофильного гриба *T. reesei*.

Поскольку ионы меди, находящиеся в активном центре ПМО, могут стабилизировать белковую глобулу за счет координации с аминокислотными остатками, также была исследована температурная стабильность инактивированных с помощью ЭДТА ПМО *T. reesei* и *T. terrestris*. При проведении данного эксперимента исследуемые ферменты (как исходные формы, так и формы белков, из которых были удалены ионы меди) растворяли не в буферном растворе, а в воде. Замена буфера на воду для активных форм ферментов привела к небольшому снижению температуры плавления лишь в случае ПМО *T. terrestris* (на 0,3°C). Удаление меди из активного центра ПМО привело не только к потере активности ферментов, как было показано выше, но и к уменьшению термостабильности белков (рис. 5). Для ПМО *T. terrestris* и *T. reesei* температура плавления после удаления Cu^{2+} понизилась на 19,4 и 7,6°C, соответственно, и в итоге составила 62,5°C для обоих ферментов, что может свидетельствовать о том, что

конформационные изменения и денатурация различных ПМО при повышении температуры происходят по схожему механизму. Таким образом, ион Cu^{2+} принимает участие в стабилизации белка помимо функционирования в качестве каталитического центра.

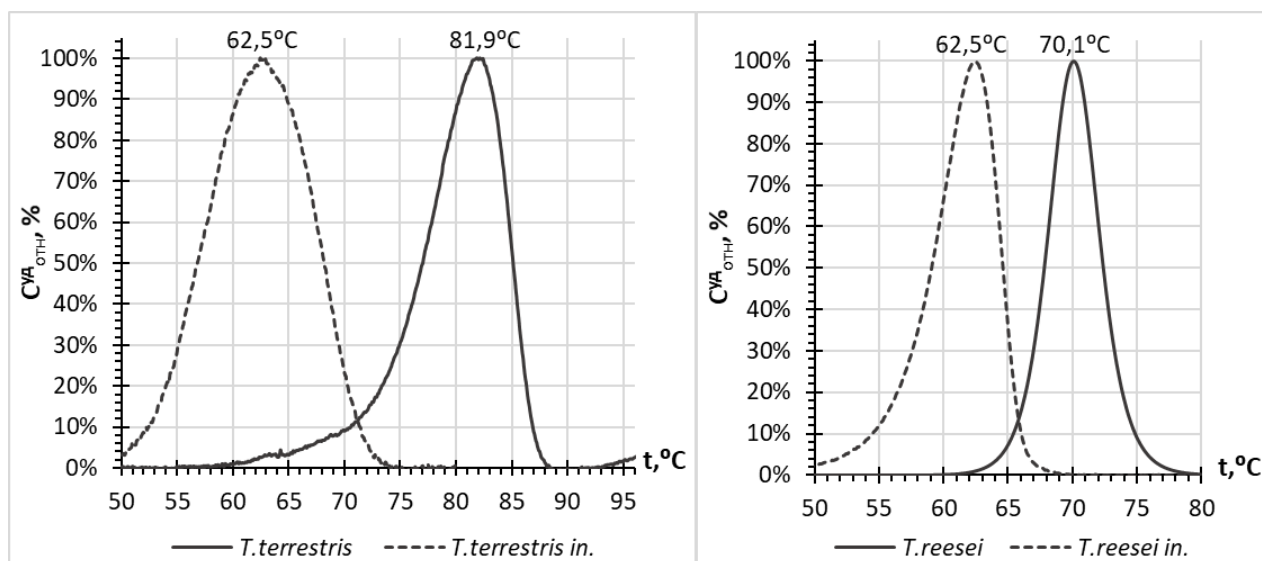


Рис. 5 - Графики зависимости относительной избыточной удельной теплоемкости ПМО в зависимости от температуры в сравнении с инактивированными (in.) формами ферментов, из активного центра которых с помощью ЭДТА был удален ион Cu^{2+} . Сверху, над соответствующими пиками, приведены температуры фазовых переходов белков.

4. Анализ продуктов деструкции целлюлозы под действием ПМО

Как известно из литературных данных, при деструкции целлюлозы ПМО расщепляют β -1,4-связь полимера, окисляя глюкозидный остаток либо по C1, либо по C4 атому углерода с образованием альдоновой кислоты (ее лактона) или 4-кето-альдозы, соответственно. В процессе ферментативной реакции в раствор могут высвобождаться как окисленные, так и нейтральные олигосахариды.

На рис. 6 приведена хроматограмма продуктов деструкции целлюлозы под действием ПМО *T. terrestris*, полученная с помощью анионообменной хроматографии высокого разрешения (НРАЕС) на колонке CarboPac PA100 (Dionex, США). Среди растворимых продуктов были обнаружены окисленные по C1 атому глюкозидного остатка олигосахариды в форме альдоновых кислот на конце (G1A, Glc₂G1A и Glc₄G1A), а также глюкоза и ряд нейтральных целлоолигосахаридов (от целлобиозы до целлопентаозы).

В образцах для ПМО *T. reesei* и *M. thermophila* из окисленных продуктов были идентифицированы G1A, Glc₂G1A и Glc₃G1A. Данные образцы характеризовались относительно высоким выходом глюкозы. Помимо глюкозы в реакционной смеси были найдены целлобиоза, целлотриоза и целлопентаоза, однако в меньших количествах по сравнению с ПМО *T. terrestris*.

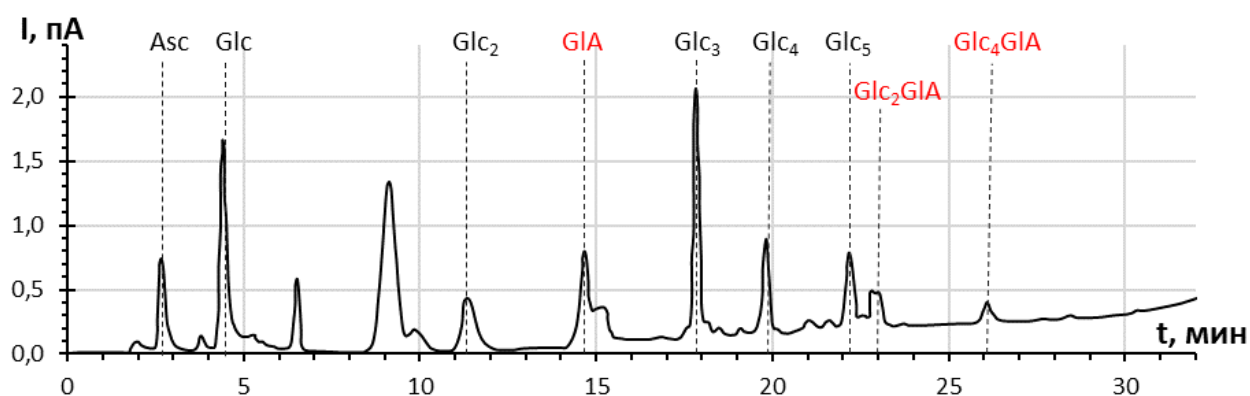


Рис. 6. НРАЕС хроматограмма продуктов деструкции аморфной целлюлозы под действием ПМО *T. terrestris*. Черными пунктирными линиями обозначены нейтральные олигосахариды, а серыми – идентифицированные окисленные олигосахариды, отмеченные красным цветом. Asc – аскорбиновая кислота, Glc – глюкоза, Glc_n – целлоолигосахарид из n звеньев, GlA – остаток альдоновой кислоты.

На хроматограммах продуктов деструкции целлюлозы под действием исследуемых ПМО также имелись неидентифицированные пики, вероятно соответствующие окисленным по С4 атому углерода сахарам (идентификация продуктов в форме 4-кето-альдоз не представлялась возможной из-за отсутствия хроматографических стандартов для них), при этом интенсивность таких пиков была выше в случае ПМО *T. reesei* и *M. thermophila*.

Анализ продуктов деструкции целлюлозы с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии подтвердил результаты, полученные методом НРАЕС (масс-спектрометрические данные приведены в диссертации). В пробах для всех трех изучаемых ПМО были обнаружены те же соединения, что были идентифицированы хроматографическим методом. Дополнительно в масс-спектрах были обнаружены пики, соответствующие по массе олигосахаридам, окисленным по С4-атому углерода. Например, в образце для ПМО *T. reesei* был обнаружен пик с m/z 525.2, соответствующий олигосахариду 4-кето-Glc₃, а в образце для ПМО *M. thermophila* были обнаружены пики, соответствующие олигосахаридам 4-кето-Glc₂ и 4-кето-Glc₃GlA. Эти данные подтверждают то, что ПМО из *T. reesei* и *M. thermophila* при воздействии на целлюлозу могут осуществлять окисление как по С1, так и по С4 атому глюкозидного остатка. Однако, поскольку МАЛДИ масс-спектрометрия позволяет проводить только качественный анализ продуктов, сделать вывод о том, по какому атому (С1 или С4) эти ПМО предпочтительно атакуют остаток полимерной цепи целлюлозы, не представлялось возможным.

5. Взаимодействие ПМО с очищенными целлюлазами (ЦБГ и ЭГ)

Целлобиогидролазы (ЦБГ) и эндоглюканазы (ЭГ) являются основными компонентами ферментных препаратов для деструкции ЦСС. ЦБГ, в зависимости от их принадлежности к 7-му или 6-му семейству гликозилгидролаз, атакуют цепь целлюлозы либо с восстанавливающего (ЦБГ I), либо с невосстанавливающего

(ЦБГ II) конца. Таким образом, возможные сайты окисления целлюлозы под действием ПМО могут сказываться и на эффективности действия ЦБГ.

Мы исследовали осахаривающую способность смесей ЦБГ I и ЦБГ II *T. reesei* (все перечисленные в этом разделе целлюлазы и БГЛ были взяты из лабораторной коллекции очищенных ферментов) с каждой из трех выделенных ПМО. Во избежание ингибирования ЦБГ продуктом их действия (целлобиозой) в реакционную смесь дополнительно вносили очищенную БГЛ *A. niger*, которая катализирует гидролиз целлобиозы до глюкозы. В качестве донора электронов использовали ЦДГ1 *M. thermophila* в эквимольном ПМО количестве. Результаты экспериментов приведены на рис. 7.

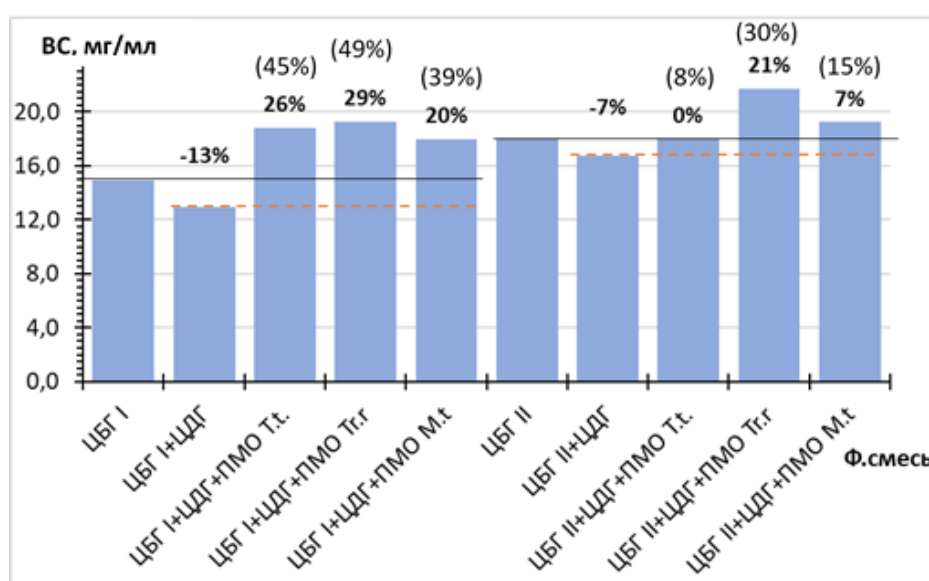


Рис. 7 - Выходы восстанавливающих сахаров (ВС) при гидролизе МКЦ под действием ЦБГ I или ЦБГ II через 48 ч ферментативной реакции в отсутствие и в присутствии ПМО. Концентрации: МКЦ – 50 мг/мл, ЦБГ – 0,05 мг/мл, БГЛ – 0,005 мг/мл, ПМО – 0,4 мкМ, ЦДГ – 0,4 мкМ, 50°C, pH 5,0. Цифры над барами показывают увеличение выхода ВС в % относительно контроля «ЦБГ I без ЦДГ» и в скобках – относительно контроля «ЦБГ I + ЦДГ».

ЦДГ сама по себе отрицательно влияла на выход ВС, поскольку образующаяся при гидролизе целлобиоза частично окислялась под действием данного фермента. Но совместная добавка ПМО и ЦДГ приводила к увеличению выхода сахаров. Так, при взаимодействии ЦБГ I с ПМО *T. terrestris* и *M. thermophila* увеличение выхода сахаров относительно контроля «ЦБГ I без ЦДГ» составило 26 и 20% (45 и 39% относительно контроля «ЦБГ I + ЦДГ»). ПМО *T. reesei* усиливала действие обеих ЦБГ в наибольшей степени: с ЦБГ I – на 29% (49%), а с ЦБГ II – на 21% (30%).

При исследовании взаимодействия ПМО с ЭГ I и ЭГ II *P. verruculosum* полученные данные для разных ПМО оказались более разнородными. При взаимодействии ПМО и ЭГ I увеличение выхода сахаров достигало в максимальном случае (для ПМО *T. reesei*) 12% (69%), а при взаимодействии ПМО и ЭГ II

варьировало от 14 до 84% (от 229 до 430%) относительно контролей ЭГ в отсутствие (в присутствии) ЦДГ.

Из результатов этих экспериментов следует, что ПМО проявляют эффекты синергизма как с ЭГ, так и с ЦБГ, что делает их применение в составе целлюлазных комплексов для деструкции ЦСС многообещающим.

6. Влияние доноров электронов различной природы на деструкцию целлюлозы под действием целлюлазного комплекса в присутствии ПМО

Мы сравнили влияние на выход сахаров при гидролизе МКЦ под действием целлюлазного комплекса *P. verruculosum* (PV) в присутствии ПМО донора электронов химической природы – галлиевой кислоты (ГК) с донором электронов биологической природы – ферментом ЦДГ1 *M. thermophila*, при этом концентрация ГК составляла 10 мМ (данная концентрация была оптимальной в условиях реакции по данным предварительных экспериментов), а ЦДГ использовали в эквимольном количестве относительно ПМО.

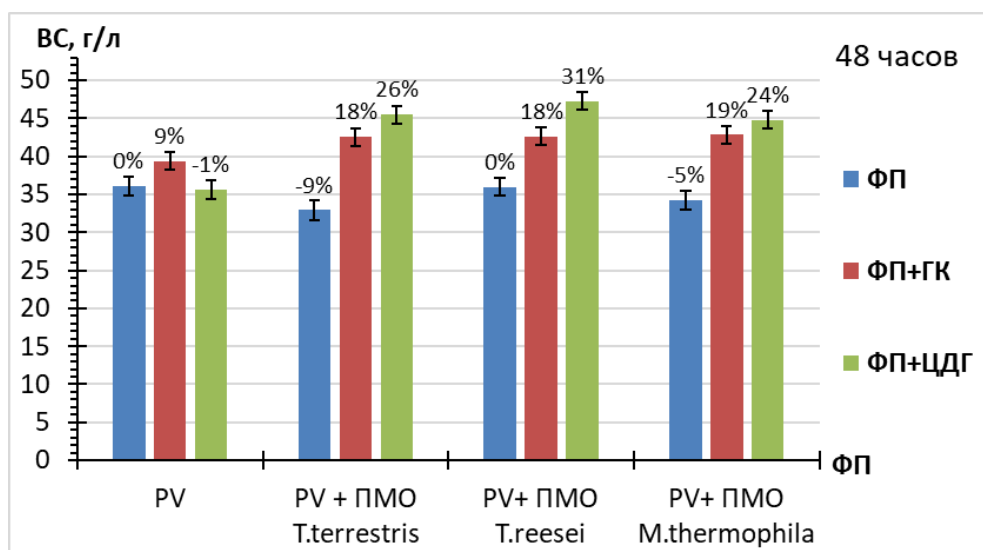


Рис. 8 - Выходы ВС через 48 ч ферментативного гидролиза МКЦ, 50°C, pH 5,0.

Концентрация субстрата – 100 мг/мл, целлюлазного препарата – 0,5 мг/мл. В опытах с ПМО 10% целлюлазного препарата по белку заменяли очищенной ПМО. [ГК] = 10 мМ, [ЦДГ] = 2,1 мкМ. Цифры над барами диаграммы означают прирост (убыль) выхода сахаров относительно PV без донора электронов.

После 48 ч гидролиза для всех ПМО добавка ЦДГ приводила к более высоким выходам сахаров по сравнению с ГК (рис. 8). Выходы продукта в случае добавок ПМО *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila* совместно с ЦДГ были выше на 26, 31 и 24%, чем в контроле (PV без донора электронов – левый синий бар). По-видимому, это было связано с тем, что в отличие от донора электронов химической природы (ГК), ЦДГ не расходовалась в ходе реакции, а её активность сохранялась на протяжении всей ферментативной реакции. Следует отметить, что в образцах серии PV (три левых бара на рис. 8) добавка ГК сама по себе увеличивала выход ВС (на 9%). Это может свидетельствовать о наличии некоторого количества собственной ПМО в составе ферментного препарата *P. verruculosum*.

Таким образом, при длительных временах гидролиза целлюлозы под действием целлюлазного комплекса с добавкой ПМО использование фермента – ЦДГ1, как донора электронов, оказалось эффективнее химического агента (ГК). Необходимо также отметить, что фермент ЦДГ часто является одним из компонентов культуральной жидкости грибных продуцентов целлюлаз. В таком случае не требуется проводить дополнительных работ по внедрению генов данного фермента в эти продуценты.

7. Получение штамма, осуществляющего экспрессию ПМО *T. reesei* под контролем промотора гена *gla1*, и изучение свойств ферментного препарата

С целью увеличения выхода сахаров в процессе ферментативной деструкции ЦСС содержание ПМО в мультиферментном целлюлазном препарате не должно превышать 10%, как показывает анализ литературы и наши данные. При этом введение ПМО в целлюлазный комплекс не должно нарушать его целостность и сбалансированность. Для этих целей в нашей лаборатории была разработана система экспрессии на основе индуцибельного промотора гена глюкоамилазы *gla1* гриба *P. verruculosum*. Её применение позволяет вводить в культуральную жидкость ферменты, не нарушая в целом базовую секрецию целлюлаз, обеспечивающую эффективность ферментного препарата. Для данной цели была выбрана ПМО *T. reesei*, ввиду того, что данный фермент обладал большей активностью в сравнении с другими исследуемыми ПМО, и при его применении в смеси с PV были достигнуты наибольшие выходы сахаров.

Клонирование гена ПМО *T. reesei* и получение ферментного препарата. Участок генома штамма *P. verruculosum* (код в базе данных GenBank KY086000), состоящий из 3924 пар оснований и содержащий промоторную область гена *gla1* и сам ген *gla1*, был клонирован в лабораторный вектор pUC-LIC. Для генерации LIC-сайтов вектор pUC-LIC был вначале линейаризован с помощью экзонуклеазы рестрикции BseR1, а затем обработан Т4-ДНК полимеразой с добавкой dGTP. Вставка также обрабатывалась Т4-ДНК полимеразой, однако в присутствии dCTP. В результате лигирования была получена плаزمиды pGA-GA (рис. 9). Далее методом ПЦР в плазмиду pGA-GA были введены новые LIC-сайты, Upper-LIC и Lower-LIC, для клонирования любой вставки методом независимого лигирования. Таким образом, в составе линейного вектора pGA присутствовал промотор гена *gla1* и новые LIC-сайты. Далее ген *cel61A*, кодирующий ПМО *T. reesei*, амплифицировали и лигировали в вектор pGA. В результате была получена плазмиды pGA-EGIV, содержащая ген *cel61A* под контролем промотора гена *gla1*.

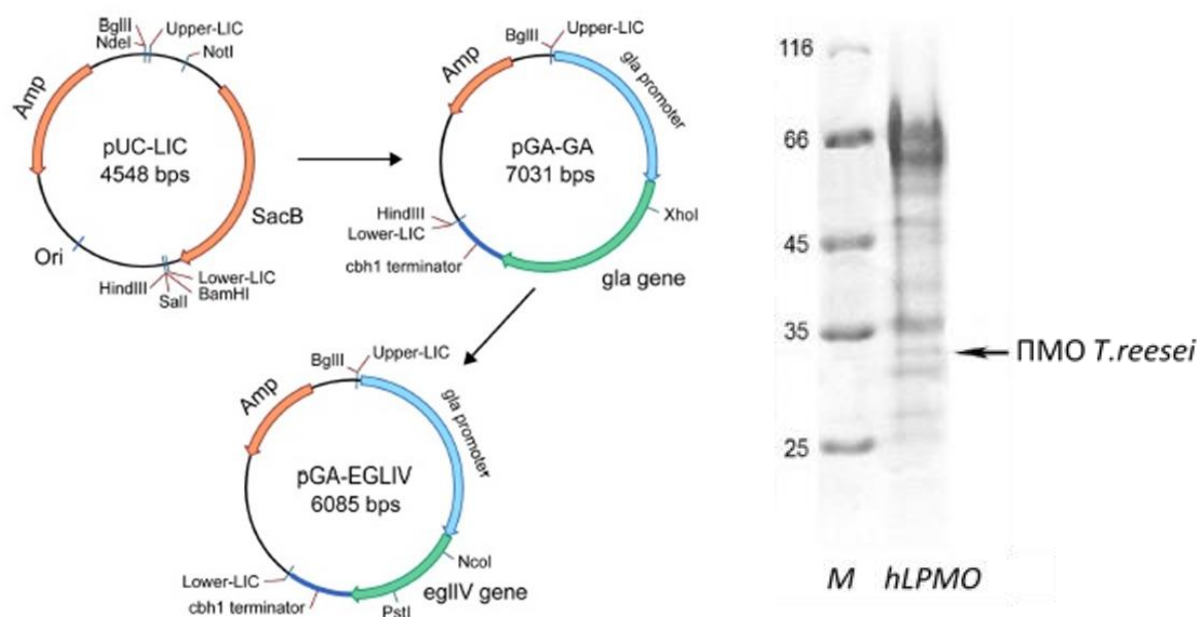


Рис. 9 - Схема получения плазмиды pGA-EGIV (слева) и Ds-Na-ПААГ-электрофорез препарата hLPMO (справа).

Полученная плазмида pGA-EGIV была котрансформирована с плазмидой pSTA10 в соотношении 10:1 в реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537, ауксотрофный по нитрат-редуктазе (*niaD*⁻). Плазмида pSTA10 содержала ген нитрат-редуктазы, который позволяет проводить отбор трансформантов на среде, содержащей нитрат натрия в качестве единственного источника азота. В результате на селективной среде выросло более 200 трансформантов. Скрининг трансформантов на наличие целевого гена проводили методом ПЦР, используя Phire Hot StartII ДНК полимеразу. Отобранные после ПЦР-скрининга трансформанты культивировали в колбах Эрленмейера на среде из пшеничной муки, содержащей крахмал – индуктор для гена *gla1*, и МКЦ. Ферментацию проводили в течение 6 суток при температуре 30°C при перемешивании со скоростью 220 об/мин. По завершении культивирования только 4 клона экспрессировали целевой белок. В результате был отобран один клон, который, согласно интенсивности полос на электрофореграмме, экспрессировал наибольшее количество ПМО *T. reesei*. Им оказался 21-й клон, которому для дальнейшей работы было присвоено имя hLPMO. На рис. 9 показана электрофореграмма белков из соответствующей культуральной жидкости в ПААГ. ПМО *T. reesei* соответствует полоса массой около 33 кДа. После обработки белка из данной полосы трипсином в масс-спектре гидролизата были обнаружены 6 пиков, соответствующих по массе теоретическим триптическим пептидам из целевого белка. Степень покрытия аминокислотной последовательности составила 30%, что позволило заключить, что данный белок действительно является ПМО *T. reesei*. Содержание ПМО в ферментном препарате составило около 3%, при этом базовая часть ферментного комплекса исходного штамма *P. verruculosum* в целом сохранилась.

Осахаривающая способность нового ферментного препарата. Коллегами по лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН с использованием той же экспрессионной системы на основе промотора гена *gla1* был получен препарат hBGL2, который гетерологично экспрессирует БГЛ *A. niger*. Количество БГЛ в этом ферментном препарате, аналогично ПМО, было сравнительно небольшим (около 10%), при этом в целом сохранился базовый целлюлазный комплекс. Были проведены эксперименты по осаживающей способности ЦСС препаратами hBGL2, hLPMO, а также их смесью. В качестве контролей использовали ферментные препараты на основе исходного штамма *P. verruculosum* B1-537, выращенного на той же среде с пшеничной мукой (препарат PVC1), что и в случае hBGL2 и hLPMO, а также на стандартной среде для данного продуцента, содержащей МКЦ без муки – препарат PVC2.

Концентрация глюкозы при гидролизе измельченной осиновой древесины препаратом hLPMO через 48 ч составила 42 г/л, что выше на 43 и 10% концентрации продукта для контрольных препаратов PVC1 и PVC2 (рис. 10), однако несколько ниже показателя для препарата hBGL2. При использовании же смеси hLPMO с hBGL2 (1:1) при сохранении общей дозировки ферментов по белку концентрация глюкозы достигла 59 г/л, что на 13% выше, чем для препарата hBGL2, на 56% выше, чем для контрольного препарата PV2, и в 2 раза выше, чем для контрольного препарата PV1.

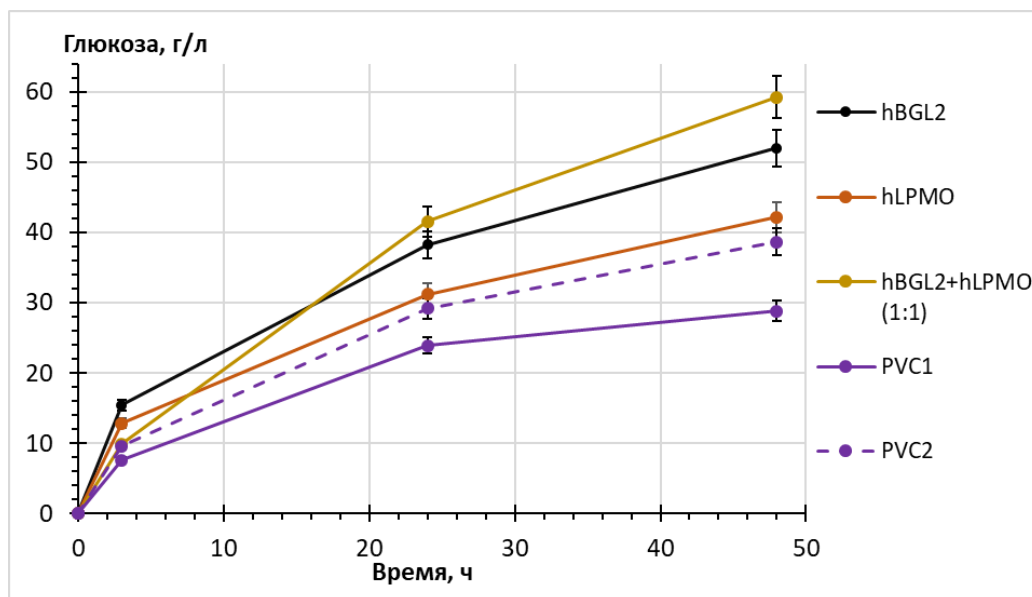


Рис. 10 - Кинетические кривые накопления глюкозы при ферментативном гидролизе измельченной осиновой древесины, 50°C, pH 5,0. Концентрация субстрата 100 мг/мл, концентрация ФП - 0,5 мг/мл.

Таким образом, синергетический эффект от введения двух гетерологично экспрессируемых ферментов (ПМО и БГЛ) в состав целлюлазного комплекса оказался при гидролизе лигноцеллюлозного субстрата выше, чем от введения какого-либо одного из этих ферментов. Важно подчеркнуть, что использование относительно слабого промотора гена *gla1* для экспрессии указанных ферментов

позволило сохранить в целом базовый уровень экспрессии ключевых целлюлаз, что и привело к заметному росту эффективности препаратов при гидролизе ЦСС.

8. Получение и свойства химерной ПМО-ЦСМ

Молекулы многих целлюлаз содержат, помимо каталитического домена, присоединенный к нему через пептидный линкер целлюлозосвязывающий модуль (ЦСМ), в функцию которого входит адсорбция фермента на поверхности нерастворимой целлюлозы, предшествующая собственно каталитическому акту. При катализе целлюлазами гидролитического типа действия наличие ЦСМ существенно увеличивает их активность по отношению к целлюлозным субстратам по сравнению с их каталитическими модулями, лишенными ЦСМ. Большинство известных ПМО не имеют в своей структуре ЦСМ, однако есть и такие, которые обладают ЦСМ, однако достоверные данные о том, как ЦСМ влияет на их активность, практически отсутствуют в научной литературе. Выше было показано, что ПМО *T. reesei* проявляет более высокую активность по отношению к целлюлозе по данным СПК, а также при комплексном гидролизе ЦСС по сравнению с ПМО *T. terrestris* и *M. thermophila*. Мы предположили, что это связано с наличием в структуре ПМО *T. reesei* ЦСМ, которого лишены другие ПМО из данного исследования. Таким образом, было решено сконструировать химерный белок, состоящий из ПМО *T. terrestris*, к С-концу которого через линкер присоединен ЦСМ от ЦБГ I *P. verruculosum*, исследовать свойства химерной ПМО-ЦСМ, а также изучить ее влияние на деструкцию ЦСС в составе целлюлазного препарата.

Генетическая инженерия и экспрессия химерного белка. На первом этапе были амплифицированы полинуклеотидные последовательности, соответствующие областям генов *eglE* (784 п.о.) и *cbhI_{cbd}* (186 п.о.), кодирующих ПМО *T. terrestris* и ЦСМ ЦБГ I *P. verruculosum* с линкерной областью. Далее выделенные ПЦР-фрагменты были использованы в качестве матрицы в ПЦР для получения полноразмерного гена, кодирующего химерный белок ПМО-ЦСМ. Далее полученный ПЦР-фрагмент, размером 970 п.о., обрабатывали Т4-ДНК полимеразой для генерации «липких концов» и смешивали с вектором pUC-SВНІ в соответствии с методом независимого лигирования. После трансформации в компетентные клетки *E. coli* MachI и наработки генетического материала по результатам секвенирования плазмид была отобрана одна, не содержащая нуклеотидных замен.

Полученная плазида была котрансформирована с плазмидой pSTA10 в лабораторный штамм-реципиент В1-537, ауксотрофный по нитрат-редуктазе. По результатам ПЦР скрининга получили 24 трансформанта, содержащих целевой ген. После 6 суток ферментации отобранных трансформантов в колбах Эрленмейера на стандартной среде при 30°C при скорости перемешивании 220 об/мин получили только 6 клонов, секретирующих нужный белок в составе культуральной жидкости. Из этих трансформантов был выбран один, секретирующий наибольшее количество целевого белка. Далее проводили повторную ферментацию данного клона для последующего выделения химерной ПМО-ЦСМ.

С помощью анионообменной хроматографии на колонке MonoQ и гидрофобной хроматографии на колонке Source 15Iso была выделена в гомогенном состоянии химерная ПМО-ЦСМ (рис. 11). Молекулярная масса химерного белка составила около 30 кДа, что соответствует теоретической сумме масс ПМО *T. terrestris* и ЦСМ от ЦБГ I *P. verruculosum* с линкером (30,3 кДа).

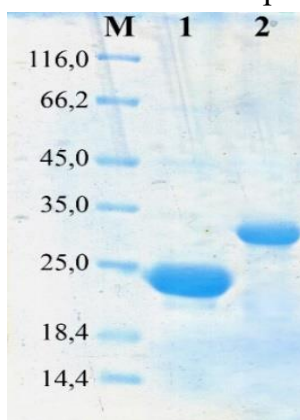


Рис. 11 - Ds-Na-ПААГ-электрофорез исходной ПМО *T. terrestris* (1) и химерной ПМО-ЦСМ (2).

Идентификацию химерной ПМО-ЦСМ проводили методом пептидного картирования с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии. При анализе масс-спектра трипсинового гидролизата белка из соответствующей полосы геля было обнаружено 10 пептидов, массы которых совпадали с теоретическими, рассчитанными с помощью программы PeptideMass (https://web.expasy.org/peptide_mass/). Степень покрытия аминокислотной последовательности идентифицированными пептидами составила 49%, что позволило заключить о том, что был выделен целевой белок.

Влияние присоединения ЦСМ на свойства ПМО. Присоединение к ПМО *T. terrestris* ЦСМ от ЦБГ I прежде всего должно было повлиять на связывание фермента с целлюлозой. Поэтому исследовали адсорбционную способность различных ПМО, а также ЦБГ I *P. verruculosum* на целлюлозе. Данные по степени адсорбции исследуемых ферментов представлены в табл. 2.

Таблица 2 - Степень адсорбции ферментов (0,8 мг/мл) на МКЦ (25 мг/мл), 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0, 6°C, 30 мин.

Фермент	ЦБГ I <i>P. verruculosum</i>	ПМО <i>T. terrestris</i>	ПМО- ЦСМ	ПМО <i>T. reesei</i>	ПМО <i>M. thermophila</i>
Степень адсорбции	79 ± 5%	46 ± 4%	92 ± 5%	84 ± 4%	49 ± 4%

Из данных таблицы видно, что схожие по строению ПМО *T. terrestris* (исходная) и *M. thermophila*, у которых ЦСМ отсутствует, обладают близкой и относительно невысокой адсорбционной способностью, не превышающей 50%. Для ПМО *T. reesei*, обладающей ЦСМ, данный показатель составил 84%, что сравнимо с адсорбционными характеристиками других целлюлаз, в том числе ЦБГ I *P. verruculosum* (табл. 2). Как и следовало ожидать, присоединение к ПМО *T. terrestris*

ЦСМ привело к существенному увеличению адсорбционной способности фермента (в 2 раза).

В результате присоединения ЦСМ ΔСПК для ПМО *T. terrestris* при воздействии на аморфную целлюлозу возросла с 9,6 до 11,9 пмоль/мин (рис. 12), приблизившись к таковой для ПМО *T. reesei*, исходно обладающей ЦСМ.

Исследование субстратной специфичности ферментов показало, что ПМО *T. reesei*, помимо активности по отношению к целлюлозе, обладала сравнимой активностью по ксилотригексозану, однако не действовала на ксилан, КМЦ и β-глюкан (рис. 12). Исходная ПМО из *T. terrestris* также обладала небольшой активностью по отношению к ксилотригексозану и относительно высокой активностью по β-глюкану, тогда как не проявляла активности по ксилану и КМЦ. Однако в результате присоединения ЦСМ химерный фермент приобрел способность расщеплять ксилан и КМЦ, а его активность по отношению к ксилотригексозану при этом возросла на порядок и превысила таковую для ПМО из *T. reesei*.

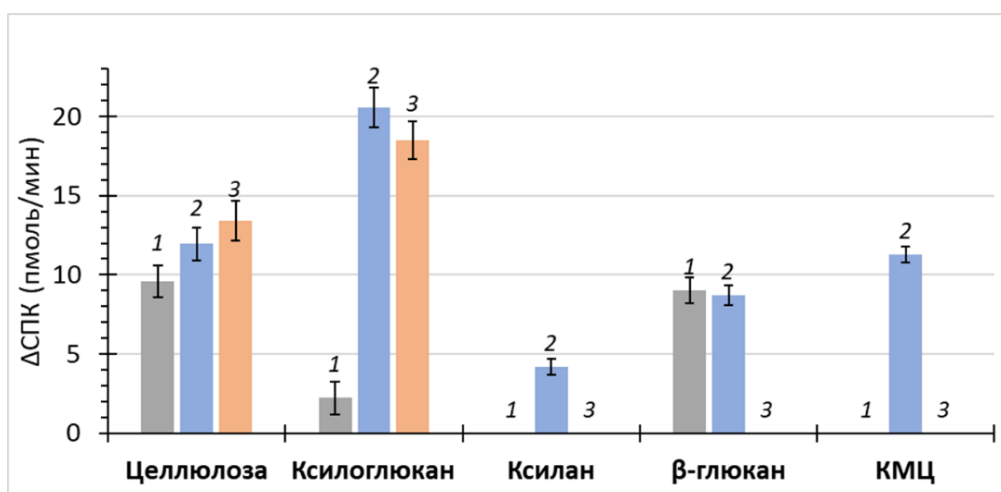


Рис. 12 - Активность (ΔСПК) ПМО (8 мкМ) при действии на полисахаридные субстраты (4 мг/мл) в присутствии 0,5 мМ аскорбиновой кислоты.
1 – ПМО *T. terrestris*; 2 – химерная ПМО-ЦСМ; 3 – ПМО *T. reesei*.

Таким образом, присоединение ЦСМ к ПМО *T. terrestris* привело не только к увеличению её активности по отношению к целлюлозе, но и расширило субстратную специфичность фермента, что открыло ряд перспектив для изучения влияния химерной ПМО-ЦСМ на комплексную деструкцию природных видов растительного сырья, состоящего из различных полисахаридов.

Влияние химерной ПМО-ЦСМ на комплексную деструкцию ЦСС. В качестве исходного ферментного препарата при исследовании влияния химерной ПМО-ЦСМ на комплексную деструкцию ЦСС (МКЦ и измельченной осиновой древесины) был выбран один из наиболее эффективных лабораторных целлюлазных препаратов – hBGL2 (см. выше). Изучение влияния добавки ПМО-ЦСМ на осахаривающую способность hBGL2 проводили в сравнении с исходной ПМО *T. terrestris*, а также с ПМО *T. reesei*, имеющей собственный ЦСМ.

При гидролизе осиновой древесины максимальная концентрация восстанавливающих сахаров (ВС) достигала 49,0–49,6 г/л (рис. 13а). Однако в случае применения химерной ПМО-ЦСМ данный показатель был достигнут за 24 ч, тогда как в случае добавки ПМО *T. reesei* сравнимый выход продуктов был получен лишь через 48 ч гидролиза. На отметке 24 ч в случае добавки ПМО-ЦСМ концентрация ВС была выше на 47%, чем для препарата hBGL2 без добавки ПМО, тогда как в случае добавки исходной ПМО *T. terrestris* и ПМО *T. reesei* прирост выхода ВС относительно hBGL2 был меньше – соответственно 23 и 32% (рис. 13б).

Таким образом, увеличение активности и расширение субстратной специфичности ПМО *T. terrestris* за счет присоединения ЦСМ привело к существенному приросту выхода сахаров при комплексном ферментативном осахаривании ЦСС и позволило сократить время процесса до двух раз.

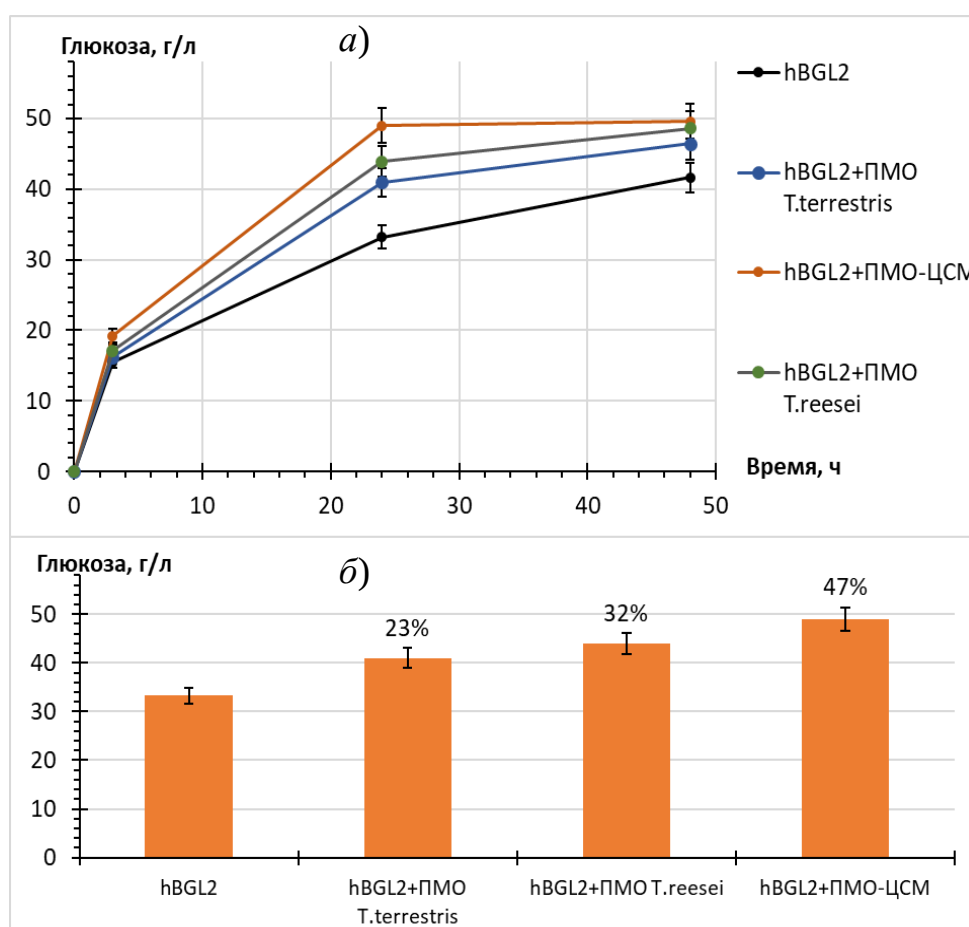


Рис. 13 - Кинетические кривые накопления ВС (а) и выходы ВС через 24 ч (б) при осахаривании измельченной осиновой древесины (80 мг/мл) препаратом hBGL2 в отсутствие и в присутствии ПМО, 50°C, pH 5,0. Общая концентрация ферментов – 0,5 мг/мл. В опытах с ПМО 10% hBGL2 заменяли очищенной ПМО. Цифры над барами показывают прирост выхода ВС относительно hBGL2.

ВЫВОДЫ

1. С помощью хроматографических методов выделены в гомогенном состоянии три литические полисахаридмонооксигеназы (ПМО) из аскомицетов *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* и *Myceliophthora thermophila*. Первые два фермента представляли собой рекомбинантные белки, гетерологично экспрессированные грибом *Penicillium verruculosum*, тогда как третий фермент являлся нативной ПМО, секретируемой *M. thermophila*.
2. Разработан метод измерения активности ПМО по скорости потребления кислорода в реакционной смеси с помощью высокочувствительных флуоресцентных сенсоров на кислород, используемых в анализаторе Seahorse XFp (Agilent, США). С помощью этого метода определены кинетические параметры (число оборотов) действия выделенных ПМО на аморфную целлюлозу в присутствии аскорбиновой кислоты в качестве донора электронов, а также pH-оптимумы действия ферментов (pH 7,0–8,0). В режиме реального времени исследована инактивация ПМО под действием ЭДТА с последующим восстановлением активности фермента путем введения в реакционную смесь избытка ионов Cu^{2+} .
3. Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии определена температурная стабильность выделенных ПМО. Для ПМО *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila* температура плавления составила 82,2; 70,1 и 79,6°C, соответственно. Показано, что после извлечения атома меди из активного центра ПМО с помощью ЭДТА температура плавления белка существенно снижается.
4. Показано, что при действии на целлюлозные субстраты ПМО проявляют синергизм как с индивидуальными целлюлазами (целлобиогидролазами и эндоглюканазами), так и с целлюлазным комплексом в целом. При гидролизе целлюлозных субстратов замена 10% целлюлаз в составе мультиферментного препарата на соответствующее количество ПМО приводит к увеличению выхода глюкозы и восстанавливающих сахаров до 30%.
5. Получен новый штамм-продуцент гриба *P. verruculosum*, секретирующий под контролем промотора гена глюкоамилазы гетерологичную ПМО *T. reesei* при сохранении в целом базового состава целлюлазного комплекса. Установлено, что при гидролизе измельчённой осиновой древесины полученный на основе этого продуцента ферментный препарат hLPMO обеспечивает увеличение выхода глюкозы на 10–43% по сравнению с контрольными препаратами на основе исходного штамма *P. verruculosum* B1-537. Использование препарата hLPMO в смеси с высокоэффективным препаратом hBGL2 на основе штамма *P. verruculosum*, осуществляющего экспрессию гетерологичной β -глюкозидазы из *Aspergillus niger* под тем же промотором, позволило в тех же условиях повысить выход глюкозы на 56% по сравнению с контролем.
6. Методами генетической инженерии сконструирован химерный белок, N-домен которого представляет собой ПМО *T. terrestris*, а C-домен – целлюлозо-связывающий модуль (ЦСМ) целлобиогидролазы I *P. verruculosum*. Установлено,

что химерная ПМО-ЦСМ обладает более высокой активностью по отношению к аморфной целлюлозе (на 24%) и ксилотриглицериду (в 9,2 раза), а также расширенной субстратной специфичностью по сравнению с исходной ПМО, приобретая способность расщеплять ксилан и карбоксиметилцеллюлозу. Применение химерной ПМО-ЦСМ в качестве добавки к препарату hBGL2 при деструкции измельчённой осиновой древесины позволило повысить выход сахаров на 47% при существенном сокращении времени реакции (до двух раз).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Издания, входящие в перечень ВАК РФ

1. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Сатрутдинов А.Д., Кошелев А.В., Матыс В.Ю., Синицын А.П. Получение гомогенных полисахаридмонооксигеназ из грибных источников и изучение их синергизма с целлюлазами при действии на целлюлозу. // Биохимия. 2016. Т. 81. № 5. С. 701–709.
2. Bulakhov A.G., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Gusakov A.V., Nemashkalov V.A., Satrutdinov A.D., Sinitsyn A.P. Using an inducible promoter of a gene encoding *Penicillium verruculosum* glucoamylase for production of enzyme preparations with enhanced cellulase performance. // PLOS ONE. 2017. V. 12. № 1. e0170404.
3. Gusakov A.V., Bulakhov A.G., Demin I.N., Sinitsyn A.P. Monitoring of reactions catalyzed by lytic polysaccharide monooxygenases using highly-sensitive fluorimetric assay of the oxygen consumption rate. // Carbohydrate Research. 2017. V. 452. P. 156–161.
4. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Рожкова А.М., Волков П.В., Матыс В.Ю., Зоров И.Н., Синицын А.П. Свойства химерной полисахаридмонооксигеназы с присоединенным целлюлозосвязывающим модулем и ее применение для гидролиза целлюлозосодержащего сырья в составе целлюлазного комплекса. // Катализ в промышленности. 2017. Т 17. № 6. С. 554–560.

Тезисы докладов на научных конференциях

1. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Вохмянина Д.В. Детекция полисахаридмонооксигеназ в целлюлолитических ферментных комплексах на основе грибных продуцентов. // Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни», Москва, 18-20 марта 2014. С. 438–439.
2. Гусаков А.В., Булахов А.Г., Синицын А.П. Полисахаридмонооксигеназы – новый класс ферментов, участвующих в биodeградации целлюлозы. // Тезисы докладов международной научной конференции «Биотехнологии в химико-лесном комплексе», Архангельск, 11-12 сентября 2014. С. 134–136.
3. Булахов А.Г., Гусаков А.В. Влияние полисахаридмонооксигеназ на эффективность ферментативной деструкции целлюлозосодержащих субстратов под действием грибных целлюлаз. // Материалы XXVII зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 9-12 февраля 2015. С. 120.

4. Булахов А.Г., Гусаков А.В. Полисахаридмонооксигеназы *Thielavia terrestris* и *Trichoderma reesei* и их роль в ферментативной деградации целлюлозы. // Материалы VIII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 17-20 марта 2015. Т. 1. С. 362–363.
5. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Короткова О.Г. Роль полисахаридмонооксигеназ в комплексном гидролизе целлюлозосодержащей биомассы. // Материалы II Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», Минск, Беларусь, 13-16 октября 2015. С. 185.
6. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Доценко А.С. Влияние полисахаридмонооксигеназ на активность очищенных целлюлаз при ферментативной деструкции целлюлозы. // Научные труды V съезда физиологов СНГ и V съезда биохимиков России, Сочи, 4-8 октября 2016. Acta Naturae, Спецвыпуск. Т. 2. С. 234.
7. Булахов А.Г., Волков П.В., Гусаков А.В., Рожкова А.М. Конструирование улучшенных целлюлолитических ферментных препаратов с применением полисахаридмонооксигеназ. // Тезисы докладов XI молодежной школы-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 1-2 ноября 2016. С. 36.
8. Булахов А.Г., Волков П.В., Рожкова А.М., Гусаков А.В., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Сеницын А.П. Использование индуцибельного промотора гена глюкоамилазы *Penicillium verruculosum* для получения ферментных препаратов целлюлаз с увеличенной гидролитической активностью, содержащих гетерологичные β -глюкозидазу и полисахаридмонооксигеназу. // Тезисы докладов ежегодной научной конференции ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 14-16 февраля 2017. С. 26.
9. Булахов А.Г. Кинетические аспекты взаимодействия индивидуальных целлюлаз из мультиферментных комплексов грибов с полисахаридмонооксигеназами. // Материалы IX Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 20-22 февраля 2017. С. 400–402.