

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ  
БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

---

*На правах рукописи*

Булахов Александр Глебович

**Свойства литических полисахаридмонооксигеназ из  
низших грибов.**

03.01.04 Биохимия  
03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
д.х.н., проф. Гусаков А.В.

**Москва – 2018**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
Глава 1. Растительная биомасса и целлюлозосодержащие сырьё (ЦСС)	14
1.1. Запасы растительной биомассы	14
1.2. Состав клеточной стенки растений	15
1.3. Состав различных видов ЦСС	19
Глава 2. Современные представления о ферментативной деструкции растительной биомассы	20
2.1. Основные компоненты ферментных комплексов для деструкции ЦСМ	20
2.2. Механизм комплексной ферментативной деструкции целлюлозы	23
Глава 3. Полисахаридмонооксигеназы (ПМО)	27
3.1. Разнообразие и классификация ПМО	27
3.2. Структура ПМО	28
3.3. Механизмы действия ПМО	33
3.3.1. Механизм действия ПМО с потреблением кислорода	33
3.3.2. Механизм действия ПМО с использованием перекиси водорода.	35
3.4. Активность и субстратная специфичность ПМО	37
3.5. Свойства ПМО	40
3.6. Особенности практического применения ПМО.	41
3.7. Комплексная аэробная деструкция ЦСС	42
3.8. Влияние ЦСМ на активность ПМО	44
II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	47
Глава 4. Материалы и методы экспериментов	47
4.1. Используемые вещества	47
4.1.1. Ферментные препараты (ФП)	47
4.1.2. Субстраты	48
4.1.3. Доноры электронов	49
4.1.4. Хроматографические сорбенты и системы для хроматографии и концентрирования белков	50
4.2. Получение генетических конструкций для трансформации в <i>P. verruculosum</i> .	50
4.2.1. Конструирование экспрессионной плазмиды, содержащей ген <i>cel61A</i> , кодирующий гетерологичную ПМО <i>T. reesei</i>	50
4.2.1.1. Получение плазмиды pGA-GA с индуцибельным промотором гена <i>glal</i>	50
4.2.1.2. Получение конструкции с геном <i>cel61A</i> , кодирующим ПМО <i>T. reesei</i>	52

4.2.2. Конструирование химерного белка РМО-CBD, состоящего из ПМО <i>T. terrestris</i> и ЦСМ целлюбиогидролазы I <i>P. verruculosum</i>	53
4.3. Получение ферментных препаратов, содержащих гетерологичные ПМО	54
4.3.1. Проведение трансформации штамма-реципиента гриба <i>P. verruculosum</i>	54
4.3.2. Ферментация рекомбинантных штаммов в колбах	55
4.3.3. ПААГ - электрофорез	55
4.3.4. Определение активности ферментных препаратов по отношению к полисахаридным и синтетическим субстратам	55
4.4 Выделение и очистка ферментов	56
4.4.1. ПМО <i>T. terrestris</i> , ПМО <i>T. reesei</i> , ПМО <i>M. thermophila</i>	56
4.4.2. ЦДГ1 <i>M. thermophila</i>	56
4.4.3. Химера ПМО-ЦСМ.	56
4.5 Идентификация ферментов методом масс-спектрометрии	57
4.6. Идентификация продуктов окислительной деструкции целлюлозы под действием ПМО	58
4.6.1. Приготовление стандартов для анализа окисленных олигосахаридов	58
4.6.2. Хроматографический и масс-спектрометрический анализ продуктов деструкции целлюлозы	58
4.7. Адсорбция ПМО	59
4.8. Термостабильность ПМО	60
4.9. Изучение взаимодействия ПМО с индивидуальными целлюлазами.	60
4.10. Оптимизация применения ПМО при ферментативном осахаривании ЦСС	61
4.10.1. Изучение различных вариантов применения ПМО в процессах ферментативного осахаривания ЦСС	62
4.10.1.1. Осахаривание целлюлозы смесью ПМО и целлюлазного комплекса	62
4.10.1.2. Предобработка целлюлозы под действием ПМО	62
4.10.1.3. Деструкция целлюлозы ПМО после предобработки целлюлазным комплексом	63
4.10.2. Поиск оптимальных условий применения донора электронов.	63
4.10.2.1. Вариация концентрации галлиевой кислоты в реакционной смеси	63

4.10.2.2. Изучение влияния доноров электронов различной природы на осаживающую способность ферментного препарата	64
4.10.3. Гидролиз ЦСС ферментными смесями на основе hBGL2 и hLPMO. Исследование воздействия химерной ПМО на комплексную деструкцию целлюлозы	64
4.11. Определение активности ПМО по скорости потребления кислорода в реакционной смеси	65
4.11.1. Определение активности ферментов	65
4.11.2. Влияние ЭДТА на активность ПМО	66
4.11.3. Изучение влияния различных доноров электронов на скорость потребления кислорода в ходе ферментативной реакции.	67
4.11.4. Определение рН-оптимума активности исследуемых ПМО	67
4.11.5. Изучение влияния ЦСМ на субстратную специфичность ПМО.	67
III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	68
Глава 5 Выделение и идентификация исследуемых белков	68
5.1. Выделение и очистка ферментов	68
5.2. Идентификация ферментов	71
Глава 6. Разработка метода определения активности ПМО по скорости потребления кислорода (СПК).	75
6.1. Активность ПМО по скорости потребления кислорода.	75
6.2. Исследование процесса инактивации ПМО с последующей реактивацией фермента	80
Глава 7. Биохимические характеристики ПМО	83
7.1. рН-зависимость активности ПМО	83
7.2. Субстратная специфичность ПМО	85
7.3. Влияние доноров электронов на ΔСПК	86
7.4. Температурная стабильность ПМО	88
Глава 8. Анализ продуктов деструкции целлюлозы под действием ПМО	92
8.1. Анализ продуктов методом НРАЕС	92
8.2. Масс-спектрометрический анализ продуктов деструкции целлюлозы	96
Глава 9. Возможности биотехнологического применение ПМО	98
9.1. Взаимодействие ПМО с отдельными гидролазами	98
9.1.1. Исследование взаимодействия ПМО и ЦБГ I и ЦБГ II.	98
9.1.2. Взаимодействие ПМО с ЭГ I и ЭГ II	99
9.2. Вариация способа применения ПМО	101
9.3. Исследование влияния доноров электронов различной природы на комплексную деструкцию ЦСС	103

9.3.1. Вариация концентрации галлиевой кислоты.	103
9.3.2. Сравнение эффективности применения в качестве донора электронов ГК и ЦДГ	104
Глава 10. Получение нового штамма <i>P. verruculosum</i> , экспрессирующего ПМО <i>T. reesei</i> под контролем промотора гена глюкоамилазы, и изучение свойств ферментного препарата	107
10.1. Получение ферментного препарата, содержащего гетерологичную ПМО <i>T. reesei</i>	107
10.2. Осахаривающая способность нового ФП	110
Глава 11. Получение и свойства химерного ПМО-ЦСМ	113
11.1. Генетическая инженерия химерного белка	115
11.2. Первичный скрининг трансформантов и наработка культуральной жидкости, содержащей химерную ПМО-ЦСМ	116
11.3. Выделение и идентификация ПМО-ЦСМ.	117
11.4. Влияние присоединения ЦСМ на активность химерной ПМО-ЦСМ и её субстратная специфичность	119
11.5. Адсорбционные характеристики нового фермента	120
11.6. Анализ продуктов деструкции целлюлозы под действием ПМО-ЦСМ	121
11.7. Изучение влияния химерной ПМО-ЦСМ на комплексную деструкцию ЦСС	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК – аминокислота/аминокислотная

БГЛ –  $\beta$ -глюкозидаза

ВС – восстанавливающие сахара

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза

ПААГ – полиакриламидный гель

ПМО - полисахаридмонооксигеназа

СП – степень полимеризации

СПК – скорость потребления кислорода

ФП – ферментный препарат

ЦБГ – целлобиогидролаза

ЦСМ – целлюлозосвязывающий модуль

ЦСС - целлюлозосодержащее сырье

ЭГ – Эндоглюканазы

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Ds-Na – додецилсульфат натрия

*p*-NPG – пара-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозид

PV – *Penicillium verruculosum*

HPAEC – High performance anion exchange chromatography

(анионообменная хроматография высокого разрешения)

## ВВЕДЕНИЕ

**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),  $\beta$ -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, рН-оптимумы активности ферментов (рН 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  $\text{Cu}^{2+}$ . 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 микрокристаллической 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 C-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* В1-537. 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, рН-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  $\text{Cu}^{2+}$ .

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 С1 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).

# I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## Глава 1. Растительная биомасса и целлюлозосодержащее сырьё (ЦСС)

### 1.1. Запасы растительной биомассы

Целлюлоза является наиболее распространенным растительным полимером. Ежегодный прирост растительных органических соединений (растительной биомассы) в процессе биосинтеза составляет около  $2 \cdot 10^{11}$  т, примерно треть этого количества приходится на целлюлозу [1]. Целлюлозосодержащая биомасса – наиболее крупномасштабный источник возобновляемого сырья для различных нужд, но при этом наименее освоенный [2].

К растительному сырью, пригодному для получения сахаров, относятся вторичные продукты лесопиления и деревообработки, а также отходы переработки сельскохозяйственных культур. Критериями использования тех или иных видов сырья являются их стоимость, размеры запасов, возможности концентрирования их в районе расположения гидролизного производства, технологические свойства.

Среди вторичных ресурсов и отходов промышленности и сельского хозяйства прежде всего следует отметить древесное сырьё [2]. Для Российской Федерации, страны с обширнейшими запасами леса в мире, древесное сырьё является наиболее перспективным источником целлюлозы. В 2015 году на территории России было заготовлено около 230 млн. м<sup>3</sup> необработанной древесины, древесные отходы составили 85 млн м<sup>3</sup>. К отходам деревообработки относятся ветки, вершины, пни, кора (25% от общего количества древесины), лесопильные твердые (горбыль, рейка, обрезки и т.д., всего до 20%) и мягкие отходы - опилки (до 12%). На лесосеках и производственных площадях скапливается большое количество древесных отходов, что создает экологические проблемы [3]. Вторыми по объему отходов растительной биомассы являются сельскохозяйственные производства. Прежде всего, к ним относится злаковая солома, содержащая 30-40%

целлюлозы, которая накапливается до 4-5 млрд. т в год. Она мало используется, гниет или сжигается [4]. В районах, где производится кукуруза, отходами является кукурузная кочерыжка (400-600 тыс. т в год). На мукомольных заводах накапливается шелуха (25% от массы зерна). Отходом первичной обработки льна является так называемая костра (до 70 % от массы, поступающей на обработку). Также следует упомянуть верховой малоразложившийся слой торфа (степень разложения 15-20%), химический состав которого во многом повторяет химический состав растений, образующих его. Запасы торфа огромны, причем имеются крупные месторождения, в которых содержание торфа достигает 2-30 млн. т [5, 6].

Другими отходами являются отходы целлюлозно-бумажного производства. Целлюлозу содержат также муниципальные отходы и макулатура.

## **1.2. Состав клеточной стенки растений**

Наиболее важными компонентами в составе растительной клеточной стенки являются полисахариды. В зависимости от своего состава и строения они могут быть разделены на три большие группы: целлюлоза, гемицеллюлозы и пектин (Рисунок 1) [7, 8]. Полисахариды - не единственные составляющие, помимо них в состав клеточных стенок многоклеточных растений входит лигнин, а также белки, выполняющие, по-видимому, структурную роль. Значительно реже встречаются неорганические соединения представленные, главным образом, карбонатами и силикатами кальция [9, 10].

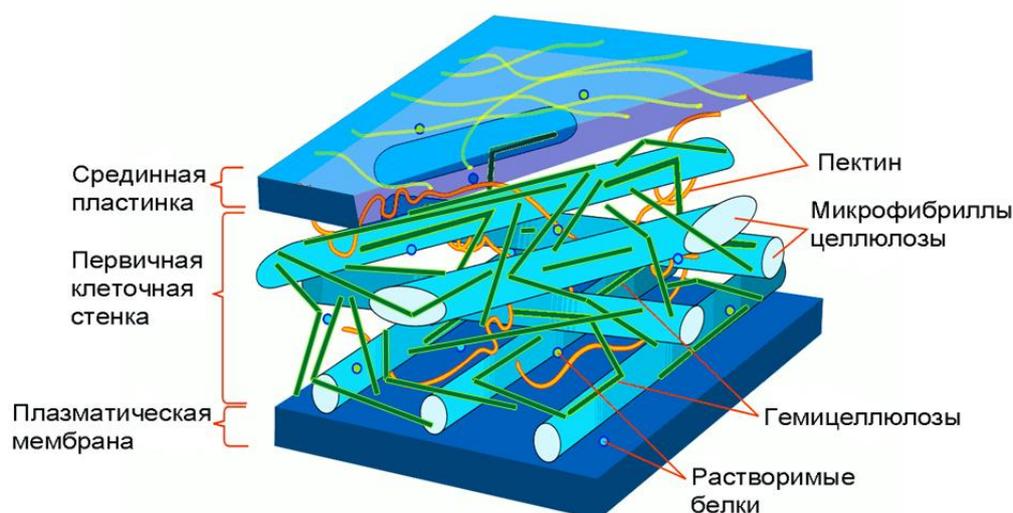


Рисунок 1 - Строение клеточной стенки растений (по данным [7]).

Целлюлоза является основным компонентом растительной биомассы и по строению представляет собой линейный полимер, ангидроглюкозные звенья которого связаны  $\beta$ -1,4-гликозидными связями. Количество звеньев ангидроглюкозы в молекуле целлюлозы может достигать до 15000, при этом молекула достигает длины в 2-3 мкм и массы более 1,5 млн. Да [11].

Цепочки целлюлозы образуют кристаллическую надмолекулярную структуру: несколько десятков молекул целлюлозы связаны между собой водородными связями и силами Ван-дер-Ваальса в микрофибриллу, толщина которой составляет 5-10 нм. Внутри микрофибриллы разные молекулы целлюлозы начинаются и заканчиваются в разных местах, поэтому микрофибрилла может достигать сотен микрометров в длину и содержать тысячи индивидуальных цепочек [12].

В микрофибриллах однородные высокоупорядоченные кристаллические зоны чередуются с неоднородными и менее упорядоченными аморфными зонами [13]. Микрофибриллы заключены в матрикс, состоящий из полисахаридов, которые не имеют кристаллической структуры. В полисахариды матрикса, в свою очередь, входит аморфная целлюлоза,

пектины и гемицеллюлозы. Аморфная целлюлоза имеет рыхлую структуру и поэтому более доступна для ферментов. Напротив, кристаллическая высокоупорядоченная целлюлоза гораздо труднее поддается разрушению под действием ферментов [14].

Гемицеллюлозы составляют около 20-30% клеточной стенки растений. В зависимости от источника и способов выделения, молекулы гемицеллюлоз могут иметь как линейную, так и разветвленную структуру. Основным гемицеллюлозным полимером злаков и лиственных деревьев является ксилан. Функциональная роль гемицеллюлоз заключается в осуществлении взаимосвязи между основными компонентами клеточной стенки за счет формирования переходного слоя между ними – матрикса. В первичной клеточной стенке они объединяют пектины и целлюлозу, во вторичной – целлюлозу и лигнин [15].

Пектины выполняют важную функцию: регулируют водный обмен, являясь промежуточным звеном в поглощении и транспорте ионов. Под термином пектины подразумевают группу полисахаридов, общим признаком которых является наличие неразветвленных блоков полигалактуроновой кислоты или ее метилового эфира. Пектины хорошо экстрагируются кипящей водой, в то время как гемицеллюлозы растворимы лишь в 4 М растворе КОН (микрофибриллярные полисахариды не растворимы ни в кипящей воде, ни в щелочи).

Лигнин является одним из наиболее сложных природных полимеров. Это аморфный трехмерный полимер с остатками фенилпропана в качестве основных строительных блоков. Конкретнее, в составе присутствуют 4-оксикоричный (*n*-кумаровый), 3-метокси-4-оксикоричный (кониферилловый) и 3,5-диметокси-4-оксикоричный (синаповый) спирты (Рисунок 2).

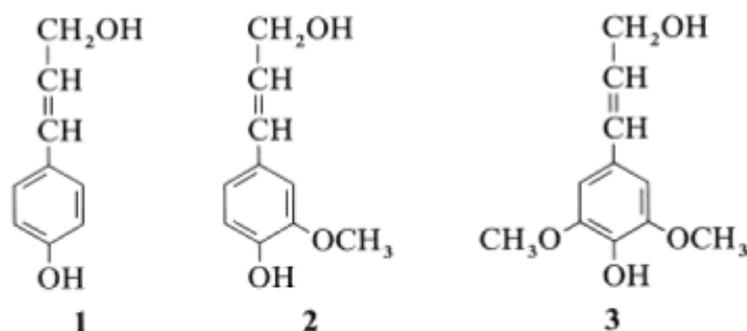


Рисунок 2 - Структура основных спиртов, входящих в состав лигнина. **1** - 4-оксикоричный (*n*-кумаровый), **2** - 3-метокси-4-оксикоричный (конифероловый), **3** – 3,5-диметокси-4-оксикоричный (синаповый) спирты.

Установлено, что лигнин из древесины хвойных пород (голосеменных), состоит более чем на 90% из кониферолового спирта. Остальные 10% - это, в основном, *n*-кумаровый спирт. В отличие от лигнина хвойных, лигнин, содержащийся в лиственных породах (покрытосеменных) состоит из кониферолового и синапового спиртов [13].

Прямыми и косвенными методами установлено, что основная часть лигнина является, несомненно, высокомолекулярным веществом. То, что часто лигнин называют полимером, строго говоря, не совсем правильно, поскольку в молекулах лигнина чередование одинаковых группировок атомов не отмечено. Это верно лишь, если в качестве повторяющегося звена рассматривать только скелет фенилпропана.

Лигнин - наиболее «непокорный» компонент клеточной стенки растений. К его эффективной деполимеризации способны только грибы белой гнили, такие как *Ceriporiopsis subvermispora*, *Physisporinus rivulosus*, *Dichomitus squalens*, хотя в основном считается, что деградация лигнина необходима им только для того, чтобы получить доступ целлюлозе и гемицеллюлозе [16].

### 1.3. Состав различных видов ЦСС

Целлюлозосодержащее сырье, в зависимости от происхождения, значительно отличаются по составу. Так, бытовые и промышленные отходы отличаются высоким содержанием целлюлозы и низким содержанием других компонентов. В травах, коре и зеленых частях многолетних растений обнаруживается большое количество гемицеллюлоз и лигнина, солома также лигнифицирована. Древесина хвойных пород богата целлюлозой, в меньшей степени гемицеллюлозой. Древесина лиственных деревьев отличается от древесины хвойных меньшим содержанием лигнина и отсутствием смол [17].

Древесина – продукт биологического происхождения, представляющий сложный комплекс. Древесина состоит из клеток с одревесневшими оболочками. Вещество древесины – это вещество оболочек клеток (клеточных стенок). Биологическое происхождение этого вещества обуславливает его сложный химический состав.

Древесина на 99% состоит из органических веществ, 90% из которых представляют собой вещества, образующую клеточную стенку. Минеральные вещества составляют обычно небольшую часть – до 1%. В состав древесины также входит ароматическая часть – лигнин, массовая доля которого 20-30%, причем хвойные породы содержат больше лигнина, чем лиственные [17].

В древесине структурные компоненты тесно связаны между собой связями различного типа: ковалентными связями (между лигнином и гемицеллюлозой), силами межмолекулярного взаимодействия (между всеми компонентами), что чрезвычайно затрудняет разделение и выделение компонентов в чистом виде. Разделение компонентов древесины в анализе и при переработке растительного сырья основано на различиях по растворимости и химическим свойствам [18].

При выборе сырья, подлежащего переработке, следует учитывать его состав, поскольку наличие или отсутствие того или иного компонента может значительно влиять на ход процессов ферментативной деструкции.

## **Глава 2. Современные представления о ферментативной деструкции растительной биомассы**

Растительная биомасса представляет собой сложный многокомпонентный комплекс полисахаридов, лигнина, неорганических соединений. Лигнин удаётся извлекать методами предобработки. Сейчас наиболее популярны кислотный гидролиз и паровой взрыв [19, 20]. Ферментативному гидролизу, как правило, подвергается предобработанная, частично или полностью делигнифицированная биомасса, состоящая в основном из полисахаридов. Ферменты являются эффективными катализаторами белкового происхождения высокой специфичности. Для гидролиза сложных субстратов требуется воздействие целого комплекса различных энзимов.

Продуцентами наиболее эффективных многокомпонентных ферментных комплексов для деструкции ЦСС являются низшие грибы рода *Trichoderma* и *Penicillium* [21, 22, 23]. Их целлюлолитические комплексы содержат в своем составе набор преимущественно гидролитических ферментов. Конечными продуктами деструкции ЦСС являются глюкоза и набор других моно- и дисахаридов.

### **2.1. Основные компоненты ферментных комплексов для деструкции ЦСС**

Эффективность гидролиза целлюлозы и относительный состав продуктов ее деструкции зависят от сбалансированности состава целлюлазного комплекса и уровня активности отдельных компонентов. Одно из основных требований к составу целлюлазного комплекса заключается в том, чтобы он имел высокую эндоглюканазную и целлобиогидролазную активности, а также  $\beta$ -глюкозидазную (целлобиазную) активность для конверсии в глюкозу промежуточного продукта – целлобиозы, поскольку глюкоза является целевым продуктом гидролиза [24].

Целлюлолитические ферменты относятся к классу  $\beta$ -1,4-глюканаз, т.е. карбогидраз, гидролизующих  $\beta$ -1,4-связи в О-гликозильных соединениях. По типу действия на субстраты целлюлазы делят на эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы (КФ 3.2.1.4), экзо-целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91, КФ 3.2.1.176) и  $\beta$ -глюкозидазы (целлобиазы) (КФ 3.2.1.21) [25]. Далее рассмотрим подробнее три основных компонента целлюлазных комплексов.

Для **эндоглюканаз** (ЭГ) прежде всего характерна высокая активность по отношению к растворимым производным целлюлозы и  $\beta$ -глюканам, содержащим  $\beta$ -1,4-связи, а именно по отношению к карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ), глюкану из ячменя и лихенану, причем в первую очередь это выражается в быстром уменьшении вязкости растворимых полисахаридов (а также в образовании восстанавливающих сахаров) [26, 27]. Как правило, эндоглюканазы способны достаточно эффективно гидролизовать аморфную целлюлозу. Однако, их активность по отношению к кристаллической целлюлозе – например, к хлопку, фильтровальной бумаге “Whatman №1”, микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) - относительно низка по сравнению с целлобиогидролазами [28, 29]. Грибные эндоглюканазы, как правило, не активны по отношению к целлобиозе, а также далеко не все из них способны расщеплять целлотриозу. Многие эндоглюканазы способны гидролизовать целлоолигосахариды со степенью полимеризации более 3, причем скорость гидролиза, как правило, возрастает с увеличением СП олигосахаридов [30]. При действии на целлоолигосахариды эндоглюканазы предпочтительно действуют на внутренние связи, удаленные от концов молекул олигосахаридов, при этом для различных ферментов распределение гидролизуемых связей различается.

Известны эндоглюканазы, способные гидролизовать ксилан – так называемые «целлюлазы-ксилазы». Например, такое свойство характерно для ЭГ I (Cel7B) из *T.reesei* [31, 32]. Некоторые эндоглюканазы подвержены ингибированию продуктом реакции – целлобиозой, однако такое ингибирование слабее, чем у целлобиогидролаз [33].

**Целлобиогидролазы** (ЦБГ) отщепляют остатки целлобиозы от концов полимерных молекул нативной или частично гидролизованной целлюлозы, а также целлоолигосахаридов [34]. Целлобиогидролазы способны отщеплять целлобиозу как с восстанавливающего (с сохранением конфигурации), так и с невосстанавливающего конца молекул субстрата (с обращением конфигурации аномерного атома углерода) [35]. По этому признаку их относят к первому и второму типу целлобиогидролаз (ЦБГ I и II), соответственно. Целлобиогидролазы могут гидролизовать как аморфную, так и кристаллическую целлюлозу, причем именно относительно высокая активность по отношению к кристаллической целлюлозе является их отличительным свойством по сравнению с эндоглюканазами [27, 32, 35, 36]. Поэтому принято считать, что при действии целлюлазного комплекса на МКЦ измеряемая активность отражает в первую очередь активность целлобиогидролаз. При исследовании кинетики действия целлобиогидролаз на олигосахариды установлено, что, как и в случае эндоглюканаз, скорость реакции возрастает с увеличением СП субстрата [37, 38].

Как правило, практически единственным продуктом при действии целлобиогидролаз на целлюлозу является целлобиоза [37, 38]. Иногда наряду с целлобиозой в небольших количествах образуется глюкоза, а также целлоолигосахариды [39]. Продукт гидролиза (целлобиоза) является весьма сильным конкурентным ингибитором многих известных ЦБГ. Константы ингибирования ЦБГ лежат в диапазоне 0,05-0,15 мМ [38].

**$\beta$ -глюкозидазы** (БГЛ) также являются важным компонентом целлюлазных комплексов. Они катализируют реакцию гидролиза целлобиозы, являющейся ингибитором целлобиогидролаз. БГЛ грибов, как правило, представляют собой более высокомолекулярными ферменты, чем эндоглюканазы и целлобиогидролазы; их молекулярные массы лежат в диапазоне 90-130 кДа [40, 41]. В отличие от истинных целлюлаз, действующих на нерастворимую целлюлозу, БГЛ часто являются субъединичными ферментами, у которых размер субъединиц варьирует от 41 до 170 кДа [42].

Другой особенностью  $\beta$ -глюкозидаз является то, что они могут быть как внеклеточными, так и внутриклеточными (или связанными с мембраной) ферментами. рН-оптимумы грибных целлюлаз и БГЛ в большинстве случаев находятся в слабокислой области (при рН 4,0-5,5) [43].

Помимо трех описанных выше целлюлаз, ферментные комплексы содержат ферменты для гидролиза и других полисахаридов клеточной стенки растений –  $\beta$ -глюканазы, маннаназы, ксиланазы, ксилоглюканазы, а также оксигеназы, сволленин, и другие сопутствующие белки, увеличивающие эффективность действия целлюлаз [23].

Состав целлюлазных комплексов варьируется в широких пределах в зависимости от происхождения, однако лишь некоторые из описанных в литературе комплексов можно рассматривать как реальных кандидатов на осуществление эффективного гидролиза целлюлозы. Проблема заключается в том, что целлюлазные комплексы, продуцируемые разными микроорганизмами, как правило, не сбалансированы по компонентному составу (для получения глюкозы), хотя и имеют высокие активности отдельных компонентов. Наиболее простым выходом из положения является совместное применение препаратов целлюлазных комплексов, которые имеют высокие активности отдельных компонентов [35, 40].

## **2.2. Механизм комплексной ферментативной деструкции целлюлозы**

Особенности строения целлюлозы обуславливают ее высокую химическую стабильность и устойчивость к ферментативному гидролизу. Молекулы целлюлозы в стенках растений могут образовывать как высокоупорядоченную кристаллическую упаковку звеньев, так и содержать аморфные участки. Для эффективного гидролиза целлюлозы требуется совместное действие ферментов различного типа.

Основу целлюлазного комплекса составляют гидролазы трех типов (ЭГ, ЦБГ, БГЛ), описанные выше. ЭГ расщепляют целлюлозную цепь

преимущественно на аморфных участках фибрилл целлюлозы. При этом образуются свободные концы, то есть субстрат для действия экзо-деполимераз (ЦБГ). ЦБГ последовательно отщепляют остатки целлобиозы от концов полимерной цепи, реакция осуществляется по процессивному механизму. ЦБГ могут атаковать как кристаллические, так и аморфные зоны субстрата. Целлобиоза (основной промежуточный продукт гидролиза), а также другие растворимые олигосахариды, образующиеся под действием ЭГ (в гораздо меньшем количестве, чем целлобиоза) гидролизуются до глюкозы БГЛ. Таким образом, при действии одних ферментов комплекса образуется субстрат для других ферментов. При совместном действии ферментов этих трех типов проявляются синергетические эффекты, обусловленные, в том числе, минимизацией эффекта ингибирования продуктом реакции (целлобиозой) [44].

Помимо основных целлюлаз ферментные комплексы содержат в своем составе гемицеллюлазы, ряд вспомогательных гидролаз и белки, не оказывающие прямое воздействие на деструкцию компонентов клеточной стенки растений. Недавно было выяснено, что и ферменты, осуществляющие окислительную деполимеризацию целлюлозы – литические полисахаридмонооксигеназы (ПМО), оказывают существенное влияние на комплексный гидролиз [45]. ПМО не обладают гидролитической активностью, но играют важную роль в деструкции целлюлозы. При действии ПМО целлюлозная цепь окисляется в произвольном месте на поверхности кристалла. При этом образуются свободные концы – субстрат для действия ЦБГ. Кроме того, заряженные группы на образующихся концах способствуют аморфизации целлюлозы и повышают ее доступность для ферментов [44, 46, 47]. Схема действия целлюлолитического комплекса представлена на рисунке 3 [46].

На сегодняшний день роль и синергетические взаимодействия основных ферментов в процессе гидролиза целлюлозы достаточно изучены, но остался ряд неясных вопросов [47]. Ферментный комплекс, содержащий

«классические» целлюлазы, способен конвертировать целлюлозу, но, несмотря на предобработку ЦСС, выходы глюкозы далеки от 100%. Интерес для промышленных процессов также представляет увеличение скорости гидролиза. Глубина и скорость биоконверсии целлюлозы напрямую связана с доступностью полимерной цепи для молекул ферментов [48, 49]. Молекулы целлюлозы в кристалле плотно упакованы, требуется значительная работа для декристаллизации целлюлозы, чтобы обеспечить доступ ферментов к отдельной молекуле [47].

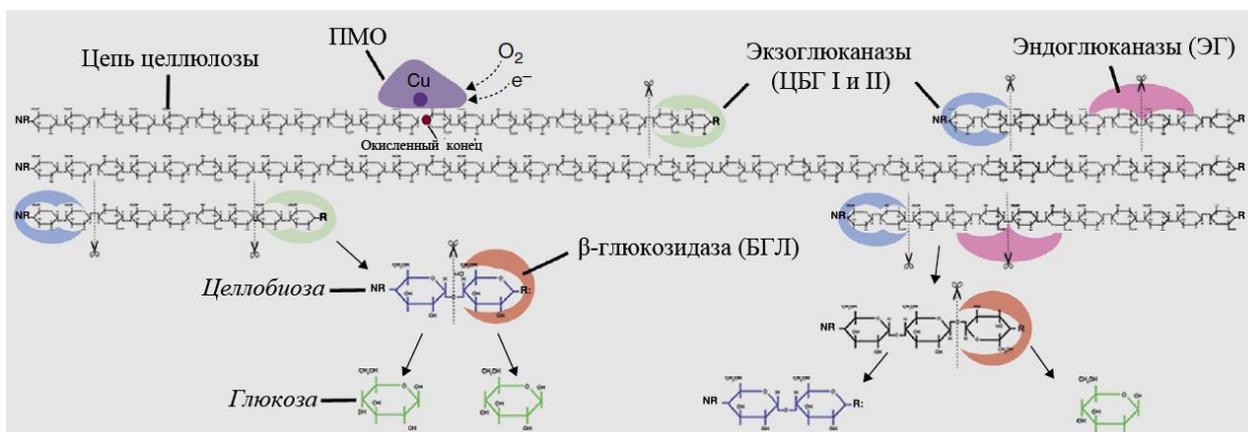


Рисунок 3 - Механизм внеклеточной деструкции целлюлозы, осуществляемый ферментными комплексами большинства бактерий и грибов. Деструкция субстрата происходит благодаря синергетическому эффекту взаимодействия отдельных секретируемых эндо- и экзоглюканаз и ПМО. (Сайты атаки ферментов приведены не в масштабе). NR-невосстанавливающие концы; R-восстанавливающие концы [46].

При изучении деградации целлюлозы микроорганизмами, ввиду высокой технической значимости процесса, было проведено множество работ, направленных на поиски факторов, влияющих на степень кристалличности биополимера. В частности, был обнаружен белок – сволленин, способный ослаблять водородные связи между молекулами целлюлозы в кристалле [50, 51]. В начале 1980-х годов было сделано предположение, что этот фактор - не отдельный компонент целлюлазного комплекса, а свойство ферментов прочно адсорбироваться на целлюлозе [52, 53]. Прочно адсорбирующиеся целлюлазы диспергируют кристаллическую целлюлозу, переводя ее в более реакционноспособное состояние. Медь-зависимые монооксигеназы также

могут считаться таким фактором, так как в результате их действия концы целлюлозной цепи приобретают заряженную группу, что приводит к разрушению кристаллов целлюлозы [47]. Дальнейшее изучение совместного действия различных факторов, способствующих разрушению кристаллической структуры целлюлозы, позволит создавать высокоэффективные целлюлазные препараты для конверсии ЦСС.

### **Глава 3. Полисахаридмонооксигеназы (ПМО)**

Впервые ген нового типа ферментов был обнаружен в 1992 в *Agaricus bisporus* [54]. Тогда фермент причислили к эндоглюканазам, так как не было данных о его структуре и механизме действия. Позднее было выяснено, что данный белок не обладает ни эндоглюканазной, ни бета-глюкозидазной, ни целлобиогидролазной активностями, но способствует отделению растворимых олигосахаридов в кристаллических участках целлюлозы [55, 56]. Данное свойство фермента позволяло существенно увеличивать эффективность целлюлазных комплексов. Гены ферментов данного типа начали внедряться в штаммы-продуценты ферментных комплексов нового поколения [57]. Но, несмотря на то, что у фермента уже было практическое применение, его по-прежнему относили к гликозидгидролазам, к семейству GH61. В 2008 году была впервые получена структура белка данного семейства для фермента из *Trichoderma reesei* [58], и было показано, что в активном центре фермента заключен атом двухвалентного металла, а именно Ni. В последующих исследованиях было обнаружено, что у белков семейства GH61 существенно увеличивается эффективность их действия на целлюлозу при наличии в реакционной смеси целлобиозодегидрогеназы (ЦДГ), что давало повод усомниться в гидролитической природе исследуемых ферментов [59]. Примерно в то же время вышли работы [60, 61], где были проанализированы продукты гидролиза целлюлозы ферментом семейства GH61 методом масс-спектрометрии. Среди продуктов были идентифицированы олигосахариды, окисленные по C1 или по C4 атому ангидроглюкозного остатка. После этого открытия белки семейства GH61 стали классифицировать как полисахаридмонооксигеназы, и они были отнесены к семейству вспомогательных активностей (Auxiliary Activities) AA9 [62, 63].

#### **3.1. Разнообразие и классификация ПМО**

Помимо ферментов, осуществляющих окислительную деструкцию целлюлозы, были обнаружены аналогичные белки, увеличивающие

гидролитическую способность хитиназных гидролитических комплексов [64]. Данные ферменты достаточно продолжительное время причисляли к семейству хитин-связывающих модулей (Carbohydrate Binding Module Family 33), и аналогично белкам семейства AA9 гены ферментов начали активно внедрять в хитиназные комплексы. В 2010 году было выяснено, что данные хитин-связывающие белки являются полисахаридмонооксигеназами [61]. Эти ферменты классифицируют сейчас как представителей семейства AA10 [63].

Также существуют семейства полисахаридмонооксигеназ AA11 и AA13. Семейство AA11 было идентифицировано при помощи биоинформатического подхода “шагающего модуля” [65]. В него попали преимущественно белки, ранее относившиеся к семейству GH18, в которое входили хитиназы и эндо- $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы. В семейство AA13 входят ПМО, действующие на крахмал [66].

### **3.2. Структура ПМО**

Первые структуры ПМО семейств AA9 и AA10 были определены еще до их идентификации как оксидаз в 2010-2011 годах [58, 64]. В ранних работах, посвященных определению структур белков новых семейств, в их активных центрах обнаруживали ионы таких металлов как Mg, Ca, Ni, Mn, Zn и Cu. Согласно результатам анализа и моделирования, основанного на гомологии аминокислотных последовательностей (база данных PDB) [58, 61, 67], ПМО могли содержать данные металлы в своем активном центре. Но в более поздних работах было показано, что все ранее описанные ПМО обладают практически идентичными структурными элементами, содержащими координированный атом  $\text{Cu}^{2+}$  [68]. Данный структурный мотив представляет собой иммуноглобулино-подобный  $\beta$ -сэндвич, который бывает дополнен петлей  $\alpha$ -спирали неконсервативного состава [69]. Строго консервативный N-терминальный остаток гистидина вместе с другим гистидином полипептидной

цепи координирует атом меди, образуя тем самым активный центр ПМО, так называемый Т-образный гистидиновый браслет, «histidine brace» (Рисунок 4).

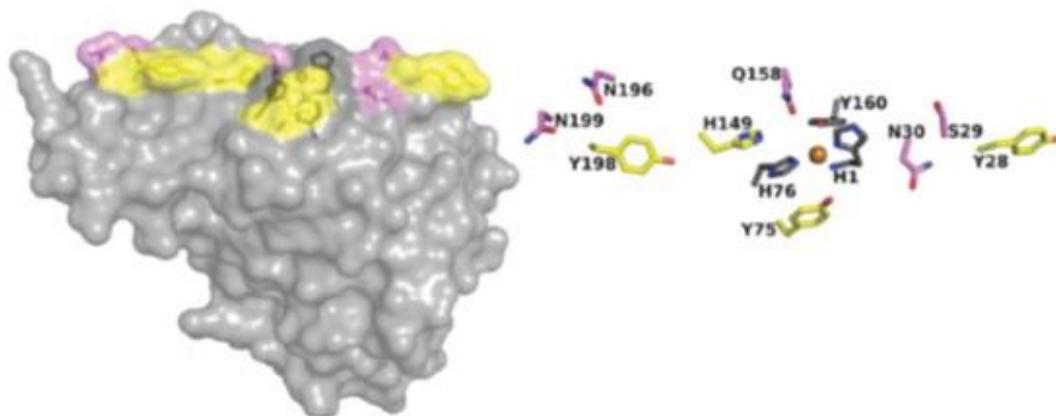


Рисунок 4 - Боковые цепи субстрат-связывающей плоскости ПМО *Phanerochaete chrysosporium* (PDB код 4B5Q). Аминокислотные остатки, координирующие ион меди, окрашены в серый цвет, ароматические и выступающие заряженные аминокислоты субстрат-связывающей плоскости выделены желтым и фиолетовым соответственно. Атом меди – оранжевая сфера. Справа представлено аминокислотное окружение иона  $\text{Cu}^{2+}$ , Т-образный гистидиновый браслет, и аминокислоты, задействованные в связывании фермента с субстратом [70].

В отличие от активных центров гидролитических ферментов, представляющих собой «ущелья» и «туннели», связывающие одиночные молекулы полисахаридов [71], активный центр ПМО находится в центре плоскости на поверхности белковой глобулы. Размеры данной плоскости составляют примерно  $30 \times 40 \text{ \AA}$ . Считается, что плоский активный центр белков семейства AA9 и AA10 позволяет ферментам атаковать кристаллические нерастворимые участки целлюлозы или хитина.

Проанализировав доступные в базе данных PDB структуры белков семейств AA9 и AA10, можно обнаружить, что белки по-разному связываются с субстратом из-за различного состава аминокислот, расположенных на лицевой плоскости биокатализаторов. Кроме того, прослеживаются различия не только между двумя семействами, но и среди белков, относящихся к AA9 [68]. Так, в этом семействе, исходя из количества и природы ароматических аминокислот, участвующих в связывании с субстратом, было выделено три подгруппы ПМО1, ПМО2 и ПМО3 [72, 73] (Рисунок 5). Структурное разнообразие этих ферментов коррелирует с сайтом разрыва цепи

полисахарида, что позволяет сделать вывод о том, что положение субстрата в активном центре диктует место окисления полимера [68]. Что же касается белков семейства AA10, то они больше похожи на ПМОЗ семейства AA9, но, как ни странно, здесь положение субстрата определяют не непосредственные гидрофобные взаимодействия белка с субстратом, а водородные связи между остатками глутамина, треонина и глутамата, расположенными у активного центра [74, 75]. Именно различие в способе связывания фермента с субстратом позволило разделить ПМО на 4 семейства [73].

Более того, анализ секретома и транскриптома различных микроорганизмов показал, что организмы, воздействующие на целлюлозу часто экспрессируют сразу несколько различных белков семейства AA9, когда как хитин-деградирующие организмы чаще всего лишь одну форму белков AA10 [76, 77, 78].

Далее будут рассматриваться в основном ПМО семейства AA9, воздействующие на целлюлозу, так как данная работа направлена на изучение и оптимизацию состава ферментных комплексов для деструкции ЦСС. Как правило, белки семейства AA9 обладают невысокой молекулярной массой (до 40 кДа) и высокой степенью гомологии. В основе структуры ферментов данного типа лежит компактный домен, состоящий из двух  $\beta$ -листов, собранных по фибронектин III - подобному типу. Большинство из консервативных аминокислотных остатков расположены в этих  $\beta$ -листах и образуют обширную сеть структурообразующих ионных взаимодействий. В частности, остатки Glu-137 и Arg-135 формируют ионную пару в недоступной для растворителя части глобулы и являются наиболее консервативными остатками данного семейства [79].

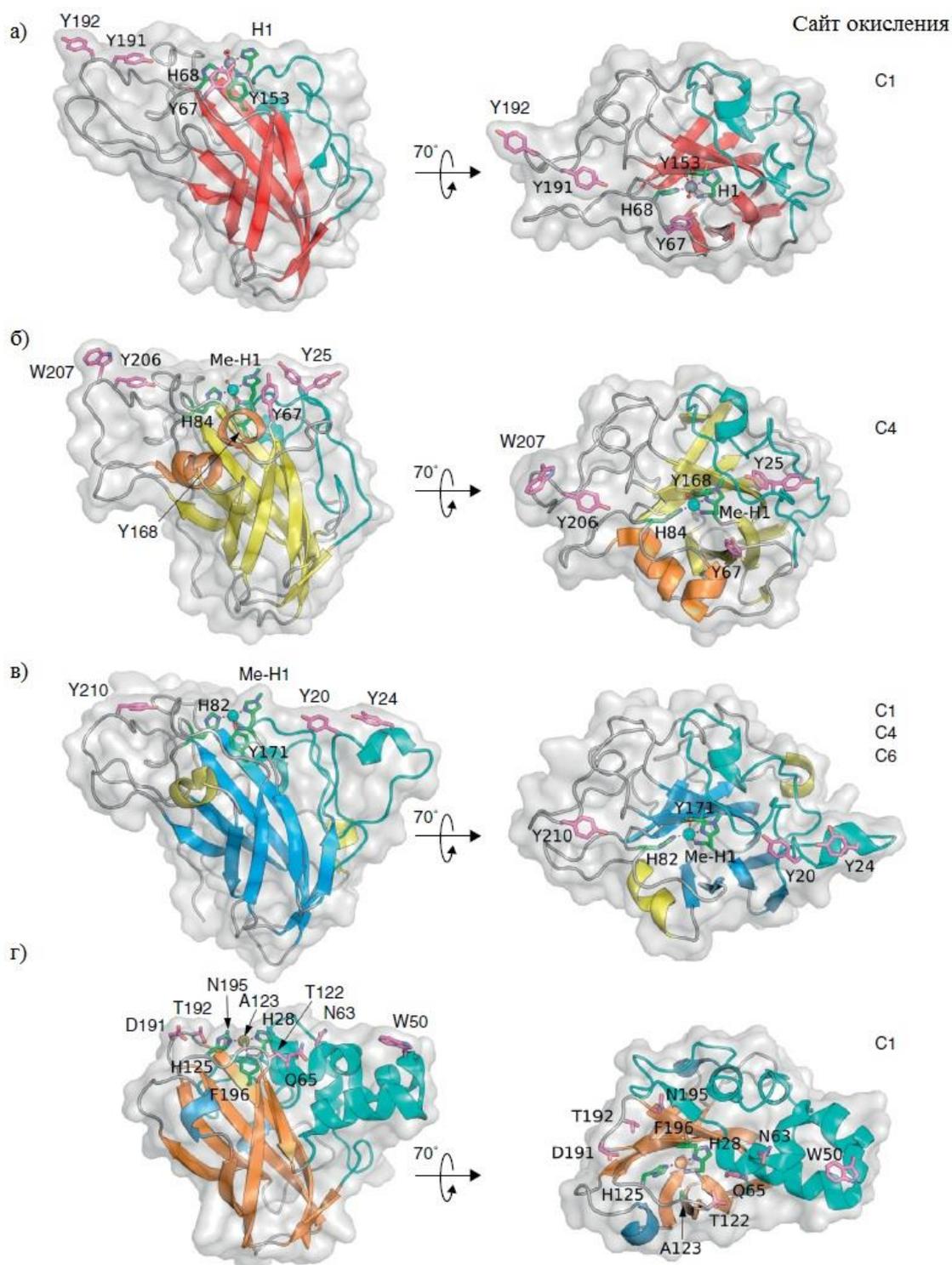


Рисунок 5 - Структуры представителей семейства AA9: а) ПМО1-*Thielavia terrestris* (PDB:3eii), б) ПМО2-*Neurospora crassa* (PDB:4eir), в) ПМО3-*Neurospora crassa* (PDB:4eis), - и семейства AA10 г) *Bacillus amyloliquefacies* (PDB:2uox). Атом металла активного центра изображен в виде шара расположенного в середине плоскости, взаимодействующей с субстратом. Атомы углерода, координированных с ним аминокислотных остатков окрашены в зеленый. Атомы углерода остатков, которые, как предполагается, связываются с субстратом – в фиолетовый. Участок  $\alpha$ -спирали на поверхности ПМО3 и AA10, задействованный в связывании с субстратом отмечен голубым цветом [73].

Как уже было сказано выше, в активном центре ПМО содержат ион  $\text{Cu(II)}$ . Металл, определяющий ферментативную активность, заключен в структуре белка в так называемом гистидиновом браслете, состоящем из имидазола N-концевого гистидина, и гистидина боковой цепи [80]. N-концевой гистидин часто метилирован по 4-ому атому гетероцикла [73, 81, 82]. Тем не менее функция метильной группы до сих пор не ясна до конца, так как были обнаружены ПМО, в частности рекомбинантный фермент, экспрессированный в *Pichia pastoris*, в которых N-концевой аминокислотный остаток не метилирован [82]. Следует отметить, что данный реципиент не осуществляет данную посттрансляционную модификацию. Было выдвинуто предположение, что метильная группа, присоединенная к N-концевому гистидину, выступает в роли стерического препятствия, направленного на защиту от депротонирования гистидина активного центра, осуществляя дополнительный контроль окислительно-восстановительной реакции с участием атома  $\text{Cu}$  [68]. Как известно, координационное число иона  $\text{Cu(II)}$  – 4. N-концевой гистидин координирует металл двумя атомами азота аминокислотного остатка, вторая аминокислота гистидинового браслета, чей порядковый номер не консервативен, связывает медь лишь 4-ым атомом азота гетероцикла. Завершает координационное окружение остаток тирозина, находящийся далее по полипептидной цепи. Замена данной аминокислоты методом сайт-направленного мутагенеза показала, что тирозин является важным фактором, определяющим ферментативную активность, но при этом не столь критичным [67]. В той же работе было показано, что остаток глутамина, находящийся во внешней координационной сфере, на расстоянии около  $3,8\text{\AA}$  от атома меди, является ключевым фактором для активности фермента (Рисунок 6). Вероятно, данный остаток глутамина задействован в образовании водородных связей при ассоциации фермента с субстратом.

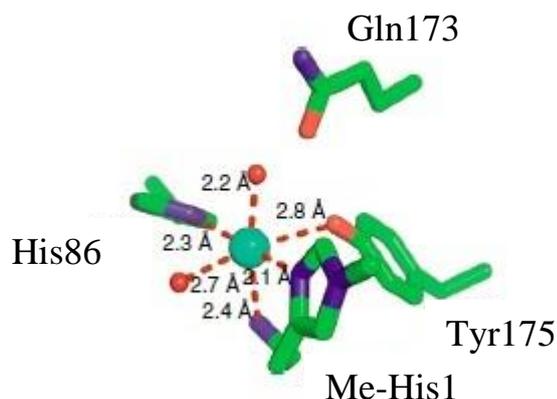


Рисунок 6 - Структура медного активного центра белков семейства AA9 на примере белка из *Thermoascus aurantiacus* (PDB:2uet). Внутренняя координационная сфера представлена метилированным гистидином-1, гистидином-86 и тирозином-175, расположенном на некотором удалении от металла. Во внешней координационной сфере находится остаток глутамина-173. Атомы кислорода, образующие супероксидный интермедиат с центральным атомом, изображены красным.

Более того, ион меди во время каталитического акта оказывается координирован с анионом супероксида. Для фермента из *Neurospora crassa* расстояние Cu – O составило 2,9 Å, что значительно больше длины связи в низкомолекулярных супероксидах меди, в которых она обычно составляет около 2,0 Å [73]. Также в последующих работах по изучению структур белков семейства AA9 удалось засечь в спектрах поглощения рентгеновских лучей рефлексы, отвечающие иону Cu(I), в которых координационное число атома металла ниже [82, 83].

### 3.3. Механизмы действия ПМО

#### 3.3.1. Механизм действия ПМО с потреблением кислорода

Ион меди принимает непосредственное участие в каталитическом акте расщепления субстрата. При этом задействуются электроны из внешнего окружения и молекула кислорода. В качестве донора электронов для ПМО могут выступать как химические агенты, такие как галлиевая или аскорбиновая кислоты, так и доноры биологического происхождения, в частности фермент целлобиозодегидрогеназа (ЦДГ), который катализирует сопряженную реакцию окисления целлобиозы [84]. ЦДГ содержит FAD и гем-

домен, который осуществляет восстановление ПМО в процессе ферментативной деструкции целлюлозы.

Так, первый электрон от ЦДГ восстанавливает атом  $\text{Cu}^{2+}$  в активном центре ПМО до  $\text{Cu}^{1+}$ , к которому присоединяется молекула кислорода, после чего за счет внутреннего переноса электрона образуется супероксидный интермедиат (Рисунок 7). Таким образом, ион меди во время каталитического акта оказывается координирован с анионом супероксида. Далее супероксидный интермедиат отщепляет атом водорода либо по С1, либо по С4 атому ангидроглюкозного остатка молекулы целлюлозы. Присоединение второго электрона от ЦДГ приводит к разрыву пероксидной связи. Образовавшийся радикал  $\text{Cu-O}\cdot$  гидроксилирует радикал субстрата. Присоединение к молекуле целлюлозы дополнительного атома кислорода приводит к её дестабилизации и последующему разрыву  $\beta$ -1,4-гликозидной связи, сопровождающемуся отделением остатка целлюлозы и образованию остатка кетоальдозы или альдоновой кислоты (лактона) из второй части молекулы полимера [45, 84].

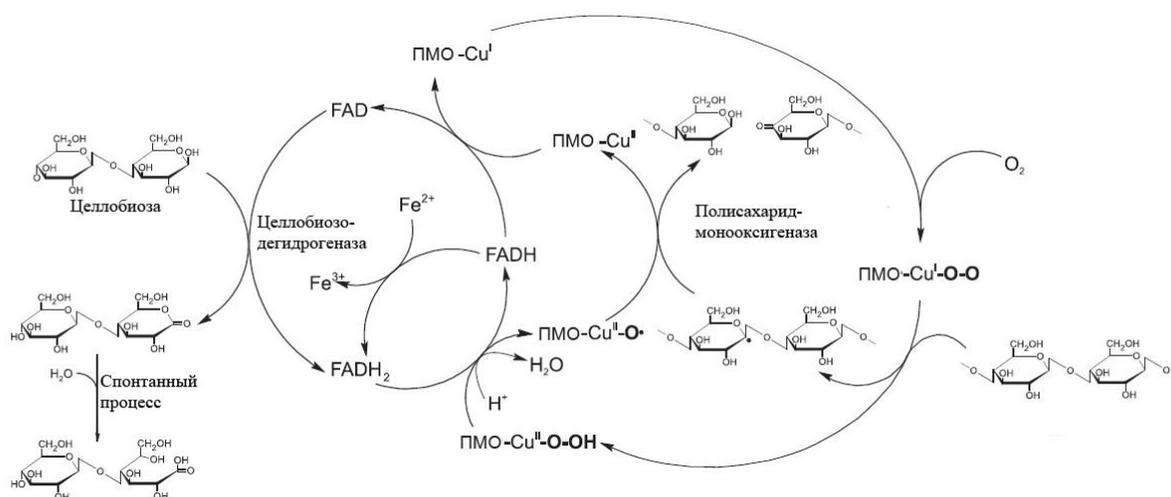


Рисунок 7 - Механизм сопряженной реакции ПМО и ЦДГ [45].

Среди доноров электронов для ПМО химической природы чаще всего используют аскорбиновую или галлиевую кислоты, однако источником электронов могут выступать и различные ароматические соединения, в

частности производные ароматических спиртов, являющихся составными частями лигнина. В работах [85, 86] было проанализировано влияние различных ароматических спиртов и их производных, ЦДГ, глюкозодегидрогеназы и некоторых других соединений на выходы продуктов под действием ПМО при осахаривании целлюлозы. В результате было выяснено, что ферментные доноры электронов эффективнее химических агентов. Так, использование ЦДГ оказалось примерно в 10 раз эффективнее других исследуемых восстановителей [86]. Возможно, это связано с тем, что химические агенты расходуются в процессе реакции, а активность ЦДГ существенно не изменяется. Кроме того, введение больших количеств донора электронов может изменить pH реакционной смеси, что отрицательно скажется на активности гидролаз и приведет к уменьшению выходов целевых продуктов при ферментативном гидролизе ЦСС. Что же касается ароматических соединений, то для ПМО *Myceliophthora thermophila* наиболее эффективными оказались *n*-кумаровая кислота, 3-гидрокси-4-метоксикоричная кислота и 4-гидрокси-3-метоксифенилацетон [85].

### 3.3.2. Механизм действия ПМО с использованием перекиси водорода

В 2017 году появилась публикация, в которой было обнаружено, что реакция окислительного расщепления целлюлозы под действием ПМО *Streptomyces coelicolor* протекает значительно быстрее при внесении в реакционную смесь перекиси водорода (Рисунок 8) [87]. В указанной статье был предложен альтернативный механизм действия ПМО, который подразумевает, что после восстановления меди, к активному центру присоединяется кислород от перекиси водорода, попутно обратно окисляя медь до  $\text{Cu}^{2+}$ . У кислорода при этом остается свободная электронная орбиталь. Эта орбиталь взаимодействует с атомом водорода C1 или C4 углеродного атома гликозидного остатка целлюлозы с образованием радикала на поверхности полимера. В завершение каталитического акта гидроксильная группа, присоединённая к атому меди, переходит на радикал субстрата, что сопровождается разрывом  $\beta$ -1,4-гликозидной связи и образованием 4-

кетозальдозы или альдоновой кислоты.  $\text{Cu}^{2+}$  активного центра при этом снова приобретает степень окисления +1.

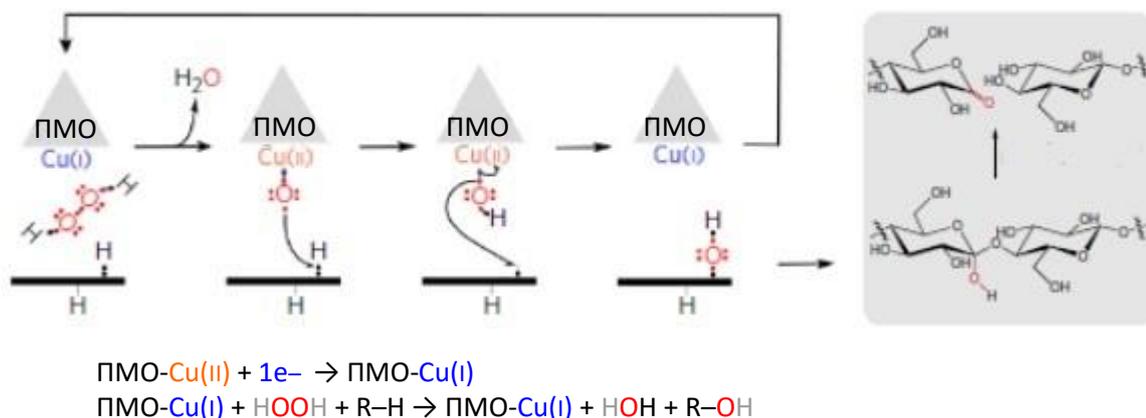


Рисунок 8 - Механизм расщепления целлюлозы под действием ПМО в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  [87].

Так, при добавке в реакционную смесь перекиси водорода, число оборотов фермента в минуту достигло 4,2, тогда как в обычных аэробных условиях данный показатель составлял  $0,3 \text{ мин}^{-1}$ . Оптимальными условиями использования перекиси в модельных экспериментах оказалось введение 600 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  каждый час. Так при концентрации фермента 0,5 мкМ, через 6 часов образовалось более 3000 мкМ окисленных олигосахаридов, при том, что было израсходовано лишь 200 мкМ аскорбиновой кислоты [87].

Ускорение реакции при введении в реакционную смесь перекиси водорода, по-видимому, обусловлено увеличением доступности для ПМО одного из субстратов-окислителей ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), так как растворимость кислорода в условиях эксперимента при  $37^\circ\text{C}$  не превышает 200 мкМ. Отсюда можно заключить, что скорость реакции расщепления целлюлозы под действием ПМО лимитируется присоединением атома кислорода к атому меди активного центра фермента.

Утилизирующие целлюлозу микроорганизмы в составе культуральной жидкости часто содержат фермент глюкозооксидазу, продуктом действия которого являются глюконолактон и перекись водорода. В природе, возможно, именно этот фермент обеспечивает ПМО перекисью водорода. Однако, маловероятно, что в процессе биодеструкции целлюлозы перекись водорода

образуется в количестве нескольких сотен микромоль/л, т.е. концентраций, при которых в работе [87] был определен эффект драматического возрастания активности ПМО. Поэтому до настоящего времени остается не выясненным вопрос, какие формы активного кислорода наиболее существенны в механизме действия ПМО. Следует также отметить, что в большинстве промышленных штаммов-продуцентов для производства ферментных препаратов для деструкции ЦСС ген глюкозооксидазы делетирован, так как глюконолактон является ингибитором БГЛ и ЦБГ.

Необходимо также отметить что в начале 2018 года коллективом итальянских ученых была опубликована статья [88], в которой на основании компьютерных расчетов было показано, что более вероятен механизм действия ПМО, в котором участвует растворенный кислород (раздел 3.3.1), хотя авторы указанной работы не исключали и механизма с участием перекиси водорода при некоторых, достаточно жестких условиях, использованных в компьютерной модели.

### **3.4. Активность и субстратная специфичность ПМО**

Несмотря на то, в настоящее время достаточно хорошо известны структуры ПМО из различных семейств, методы определения активности ПМО по начальным скоростям ферментативной реакции практически отсутствуют. Это связано с тем, что сами по себе ПМО обладают весьма невысокими каталитическими константами, кроме того, присутствие донора электронов в реакционной смеси зачастую затрудняет применение рутинных лабораторных методик определения концентрации сахаров. Как правило активность ПМО из семейств AA9 и AA10 идентифицируют методом анионообменной жидкостной хроматографии высокого давления (НРАЕС) [88], однако для образования детектируемых количеств окисленных олигосахаридов часто требуются многие часы ферментативной реакции. В работе [89] при помощи электрофореза углеводов в полиакриламидном геле было проанализировано действие ПМО на растворимые олигосахариды и

показано, что данные ферменты также способны воздействовать и на растворимые фрагменты биополимера. Белки семейства AA9 в присутствии донора электронов расщепляли олигосахариды от целлотриозы до целлогексаозы с образованием преимущественно окисленных целлобиозы и целлотриозы.

Для подтверждения протекания ферментативной реакции под действием ПМО также часто используют масс-спектрометрический анализ окисленных продуктов деструкции целлюлозы [81, 90]. Однако данный является качественным и не позволяет рассчитать активности ферментов. Наиболее эффективно масс-спектрометрия продуктов используется в тандеме с их хроматографическим анализом [91].

Для определения кинетических параметров реакции деструкции растворимых олигосахаридов под действием ПМО был синтезирован специальный субстрат, целлотетраоза с флуоресцентной меткой (См. Рисунок 9). Посредством измерения флуоресценции резонансного перехода энергии в субстрате (FRET), удалось определить активность фермента. Интенсивность флуоресценции максимальна до расщепления субстрата [89].

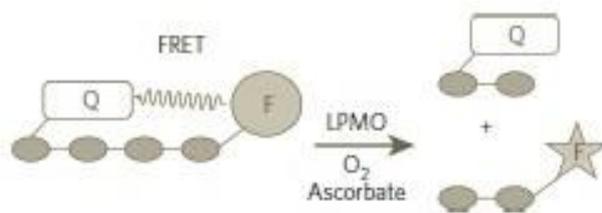


Рисунок 9 - Схема анализа активности ПМО методом измерения флуоресценции в конъюгированной флуоресцентным белком целлотетраозе [89].

Исследование кинетических характеристик ПМО *Lentinus similis* показало, что фермент не обладает лаг-периодом, и в режиме начальных скоростей поддается описанию при помощи модели Михаэлиса-Ментен. Таким образом были получены следующие кинетические параметры при pH 7.0 и 37°C:  $K_M=43\pm9$  мкМ,  $k_{cat}=0.11\pm0.01$  с<sup>-1</sup>. Данные результаты удовлетворительно согласуются с кинетическими параметрами ПМО,

рассчитанными по результатам хроматографического анализа. Для воздействующей на хитин ПМО семейства AA10 из *Serratia marcescens* число оборотов составило  $0,017 \text{ с}^{-1}$ , а для ПМО семейства AA9 *N. crassa* при воздействии на различные субстраты - от  $0,03$  до  $0,06 \text{ с}^{-1}$  [61, 89, 92, 93].

Ввиду того, что удалось детектировать активность ферментов семейства AA9 по отношению к растворимым полисахаридам, в работе [89] были проанализированы рентгеновские спектры комплекса фермента с целлотриозой и целлогексаозой. В обоих случаях были обнаружены ярко-выраженные рефлексы, свидетельствующие об образовании комплекса олигосахаридов с предполагаемым центром связывания фермента из *Lentinus similis* [89]. Данное наблюдение подтвердило тот факт, что поверхность, окружающая активный центр, является центром связывания субстрата.

Помимо воздействия на целлюлозу, некоторые ПМО семейства AA9 обладают активностью и по отношению к гемицеллюлозам [94]. Данное предположение было выдвинуто исходя из анализа секрета базидиомицетов, выращенных на различных средах на основе целлюлозы с различными добавками гемицеллюлоз. Содержание различных полисахаридов в среде повлияло не только на экспрессию гемицеллюлаз, но и на экспрессию белков, позже идентифицированных как ПМО [95, 96]. Таким образом было показано, что активность ПМО не ограничивается действием на целлюлозу, но данные ферменты могут участвовать в расщеплении ксилана, ксилоглюкана, маннана, пектина и даже крахмала. Действительно, ПМО *Neurospora crassa* NcLPMO9C обладает активностью по отношению к ксилоглюкану,  $\beta$ -глюкану и глюкоманнану [94]. Позднее, в работе [97] было показано, что ПМО *Myceliophthora thermophila* (MtLPMO9A) обладает активностью по отношению к ксилану, ассоциированному с целлюлозой. Также для ПМО *N. crassa* NcLPMO9C методом изотермической термокалориметрии были получены термодинамические характеристики связывания фермента с различными субстратами, а именно с целлогексаозой и олигосахаридом из четырнадцати звеньев ксилоглюкана ( $\text{XG}_{14}$ ). Связь с  $\text{XG}_{14}$  сопровождалась

большим выигрышем освобождения энтальпии, что свидетельствует о большем количестве сайтов связывания ПМО *N. crassa* с данным субстратом. Константа диссоциации комплекса фермент-субстрат для целлогексаозы составила  $0,81 \pm 0,08$  мМ, а для XG<sub>14</sub> -  $0,33 \pm 0,04$  мМ [92, 98]. Однако при наличии этих данных, а также структур фермента и комплекса фермента с субстратом, полученными методом ЯМР, активности по отношению к гемицеллюлозным субстратам не были определены.

### 3.5. Свойства ПМО

В виду сложности определения активности ПМО, исследование их биохимических характеристик затруднено. На данный момент ничего не известно об ингибировании фермента продуктами реакции и компонентами реакционных смесей при комплексном гидролизе ЦСС. Однако, благодаря своей «легкой доступности», атом меди активного центра субстрата относительно легко удаляется из фермента с помощью хелатирующих агентов, в частности этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). ПМО при этом полностью теряет свою активность [61, 81]. Стоит отметить, что удаление металла из активного центра не приводит к разрушению белковой глобулы. Повторное введение в раствор инактивированного фермента солей  $\text{Cu}^{2+}$  полностью регенерирует активность ПМО [84]. Так для ПМО *Bacillus amyloliquefaciens*, воздействующей на хитин, при pH 5,0  $K_d$ , определяемая методом изотермической калориметрии при титровании инактивированного фермента раствором ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , составила 6 нМ [83]. Зачастую, как и в случае с ПМО *Phanerochaete chrysosporium* PcGH61D фермент проявляет активность и с другими ионами металлов, например, с ионами  $\text{Mg}^{2+}$ , однако, в подобных случаях активность фермента с изменённым активным центром оказывается существенно ниже исходной [81].

Также извлечение иона меди из активного центра ПМО может приводить к уменьшению термостабильности белка. Так, температура плавления ПМО *Bacillus amyloliquefaciens* составляет 65°C, а после удаления

ионов меди снижается на 20°C [83]. Данные по температурной стабильности других ПМО практически отсутствуют в научной литературе.

Другой характеристикой фермента, существенной для его биотехнологического применения является pH-оптимум его активности. За редким исключением данные о влиянии pH на активность ПМО также практически отсутствуют в литературе, у ферментов семейства AA9 из *Nahella chejuensis* и *Pestalotiopsis simplicissimum* при воздействии на целлюлозу pH оптимум лежал в диапазоне 5,5 до 6,5 [99, 100]. Две ПМО из *M. thermophila* (MtLPMO9B и MtLPMO9D) проявляли наибольшую активность при pH 7,0-8,0 [101].

### **3.6. Особенности практического применения ПМО**

В настоящее время ПМО семейства AA9 являются неотъемлемыми компонентами современного поколения ферментных препаратов для деструкции ЦСС. Согласно данным исследований, внедрение в целлюлазный препарат небольших количеств ПМО, не более 10%, заметно усиливает их осахаривающую способность [61, 102, 103]. Один из наиболее эффективных на сегодняшний день ферментных препаратов CellicCtec 3 (Novozymes, Дания) содержит в своём составе ПМО *Trichoderma reesei* [104]. Однако, при создании данного препарата данный фермент еще рассматривался как представитель семейства GH61 [58]. Новые данные по изучению ферментов данного семейства позволят не только оптимизировать применение ферментных препаратов нового поколения, но и, возможно, скорректировать компонентный состав новых комплексов с учетом особенностей функционирования ПМО. Например, в отличие от гидролаз, для функционирования ПМО необходимо наличие в реакционной смеси доноров электронов и растворенного кислорода.

### 3.7. Комплексная аэробная деструкция ЦСС

Обнаружение ПМО в секрете большинства плесневых грибов [105, 106], являющихся основными продуцентами целлюлазных ферментных комплексов, поставило под сомнение концепцию анаэробной деструкции ЦСС. Анализ секрета бактерий, выращенных на целлюлозе в аэробных условиях, показал наличие ПМО, что подтверждает способность микроорганизмов утилизировать окисленные моно- и олигосахариды [46, 107].

ПМО воздействуют на целлюлозу в кристаллических участках. Окисление целлюлозы ведет к нарушению структуры её микрофибрилл, что заметно облегчает гидролиз нерастворимого субстрата целлюлазами. Мануэлем Эйбингером и коллегами было проведено исследование, подтверждающее эту гипотезу [108]. Целлюлозу подвергали 12-часовой обработке ПМО, используя в качестве донора электронов аскорбиновую кислоту; далее поверхность очищали и окрашивали флуоресцентной краской SYTO-62 (Invitrogen), связывающейся с карбоксильными группами окисленных остатков целлюлозы. Связывание краски с субстратом оценивали методом Конфокальной Лазерной Сканирующей Микроскопии (КЛСМ). На Рисунке 10 приведены результаты данного эксперимента.

Также следует отметить, что на образцах, обработанных лишь ПМО, без добавки аскорбиновой кислоты, флуоресцентные метки не закрепились. Подобная предобработка субстрата привела к увеличению выхода сахаров при гидролизе целлюлозы смесью ЦБГ I с БГЛ и смесью ЦБГ I, ЦБГ II, ЭГ, БГЛ.

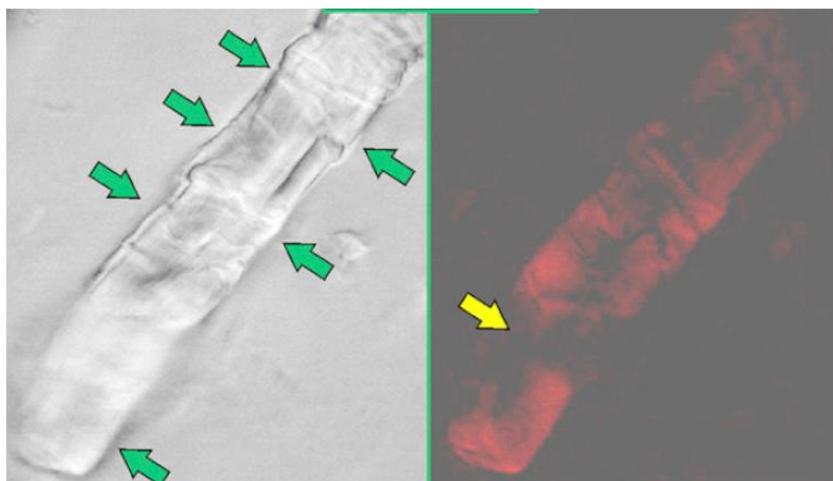


Рисунок 10 - Изображение образца целлюлозы после обработки ПМО *Neurospora crassa* и флуоресцентной краской SYTO-62. Слева изображение, полученное методом просвечивающей микроскопии, а справа методом КЛСМ. Видно, что флуоресцентные сигналы от красителя зафиксированы лишь в кристаллических участках поверхности образца (показаны зелеными стрелками), когда как аморфные окрашены не были (желтая стрелка). Более того, наличие красителя зафиксировано лишь на поверхности образца, во внутренней его части сигналов обнаружено не было [108].

При работе с ферментными комплексами для деструкции ЦСС, содержащими ПМО, создание дополнительных условий, необходимых для активности ПМО, а именно наличие в реакционной смеси донора электронов и кислорода, привело к заметному увеличению выхода целевых продуктов [109]. В этой же работе показано, что при комплексном гидролизе чистой делигнифицированной целлюлозы введение дополнительного донора электронов, аскорбиновой кислоты, необходимо, тогда как при гидролизе растительных субстратов, в частности измельченной древесины различных пород, введение химических доноров электронов не оказывает существенного воздействия на выходы целевых продуктов [109]. Тем не менее, способность ПМО использовать фенольные соединения - составные части лигнина древесины в качестве донора электронов [85] не отменяет необходимость тщательной предобработки растительного сырья, так как данные соединения инактивируют целлюлазы ферментных комплексов [110, 111, 112]. Таким образом, при конструировании ферментных комплексов нового поколения для аэробной деструкции ЦСС и оптимизации их промышленного использования

следует учитывать особенности ПМО, так как они играют существенную роль в процессах разрушения клеточной стенки растений.

### **3.8. Влияние ЦСМ на активность ПМО**

Для применения в составе ферментных препаратов эффективнее оказываются те ПМО, которые обладают более широкой субстратной специфичностью. Что касается других факторов, влияющих на эффективность применения ПМО для комплексной переработки ЦСС, важным и неясным остается вопрос о том, как влияет наличие или отсутствие целлюлозосвязывающего модуля (ЦСМ) на активность данных ферментов. Большинство из известных ПМО не имеют в своей структуре дополнительных модулей, таких как ЦСМ, характерных для целлюлаз гидролитического типа действия. Однако есть и такие ПМО, которые обладают ЦСМ, последний связан с основным каталитическим модулем фермента через пептидный линкер; в частности, это относится к ПМО из *T. reesei* и *N. crassa* [94, 113]. 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), однако в случае ПМО достоверные данные о том, как ЦСМ влияет на их активность, практически отсутствуют в научной литературе, за исключением нескольких работ, в которых были получены несколько противоречивые данные по этому вопросу.

Так делеция ЦСМ у ПМО семейства AA10 привела к двукратному снижению активности фермента по отношению к микрокристаллической и аморфной целлюлозе [114, 115]. Однако делеция ЦСМ у ПМО *N. crassa*, принадлежащего к семейству AA9, не повлияла на активность к аморфной целлюлозе, но вдвое снизила активность по отношению к ксилоглюкану [92]. В работе [116] провели исследование, в котором в ПМО семейства AA10 из *Thermobispora bispora* и *Cellulomonas fimi* меняли местами их ЦСМ или заменяли его на аналогичный домен из целлюлосомы *Clostridium thermocellum*

(СВМ3а) или на ЦСМ (СВМ10) из *Cellvibrio japonicus*. Для ПМО *Cellulomonas fimi* подобные манипуляции привели к следующим результатам: делеция ЦСМ привела к снижению активности по отношению как к аморфной (АМЦ), так и к микрокристаллической целлюлозе (МКЦ), присоединение ЦСМ из *T. bispora* привело к увеличению активности ПМО как по отношению к МКЦ, так и АМЦ; присоединение СВМ3а понизило активность фермента, а в случае СВМ10 активность по отношению к АМЦ понизилась, а по отношению к МКЦ возросла. Для ПМО *Thermobispora bispora* во всех случаях наблюдалось снижение активности по отношению к аморфной и кристаллической целлюлозе, за исключением замены ЦСМ на СВМ3а, для которой наблюдался рост активности по отношению к МКЦ. При этом во всех случаях наблюдалось изменение распределения выходов как окисленных, так и неокисленных олигосахаридов. Таким образом, замена ЦСМ в ПМО семейства АА10 на ЦСМ из других белков не всегда ведет к росту активности фермента. На активность подобных мутантных ПМО влияет большое количество факторов: длина линкера, субстратная специфичность ЦСМ и самой ПМО, кроме того адсорбция гетерологичного ЦСМ может ориентировать ПМО так относительно субстрата, что протекание реакции будет невозможным [116].

Указанные выше данные были получены для ПМО семейства АА10. Однако основным субстратом для данного семейства ПМО является хитин, хотя эти ферменты часто способны действовать и на целлюлозные субстраты. Но главный вывод заключается в том, что замена ЦСМ в ПМО влияет на её активность и субстратную специфичность. Что касается данной диссертационной работы, то больший интерес представляло бы исследование по подобной модификации белка семейства АА9, а именно присоединение ЦСМ к ПМО того же класса, которая не обладает таковым.

\* \* \*

Таким образом, на основании анализа литературы в данной диссертационной работе были поставлены следующие цели:

- Исследование свойств очищенных ПМО из *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* и *Myceliophthora thermophila*, продуценты которых были ранее получены в нашей лаборатории, однако свойства ферментов детально изучены не были.

- Исследование синергизма между ПМО и целлюлазами при комплексной ферментативной деструкции ЦСС

- Создание нового грибного штамма-продуцента, секретирующего рекомбинантную ПМО в культуральной жидкости при сохранении базового состава целлюлазного комплекса.

Для достижения поставленных целей было необходимо выполнить следующие задачи:

- Выделить рекомбинантные ПМО из грибов *Thielavia terrestris* и *Trichoderma reesei* из лабораторных ферментных препаратов на основе генетически модифицированных штаммов *P. verruculosum*. Выделить нативную ПМО из ферментного препарата на основе гриба *Myceliophthora thermophila*.

- Разработать метод измерения активности ПМО. Определить кинетические и биохимические параметры изучаемых ферментов. Идентифицировать продукты деструкции целлюлозы под действием ПМО.

- Изучить влияние ряда донора электронов различного происхождения на эффективность катализа ферментами.

- Исследовать влияние очищенных ПМО на эффективность гидролиза ЦСС как индивидуальными целлюлазами, так и комплексом целлюлолитических ферментов в целом.

- Разработать методами генетической инженерии новые ферментные препараты на основе экспрессионной системы лабораторного штамма *P. verruculosum*, содержащие в своем составе ПМО и обладающие улучшенными биокаталитическими характеристиками.

- Получить химерный фермент, состоящий из ПМО *T. terrestris* и целлюлозосвязывающего модуля от целлобиогидролазы I *P. verruculosum*, и исследовать его свойства.

## II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 4. Материалы и методы экспериментов

#### 4.1. Используемые вещества

##### 4.1.1. Ферментные препараты (ФП)

В данной работе были использованы следующие ферментные препараты:

*Ферментные препараты целлюлаз на основе штаммов-продуцентов гриба *Penicillium verruculosum*, разработанные ранее в лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН:*

- В1-537 – лабораторный ферментный препарат. Штамм-продуцент *P. verruculosum* В1-537 являлся исходным для генно-инженерных манипуляций.
- В1-F10 – лабораторный ферментный препарат β-глюкозидазы (БГЛ) на основе культуральной жидкости рекомбинантного штамма *P. verruculosum* F-10, секретирующего гетерологичную БГЛ *Aspergillus niger* под контролем промотора гена *cbh1*, кодирующего гомологичную целлобиогидролазу I (ЦБГИ).
- hBGL2 – лабораторный ферментный препарат β-глюкозидазы, полученный на основе рекомбинантного штамма *P. verruculosum* GA-BG, секретирующего БГЛ *Aspergillus niger* под контролем гомологичного промотора гена *glal*.

*Ферментные препараты, использованные для выделения ферментов:*

- #3-389.3 - целлюлазный препарат на основе культуральной жидкости рекомбинантного штамма *P. verruculosum* PMO $Th$ , секретирующего гетерологичную ПМО *T. terrestris* под контролем промотора гена *cbh1*.
- #3-332.2.2 - целлюлазный препарат на основе культуральной жидкости рекомбинантного штамма *P. verruculosum* PMO $Tr$ , секретирующего гетерологичную ПМО *T. reesei* под контролем промотора гена *cbh1* [117].

*Ферментные препараты на основе рекомбинантных штаммов P. verruculosum, полученных на основе реципиентного штамма P. verruculosum BI-537:*

- ПМО-ЦСМ - целлюлазный препарат на основе культуральной жидкости рекомбинантного штамма *P. verruculosum PMOTth-CBD*, секретирующего химерный фермент, полученный сшивкой ПМО *T. terrestris* и ЦСМ ЦБГП *P. verruculosum* под контролем промотора гена *cbh1*.
- hLPMO - целлюлазный препарат на основе культуральной жидкости рекомбинантного штамма *P. verruculosum GA-PMOTr*, секретирующего гетерологичную ПМО *T. reesei* под контролем промотора *glal* гена глюкоамилазы.

*Коммерческие целлюлолитические ферментные препараты:*

- CellicCtec3 – продукт компании Novozymes, Дания
- Accellerase Trio – продукт компании Dupont, США.
- NCE L600 - коммерческий ферментный препарат на основе *M. thermophila*, содержащий нативную ЦДГ (Dayadic Int., США).
- G7B11 – целлюлазный ферментный препарат на основе культуральной жидкости гриба *Myceliophthora thermophila*, содержащий нативную ПМО. (Dayadic Int., США).

#### 4.1.2. Субстраты

*Субстраты для ферментативного осахаривания ЦСС:* В экспериментах по гидролизу ЦСС различными ферментными смесями в качестве субстратов использовали микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ, ООО «МК-Центр», Россия), измельченную осиновою древесину (двухстадийное измельчение на ударной мельнице Микроселима IM-450, Монолитстрой, Российская Федерация, при скорости вращения ротора 4500 об/мин с производительностью 0,5-3,0 м<sup>3</sup>/ч, с мощностью 30 кВт; средний размер частиц 5-10 мкм), а также МКЦ Avicel PH-101 (Sigma, США).

*Субстраты для определения активности ферментов:* Для определения скорости потребления кислорода в ходе ферментативной реакции под действием ПМО в качестве субстратов использовали аморфную целлюлозу, полученную из МКЦ (Sigma, США) по методу, описанному в работе [118], ксилан из бука (Sigma, США), КМЦ (Sigma, США),  $\beta$ -глюкан из ячменя (Megazyme, Австралия), картофельный крахмал (Реахим, Россия), ксилоглюкан (Megazyme, Австралия), *p*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозид (Sigma, США) (*p*-NPG).

#### 4.1.3. Доноры электронов

Для исследования реакций, катализируемых ПМО, был выбран ряд различных доноров электронов, в основном производных ароматических спиртов, обладающих различным окислительно-восстановительным потенциалом.

Таблица 1 - Используемые в работе доноры химических электронов для ПМО и их потенциалы.

Донор электронов	Окислительно-восстановительный потенциал, мВ
Аскорбиновая кислота (Acros Organics, США)	79
Эвгенол (Merck, Германия)	411
Гваякол (Acros Organics, США)	460
Циннамальдегид (Sigma, США)	588
2-гидроксибензальдегид (Merck, Германия)	202
Галлиевая кислота (Sigma, США)	274
Эллаговая кислота (Acros Organics, США)	187
2,5-дигидроксибензальдегид (Merck, Германия)	202
Ванилин (Merck, Германия)	620
4-гидроксикумарил (Merck, Германия)	763
2,5-диметилпарабензохинон (Acros Organics, США)	23

#### 4.1.4. Хроматографические сорбенты и системы для хроматографии и концентрирования белков:

Для разделения ферментных препаратов использовали следующие хроматографические носители: для гель-фильтрации – Bio Gel P10 фирмы «Bio-Rad» (США); для анионообменной хроматографии среднего давления – Source 15Q и Mono Q фирмы GE Healthcare, Великобритания (бывш. «Pharmacia», Швеция); для гидрофобной хроматографии среднего давления – Source 15Iso фирмы (GE Healthcare, Великобритания); для гель-проникающей хроматографии среднего давления Superose12 (GE Healthcare, Великобритания). Для разделения использовали хроматографические системы Akta Purifier и Akta Pure (GE Healthcare, Великобритания)

Для концентрирования и обессоливания белков использовали систему Pellicon XL с мембраной Biomax 5 («Merck Millipore», Германия).

## **4.2. Получение генетических конструкций для трансформации в *P. verruculosum* B1-537**

### 4.2.1. Конструирование экспрессионной плазмиды, содержащей ген *cel61A*, кодирующий гетерологичную ПМО *T. reesei*

#### *4.2.1.1. Получение плазмиды pGA-GA с индуцибельным промотором гена *glal**

ПЦР-продукт, соответствующий последовательности гена *glal*, вместе с его промоторной областью (3924 bp, GenBank accession number: KY086000) сшивали методом независимого лигирования [119] с линейризованным вектором pUC-LIC. Вектор pUC-LIC был разработан в лаборатории ранее на основе плазмиды pUC19 («NEB», Великобритания). Отличительной особенностью вектора pUC-LIC является наличие сайтов независимого лигирования (LIC-сайтов) на 5'- и 3'- концах линейризованного вектора.

Таким образом, ПЦР-продукт (3924 bp) и линейризованный вектор pUC-LIC подвергали обработке T4-ДНК полимеразой (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA, USA) в присутствии dCTP и dGTP, соответственно, для

генерации «липких» концов. Обработанный амплификат вставки был лигирован в линейризованный вектор pUC-LIC. Для этого смешивали 50 нг вектора и 150 нг вставки. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 22°C. Далее полученную плазмиду трансформировали в компетентные клетки *E. coli* MachI [F– Ф80lacZΔM15 ΔlacX74 hsdR(rK–, mK+) ΔrecA1398 endA1 tonA] по стандартной методике [120]. Таким образом, была получена плазида pGA-GA. Наличие сайтов независимого лигирования позволяет клонировать любой ген без использования лигазы. Этот способ был использован для получения плазмид, описанных в [117, 119, 121].

Далее плазмиду pGA-GA использовали для получения линейризованного вектора pGA. Для этого были сконструированы следующие синтетические олигонуклеотиды pUC-gla-LIC5 и pUC-gla-LIC3 (Таблица 2):

Таблица 2- Синтетические олигонуклеотиды, использованные в работе.

Название	Структура олигонуклеотида (в направлении 5'→3')
pUC-gla-LIC5	TGCCGGCTGTGTTGAACGAAGGAAAAAACAG
pUC-gla-LIC3	CCGGGCTTCTCCTCATAGACTTTCACCTTTTTTCGACAG
eglIV-gla-LIC5	CAACACAGCCGGCATCATGATCCAGAAGCTTTCCAACCTC
eglIV-gla-LIC3	GAGGAGAAGCCCGGTCTAGTTAAGGCACTGGGCGTAGT
PMO- LIC5	CAAACAGAAGCAACCGACACAATGCTCGCAAACGGTGCCA TCGTCTTCCT
PMO-CBD-REV	AGAAGAAGTAGTGCTGCCACCGCAGCTGAAGACGGCCGGGC
PMO-CBD-FWD	GCCCGGCCGTCTTCAGCTGCGGTGGCAGCACTACTTCTTCTAC
CBD-LIC3	GAGGAGAAGCCCGGTTACAGGCACTGAGAGTAGTAAG

Для амплификации линейризованного вектора использовали Long PCR enzyme (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) при следующих условиях: первичная денатурация 95 °C (3 мин), денатурация в цикле – 95 °C (45 сек), отжиг праймеров – 50 °C (2 мин), синтез полинуклеотидной цепи – 68 °C (5 мин). Проводили 20 циклов. По завершении 20 циклов инкубировали смесь при 4°C (10 мин). Полученный ПЦР-продукт выделяли из агарозного геля при помощи набора QiAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США).

#### 4.2.1.2. Получение конструкции с геном *cel61A*, кодирующим ПМО *T. reesei*

Ген *cel61A* (Genbank: XM\_006961505.1) кодирует белок EGLIV, ныне отвечающий ПМО *T. reesei*. Для получения конструкции, содержащей ген *cel61A*, проводили его амплификацию, используя пару олигонуклеотидов eglIV-gla-LIC5 и eglIV-gla-LIC3 (Таблица 2).

Для амплификации вставки использовали Long PCR enzyme (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) при следующих условиях: первичная денатурация 95 °C (5 мин), денатурация в цикле – 95 °C (1,5 мин), отжиг праймеров – 50 °C (2 мин), синтез полинуклеотидной цепи – 68 °C (2 мин). Проводили 20 циклов. По завершении 20 циклов инкубировали смесь при 4°C (10 мин). Полученный ПЦР-продукт выделяли из агарозного геля при помощи набора QiAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США).

Далее ген *cel61A* клонировали в линеаризованный вектор pGA по методу, описанному в [119]. Таким образом была получена плаزمида pGA-EGIV (Рисунок 11). Далее, для наработки ДНК-материала, полученную плазмиду трансформировали в компетентные клетки *E.coli* MachI по стандартной методике [120]. Выделенную после трансформации плазмиду pGA-EGIV проверяли на отсутствие мутаций путем секвенирования по методу Сэнгера в обоих направлениях [122].

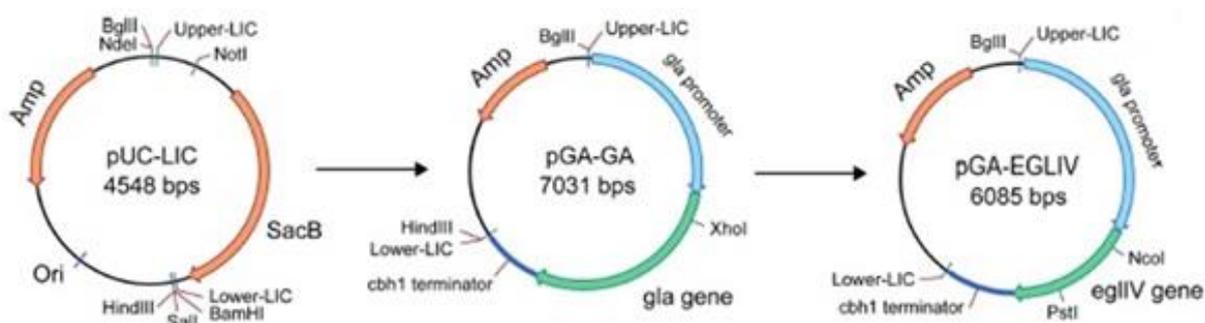


Рисунок 11 - Схема получения плазмиды pGA-EGIV.

#### 4.2.2. Конструирование химерного белка РМО-CBD, состоящего из ПМО *T. terrestris* и ЦСМ целлюбиогидролазы I *P. verruculosum*

Первым шагом для получения генетической конструкции, кодирующей химерный белок, была наработка генетического материала, включающего ген *eglE*, кодирующий ПМО *T. terrestris* (GenBank NC\_016462) и фрагмент гена *cbhI* ЦБГИ *P. verruculosum* [117, 121], кодирующего ЦСМ и линкер фермента, для последующей сшивки продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для амплификации гена *eglE* применяли ПЦР, в качестве матрицы использовали геномную ДНК *T. terrestris*, выделенную при помощи набора Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN, США), и пару олигонуклеотидов РМО-LIC5 и РМО-CBD-REV (Таблица 2).

Амплификацию фрагмента гена *cbhI<sub>cbd</sub>*, соответствующего последовательности ЦСМ вместе с линкером фермента ЦБГИ, осуществляли на матрице геномной ДНК, выделенной из лабораторного штамма низшего гриба *P. verruculosum*, при использовании олигонуклеотидов РМО-CBD-FWD и CBD-LIC3 (Таблица 2).

В обоих экспериментах в качестве полимеразы использовали Long PCR mix (ThermoScientific, США). Для проведения ПЦР были применены следующие условия: первичная денатурация – 95 °С (3 мин), денатурация в цикле – 95 °С (1 мин), отжиг праймеров – 52 °С (1 мин), синтез полинуклеотидной цепи – 68 °С (1 мин). Проводили 15 циклов. Полученные ПЦР-продукты выделяли из агарозного геля при помощи набора QiAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США). Выделенные из геля фрагменты, длиной 784 п.о. и 186 п.о., соответственно, взятые в количестве 10 нг смешивали и проводили ПЦР, используя олигонуклеотиды РМО-LIC5, CBD-LIC3 (Таблица 2) и Pfu-полимеразу (ThermoScientific, США). Условия ПЦР в этом случае были следующими: первичная денатурация – 95 °С (45 сек), денатурация в цикле – 95 °С (30 сек), отжиг праймеров – 58 °С (1 мин), синтез полинуклеотидной цепи – 68 °С (1,5 мин). Проводили 20 циклов.

Полученный амплификат обрабатывали T4-ДНК полимеразой в присутствии dATP, и смешивали с вектором pUC-SBHI, обработанным T4-ДНК полимеразой в присутствии dTTP [119]. Вектор pUC-SBHI был получен в лаборатории ранее. Отличительной особенностью вектора pUC-SBHI является наличие промоторной и терминаторной областей гена *cbhI* для осуществления индуцибельной экспрессии. Далее, лигированную смесь трансформировали в компетентные клетки *Escherichia coli* MachI. Выделенные после трансформации плазмиды серии PMO-CBD секвенировали по методу Сэнгера в обоих направлениях [122].

### **4.3. Получение ферментных препаратов, содержащих гетерологичные ПМО**

#### 4.3.1. Проведение трансформации штамма-реципиента гриба *P. verruculosum* B1-537

Плазмиды pGA-EGIV и pPMO-CBD-cl1 котрансформировали в ауксотрофный штамм-реципиент *P. verruculosum* B1-537 ( $\Delta$ *niaD*) [123] совместно с плазмидой pSTA10 (10:1 мкг), обеспечивающей прототрофность рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* серии PMO-CBD по методике, описанной Алексенко с коллегами [124], адаптированной для трансформации *P. verruculosum*. Плазида pSTA10 несет ген нитратредуктазы *Aspergillus nidulans*, замещающий дефектный ген *niaD* в штамме-реципиенте *P. verruculosum* B1-537, что приводит к возможности селекции рекомбинантных штаммов серии на средах с 10 mM NaNO<sub>3</sub>.

Первичный скрининг трансформантов осуществляли методом ПЦР, напрямую с грибных колоний, используя Phire полимеразу (ThermoScientific, США). При скрининге трансформантов использовали пару олигонуклеотидов PMO-LIC5 и CBD-LIC3, а для EGIV *T. reesei* - pUC-gla-LIC5 и eglIV-gla-LIC3.

#### 4.3.2. Ферментация рекомбинантных штаммов в колбах

Ферментацию рекомбинантных штаммов проводили в колбах Эрленмейера, объемом 750 мл. Для ферментации использовали стандартную ферментационную среду следующего состава (%): целлюлозы - 4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1,5, дрожжевого экстракта и пшеничных отрубей - по 1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и  $0,03 \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,03.

В случае ПМО *T. reesei* под контролем индуцибельного промотора гена глюкоамилазы, состав среды для культивирования был следующим (%): целлюлозы - 4, пшеничной муки грубого помола, предобработанной термостабильной амилазой в количестве 2 ед. на 1 г крахмала, - 20.

#### 4.3.3. ПААГ-электрофорез

Наличие целевого белка определяли по сравнению электрофореграмм белков из культуральных жидкостей, полученных при культивировании новых и исходного штаммов. Электрофорез белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) на приборе Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, США) согласно руководству к эксплуатации прибора. Белковые полосы в гелях окрашивали красителем кумасси бриллиантовым голубым R-250 (Ferak, Германия).

#### 4.3.4. Определение активности ферментных препаратов по отношению к полисахаридным и синтетическим субстратам

Активности ферментных препаратов по отношению к полисахаридным субстратам (Крахмал, МКЦ, КМЦ, Ксилан) определяли по начальным скоростям образования ВС, определяемых методом Шомоди-Нельсона [133]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС в минуту в рН-оптимуме действия ФП, при концентрации субстрата 5 г/л и температуре 50°C

$\beta$ -глюкозидазную активность определяли по отношению к *p*-NPG, измеряя начальную скорость образования *n*-нитрофенола. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль *n*-нитрофенола в минуту в рН-оптимуме действия фермента при 40°C.

#### 4.4. Выделение и очистка ферментов

Для выделения и очистки исследуемых белков были применены следующие индивидуальные схемы выделения:

##### 4.4.1. ПМО *T. terrestris*, ПМО *T. reesei*, ПМО *M. thermophila*

Схемы выделения ПМО *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila* приведены на рисунке 12.

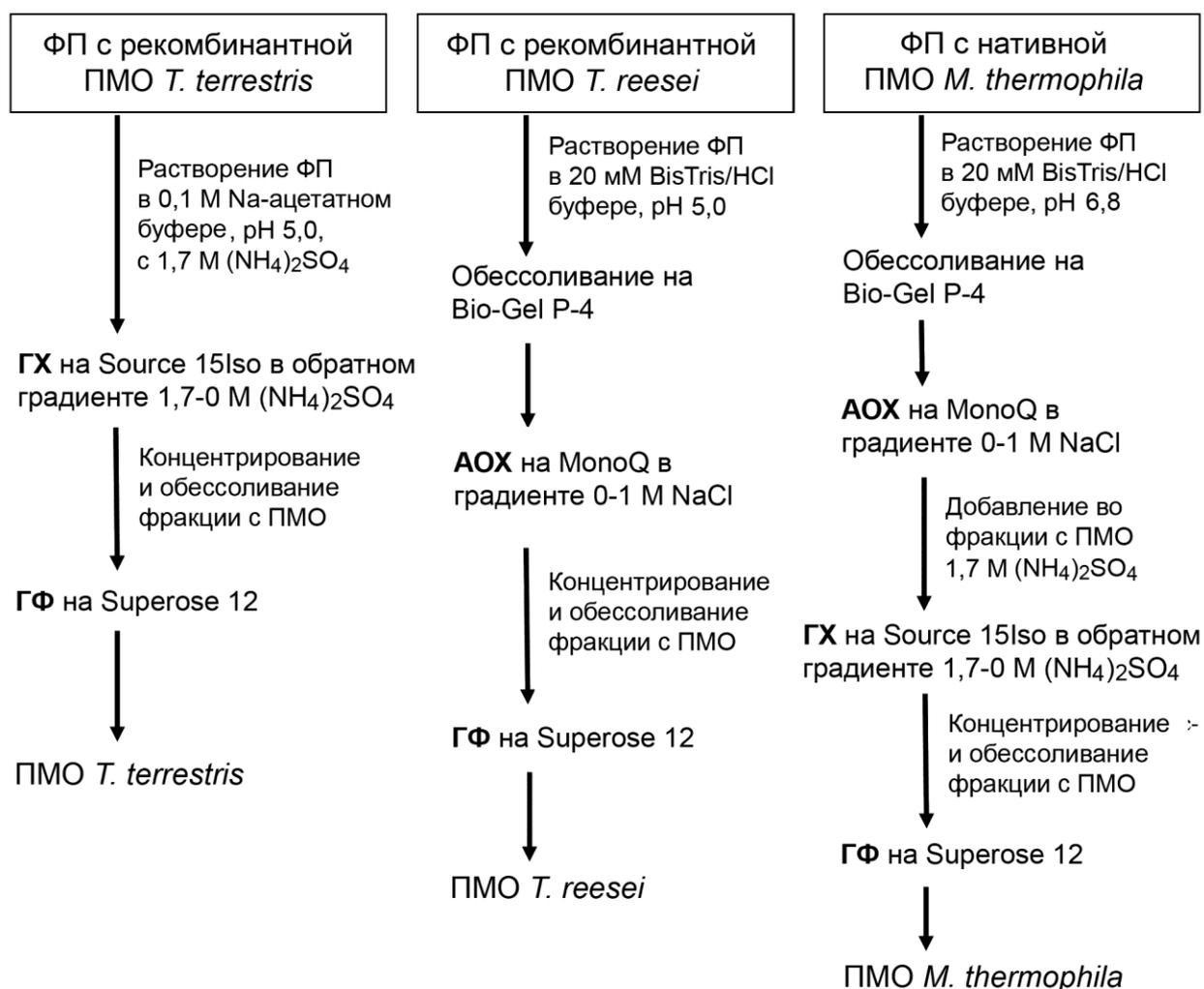


Рисунок 12 - Схема выделения и очистки ПМО. Сокращения: ФП – ферментный препарат, ГХ – гидрофобная хроматография, АОХ – анионообменная хроматография, ГФ – гель-фильтрация

##### 4.4.2. ЦДГ1 *M. thermophila*

Для выделения ЦДГ1 *M. thermophila* обессоленный ферментный препарат наносили на колонку MonoQ, уравновешенную 20 мМ Bis-Tris/HCl буфером, pH 6,8, и осуществляли элюирование связавшегося белка в градиенте

0-1 М NaCl. Во фракции, содержащие ЦДГ1, добавляли 1,7 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , и далее проводили гидрофобную хроматографию белка на колонке Source 15Iso в нисходящем градиенте 1,7-0 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Окончательную очистку ЦДГ1 проводили с помощью анионообменной хроматографии на MonoQ, как на первой стадии очистки данного фермента.

#### 4.4.3. Химера ПМО-ЦСМ

Белок из культуральной жидкости, отобранной для выделения химерной ПМО-ЦСМ, осаждали с помощью  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . После удаления супернатанта осадок растворяли в минимальном количестве буфера, содержащего 20 мМ пиперазин/HCl, pH 5,1. Разделение предварительно обессоленных на носителе Bio-Gel P-4 белков проводили на колонке MonoQ в восходящем градиенте NaCl. Во фракции, содержащие целевой белок с молекулярной массой около 30 кДа, добавляли  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до концентрации 1,7 М. После этого проводили гидрофобную хроматографию отобранных фракций в нисходящем градиенте  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  на колонке Source 15Iso. Фракцию, содержащую очищенный целевой белок, обессоливали и концентрировали на системе Pellicon XL с мембраной Biomax 5.

### **4.5 Идентификация ферментов методом масс-спектрометрии**

Идентификацию ферментов проводили методом пептидного картирования после расщепления белков, содержащихся в соответствующих полосах геля после электрофореза, с помощью трипсина («Promega», США) [125]. МАЛДИ масс-спектрометрия трипсиновых гидролизатов белков проводилась сотрудниками ЦК ФИЦ Биотехнологии РАН «Промышленные биотехнологии» на времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme («Bruker Daltonik GmbH», Германия). Анализ полученных данных осуществляли с помощью онлайн сервиса MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

При идентификации химерного белка ПМО-ЦСМ анализ полученных данных осуществляли путем сравнения масс полученных пептидов и масс

теоретических пептидов, рассчитанных при помощи онлайн сервиса PeptideMass ([http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/)).

#### **4.6. Идентификация продуктов окислительной деструкции целлюлозы под действием ПМО**

##### 4.6.1. Приготовление стандартов для анализа окисленных олигосахаридов

В качестве стандартов для анионообменной ВЭЖХ (НРАЕС) использовали глюкозу, целлобиозу, целлотриозу, целлотетраозу и целлопентаозу (Sigma, США). Окисленные олигосахариды получали окислением йодом указанных олигосахаридов по методу, описанному в работе [126].

##### 4.6.2. Хроматографический и масс-спектрометрический анализ продуктов деструкции целлюлозы

Анализ продуктов окислительной деструкции целлюлозы под действием ПМО проводили при помощи метода анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (НРАЕС).

В реакционную смесь вносили 5 г/л аморфной целлюлозы, 5 мМ аскорбиновой кислоты, 4 мкМ ПМО. Запасные растворы донора электронов, субстрата и ферментов были готовили в 0,05 М Na-ацетатном буфере, pH 5,0. Реакцию проводили в течение 48 ч при 40°C.

По завершении реакции пробы центрифугировали, отбирали супернатант и кипятили его в течении 20 мин для полной инактивации фермента. После этого пробу разделяли на 2 аликвоты. Одну анализировали масс-спектрометрически на времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme («Bruker Daltonik GmbH», Германия), а вторую хроматографически.

Хроматографический анализ проб проводили, используя систему для ВЭЖХ Agilent 1100 series (США) на колонке CarboPac PA100 (Dionex, США) по методу, аналогичному описанному в работе [88]. Разделение проводили в

0,1 М растворе NaOH в восходящем модифицированном градиенте 0-0,5 М NaAc при скорости потока 0,25 мл/мин. На предварительно уравновешенную колонку вводили 0,1 мл пробы. Первые 10 мин проводили элюирование в 0,1 М NaOH, далее в течение 40 минут линейно увеличивали концентрацию NaAc до 0,1 М, затем, для промывки колонки, в течение 5 мин довели концентрацию NaAc до 0,5 М. Далее промывали колонку 10 мин, а затем 20 мин 0,1 М NaOH для отмывки соли и уравнивания колонки, после чего система была готова к анализу следующей пробы.

После этого полученную хроматограмму анализировали путем сравнения с фоновым образцом (не содержащим фермента), стандартами исходных и окисленных олигосахаридов, а также с результатами масс-спектрометрического анализа второй аликвоты. МАЛДИ масс-спектрометрия продуктов окислительной деструкции целлюлозы проводилась сотрудниками ЦК ФИЦ Биотехнологии РАН «Промышленные биотехнологии» на времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme («Bruker Daltonik GmbH», Германия) с использованием 2,5-дигидроксибензойной кислоты в качестве матрицы.

#### **4.7. Адсорбция ПМО**

Адсорбционную способность ферментов определяли при 6°C, при этом концентрация МКЦ или измельченной древесины осины 25 г/л, а концентрация ферментов 0,8 г/л (0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0). Смесь перемешивали в пробирках объемом 1,5 мл на термошейкере Eppendorf ThermoMixer C (Германия) в течение 30 мин, после чего суспензию центрифугировали, и в супернатанте определяли остаточную концентрацию белка методом Лоури [127]. Результаты выражали в процентах адсорбировавшегося белка от исходной концентрации в растворе [38].

#### 4.8. Термостабильность ПМО

Для ПМО *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila* была определена температура плавления методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) [128, 129] на приборе MicroCal VP-DSC (Malvern Instruments, Великобритания). Растворы ферментов готовили в 10%-ном Полибуфере 96 (Polybuffer 96, Pharmacia, Швеция), доведённом до pH 7,0 уксусной кислотой. Большинство иных буферных систем в диапазоне pH 7-8 содержат соединения, взаимодействующие с медью активного центра, что может повлиять на температуру фазового перехода фермента. Концентрация белка составляла 0,9 мг/мл для ПМО *T. terrestris*, *T. reesei* и 0,7 мг/мл для ПМО *M. thermophila*. Далее, при увеличении температуры со скоростью 1°C в минуту определяли температуру плавления по тепловому эффекту конформационных изменений белковой глобулы методом ДСК.

Также для ПМО *T. terrestris* и *T. reesei* были определены температуры плавления после извлечения меди из активного центра с помощью ЭДТА. Растворы ферментов указанной выше концентрации готовили в воде во избежание сторонних реакций между ионами меди, ЭДТА и компонентами буферного раствора, затем инкубировали в течение 3 часов в растворе 0,1 мМ ЭДТА. После этого удаляли образовавшиеся комплексные соединения на центрифужных концентраторах Vivaspin 5000 (Sartorius, Германия) с мембраной на 5 кДа из полиэтиленсульфона. Далее возвращали раствору ферментов исходную концентрацию и проводили ДСК.

#### 4.9. Изучение взаимодействия ПМО с индивидуальными целлюлазами

При исследовании взаимодействия ПМО с очищенными целлюлазами, а именно ЦБГ I и ЦБГ II *T. reesei* [130], и ЭГ I и ЭГ II *P. verruculosum* [123] в качестве субстрата для осахаривания использовали МКЦ (Avicel PH-101, Sigma, США). Обработку субстрата ферментами проводили при 50°C, pH 5,0

и перемешивании в микропробирках объемом 1,5 мл на термошейкере Biosan TS-100 (Латвия). Концентрация субстрата составляла 50 мг/мл.

ЦБГ – фермент, который ингибируется продуктом реакции - целлобиозой. Поэтому в реакционную смесь дополнительно вводили фермент БГЛ из лабораторной коллекции очищенных ферментов [40], которая расщепляет дисахарид до глюкозы. Загрузка ЦБГ в реакционной смеси составляла 0,05 мг/мл, БГЛ *A. niger* – 0,005 мг/мл [131], дозировка ЭГ составляла 0,05 мг/мл. Концентрация ПМО в реакционной смеси составляла 0,4 мкМ, концентрация ЦДГ, выбранной в качестве донора электронов для ПМО также составила 0,4 мкМ. Для предотвращения микробного заражения в реакционную смесь вводили 1 мМ азида натрия в качестве консерванта. Помимо опытных образцов, проводили ряд контрольных измерений, а именно: без ферментов, ЦДГ+ПМО, ЦБГ+БГЛ и ЭГ - для выяснения персональной роли ПМО в комплексной деструкции целлюлозы.

Пробы отбирали по истечении 2, 4, 24 и 48 ч. Реакционную смесь центрифугировали при 14500 об/мин в течение 3 мин, отбирали аликвоту супернатанта, в которой определяли концентрацию восстанавливающих сахаров методом Шомоди-Нельсона [132].

#### **4.10. Оптимизация применения ПМО при ферментативном осахаривании ЦСС**

В качестве целлюлазного препарата для данного исследования была выбрана смесь, состоящая на 85% из ферментного препарата В1-537 и на 15% из препарата В1-F10, используемого как источник БГЛ. Далее данная ферментная смесь будет обозначаться как препарат РV.

#### 4.10.1. Изучение различных вариантов применения ПМО в процессах ферментативного осахаривания ЦСС

##### *4.10.1.1. Осахаривание целлюлозы смесью ПМО и целлюлазного комплекса*

Обработку микрокристаллической целлюлозы (МКЦ, ООО «МК-Центр», Россия) ферментами проводили в течение 48 ч при 50°C и pH 5,0. Навеску субстрата (150 мг) смешивали с 1 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера, pH 5,0, в пробирке объемом 1,5 мл. К суспензии добавляли 0,5 мл раствора ферментов, пробирку помещали в термостатируемый шейкер Biosan TS-100 (Латвия), и реакционную смесь перемешивали в течение 48 ч, периодически отбирая пробы суспензии объемом 0,1 мл. Суммарную дозировку ферментов рассчитывали таким образом, чтобы она составляла 5 мг белка (по Лоури) на 1 г субстрата (0,5 мг/мл). В одной из серий экспериментов проводили гидролиз МКЦ под действием композиционного целлюлазного препарата PV, в других сериях экспериментов часть целлюлазного препарата (10% по белку) заменяли очищенной ПМО, т.е. в последнем случае в реакционной смеси находилось 0,45 мг/мл целлюлаз и 0,05 мг/мл ПМО. Так как для функционирования ПМО необходимо присутствие донора электронов, в качестве последнего в реакционную смесь дополнительно вносили галлиевую кислоту (ГК, 6,25 мМ). После отбора проб (0,1 мл) их центрифугировали, и в супернатанте определяли концентрацию восстанавливающих сахаров методом Шомоди-Нельсона [132].

##### *4.10.1.2. Предобработка целлюлозы под действием ПМО.*

Итоговые концентрации реагентов и ферментов в данном опыте были теми же, что и при изучении гидролиза МКЦ смесями ферментных препаратов с ПМО (см. выше).

В образцы, содержавшие ПМО *T. terrestris* и ПМО *T. reesei* вносили рассчитанное количество соответствующей ПМО и донор электронов галлиевую кислоту (ГК, 6,25 мМ). Образец PV (контрольный) ферментативной предобработке не подвергался. Т.е. в данном случае реакционная смесь без

целлюлазного комплекса PV инкубировалась сутки при перемешивании. По истечении 24 ч инкубации, проводили инактивацию ПМО в течение 30 мин при температуре 100°C. Определяли концентрацию ВС (точка 24 ч). Далее в микропробирку вносили ферментный препарат PV, и затем проводили измерения концентрации ВС через 24 и 48 ч ферментативной реакции.

#### *4.10.1.3. Деструкция целлюлозы ПМО после предобработки целлюлазным комплексом*

Во все образцы вносили рассчитанное количество ферментного препарата PV. По истечении 24 ч инкубации проводили инактивацию целлюлаз в течение 40 мин при 100°C, а затем измеряли концентрацию ВС (точка-“предобработка 24 ч”). Далее в образцы PV+ПМО *T. terrestris* и PV+ПМО *T. reesei* вносили рассчитанное количество соответствующей ПМО и 6,25 мМ ГК.

Эффективность деструкции субстрата оценивали по концентрации ВС в реакционной смеси через 24, 48 и 72 ч гидролиза.

#### *4.10.2. Поиск оптимальных условий применения донора электронов*

##### *4.10.2.1. Вариация концентрации галлиевой кислоты в реакционной смеси*

Гидролиз МКЦ проводили при трех различных концентрациях донора электронов, как описано в предыдущем разделе. В первом случае концентрация ГК в пробирке составляла 25 мМ, во втором 10 мМ, в третьем 6,25 мМ. В четвёртом варианте вносили по 4 мМ в начале эксперимента, а затем каждые 12 ч, т.е. в 0 ч, 12 ч, 24 ч и в 36 ч (далее «4 мМ x 4»).

Эффективность деструкции субстрата оценивали по концентрации глюкозы через 48 ч гидролиза. Концентрацию глюкозы определяли хроматографически (методом НРАЕС), по методике, аналогичной описанной в разделе 4.6.2.

#### *4.10.2.2. Изучение влияния доноров электронов различной природы на осаживающую способность ферментного препарата*

Для оценки влияния донора электронов на функционирование ПМО было проведено две серии опытов в идентичных условиях. В первом случае донор химической природы (ГК) не вносили в реакционную смесь, а во втором - добавляли 6,25 мМ. Кроме того, использовали донор биологической природы - фермент ЦДГ *M. thermophila*, который вводили в реакционную смесь в эквимолярном количестве относительно ПМО, т.е. 2,5 мкМ. Также, в качестве фонового эксперимента, было исследовано влияние ЦДГ на осаживающую способность PV. Температурный режим, концентрации ферментов и субстрата в данных экспериментах были те же, что и в пункте 4.10.1. Также аналогичные опыты проводили и на измельченной осиновой древесине.

Эффективность деструкции субстрата оценивали по концентрации ВС в реакционной смеси через 3, 24 и 48 ч гидролиза.

#### 4.10.3. Гидролиз ЦСС ферментными смесями на основе hBGL2 и hLPMO. Исследование воздействия химерной ПМО на комплексную деструкцию целлюлозы

Для исследования свойств химерной ПМО в составе целлюлазного комплекса был выбран лабораторный препарат на основе *P. verruculosum* - hBGL2 (см. 4.1.1). Ферментативное осаживание микрокристаллической целлюлозы (МКЦ, Sigma, США) и измельченной осиновой древесины проводили в течение 48 ч при 50 °С и рН 5,0. Предварительно рассчитанную навеску субстрата (150 или 120 мг) смешивали с 1 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0, в пробирке объемом 1,5 мл. К суспензии добавляли 0,5 мл ферментного раствора, пробирку помещали в термостатируемый шейкер TS-100 (Biosan, Латвия), и реакционную смесь перемешивали в течение 48 ч, периодически отбирая пробы суспензии объемом 0,05 мл. Суммарную дозировку ферментов рассчитывали таким образом, чтобы она составляла 5 мг белка (по Лоури) на 1 г субстрата (0,5 мг/мл). В одной из серий экспериментов проводили гидролиз субстратов под действием препарата hBGL2, в других

сериях экспериментов часть целлюлазного препарата (10% по белку) заменяли очищенной ПМО, т.е. в последнем случае в реакционной смеси находилось 0,45 мг/мл целлюлаз и 0,05 мг/мл ПМО. Так как для функционирования ПМО необходимо присутствие донора электронов, то при гидролизе МКЦ в реакционную смесь дополнительно вносили очищенную ЦДГ I *M. thermophila* (в эквимольном количестве относительно ПМО). При гидролизе осиновой древесины дополнительное введение ЦДГ I не требовалось, так как субстрат содержал в своем составе остатки полифенольных спиртов – продуктов деградации лигнина, выступающих в качестве донора электронов для ПМО.

По такой же методике мы проверяли осаживающую способность препарата hLPMO, содержащего гетерологичную ПМО *T. reesei*, ген которой был клонирован в *P. verruculosum* под контролем глюкоамилазного промотора, и смеси hBGL2 с hLPMO в равном количестве по белку (1:1), на МКЦ и измельченной осиновой древесине.

После отбора проб (0,05 мл) их центрифугировали, и в супернатанте определяли концентрацию ВС методом Шомоди-Нельсона [132] и глюкозы глюкозооксидазно-пероксидазным методом, используя набор реактивов «Фотоглюкоза» (Импакт, Россия).

#### **4.11. Определение активности ПМО по скорости потребления кислорода в реакционной смеси**

##### 4.11.1. Определение активности ферментов

Определение активности ПМО проводили по скорости потребления кислорода (СПК) в реакционной смеси с помощью высокочувствительного флуоресцентного метода детекции растворенного кислорода на анализаторе Seahorse XFp (Agilent, США). Прибор рассчитывает СПК, исходя из уменьшения его концентрации в реакционной смеси за заданный промежуток времени (3 мин). Для определения активности ПМО в ячейки восьмилуночного планшета вносили рассчитанное количество аморфной целлюлозы, чтобы её итоговая концентрация составляла 4 г/л. Объем доводили

до 200 мкл 50 мМ Na-ацетатным буфером, рН 5,0. Далее планшеты инкубировали 40 мин в термостате при 37 °С для уравнивания содержания растворенного кислорода. Затем планшеты быстро помещали в прибор, где его дополнительно инкубировали при 37 °С в течение 12 мин, после чего начинали измерения.

Цикл одного измерения состоял из 1 мин перемешивания проб, 5 мин уравнивания и 3 мин измерения СПК. Для этого зонды прибора, несущие флуоресцентные биосенсоры, опускались на дно ячейки, где происходило измерение сигнала в создаваемой таким образом герметичной микрокамере объемом 2 мкл. По завершении измерения зонды поднимались, что позволяло уравновесить концентрацию кислорода по всему объему ячейки. По завершении 5 первоначальных холостых циклов измерений в реакционную смесь вносили 25 мкл раствора аскорбиновой кислоты (5 мМ), являющейся донором электронов для ПМО. Еще через 6 циклов, необходимых для уравнивания содержания кислорода из-за фоновой реакции окисления аскорбиновой кислоты, в реакционную смесь вводили 25 мкл раствора ПМО необходимой концентрации, запуская таким образом ферментативную реакцию, после чего проводили собственно определение активности ПМО, состоящее из 8 циклов измерений СПК. На основании этих восьми измерений рассчитывали скорость ферментативной реакции. Каждый анализ активности ПМО проводили в трех повторностях (с использованием трех лунок планшета). Таким образом, за один запуск прибора промеряли по 2 образца для фермента в трёх повторностях относительно контрольной пробы (в двух лунках). Контрольные образцы содержали те же количества целлюлозы и аскорбиновой кислоты, как и опытные, за тем исключением, что вместо фермента в них вносили 25 мкл буферного раствора.

#### 4.11.2. Влияние ЭДТА на активность ПМО

Для изучения влияния ЭДТА на СПК после 9 циклов измерений в реакционную смесь вводили 25 мкл 18 мМ раствора ЭДТА и проводили ещё 12 измерений для исследования инактивации фермента. Затем фермент

реактивировали путем введения в реакционную смесь 25 мкл 240 мМ раствора  $\text{CuSO}_4$ . После введения в раствор ионов  $\text{Cu}^{2+}$  проводили 14 измерений скорости потребления кислорода.

#### 4.11.3. Изучение влияния различных доноров электронов на скорость потребления кислорода в ходе ферментативной реакции

Оценку влияния различных доноров электронов проводили для ПМО *T. terrestris*. Опыт проводили по описанной выше схеме за тем исключением, что вместо аскорбиновой кислоты в реакционную смесь вносили 5 мМ донора электронов из таблицы 1 (п. 4.1.3). Концентрация фермента для данной серии экспериментов составляла 8 мкМ.

#### 4.11.4. Определение pH-оптимума активности исследуемых ПМО

Для определения влияния pH на активность ПМО субстрат (аморфную целлюлозу), фермент и аскорбиновую кислоту суспендировали в соответствующем буферном растворе и проводили опыт, аналогичный описанному в пункте 4.11.1. Для pH 4,0, 4,5, 5,0 использовали 0,01 М Na-ацетатный буфер. Для pH 6,0, 6,5, 7,0, 8,0, 9,0 и 10,0 использовали 10% Polybuffer 96 (Pharmacia, Швеция), доведенный до нужного значения pH уксусной кислотой (или гидроксидом калия в случае pH 9,0 и 10,0).

#### 4.11.5. Изучение влияния ЦСМ на субстратную специфичность ПМО

Изучение субстратной специфичности проводили для ПМО *T. terrestris*, ПМО *T. reesei* и ПМО-ЦСМ. Итоговая концентрация ферментов в реакционной смеси составляла 8 мкМ. Опыты по определению СПК при воздействии указанных выше ПМО на различные модельные субстраты проводили по схеме, аналогичной 4.11.1. В качестве субстратов, помимо аморфной целлюлозы, использовали ксилан из бука (Sigma, США), КМЦ (Sigma, США), ксилоглюкан (Megazyme, Австралия) и  $\beta$ -глюкан из ячменя (Megazyme, Австралия). Концентрация субстратов в реакционной смеси составляла 4 мг/мл.

### III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

#### Глава 5. Выделение и идентификация исследуемых белков

##### 5.1. Выделение и очистка ферментов

Исследуемые ферменты выделяли по схемам, приведенным в разделе 4.4. На Рисунке 13 показаны хроматограммы двух стадий очистки рекомбинантной ПМО из *T. terrestris*, экспрессированной грибом *P. verruculosum*. Следует отметить, что проведение анионообменного разделения исходного ферментного препарата при pH 6,8, как правило используемого в нашей лаборатории, в качестве первой стадии очистки целлюлаз из *P. verruculosum* оказалось практически безрезультатным. Поэтому решено было заменить стадию анионообменной хроматографии на хроматографическое разделение препарата на гидрофобной колонке. После растворения ферментного препарата в 0,1М ацетатном буфере, pH 5,0, содержащем 1,7 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , часть его компонентов выпало в осадок, однако целевой белок остался в растворе. При гидрофобной хроматографии раствора ферментного препарата (Рисунок 13а) целевой белок выходил во фракции 2; в результате гель-фильтрации (Рисунок 13б) на второй стадии очистки гомогенный фермент был обнаружен во фракции 3.

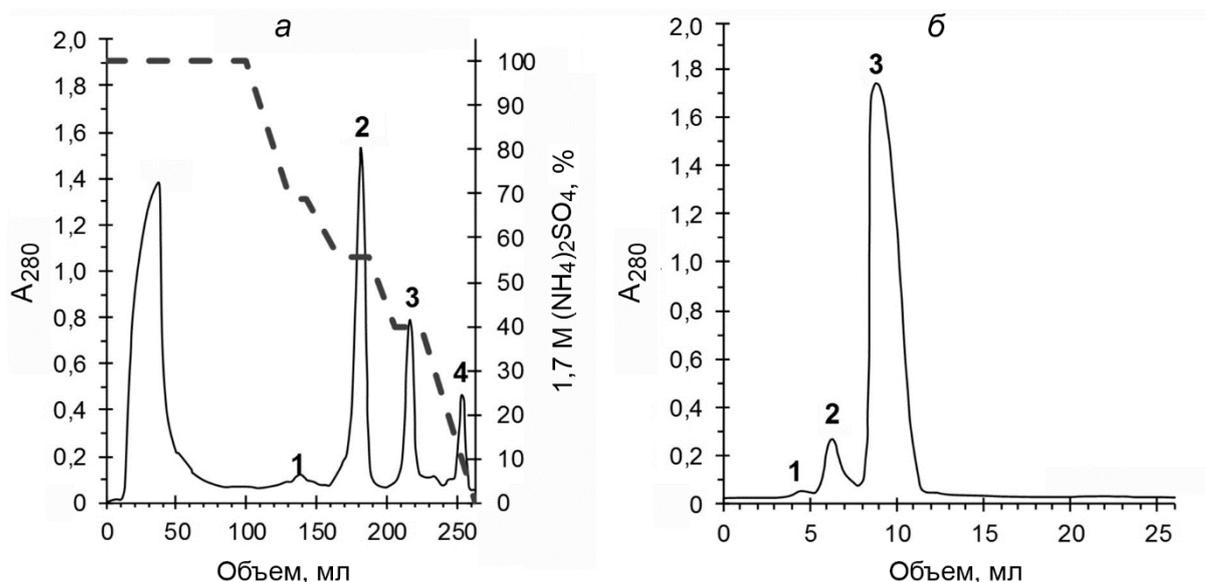


Рисунок 13 - Профили элюирования белка на двух стадиях очистки ПМО из *T. terrestris*. а – гидрофобная хроматография на колонке Source 15Iso, б – гель-фильтрация на колонке Superose 12.

При выделении рекомбинантной ПМО *T. reesei* анионообменная хроматография при рН 6,8 также не привела к желаемому результату. рI целевого белка составлял 5,2, когда как для прочих компонентов ферментного препарата данный показатель был ниже 4,9 [133]. Таким образом рН элюирующего буфера и образца был снижен до 5,0. Разделение проводили в восходящем градиенте NaCl. В данных условиях целевой белок выходил в 1-ой и 2-ой фракциях (Рисунок 14а), причем с гораздо меньшим количеством примесей, чем при анионообменной хроматографии при рН 6,8.

Далее объединенные фракции 1 и 2 концентрировали и затем разделяли методом гель-фильтрации на колонке Superose 12. Целевой белок в чистом виде выходил во фракции 2 (Рисунок 14б).

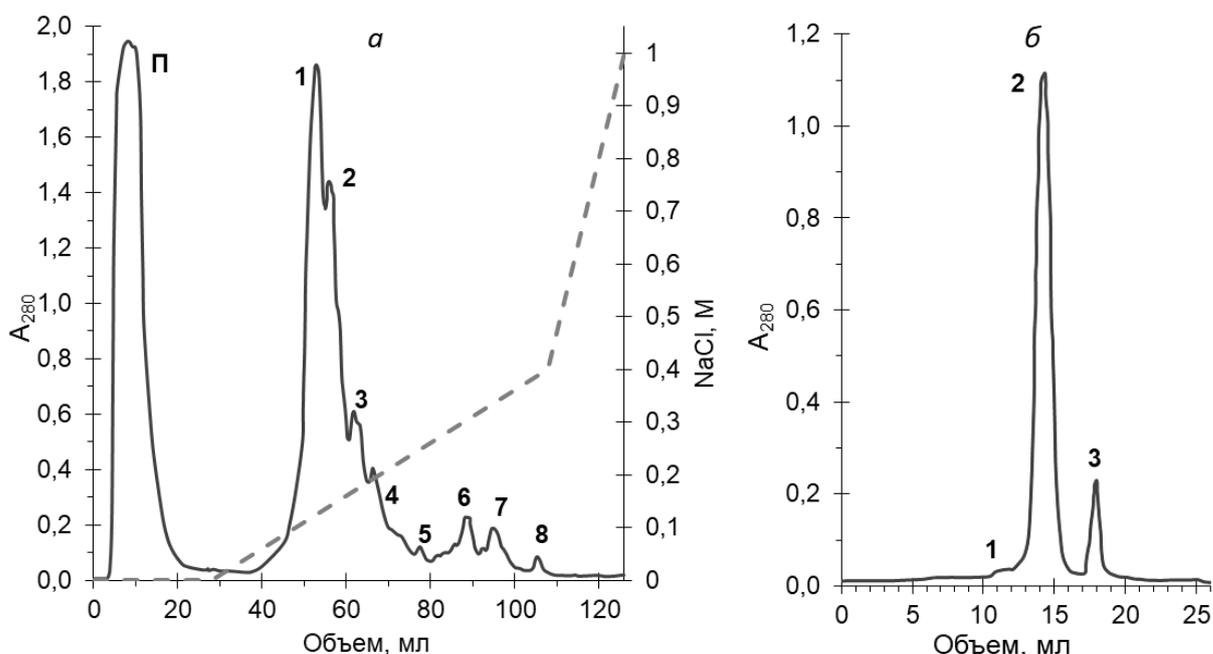


Рисунок 14 - Профили элюирования белка на двух стадиях очистки ПМО из *T. reesei*. а – анионообменная хроматография на колонке MonoQ, б – гель-фильтрация на колонке Superose 12.

После первой стадии выделения нативной ПМО *M. thermophila* из препарата G7B11 на колонке MonoQ целевой белок был обнаружен в основном в не связавшейся с носителем (проскок) и 1-ой фракциях (Рисунок 15а). Однако избежать потерь не удалось, так как данный белок присутствовал почти всем фракциях, но в очень небольших количествах, откуда

впоследствии извлечь его не удалось. Фракции, содержавшие целевой белок нарабатывали, объединяли, засаливали сульфатом аммония до концентрации в 1,7 М для последующего разделения на гидрофобной колонке Source 15Iso. После гидрофобной хроматографии целевой белок содержался во фракции 3 с небольшим количеством примесей (Рисунок 15б). Однако данная фракция была минорной, поэтому для наработки белка потребовалось увеличить как число анионообменных, так и последующих гидрофобных разделений. После наработки и концентрирования ПМО *M. thermophila* очищали методом гиль-фильтрации на носителе Superose 12 (фракция 3, Рисунок 15в).

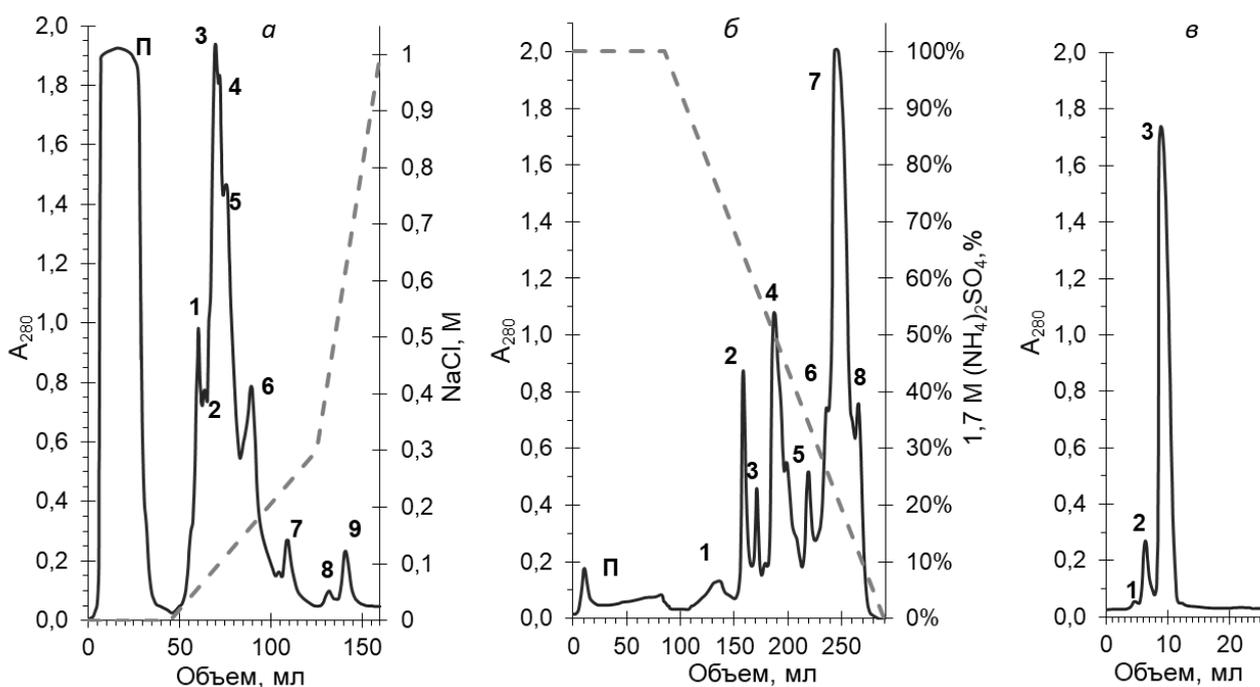


Рисунок 15 - Профили элюирования белка на трёх стадиях очистки ПМО из *M. thermophila*. а – анионообменная хроматография на колонке MonoQ, б – гидрофобная хроматография на колонке Source 15Iso, в – гиль-фильтрация на колонке Superose 12.

Следуя приведенным выше схемам, удалось выделить все исследуемые ПМО в гомогенном виде. В процессе наработки белков было выделено 0,7 г ПМО *T. terrestris* и 0,5 г ПМО *T. reesei*. Содержание же ПМО *M. thermophila* в препарате G7B11 было невысоки и составляло не более 6%. Тем не менее для последующего изучения было выделено около 100 мг белка.

Из препарата *NCE L600*, используя схему очистки, описанную в разделе 4.4.2, была также выделена ЦДГ *M. thermophila*, которую в дальнейших экспериментах использовали в качестве донора электронов для ПМО.

На Рисунке 16 представлены результаты Ds-Na-электрофореза в ПААГ выделенных ферментов, согласно которому все белки были практически гомогенными.

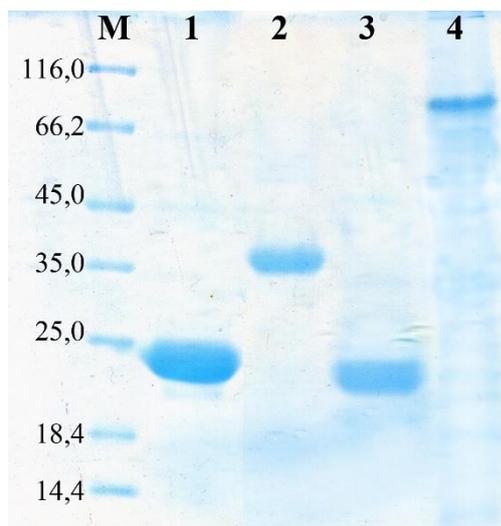


Рисунок 16 - Ds-Na-ПААГ-электрофорез выделенных ферментов: ПМО *T. terrestris* (1), ПМО *T. reesei* (2), ПМО *M. thermophila* (3), ЦДГ1 *M. thermophila* (4). М – белки-маркеры с различной молекулярной массой (в кДа – слева от М).

Наблюдаемые по данным электрофореза молекулярные массы ПМО из *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila* составили 25, 35 и 23 кДа, соответственно, тогда как масса ЦДГ1 *M. thermophila* составила ~90 кДа. Удельная активность ЦДГ1, определенная по восстановлению 2,6-дихлориндофенола [134], составила 407 ед/мг.

Использованные в работе гидролазы, а именно ЦБГ1 и ЦБГ2 *T. reesei*, ЭГ1 и ЭГ2 *P. verruculosum*, а также БГЛ *A. niger* были взяты из лабораторной коллекции гомогенных ферментов.

## 5.2. Идентификация ферментов

Кусочки геля из белковых полос после электрофореза, соответствующих конкретным ферментам, обрабатывали трипсином, после чего смесь

полученных пептидов анализировали методом времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии. На Рисунке 17 приведен масс-спектр трипсинового гидролизата ПМО *T.terrestris*.

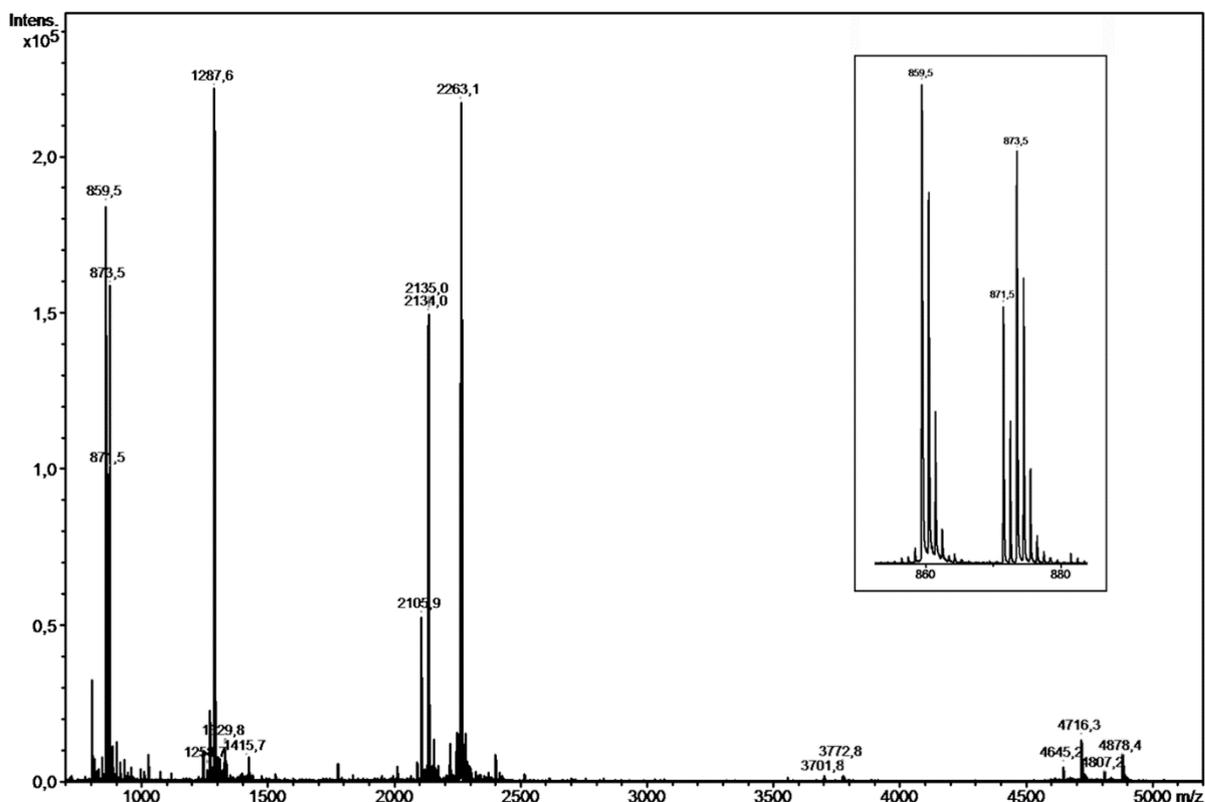


Рисунок 17 - Масс-спектры пептидов из трипсиновых гидролизатов ПМО *T. terrestris*.

В данном случае программа MASCOT обнаружила в масс-спектре 12 пиков, соответствующих по массе теоретическим триптическим пептидам из белка с кодом доступа AEO71030 в базе данных GenBank, который представляет собой ПМО из семейства AA9 (ранее классифицированный как фермент GH61E *T. terrestris* из 61-го семейства гликозилгидролаз). Степень покрытия аминокислотной последовательности составила 62% (в расчете на зрелый белок без сигнального пептида). Стоит отметить, что белок может считаться достаточно надежно идентифицированным по его пептидной карте, полученной методом МАЛДИ масс-спектрометрии, если совпали по массе не менее пяти триптических пептидов и степень покрытия аминокислотной последовательности составила при этом не менее 15% [135]. Дополнительный поиск с помощью программы GlycoMod (<http://web.expasy.org/glycomod/>)

позволил идентифицировать еще один пептид в ПМО *T. terrestris* (38 CFQATPSPAPSVLNTTAGSTVTYWANPDVYHNPGRVQFYMAR 78), в котором Asn51 модифицирован остатком GlcNAc. Этому гликопептиду соответствуют два пика в масс-спектре с  $m/z$  4645 и 4716, во втором из которых остаток цистеина модифицирован акриламидом (типичная модификация при электрофорезе белков в ПААГ). Кроме того, еще два пика в данной области масс-спектра (с  $m/z$  4807 и 4878), отличающиеся на 162 Да (массу ангидрогексозного остатка) от указанных выше пиков, по-видимому, соответствуют тому же самому гликопептиду (Cys38-Arg78), в котором какой-либо из остатков серина или треонина модифицирован остатком гексозы (глюкозы, маннозы или галактозы). Таким образом, с учетом дополнительно найденного гликопептида степень покрытия аминокислотной последовательности ПМО *T. terrestris* возросла до 83% (табл. 1). Необходимо также отметить, что в масс-спектре ПМО *T. terrestris* был обнаружен пик с  $m/z$  873,5, соответствующий по массе N-концевому пептиду (NYTPR) зрелого белка, в котором остаток гистидина метилирован (такая модификация часто встречается в ПМО из семейства AA9, в отличие от ПМО из семейства AA10, действующих на хитин [136]). При этом пик 859,5, также присутствующий в масс-спектре, соответствует немодифицированному N-концевому пептиду, что свидетельствует о том, что в рекомбинантной ПМО *T. terrestris* лишь часть молекул фермента имеет модифицированный N-конец (для наглядности указанные пики показаны в растянутом масштабе по оси абсцисс на вставке рисунка 17).

По данным масс-спектрометрии, в нативной ПМО *M. thermophila* N-концевой остаток His также был метилирован, однако, в отличие от фермента из *T. terrestris*, пептида с немодифицированным N-концом не было обнаружено (Рисунок 18б). К сожалению, не удалось выяснить, в каком состоянии находится N-концевой остаток His в ПМО *T. reesei*, поскольку соответствующий триптический пептид имел массу свыше 6000 Да, что делало затруднительным его обнаружение в масс-спектре трипсинового гидролизата

фермента. По причине преобладания в ПМО *T. reesei* длинных триптических пептидов с высокой массой степень покрытия аминокислотной последовательности для данного фермента была заметно ниже, чем в случае других выделенных ПМО (Рисунок 18а, таблица 3). Присутствие в масс-спектре трипсинового гидролизата ПМО *T. reesei* довольно большого количества неидентифицированных пиков, по-видимому, связано с тем, что они принадлежат пептидам из линкера, которые, как известно, O-гликозилированы, благодаря наличию в них большого количества остатков серина и треонина, и таким образом они не идентифицировались программой MASCOT.

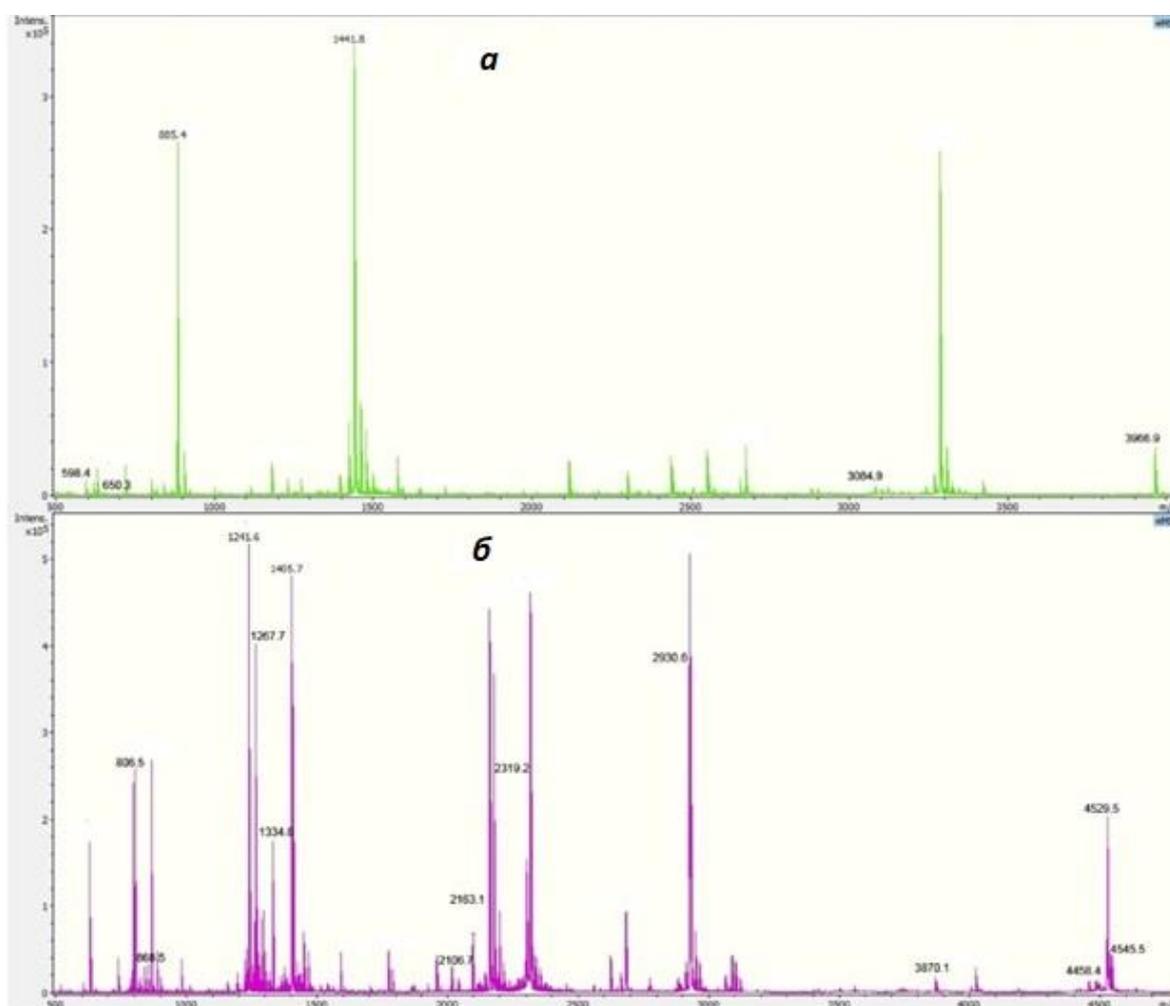


Рисунок 18 - Масс-спектры пептидов из трипсиновых гидролизатов исследуемых ПМО: (а) - *T. reesei* и (б) - *M. thermophila*.

Таким образом, в результате поиска с помощью онлайн сервиса MASCOT в базе данных NCBInr выделенные ферменты были

идентифицированы как ПМО из соответствующих микроорганизмов (Таблица 3).

По данным MASCOT-поиска выделенная ЦДГ соответствовала ЦДГ1 *M. thermophila*. Тогда как ПМО из этого же гриба соответствовала MtLPMO9A согласно базе данных CAZy (<http://www.cazy.org/AA9.html>)

Таблица 3 - 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>	AEO71030	170	10 (17)*	83*
ПМО <i>T. reesei</i>	CAA71999	33	6 (6)	30
ПМО <i>M. thermophila</i>	AEO61304	75	11 (14)*	87*
ЦДГ1 <i>M. thermophila</i>	AAC26221	309	36	46

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

## **Глава 6. Разработка метода определения активности ПМО по скорости потребления кислорода (СПК)**

### **6.1. Активность ПМО по скорости потребления кислорода**

Согласно механизму, предложенному Филиппсом и коллегами [84], при расщеплении  $\beta$ -1,4-гликозидной связи в целлюлозе ПМО расходуют одну молекулу кислорода.

Для определения активности ПМО мы разработали метод, основанный на измерении скорости потребления кислорода в ходе окислительного расщепления целлюлозы под действием ПМО. Анализатор Seahorse XFp, разработанный для измерения процессов клеточного метаболизма ([http://www.agilent.com/en-us/products/cell-analysis-\(seahorse\)/how-seahorse-xf-analyzers-work](http://www.agilent.com/en-us/products/cell-analysis-(seahorse)/how-seahorse-xf-analyzers-work)), определяет и скорость потребления кислорода из реакционной смеси с помощью высокочувствительных флуориметрических сенсоров на растворенный кислород. Однако данный прибор ранее не применяли для оценки ферментативной кинетики. Нами впервые было показано, что, используя в качестве донора электронов аскорбиновую кислоту, можно определять активность ПМО, основываясь на показаниях анализатора Seahorse XFp. Предварительно мы пытались использовать и альтернативные методы определения концентрации кислорода в реакционной смеси, в частности электрод Кларка, однако данный метод характеризовался слишком низкой чувствительностью и высоким фоновым потреблением кислорода, что не позволяло оценить активность ПМО. Сенсоры на кислород в приборе Seahorse XFp лишены этих недостатков.

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 трех минут, исходя из чего автоматически рассчитывалась СПК, а также стандартное отклонение для данной величины. На рисунке 19 показаны данные прибора, на основании которых и рассчитывали СПК.

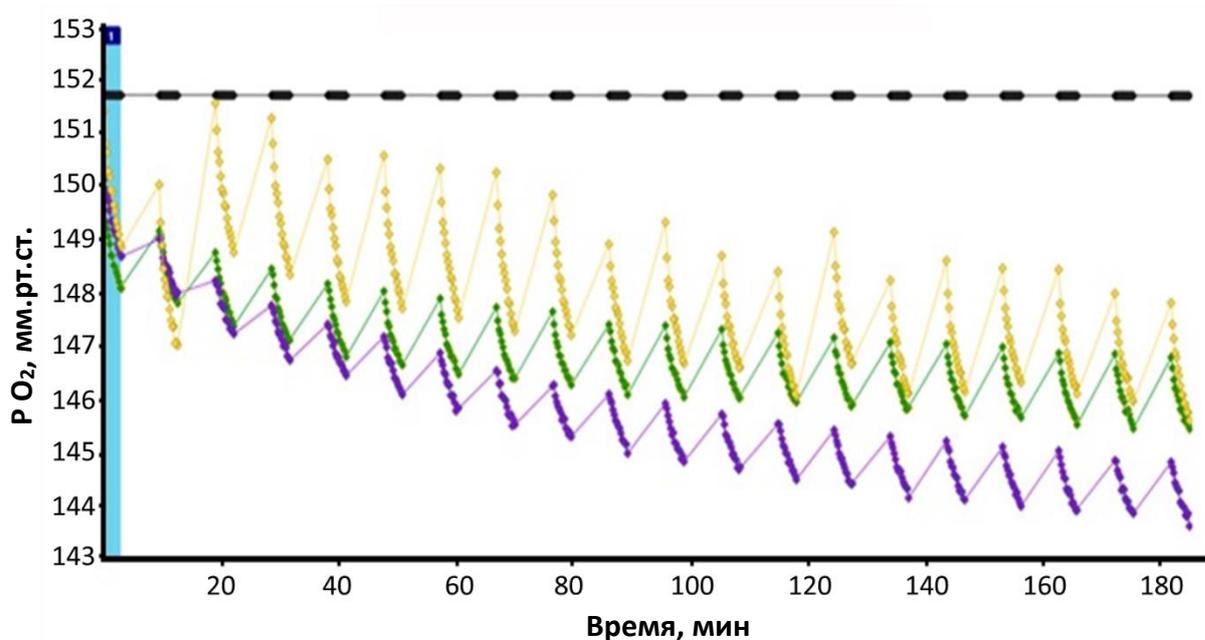


Рисунок 19 - Изменение уровня кислорода в ходе трехминутных измерений в отдельных лунках планшета. Черная линия с точками: контроль для определения фонового уровня кислорода (10 мМ Na-ацетатный буфер, pH 5,0). Group 1 (зелёный): 0,4 мМ аскорбиновой кислоты. Group 2 (фиолетовый): 0,4 мМ аскорбиновой кислоты + 8 мкМ ПМО *T.terrestris*. Group 3 (жёлтый): аморфная целлюлоза (4 мг/мл) + 0,4 мМ аскорбиновой кислоты + 8 мкМ ПМО *T.terrestris*. Голубым цветом выделена полоска, соответствующая трем минутам одного измерения СПК.

Исходя из приведённых данных видно, что аскорбиновая кислота в растворе сама по себе окисляется (зеленые и фиолетовые точки), при этом в случае ферментативной реакции (желтые точки для случая, когда в системе присутствуют все компоненты ферментативной реакции - целлюлозный субстрат, ПМО и донор электронов) СПК (разница между начальным и конечным значением концентрации кислорода в ходе трехминутного измерения) значительно выше. Пример расчета среднего  $\Delta$ СПК, соответствующего скорости реакции, катализируемой ПМО, показан на рисунке 20. Согласно схеме эксперимента, в 3 лунки планшета, используемых в качестве фона, как и в 3 лунки образца для измерений ферментативной реакции, первоначально вносили субстрат (4 мг/мл в буферном растворе, всего 200 мкл). При первой инъекции во все лунки (фона и образца) вводили 25 мкл запасного раствора аскорбиновой кислоты до финальной концентрации в реакционной системе 0,4 мМ. Из рисунка 19 видно, что введение

аскорбиновой кислоты вызывает всплеск СПК из-за ее собственного фонового окисления. Во время второй инъекции в лунки фона вводили 25 мкл буферного раствора, а в ячейки с образцом – 25 мкл запасного раствора фермента, чтобы его финальная концентрация в лунках составила 8 мкМ. Далее по разнице СПК образца и фона рассчитывали активность ПМО ( $\Delta$ СПК).

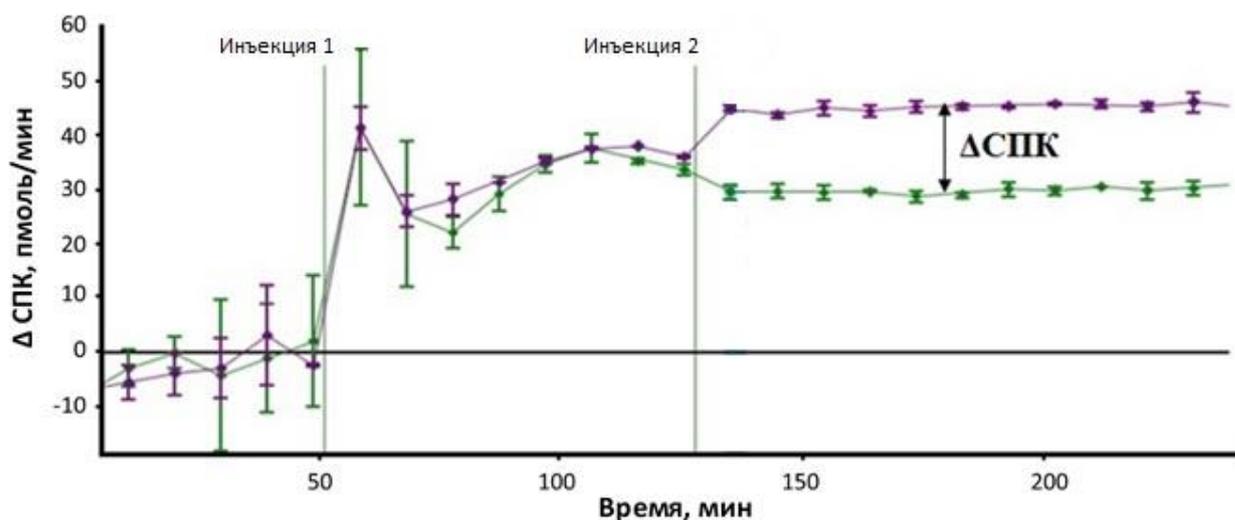


Рисунок 20 - Расчет  $\Delta$ СПК в ходе ферментативной реакции. Зеленая линия – фоновое окисление аскорбиновой кислоты в присутствии субстрата (аморфная целлюлоза 4 мг/мл + 50 мМ Na-ацетатный буфер + 0,4 мМ аскорбиновой кислоты). Фиолетовая линия – ферментативная реакция (аморфная целлюлоза 4 мг/мл + 50 мМ Na-ацетатный буфер + 0,4 мМ аскорбиновой кислоты + 8 мкМ ПМО *T.reesei*). Injection 1 - Введение в зелёный и фиолетовой образцы аскорбиновой кислоты. Injection 2 – в фиолетовый образец вводят ПМО *T.reesei* до концентрации 8 мкМ, в зеленый образец вводят 25 мкл буферного раствора.

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

Таким образом нами были определены активности трех исследуемых ПМО по отношению к аморфной целлюлозе. Скорость потребления кислорода ( $\Delta$ СПК) для 8 мкМ ферментов из *T. terrestris*, *T. reesei*, *M. thermophila* составила  $9,6 \pm 1,0$ ,  $13,4 \pm 0,8$  и  $9,4 \pm 0,2$  пмоль/мин (Рисунок 21a). На основании этих данных были рассчитаны кинетические параметры реакций (число оборотов для указанных ферментов) – соответственно 1,20, 1,68 и 1,18 мин<sup>-1</sup>

(0,020, 0,028, 0,019 с<sup>-1</sup>), что в целом соотносится с литературными данными, где число оборотов для воздействующей на хитин ПМО *Serratia marcescens* составило 0,017 с<sup>-1</sup> (~1 мин<sup>-1</sup>), при pH 8,0, температуре 37°C концентрации субстрата 0,45 мг/мл [61]. Для NcLPMO9C из *Neurospora crassa* (1,47 мкМ) при воздействии на разветвлённые олигосахариды (полученные путем ферментативного гидролиза ксилоглюкана из тамаринда) и целлопентаозу при pH 8,0 и 40°C, в присутствии 1 мМ аскорбиновой кислоты, число оборотов составило 0,06 и 0,03 с<sup>-1</sup>, соответственно. При воздействии на ксилоглюкан из тамаринда и аморфную целлюлозу в концентрации 5 мг/мл тем же ферментом данный показатель составил 0,11 с<sup>-1</sup>. Однако данную реакцию проводили при 50°C, что объясняет повышенное значение этого параметра для NcLPMO9C из *Neurospora crassa* [137]. Для рекомбинантной ПМО *Lentinus similis* при воздействии на синтетический субстрат, конъюгированный с флуоресцентным белком, при pH 7.0 и 37 °C K<sub>m</sub> составила 43 мМ, а число оборотов - 0,11 с<sup>-1</sup>. Однако в данном случае, в отличие от прочих указанных случаев, значение получено для максимальной скорости реакции (в условиях насыщения субстратом) [89]. Таким образом, полученные значения числа оборотов для различных ПМО с помощью разработанного нами метода удовлетворительно соотносятся по порядку величины с литературными данными, где данный параметр определяли совершенно другими методами.

Также для ПМО *T. terrestris* была определена концентрационная зависимость скорости потребления кислорода, представленная на Рисунке 21б.

Далее, нами было замечено, что при введении в запасные растворы ферментов 1 мМ  $\text{CuSO}_4$  наблюдается некоторый рост  $\Delta\text{СПК}$  (на 20-30%). По-видимому, данный эффект связан с тем, что в процессе выделения часть молекул ПМО теряют атом  $\text{Cu}^{2+}$  из активного центра. Таким образом, введение в запасные растворы ферментов ионов меди позволяет повысить активность ПМО.

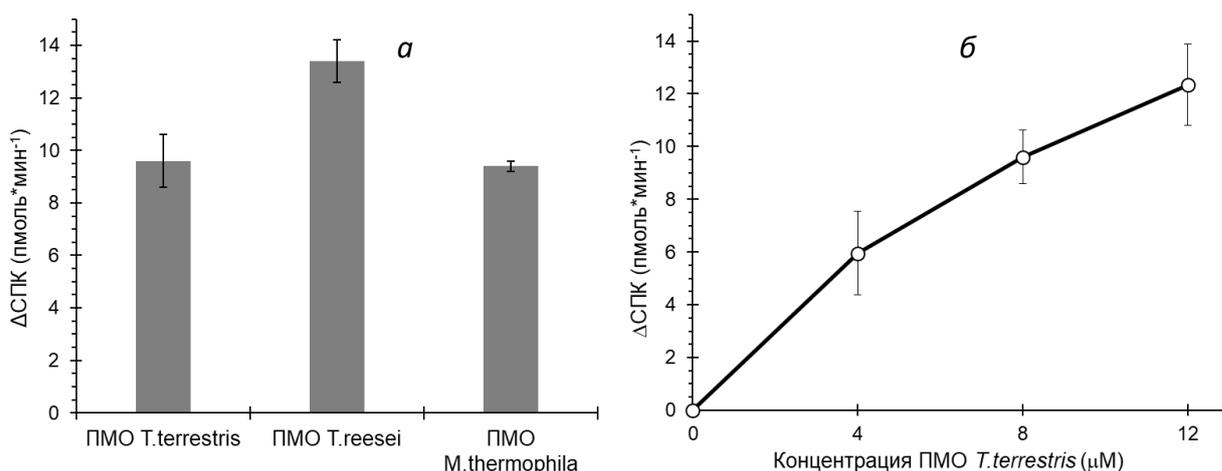


Рисунок 21 - (а)  $\Delta\text{СПК}$  в реакции окисления аморфной целлюлозы (4 мг/мл) под действием ПМО из *T. terrestris*, *T. reesei*, *M. thermophila* (8 мкМ) в присутствии 0,4 мМ аскорбиновой кислоты, рН 5,0, 37°C.

(б) Влияние концентрации ПМО *T. terrestris* на скорость потребления кислорода ( $\Delta\text{СПК}$ ) при воздействии на аморфную целлюлозу целлюлозы (4 мг/мл) в присутствии 0,4 мМ аскорбиновой кислоты как донора электронов, рН 5,0, 37°C.

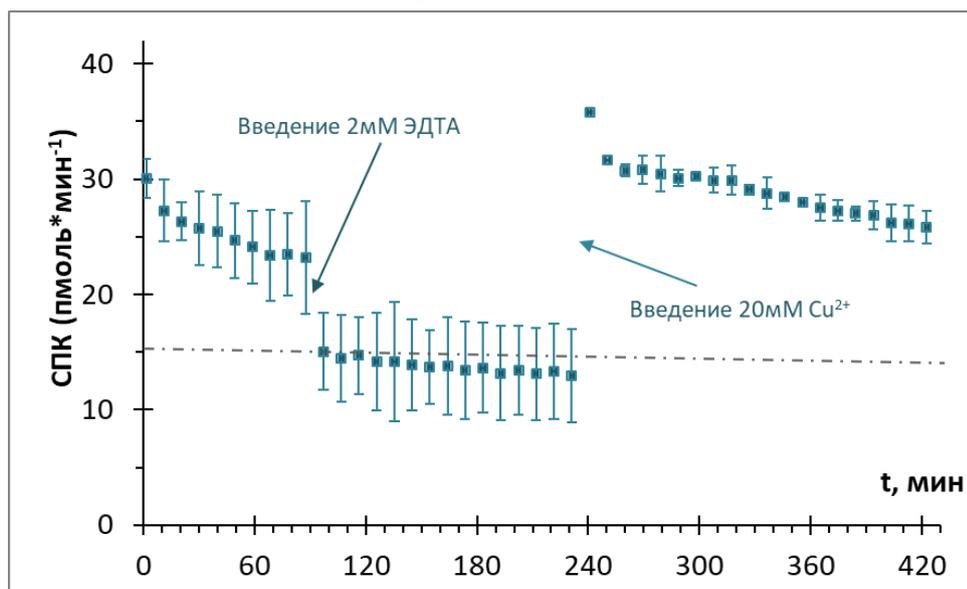
## 6.2. Исследование процесса инактивации ПМО с последующей реактивацией фермента

ПМО содержат в активном центре атом  $\text{Cu}^{2+}$ , закрепленный в «гистиридиновом браслете». Воздействие хелатирующих агентов, в частности ЭДТА, ведет к извлечению ионов меди из активного центра вследствие образования комплекса, что вызывает потерю активности фермента. Последующее введение в раствор фермента избытка  $\text{Cu}^{2+}$  восстанавливает его активность. В частности, в работе Борисовой с соавторами [92] методом изотермической калориметрии (ИТС) была определена константа диссоциации ПМО *Neurospora crassa* (NcLPMO9C) при её титровании ионами  $\text{Cu}^{2+}$ , которая составила  $33 \pm 10$  нМ при стехиометрии связывания 0,9-1,1. Однако,

проследить за изменением активности в режиме реального времени не удавалось. В литературе определяли активность нативной, инактивированной и восстановленной форм ПМО путем хроматографического анализа продуктов их воздействия на целлюлозу.

Нам удалось в режиме реального времени осуществить контроль как за инактивацией, так и реактивацией ПМО с помощью анализатора СПК Seahorse XFp. Концентрации реагентов были подобраны, исходя из литературных данных по влиянию ЭДТА на ПМО [84, 92]. На Рисунке 22 представлен график зависимости СПК для ПМО *T. terrestris* при инактивации и последующей реактивации фермента.

Из полученных данных видно, что введение в раствор хелатирующего агента (ЭДТА) ведет к быстрой инактивации фермента. Последующее введение избытка ионов меди возвращает активность ПМО.



**Рисунок 22.** График зависимости СПК при деструкции аморфной целлюлозы (4 мг/мл) под действием ПМО *T. terrestris* (8 мкМ). Условия: 0,01 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0, концентрация аскорбиновой кислоты 0,4 мМ, температура – 37°C. Время введения 2мМ ЭДТА – 90 мин, 20 мМ CuSO<sub>4</sub> – 240 мин. Серой пунктирной линией изображено изменение СПК в фоновом образце (субстрат+аскорбиновая кислота), куда также вводили ЭДТА и CuSO<sub>4</sub>.

Далее проводили аналогичный опыт для ПМО *T. reesei*. Так как данный фермент обладал большей активностью, его начальная концентрация была

снижена вдвое и составляла 4 мкМ. Помимо инактивации и реактивации фермента параллельно была промерена и дозная зависимость СПК ферментативной реакции. Так, в рамках того же эксперимента во вторую серию образцов вместо раствора ЭДТА вводили порцию буфера, а вместо раствора  $\text{CuSO}_4$  - раствор фермента рассчитанной концентрации, что привело к удваиванию его концентрации в реакционной смеси. На Рисунке 23 приведены результаты данного эксперимента.

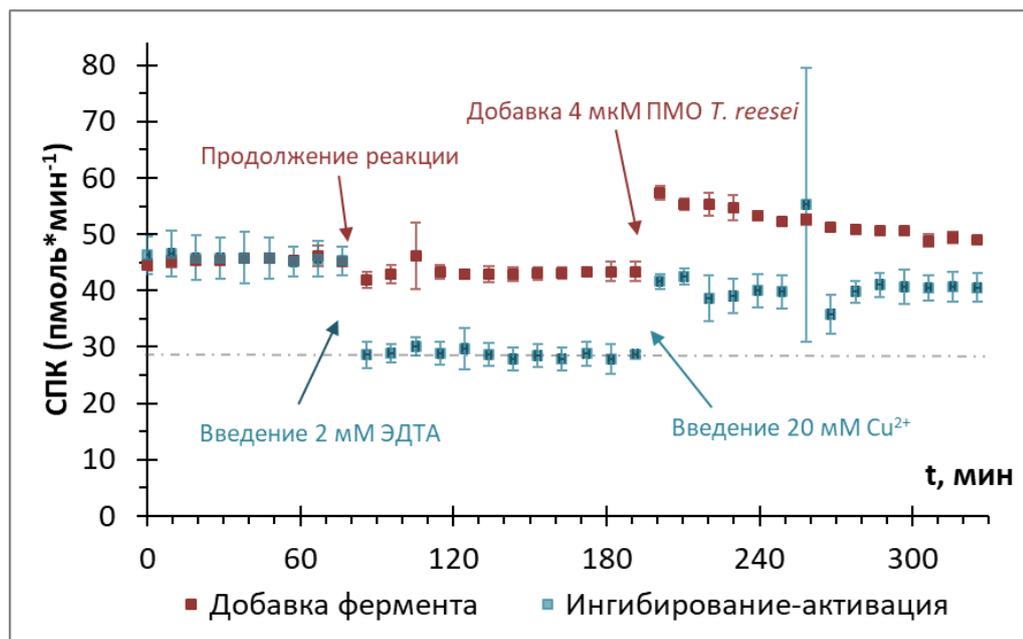


Рисунок 23 - График зависимости СПК при деструкции аморфной целлюлозы (4 мг/мл) под действием ПМО *T. reesei* (4 мкМ). Условия: 0,01 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0, концентрация аскорбиновой кислоты 0,4 мМ, температура – 37°C. Время введения 2мМ ЭДТА – 80 мин, 20 мМ  $\text{CuSO}_4$ / ПМО *T. reesei* – 198 минут. Серой пунктирной линией изображено изменение скорости потребления кислорода в фоновом образце (субстрат+аскорбиновая кислота), куда также вводили ЭДТА и  $\text{CuSO}_4$

В результате нам удалось не только провести инактивацию фермента, но и в рамках одного эксперимента сравнить данный процесс с протеканием реакции в обычном режиме, т.е. без введения ЭДТА. Также нам удалось показать, что возможности анализатора Seahorse XFp позволяют проводить различные опыты по влиянию эффекторов, добавок фермента на активность ПМО, и наблюдать за активностью фермента в режиме реального времени.

## Глава 7. Биохимические характеристики ПМО

### 7.1. pH-зависимость активности ПМО

Для определения влияния pH на активность ПМО при помощи анализатора СПК Seahorse xFp, использовали две буферные системы: для pH от 4,0 до 5,0 применяли Na-ацетатный буфер, а для pH в диапазоне 6,0-10,0 – буферную систему на основе Polybuffer 96 (все буферные растворы в концентрации 50 мМ). При применении прочих буферных систем, таких как фосфатный, Bis-Tris/HCl, Пиперазин/HCl потребление кислорода ПМО зарегистрировано не было. Либо данные буферные растворы инактивируют ПМО, взаимодействуя с атомами меди активного центра, либо гасят используемые в сенсорах прибора флуоресцентные метки.

На Рисунке 24 представлены данные по влиянию pH на  $\Delta$ СПК в реакциях с аморфной целлюлозой, катализируемых ПМО *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila*.

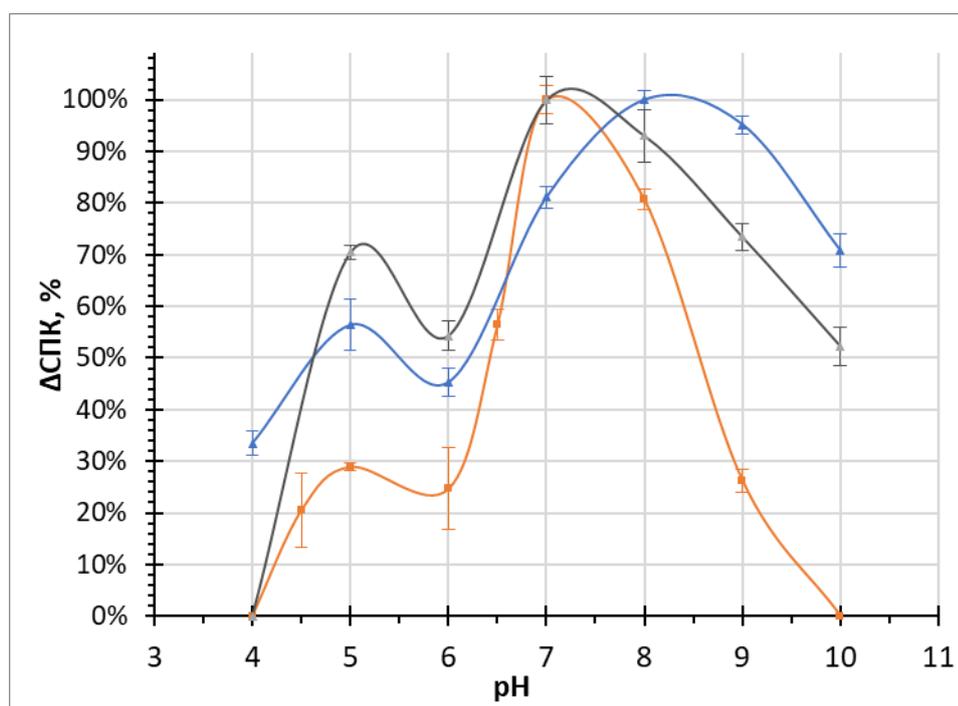


Рисунок 24 - pH-зависимости активности исследуемых ПМО в реакции с аморфной целлюлозой (4 мг/мл) в присутствии 0,5 мМ аскорбиновой кислоты при 37°C. Оранжевая линия – ПМО *T. terrestris*, голубая – ПМО *T. reesei*, серая - *M. thermophila*.

Для всех ПМО при pH 6,0 наблюдалось небольшое снижение ΔСПК. Данный эффект, вероятно был связан со сменой буферной системы. При pH ниже 4,0 СПК в ходе ферментативной реакции не удалось засечь ни для одного из исследуемых ферментов.

ПМО *T. terrestris* и *M. thermophila* проявляли pH-оптимум активности в нейтральной среде (при pH 7,0), а ПМО *T. ressei* – в слабо-щелочной области при pH (8,0-9,0). Согласно литературным данным [99, 100], ПМО семейства AA9 из *Nahella chejuensis*, экспрессированная в *E.coli*, и ПМО *Pestalotiopsis simplicisium*, экспрессированная в *Pichia pastoris*, обладают слабо кислым pH-оптимумом действия на целлюлозу - 6,5 и 5,5, соответственно. В работе [138] были исследованы выходы глюконовой и целлобионовой кислот в зависимости от pH для ПМО из гриба *M. thermophila* MtLPMO9B, окисляющей C1-атом углерода субстрата, и ПМО MtLPMO9D, окисляющей как C1, так и C4-атом углерода субстрата [101], при воздействии на аморфную целлюлозу в присутствии в качестве донора электронов либо аскорбиновой кислоты, либо 3-метилкатехола. MtLPMO9B при концентрации субстрата 1,7 мг/мл и дозе фермента 3 мг/г субстрата при использовании в качестве донора электронов аскорбиновой кислоты при 40°C давала наибольшие выходы продуктов при pH 8. При использовании в качестве донора электронов 3-метилкатехола до отметки в 10 ч фермент обладал практически идентичной максимальной активностью при pH 7 и 8, однако через 12 часов, выходы глюконовой и целлобионовой кислот оказались выше при pH 8. Фермент MtLPMO9D при использовании в качестве донора электронов аскорбиновой кислоты (при 50°C) обладал практически идентичной активностью при pH 7 и 8 на протяжении 12 ч реакции, однако при использовании 3-метилкатехола (при 40°C) максимум активности наблюдался при pH 8 [138]. В целом литературные данные по pH-оптимумам двух ПМО из *M. thermophila* (MtLPMO9B и MtLPMO9D) согласуются с нашими данными (Рисунок 24) для MtLPMO9A из того же грибного источника.

Поскольку рН оптимумы гидролитической активности целлюлазных препаратов на основе *P. verruculosum* и *T. reesei* находятся в диапазоне рН 4,5-5,5 [139], а исследуемые нами ПМО при рН 5,0 проявляют от 30 до 70% своей максимальной активности (Рисунок 24), ввиду использования ПМО в качестве добавок к целлюлажным препаратам при осахаривании целлюлозных субстратов, дальнейшие исследования, касающиеся действия ПМО, мы проводили при рН 5,0.

## 7.2. Субстратная специфичность ПМО

Согласно литературным данным, ПМО из семейства AA9 могут обладать активностью по отношению к другим полисахаридным субстратам. Так исследование субстратной специфичности ПМО *M. thermophila* (MtLPMO9A), идентичной той, что была выделена нами показало, что фермент помимо активности по отношению к целлюлозе, также способен действовать на ксилоглюкан,  $\beta$ -глюкан, а также ксилан, ассоциированный с целлюлозой [97, 101]. Поэтому была изучена субстратная специфичность двух других исследуемых нами ПМО по отношению к ксилану, КМЦ,  $\beta$ -глюкану и ксилоглюкану (таблица 4). Исследование проводили при рН 5,0 при концентрации полисахаридных субстратов 4 мг/мл. ПМО из *T. reesei* обладала активностью по ксилоглюкану, однако не действовала на ксилан, КМЦ и  $\beta$ -глюкан. ПМО из *T. terrestris* также обладала небольшой активностью по отношению к ксилоглюкану и относительно высокой активностью по  $\beta$ -глюкану, тогда как не проявляла активности по ксилану.

Таблица 4 - Скорости потребления кислорода ( $\Delta$ СПК) исследуемыми ПМО (8 мкМ) при воздействии на различные полисахаридные субстраты (4 мг/мл) в присутствии 0,5 мМ аскорбиновой кислоты, рН 5,0, 37°C.

	Целлюлоза	Ксилоглюкан	Ксилан	$\beta$ -глюкан	КМЦ
ПМО <i>T. terrestris</i>	9,6 $\pm$ 1,0	2,2 $\pm$ 1,0	0	9,0 $\pm$ 0,8	0
ПМО <i>T. reesei</i>	13,4 $\pm$ 1,2	18,5 $\pm$ 1,2	0	0	0

Следует отметить, что согласно работе [113], ПМО *T. reesei* способна снижать вязкость растворов ксилана, ксилоглюкана, глюкоманнана. Однако, нам не удалось засечь потребления кислорода в ходе воздействия фермента на ксилан, тогда как относительно высокая СПК наблюдалась в случае использования в качестве субстрата ксилоглюкана.

Как уже отмечалось выше, субстратная специфичность ПМО *M. thermophila* была изучена в литературе методом хроматографического анализа продуктов деструкции целлюлозы [97, 101]. MtLPMO9A обладала активностью по отношению к аморфной целлюлозе, ксилоглюкану из тамаринда,  $\beta$ -глюкану из ячменя и овсяной полбы. При этом данный фермент не обладал активностью по отношению к различным видам ксилана и целлоолигосахаридам. Однако, при смешении ксилана (из овсяной полбы и березы) с аморфной целлюлозой в реакционной смеси были обнаружены как окисленные целлоолигосахариды, так и ксилоолигосахариды [101]. Возможно, что при смешении ксилана с целлюлозой ПМО *T. reesei* может проявлять активность по отношению к обоим полисахаридам.

### **7.3. Влияние доноров электронов на $\Delta$ СПК**

Прямые подходы определения окислительно-восстановительного потенциала ПМО не дают результатов ввиду относительно невысокой скорости ферментативной реакции и природы субстрата. В литературе есть работы, где анализировали выходы сахаров, полученные в ходе ферментативной реакции под действием ПМО с использованием различных доноров электронов [86, 101]. В данной работе мы сравнили  $\Delta$ СПК в ходе ферментативной реакции ПМО для различных доноров электронов, перечисленных в Таблице 1 (см. раздел 4.1.3). На Рисунке 25 приведены полученные значения для  $\Delta$ СПК ПМО *T. terrestris*, а также для наглядности по вспомогательной оси отложены окислительно-восстановительные потенциалы исследуемых соединений.

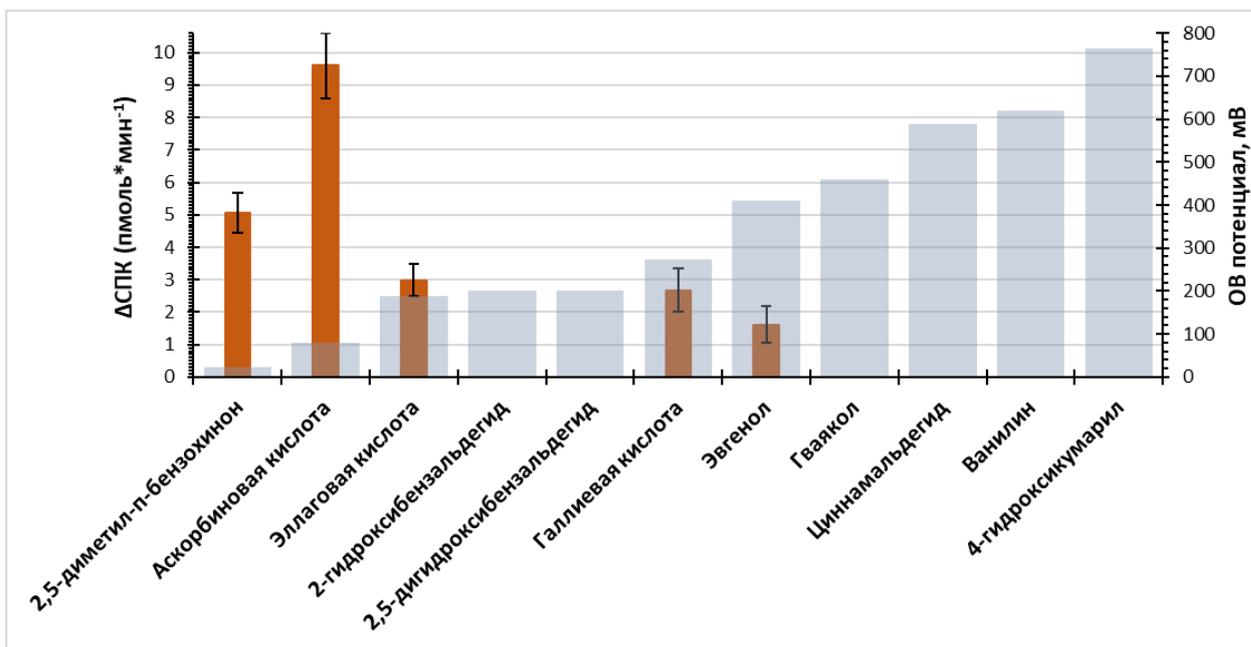


Рисунок 25 - Влияние различных доноров электронов на ΔСПК ферментативной в реакции расщепления аморфной целлюлозы под действием ПМО *T. terrestris* (8 мкМ). Концентрация донора электронов 0,5 мМ. Оранжевым обозначены ΔСПК для соответствующих доноров электронов, а серые прозрачные бары показывают окислительно-восстановительный (ОВ) потенциал соединения.

Из полученных данных видно, что скорость ферментативной реакции не коррелирует с окислительно-восстановительным потенциалом донора электронов, поэтому было решено не проводить аналогичных исследований для двух других исследуемых ПМО. К тому же в работе [101] приведены данные по взаимодействию ПМО *M. thermophila* с целым спектром различных соединений в сравнении с аскорбиновой кислотой наиболее эффективным донором электронов при деструкции аморфной целлюлозы. Так, наряду с аскорбиновой кислотой, наибольшие выходы окисленных сахаров получали при использовании в качестве донора электронов соединений на основе бензоди- и бензотриолов. Производные на основе фенолов, а также соединения, содержащие -SH группы не давали существенного выхода продуктов реакции [101]. В случае ПМО *T. terrestris* сравнимые с аскорбиновой кислотой СПК давали 2,5-диметилпарабензохинон, эллаговая и галлиевая кислоты (Рисунок 26).

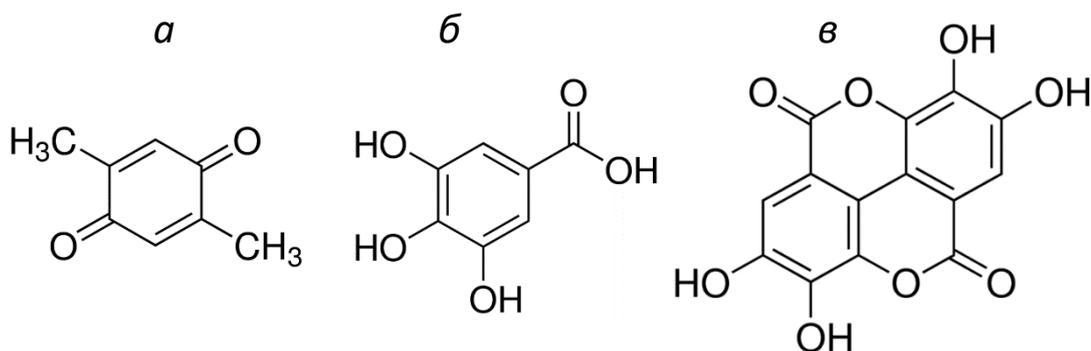


Рисунок 26 - *а* - 2,5-диметилпарабензохинон, *б* – галлиевая кислота, *в* – эллаговая кислота.

Все эти соединения, а также бензоди- и триолы сходны по химическому строению продуктами деструкции лигнина, что подтверждает литературные данные [101] о том, что ПМО при деструкции природных ЦСС, содержащих лигнин, не требуют введения в реакционную смесь дополнительных доноров электронов. Скорее всего, решающее значение для протекания ферментативной реакции играет структура активного центра ПМО и строение фермент-субстратного комплекса.

#### 7.4. Температурная стабильность ПМО

Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) была определена термостабильность исследуемых ПМО, в результате чего было выяснено, что данные ферменты являются достаточно термостабильными (Рисунок. 27).

Для рекомбинантной ПМО *T. terrestris* температура плавления составила 82,2°C, что на 2,6°C выше, чем для нативного фермента из *M. thermophila*. Для 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*.

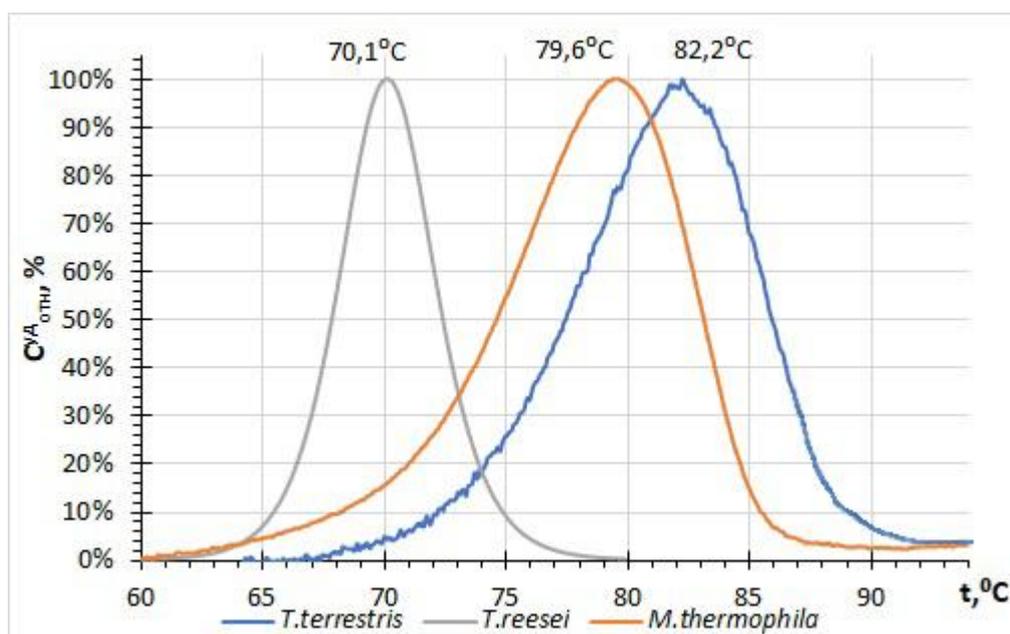


Рисунок 27 - График зависимости относительной избыточной удельной теплоемкости ПМО в зависимости от температуры. Сверху, над соответствующими пиками, приведены температуры фазовых переходов ферментов. Ферменты были растворены в 10% Полибуфере 96 (Polybuffer 96, Pharmacia, Швеция), pH 7,0.

Поскольку известно, что ионы меди активного центра могут стабилизировать белковую глобулу ПМО [83], нами было проведено исследование температурной стабильности и для инактивированных ЭДТА ферментов. Здесь мы исследовали ПМО *T. reesei* и *T. terrestris*. Аминокислотная последовательность и структура ПМО *M. thermophila* более чем на 90% идентична ПМО *T. terrestris*\*, поэтому вероятно, что закономерности термоинактивации этих ферментов похожи. К тому же ген ПМО *M. thermophila* не удалось экспрессировать ни в *P. verruculosum* ни в *P. canescens*, грибных продуцентах гетерологичных белков, используемых в нашей лаборатории, что делает этот фермент для нас менее перспективным с биотехнологической точки зрения. Для проведения данного эксперимента исследуемые ферменты растворяли не в буферном растворе, а в воде, во избежание взаимодействия ЭДТА с компонентами Polybuffer 96. Следует отметить, что смена буфера на воду привела к снижению температуры плавления ПМО *T. terrestris* на 0,3°C.

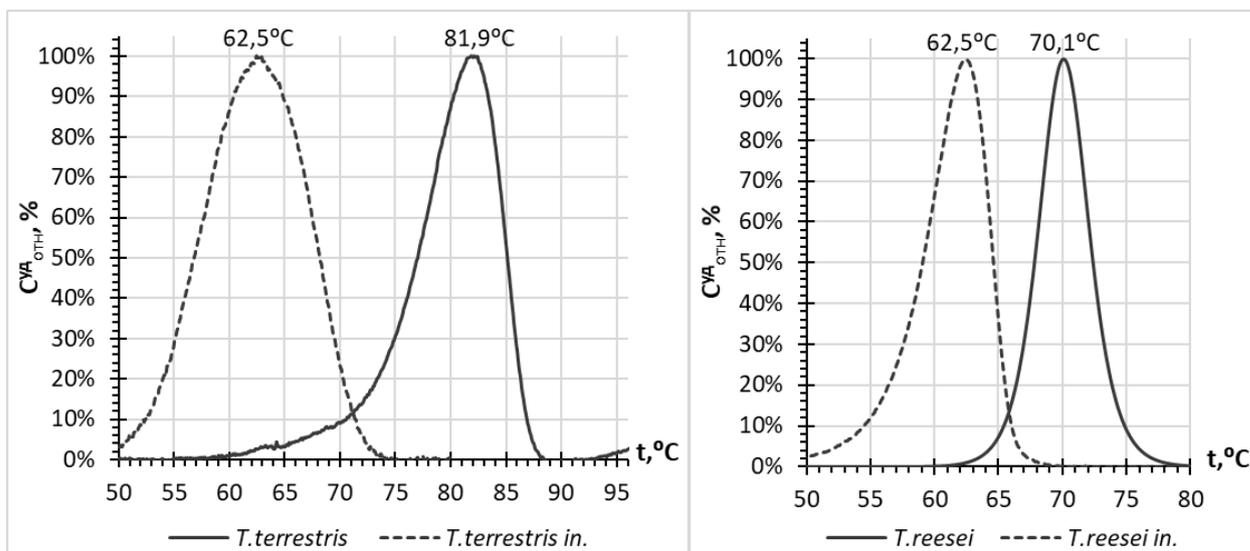


Рисунок 28 - Графики зависимости относительной избыточной удельной теплоемкости ПМО в зависимости от температуры в сравнении с инактивированной формой фермента. Наверху, над соответствующими пиками, приведены температуры фазовых переходов ферментов. Белки растворяли в воде.

Удаление меди из активного центра ПМО приводило не только к инактивации фермента, как показано в одном из предыдущих разделов, но и к уменьшению температурной стабильности белка. Для ПМО *T. terrestris* температура плавления после удаления  $\text{Cu}^{2+}$  понизилась на  $19,4^\circ\text{C}$  и составила  $62,5^\circ\text{C}$ . Для ПМО *T. reesei* удаление металла из активного центра привело к меньшему эффекту. Падение температуры плавления составило  $7,6^\circ\text{C}$ . Следует отметить, что для обеих ПМО температура плавления инактивированного фермента оказалась одинаковой –  $62,5^\circ\text{C}$ , что говорит о том, что денатурация инактивированных форм ПМО различных типов, возможно, происходит по схожему механизму. По-видимому, ион  $\text{Cu}^{2+}$  оказывает куда большее влияние на белок, нежели просто участие в активном центре. Связывание полипептида с металлом вероятно вызывает ряд конформационных изменений в третичной структуре белка, что ведет к его дополнительной стабилизации. Вероятно поэтому белок меньшей массы, ПМО *T. terrestris*, оказывается более термостабильным в активном состоянии.

Тем не менее, высокая термостабильность ПМО позволит успешно применять их не только в процессах комплексной деструкции ЦСС, под

действием целлюлаз, как правило, осуществляемых при температуре около 50°C, но и позволит использовать данные ферменты в других биотехнологических процессах, проводимых при повышенных температурах.

**\*Результаты выравнивания АК последовательностей ПМО *T.terrestris* (АЕО71030) и *M.thermophila* (АЕО61304.1).**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

АЕО61304.1   HYTLPRVGTGSDWQHVRADNWQNNGFVGDVNSEQIRCFQATPAGAQDVYTVQAGSTVTY 60
3EII_A       HYTWPRVNDGADWQVRKADNWQDNGYVGDVTSPQIRCFQATPSPAPSVLNTTAGSTVTY 60
              ***  ***. *:***:***:*****:***:*****.* *****: * .* .. *****

АЕО61304.1   HANPSIYHPGPMQFYLRVDPGQDVKSWTGEGAVWFKVYEEQPQFGAQLTWPSNGKSSFE 120
3EII_A       WANPDVYHPGPVQFYMARVPDGEDINSWNGDGAVWFKVYEDHPTFGAQLTWPTGKSSFA 120
              ***.:*****:***:*****:***:***.*:*****:.* *****.*****

АЕО61304.1   VPIPCIRAGNYLLRAEHIALHVAQSQGAQFYISCAQLQVTGGGSTEPSPKVSFPGAYK 180
3EII_A       VPIPPCIKSGYYLLRAEQIGLHVAQSVGGAQFYISCAQLSVTGGGSTEPNPKVAFPGAYS 180
              *** *::* *****:*.***** *****.*****.***** :**:*

АЕО61304.1   STDPGILININYPVPTSQNPMPAVFRC           208
3EII_A       ATDPGILINIYYPVPTSQNPMPAVFSC           208
              :***** ***** *

```



Среди продуктов деструкции целлюлозы под действием ПМО *T. terrestris* помимо окисленных продуктов GlA, Glc<sub>2</sub>GlA и Glc<sub>4</sub>GlA были обнаружены нейтральные олигосахариды от целлобиозы до целлопентаозы, а также глюкоза. Кроме того, среди продуктов реакции присутствовали не идентифицированные вещества со временем удерживания 6,5, 9,1, 9,7 мин. Ими могут выступать как сложные эфиры аскорбиновой кислоты и олигосахаридов, так и сахара, окисленные по C4 атому углерода, для которых не имелось хроматографических стандартов. В частности, в работе [140], было показано, что при деструкции аморфной целлюлозы под действием ПМО *T. terrestris* среди продуктов реакции присутствуют олигосахариды от глюкозы до целлогексаозы, соответствующие им альдоновые кислоты, а также ряд олигосахаридов, окисленных по C4 атому. Авторам этой работы также не удалось разделить окисленные по C4 атому олигосахариды, однако, судя по интенсивности сигнала и полученным площадям пиков, их количество в реакционной смеси было крайне мало. В литературе для идентификации анализа продуктов окислительной деструкции под действием ПМО в основном используют колонку Dionex CarboPac PA1 [91, 140]. При использовании доступной нам колонки CarboPac PA100 не удалось получить столь же наглядной картины разделения сахаров и их производных, как в опубликованных другими авторами статьях, однако возможностей этой колонки хватило для идентификации альдоновых кислот и установления типа действия исследуемой ПМО. Таким образом, ПМО *T. terrestris* при деструкции целлюлозы преимущественно действует по C1-атому углерода.

В образце для ПМО *T. reesei* из окисленных продуктов были идентифицированы GlA, Glc<sub>2</sub>GlA и Glc<sub>3</sub>GlA. Также данный образец характеризовался высоким выходом глюкозы и продуктом с временем удерживания 9,1 мин. Помимо глюкозы в реакционной смеси были определены целлобиоза, целлотриоза и целлопентаоза, однако в весьма небольших количествах.

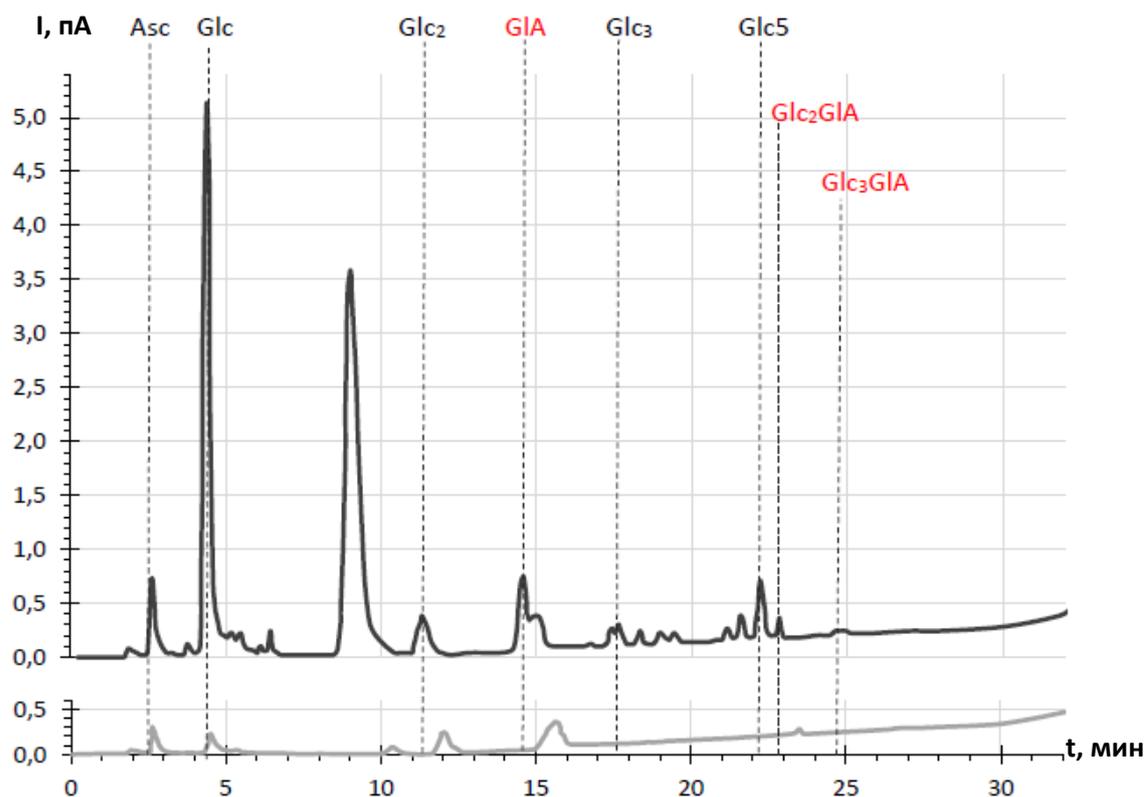


Рисунок 30 - НРАЕС хроматограмма продуктов деструкции аморфной целлюлозы под действием ПМО *T. reesei* в сравнении с фоном субстрата и аскорбиновой кислоты. Черными пунктирными линиями обозначены нейтральные олигосахариды, а серыми – идентифицированные окисленные олигосахариды. Asc – аскорбиновая кислота, Glc – глюкоза, Glc<sub>n</sub> – олигосахарид из n звеньев ангидроглюкозы, GlA – остаток альдоновой кислоты.

В данном образце площади пиков, соответствующие альдоновым кислотам, были небольшими, а пик, со временем удерживания 9,1 мин занимал почти половину от суммарной площади всех продуктов. Данные по СПК для ПМО *T. reesei* (Рисунок 21) свидетельствуют о том, что при большей активности по потреблению кислорода по сравнению с ПМО *T. terrestris* данный фермент при воздействии на целлюлозу должен был бы давать более

высокие выходы альдоновых кислот, чего не наблюдалось. Однако, так как засечь хроматографически окисленные по С4 атому углерода сахара нам не удалось, то следует заключить, что ПМО *T. reesei* при деструкции целлюлозы вероятно окисляет целлюлозу как по С1, так и по С4 атому углерода гликозидного остатка.

В образце ПМО *M. thermophila* из окисленных продуктов были также идентифицированы GlA, Glc<sub>2</sub>GlA и Glc<sub>3</sub>GlA (Рисунок 31). Однако для данной ПМО интенсивность сигнала продукта с временем удерживания 9,0 мин превзошла интенсивность сигнала глюкозы, а также пик перед сигналом аскорбиновой кислоты был существенно больше, чем у двух других исследуемых ферментов. Из нейтральных сахаров помимо глюкозы в реакционной смеси были идентифицированы целлобиоза, целлотриоза и целлопентаоза, однако в относительно малых количествах.

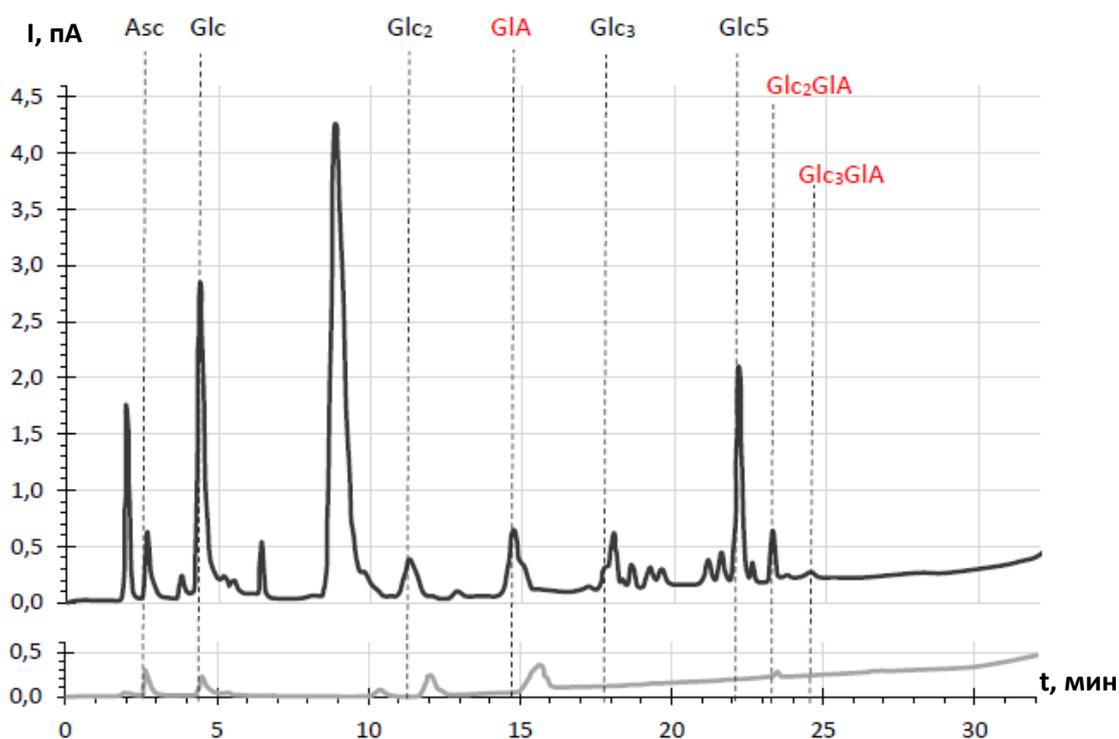


Рисунок 31 - НРАЕС хроматограмма продуктов деструкции аморфной целлюлозы под действием ПМО *M. thermophila* в сравнении с фоном субстрата и аскорбиновой кислоты. Черными пунктирными линиями обозначены нейтральные олигосахариды, а серыми – идентифицированные окисленные олигосахариды. Asc – аскорбиновая кислота, Glc – глюкоза, Glc<sub>n</sub> – олигосахарид из n звеньев ангидроглюкозы, GlA – остаток альдоновой кислоты.

Из полученных данных также можно прийти к выводу, что ПМО *M.thermophila* при деструкции не обладает ярко выраженной селективностью сайта окисления субстрата, что в целом согласуется с литературными данными по этому ферменту [101].

## **8.2. Масс-спектрометрический анализ продуктов деструкции целлюлозы**

В таблице 5 представлены результаты масс-спектрометрического анализа тех же проб. Во всех пробах видны те же соединения, что были идентифицированы хроматографическим методом. Следует отметить, что в образце для ПМО *T.terrestris* присутствуют соединения с массами 563.2 и 687.2, отвечающие кето-олигосахаридам и/или соответствующим лактонам. Однако масс-спектрометрический анализ позволяет лишь качественно оценить состав реакционной смеси, и обнаружение олигосахаридов, окисленных по C4 атому углерода, не может сказать о преимущественном сайте окисления фермента.

Состав продуктов для ПМО *T. reesei* был весьма схожим с ПМО *T. terrestris*. Из окисленных олигосахаридов в нём был дополнительно обнаружен продукт массой 525.2, соответствующий  $\text{Glc}_2\text{GlcLA}+\text{Na}$  или 4-кето- $\text{Glc}_3+\text{Na}$ . В образце с ферментом из *M. thermophila* также были обнаружены олигосахариды, окисленные по C4-атому углерода, в частности 4-кето- $\text{Glc}_2\text{GlcA}$  ( $m/z$  5632), что подтверждает тот факт, что данный фермент при деструкции может окислять как C1, так и C4 атом субстрата.

Таким образом, данные по масс-спектрометрическому анализу продуктов окислительной деструкции целлюлозы исследуемыми ПМО в целом подтверждают предположения о типе ферментов, выдвинутые после хроматографического анализа методом НРАЕС.

Таблица 5 - Сравнение продуктов деструкции целлюлозы исследуемыми ферментами по данным масс-спектрометрии.

Продукт	m/z	ПМО <i>T.terrestris</i>	ПМО <i>T.reesei</i>	ПМО <i>M.thermophila</i>	ПМО- ЦСМ*
[Аскорб. к-та + H] <sup>+</sup>	177.1	+	+	+	+
[Glc]	180.2	+	+	+	+
[Аскорб. к-та + Na] <sup>+</sup>	199.1	+	+	-	+
[Аскорбат Na + H] <sup>+</sup>	199.1	+	+	-	+
[Аскорбат Na + Na] <sup>+</sup>	221.1	-	-	-	-
[Glc <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> /[Glc <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	343.3/365.1	+	+	+	+
[GlcGlcLA+Na или 4-кето-Glc <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	363.1	-	-	+	-
[GlcGlcA+Na] <sup>+</sup>	381.1	+	+	+	+
[GlcGlcA-H+2Na] <sup>+</sup>	403.1	+	-	-	-
[Glc <sub>3</sub> ]/[Glc <sub>3</sub> +Na] <sup>+</sup>	504.4/527.2	+	+	+	+
[Glc <sub>2</sub> GlcLA+Na или 4-кето-Glc <sub>3</sub> +Na] <sup>+</sup>	525.2	-	+	-	-
[Glc <sub>2</sub> GlcA+Na] <sup>+</sup>	543.2	-	-	+	+
[4-кето-Glc <sub>2</sub> GlcA-H+2Na] <sup>+</sup>	563.2	+	-	+	-
[Glc <sub>2</sub> GlcA-H+2Na] <sup>+</sup>	565.2	+	+	+	+
[Glc <sub>3</sub> GlcLA+Na или 4-кето-Glc <sub>4</sub> +Na] <sup>+</sup>	687.2	+	+	-	-
[Glc <sub>4</sub> +Na] <sup>+</sup>	689.2	+	-	-	+
[4-кето-Glc <sub>3</sub> GlcA+Na] <sup>+</sup>	703.2	-	-	-	-
[Glc <sub>3</sub> GlcA+Na] <sup>+</sup>	705.2	-	-	-	-
[4-кето-Glc <sub>3</sub> GlcA-H+2Na] <sup>+</sup>	725.2	-	-	+	-
[Glc <sub>3</sub> GlcA-H+2Na] <sup>+</sup>	727.2	+	+	+	+
[Glc <sub>4</sub> GlcLA+Na или 4-кето-Glc <sub>5</sub> +Na] <sup>+</sup>	849.3	-	-	+	-
[Glc <sub>5</sub> +Na] <sup>+</sup>	851.3	-	+	+	+
[4-кето-Glc <sub>4</sub> GlcA+Na] <sup>+</sup>	865.3	-	-	-	-
[Glc <sub>4</sub> GlcA+Na] <sup>+</sup>	867.3	-	-	-	-
[Glc <sub>4</sub> GlcA-H+2Na] <sup>+</sup>	889.3	-	-	-	-
[Glc <sub>5</sub> GlcLA+Na или 4-кето-Glc <sub>6</sub> +Na] <sup>+</sup>	1011.3	-	-	-	-
[Glc <sub>6</sub> +Na] <sup>+</sup>	1013.3	-	-	+	-

Glc – глюкозный остаток, GlcLA – окисленный по C-1 восстанавливающий конец в форме лактона, GlcA – окисленный по C-1 восстанавливающий конец в форме альдоновой кислоты, 4-кето-Glc<sub>n</sub> – окисленный по C-4 олигосахарид в форме 4-кетальдозы.

## Глава 9. Возможности биотехнологического применения

### ПМО

#### 9.1. Взаимодействие ПМО с отдельными гидролазами

##### 9.1.1. Исследование взаимодействия ПМО и ЦБГ I и ЦБГ II

ЦБГ являются основным компонентом ферментных препаратов для деструкции ЦСС, определяющим их эффективность. ЦБГ, в зависимости от типа фермента, атакуют цепь целлюлозы либо с восстанавливающего, либо с невосстанавливающего конца. Таким образом, возможные сайты окисления целлюлозы под действием ПМО могут сказываться и на эффективности применения ЦБГ.

Мы исследовали осажаривающую способность смесей на основе ЦБГ I и ЦБГ II *T. reesei* с тремя изучаемыми ПМО. Во избежание ингибирования ЦБГ продуктом их действия вносили в реакционную смесь БГЛ *A. niger*. В качестве донора электронов использовали ЦДГ в эквимолярном ПМО количестве. Результаты экспериментов приведены на Рисунке 31.

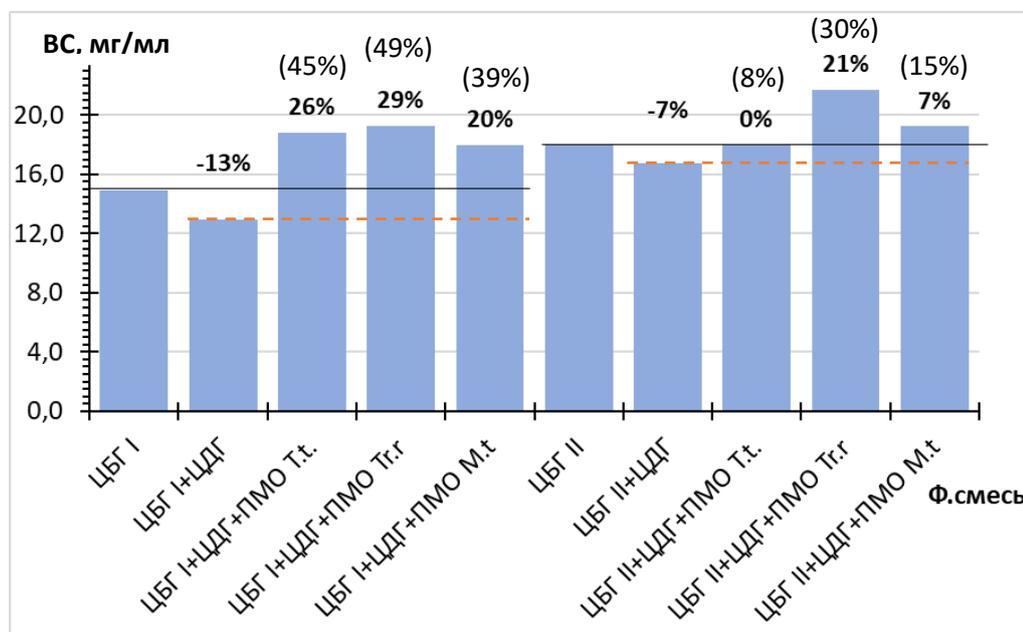


Рисунок 32 - Выходы восстанавливающих сахаров (ВС) при осажаривании МКЦ после 48 часов ферментативной реакции под действием ЦБГ I и ЦБГ II в отсутствие и в присутствии ПМО. Концентрация МКЦ 50 мг/мл, ЦБГ - 0,05 мг/мл, БГЛ – 0,005 мг/мл, ПМО 0,4 мкМ (0,01мг/мл), ЦДГ- 0,4 мкМ (0,036 мг/мл), 50°C, рН 5,0. Цифры сверху над барами показывают прирост ВС относительно ЦБГ в отсутствие ЦДГ и ПМО, в скобках – относительно ЦБГ в присутствии ЦДГ.

ЦДГ сама по себе отрицательно влияла на выход ВС, поскольку часть олигосахаридов окисляется под действием данного фермента. ПМО *T. terrestris* и *M. thermophila* проявляли значительный эффект синергизма при взаимодействии лишь с ЦБГ; увеличение выхода сахаров относительно контроля на отметке 48 ч составило 26 и 20%. С ЦБГII данный показатель составил 0 и 7%, однако, учитывая факт, что часть образовавшихся ВС окислялись под действием ЦДГ, в целом добавка указанных ПМО оказывала положительный эффект и в данном случае (сравнив выходы ВС по отношению к пунктирной линии), ПМО *T. reesei* проявляла синергизм с обеими ЦБГ. С ЦБГI было достигнуто максимальное увеличение выхода ВС – 29%, с ЦБГII – 21%. Таким образом, сравнив полученные данные с результатами хроматографического и масс-спектрометрического анализа продуктов реакции ПМО, можно говорить о наличии корреляции между эффективностью взаимодействия ПМО с ЦБГ и типом ферментов. Так, ПМО, окисляющие С1 атом углерода (AA9A), проявляют синергизм с ЦБГI, а ПМО, окисляющие и С1, и С4 атомы углерода (AA9C), проявляют синергизм с ЦБГ обоих типов. Однако делать окончательные выводы по данному исследованию было бы преждевременно, так как в нем не принимали участия ПМО подгруппы AA9B, окисляющие преимущественно С4 атом углерода субстрата. К тому же остается вероятность того, что в случае ЦБГ из других источников результат мог бы быть иным. В то же время можно утверждать, что ПМО проявляют синергизм при взаимодействии с ЦБГ, что подтверждает перспективность их применения в ферментных препаратах для осахаривания ЦСС.

#### 9.1.2. Взаимодействие ПМО с ЭГI и ЭГII

По сравнению с ЦБГ, ЭГ обладают заметно меньшей активностью по отношению МКЦ, поэтому общие выходы сахаров были ниже, чем в случае с ЦБГ, и достигали в максимальном случае 5,5 и 2,5 г/л для ЭГI и II, соответственно (Рисунок 33).

Как и в случае целлюбиогидролаз, выход продуктов в присутствии ЦДГ снижался за счет окисления части образующихся под действием эндоглюканаз олигосахаридов. ПМО *T. terrestris* и *T. reesei* увеличивали осажаривающую способность обеих ЭГ. С ЭГ I выходы сахаров увеличивались на 6 и 12%, а с ЭГ II на 14 и 84%. ПМО *M. thermophila* понижала выход ВС под действием ЭГ I на 8%, но при этом на 63% повышала выход сахаров под действием ЭГ II.

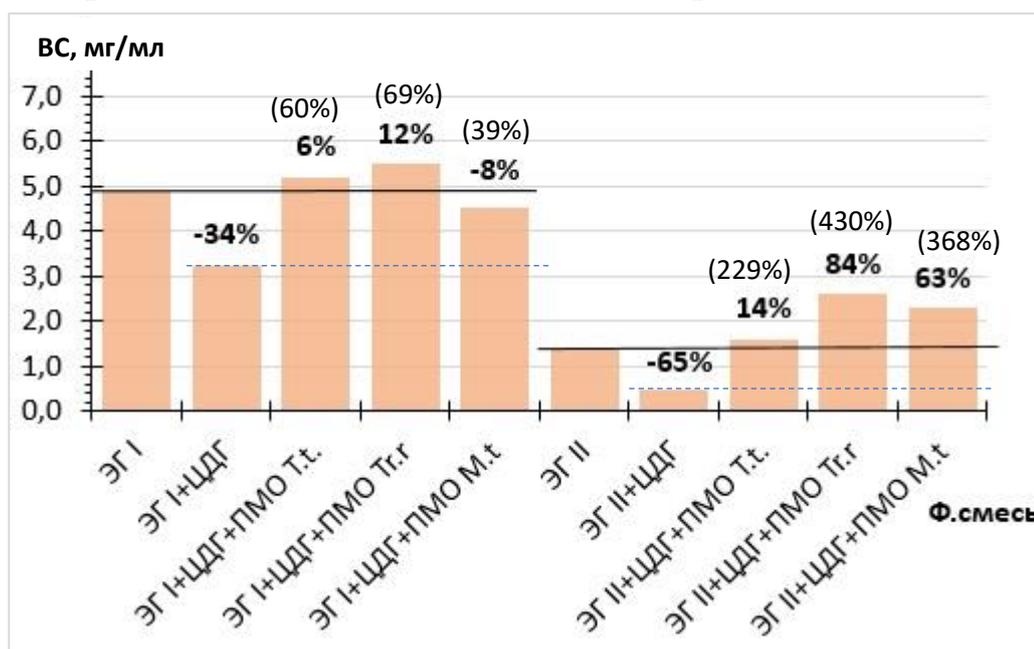


Рисунок 33 - Выходы восстанавливающих сахаров при осажаривании МКЦ после 48 часов ферментативной реакции под действием ЭГ в отсутствие и в присутствии ПМО. Концентрация МКЦ 50 мг/мл, ЭГ - 0,05 мг/мл, ПМО 0,4 мкМ (0,01 мг/мл), ЦДГ - 0,4 мкМ (0,036 мг/мл), 50°C, pH 5,0. Цифры сверху над барами показывают прирост ВС относительно ЭГ в отсутствие ЦДГ и ПМО, в скобках – относительно ЭГ в присутствии ЦДГ.

Тем не менее, учитывая, что во всех случаях, как при гидролизе МКЦ целлюбиогидролазами, так и эндоглюканазами, часть образующихся олигосахаридов окислялась под действием ЦДГ, в целом все ПМО оказывали стимулирующее влияние на выход продуктов под действием использованных целлюлаз, если сравнивать выходы по сравнению с пунктирной линией на рисунках 31 и 32. Из проделанных экспериментов можно заключить, что ПМО проявляют эффекты усиления эффективности как ЭГ, так и ЦБГ, что делает их применение в составе ферментных комплексов для деструкции ЦСС еще более многообещающим.

## 9.2. Вариация способа применения ПМО

Согласно результатам работы Эйбингера с соавторами [108], ПМО вызывают существенное разрушение поверхностного слоя частиц целлюлозы. При воздействии на целлюлозу ПМО разрыхляют её поверхностную структуру, освобождая тем самым сайты для атаки целлюлаз. При предварительной обработке субстрата под действием ПМО увеличивается как адсорбция целлюлаз на субстрате, так и выход продукта ферментативного гидролиза [108, 141], что создает предпосылки для применения ПМО в качестве дополнительного агента предобработки нерастворимых растительных субстратов перед их гидролизом под действием целлюлазных препаратов. Таким образом было решено исследовать 3 варианта взаимодействия ПМО и целлюлазного комплекса: предобработка целлюлозы ПМО с последующим гидролизом ферментным препаратом, предобработка ферментным препаратом, а затем введение ПМО, и вариант применения ПМО в смеси с ферментным препаратом. В качестве целлюлазного препарата была выбрана смесь на основе *Penicillium verruculosum* (PV), состоящая на 85% из B1-537 и на 15% из B1-F10. На Рисунке 34 представлены выходы восстанавливающих сахаров при воздействии на МКЦ и осиновою древесину для двух ПМО в зависимости от типа обработки ЦСС в сравнении с контролем (PV).

В случае предобработки ПМО контрольный образец, содержащий субстрат, буферный раствор и донор электронов, инкубировали в течение суток при температуре 50°C, а затем туда вводили рассчитанное количество PV. При предобработке PV для контрольного образца приведены выходы гидролиза ЦСС за 24 часа.

Как и следовало ожидать, вариант предобработки субстрата целлюлазами, с последующим 48-часовым воздействием ПМО оказался наименее эффективным. После суток обработки субстратов препаратом PV было достигнуто более чем 90% итогового выхода. За последующие 48 часов воздействия ПМО удалось увеличить выход на 4 г/л. Данный результат

закономерен, так как сами по себе ПМО не обладают высокой осажаривающей способностью, а при деструкции полученных в результате предобработки сахаров они не приводят к существенному увеличению выхода ВС, так как обладают невысокой активностью по отношению к растворенным олигосахаридам и при их деструкции окисляют восстанавливающий конец, что не позволяет зафиксировать увеличения выхода восстанавливающих сахаров.

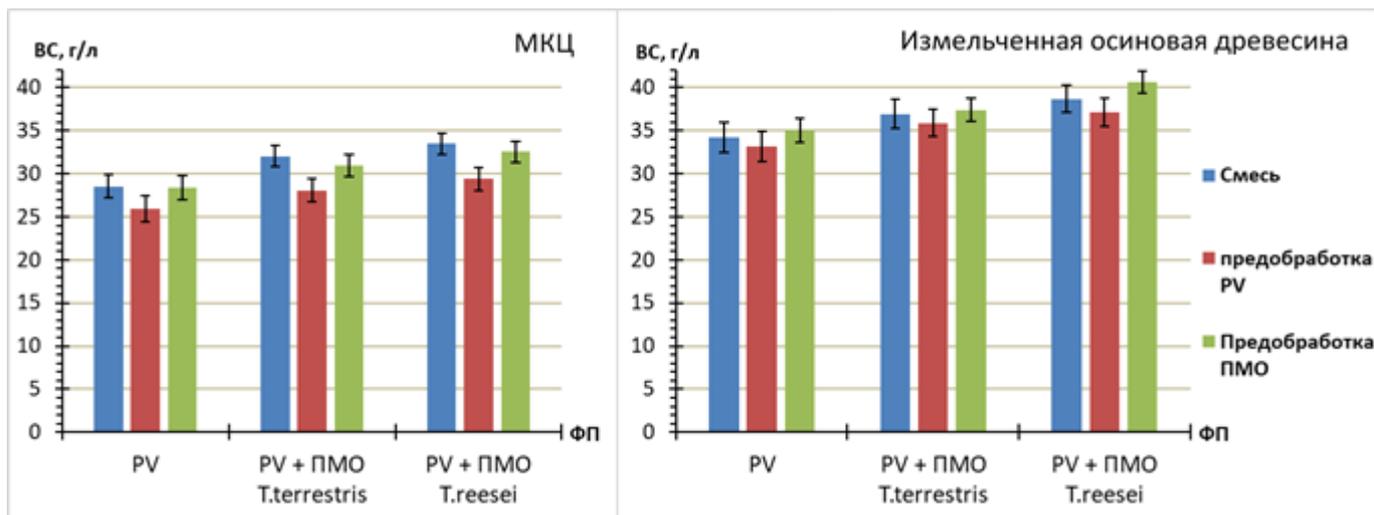


Рисунок 34 - Выходы восстанавливающих сахаров (ВС) по окончании двух суток экспозиции ЦСС ферментами после 24 ч предобработки.

Концентрация субстрата 10% (100 мг/мл). В опытах с ПМО 10% целлюлазного препарата по белку заменяли очищенной ПМО, концентрация донора электронов (ГК) 6,25 мМ. 50°C, pH 5,0. Пробы «Смесь» предобработке не подвергались.

При деструкции МКЦ наиболее предпочтительным выглядит вариант, где ПМО применялась в смеси с препаратом PV, т.е. без ферментативной предобработки. Добавка ПМО *T. reesei* при деструкции МКЦ позволяет достичь выхода сахаров 34 г/л, относительно 28 г/л в контрольном образце (PV). Однако для МКЦ и осинового дерева картина несколько различается. Так, в случае МКЦ гидролиз субстрата смесью предпочтительнее прочих вариантов, а в случае осинового дерева при предобработке ПМО удалось получить несколько больший выход сахаров, чем для смеси. Возможно, это связано с тем, что при предобработке МКЦ ПМО ГК была израсходована полностью раньше завершения экспозиции субстрата с ПМО. Осинное

древесина содержит ароматические соединения, которые способны выступать в качестве донора электронов для ПМО и которые позволили полноценно использовать фермент и далее. Для ПМО *T. reesei* после предобработки ею осиновой древесины и последующих двух суток гидролиза субстрата препаратом PV удалось достичь выхода ВС в 42 г/л. Кроме того, при предобработке осиновой древесины ПМО происходит разрушение не только целлюлозы, но и других полисахаридов клеточной стенки растений, что освобождает новые, ранее недоступные для действия целлюлаз сайты поверхности целлюлозы.

Однако, рассматривая эти результаты, не следует забывать, что суммарное время в случае предобработки ПМО было на сутки больше, чем для смеси (48 ч для смеси; а в случае 24-часовой предобработки суммарное время составляло 72 ч). Кроме того, для предобработки субстрата под действием ПМО необходимо получить и выделить данный фермент, что требует существенных затрат. Поэтому наиболее эффективным и рентабельным оказывается вариант с применением ПМО в составе препарата для деструкции ЦСС.

### **9.3. Исследование влияния доноров электронов различной природы на комплексную деструкцию ЦСС**

Наличие донора электронов в реакционной смеси критично для активности ПМО. Однако по мере функционирования ПМО с течением времени доноры электронов химической природы расходуются. При этом, возможно, большие концентрации доноров электронов могут ингибировать ферменты целлюлазных комплексов. Поэтому мы исследовали влияние концентрации галлиевой кислоты, как донора электронов, на комплексное осахаривание целлюлозы.

#### 9.3.1. Вариация концентрации галлиевой кислоты

Подбор оптимальной концентрации донора электронов является важной задачей для биотехнологического применения ПМО. Для данного

исследования мы выбрали 4 варианта концентрации донора электронов: 25, 10, 6,25 мМ, а также 4-х кратное введение ГК по 4 мМ в реакцию смесь каждые 12 ч. Выходы глюкозы определяли хроматографически, методом НРАЕС, так как большие концентрации ГК влияют как на глюкозооксидазно-пероксидазный метод определения глюкозы, так и на метод Шомоди-Нельсона определения ВС. Итоговые выходы продукта приведены на Рисунке 35.

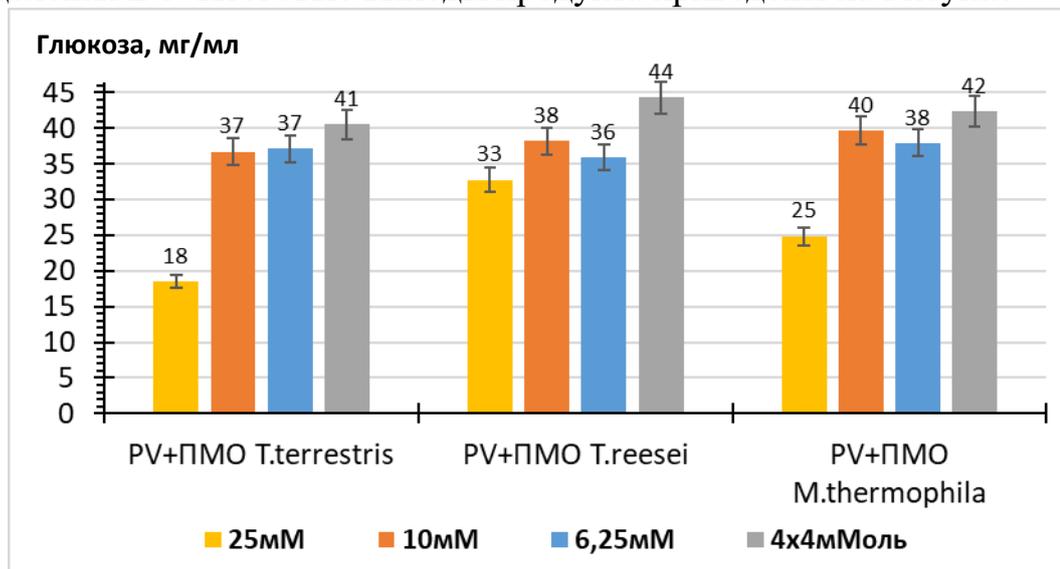


Рисунок 35 - Влияние концентрации и способа ведения донора электронов (ГК) на выход глюкозы через 48 ч гидролиза МКЦ ферментными смесями. 50°C, рН 5,0. Концентрация субстрата 100 мг/мл. Количество ПМО составляло 10% от целлюлазного препарата по белку.

Самая высокая концентрация ГК (25 мМ), по-видимому, частично ингибировала целлюлазы. Особенно отчетливо это прослеживается для ПМО *T.terrestris* и *M.thermophila*. Наиболее эффективной оказалась периодическая добавка донора электронов, что показано серым цветом, где удалось достичь концентрации глюкозы 41, 44, 42 г/л для ПМО *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila* соответственно. Однако, чтобы упростить схему экспериментов, далее использовали концентрацию ГК в 10мМ.

### 9.3.2. Сравнение эффективности применения в качестве донора электронов ГК и ЦДГ

Далее мы сравнивали влияние донора электронов химической природы (ГК) с ферментным донором - ЦДГ *M. thermophila*. Концентрация ГК составляла 10 мМ. ЦДГ использовали в эквимольном количестве

относительно ПМО *T.terrestris*. В качестве контроля использовали смеси PV и ПМО без добавки какого-либо донора.

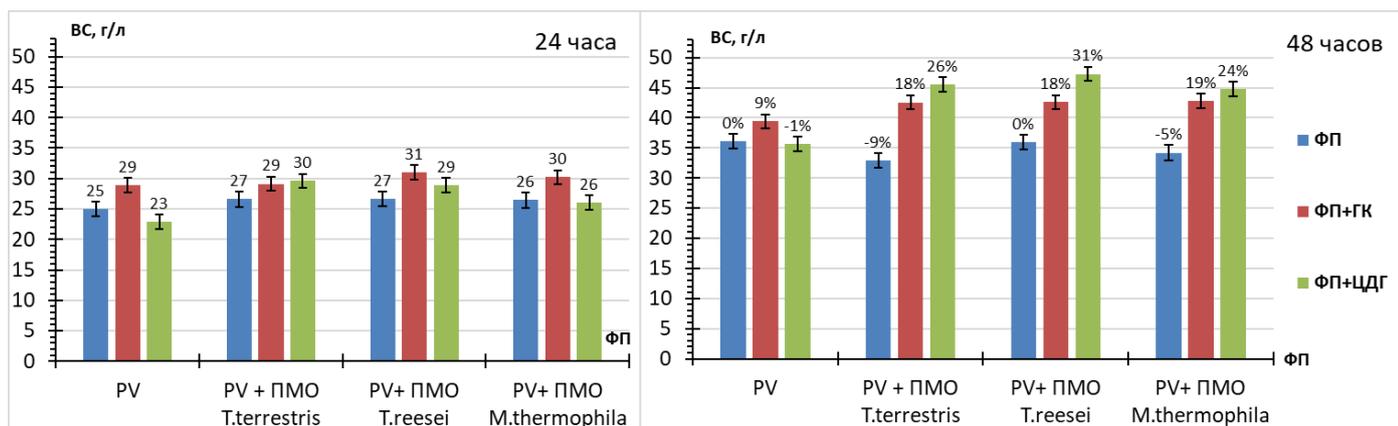


Рисунок 36 - Выходы восстанавливающих сахаров через 24 и 48 ч ферментативного гидролиза МКЦ. 50°C, pH 5,0. Концентрация субстрата 10% (100 мг/мл). В опытах с ПМО 10% целлюлазного препарата по белку заменяли очищенной ПМО, [ГК]=10 мМ, [ЦДГ]=2,1 мкМ. Цифры над барами диаграммы для 24 ч означают выход продукта в г/л, а для 48 ч – прирост выхода сахаров относительно PV.

На отметке в 24 ч наиболее заметным положительным эффектом относительно препарата PV обладали образцы, где совместно использовали ПМО и ГК. Использование ЦДГ в качестве донора электронов оказалось менее эффективным, чем применение ГК, за исключением ПМО *T. terrestris*. В контрольном образце добавка ГК привела к увеличению концентрации ВС с 25 до 29 г/л, а введение ЦДГ – к ее уменьшению до 23 г/л, что связано с окислением части сахаров под действием данного фермента.

После 48 ч картина изменилась. Для всех ПМО добавка ЦДГ приводила к более высоким выходам сахаров по сравнению с ГК. Выходы продукта при этом составили 45,5, 47,3, 44,8 г/л для ПМО *T. terrestris*, *T. reesei* и *M. thermophila*, что на 26, 31 и 24% выше, чем для контроля. 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 длительности гидролиза. В образцах серии PV также, как и для времени 24 ч, добавка ГК увеличивала выход ВС (на 9%). Это может

свидетельствовать о наличии некоторого количества собственной ПМО в составе культуральной жидкости *P. verruculosum*.

Таким образом, при длительных временах гидролиза ЦСС под действием целлюлазного комплекса с добавкой ПМО использование фермента – ЦДГ, 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 дополнительные работы по внедрению генов данного фермента в штаммы-продуценты целлюлаз.

## **Глава 10. Получение нового штамма *Penicillium verruculosum*, экспрессирующего ПМО *T. reesei* под контролем промотора гена глюкоамилазы, и изучение свойств ферментного препарата**

Исходный штамм *Penicillium verruculosum* B1-537 является эффективным продуцентом высокоактивного и сбалансированного по компонентному составу целлюлазного комплекса. Ферментные препараты на базе этого штамма также содержат небольшое количество глюкоамилазы (не более нескольких процентов от общего количества белка). Поэтому возникла идея использовать индуцибельный промотор гена глюкоамилазы (*glal*) для гетерологичной экспрессии рекомбинантной ПМО *T. reesei* в грибе *P. verruculosum*. Поскольку промотор гена *glal* является относительно слабым и индуцируется крахмалом, в этом случае можно было бы ожидать сравнительно небольшой экспрессии ПМО *T. reesei* при сохранении базового состава целлюлазного комплекса *P. verruculosum*, в отличие от случая использования «сильного» промотора гена *cbh1* для получения препарата, содержащего рекомбинантную ПМО *T. reesei* в количестве около 25% от общего белка, из которого мы выделяли этот фермент (см. раздел 4.1.1 и 5.1) и в котором было существенно снижено содержание ЦБГП – ключевого компонента целлюлазного комплекса *P. verruculosum*.

### **10.1. Получение ферментного препарата, содержащего гетерологичную ПМО *T. reesei***

Плазмида pGA-EGIV (см. п. 4.2.1.2 и Рисунок 11) была котрансформирована с плазмидой pSTA10 в соотношении 10:1 в ауксотрофный штамм *P. verruculosum* B1-537 (*ΔniaD*) по методике, описанной в работе [124]. На селективной среде выросло более 200 трансформантов.

На рисунке 37 показаны результаты ПЦР-скрининга трансформантов. Отобранные трансформанты культивировали в колбах Эрленмейера на среде

из пшеничной муки, содержащей крахмал, индуктор гена *glal*, и МКЦ. Ферментацию проводили в течение 6 суток при температуре 30°C при перемешивании со скоростью 220 об/мин.

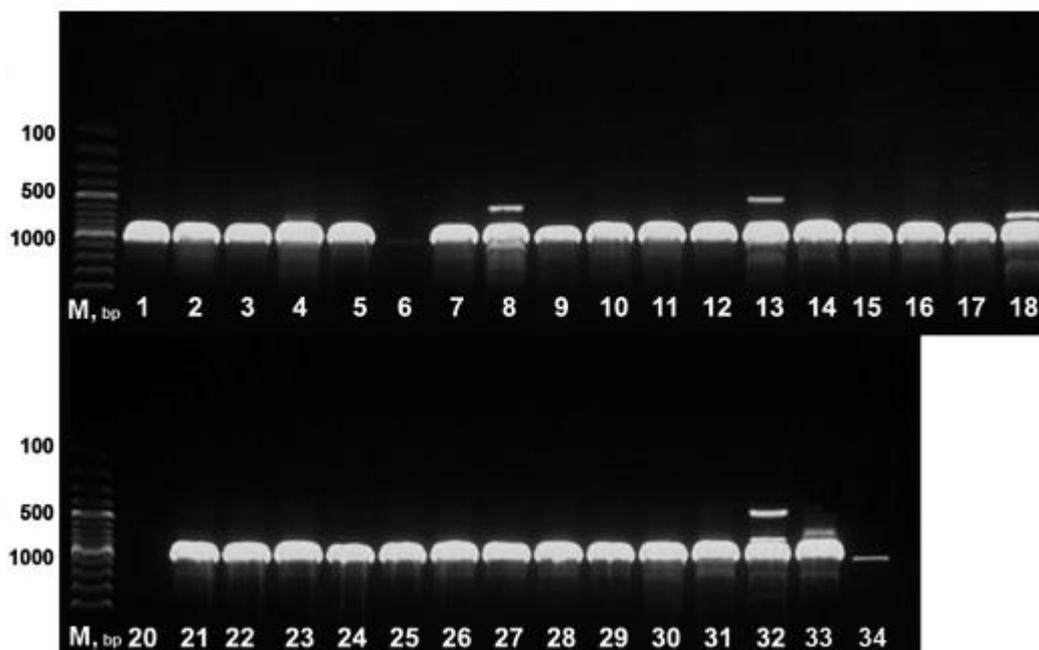


Рисунок 37 - ПЦР скрининг трансформантов на наличие гена ПМО *T. reesei*.

По завершении культивирования только 4 клон экспрессировали целевой белок. В результате был отобран один клон, который, согласно интенсивности полос на электрофореграмме, экспрессировал наибольшее количество ПМО *T. reesei*. Им оказался 21 клон, которому для дальнейшей работы было присвоено имя hLPMO. На Рисунке 38 изображена электрофореграмма белков из соответствующей культуральной жидкости в ПААГ.

Рекомбинантной ПМО *T. reesei* соответствует полоса массой около 33 кДа. По результатам её масс-спектрометрического анализа было обнаружено 6 пептидов, соответствующих целевому белку. Степень покрытия аминокислотной последовательности составила 30%, что позволяет заключить, что данный белок действительно является ПМО *T. reesei*.

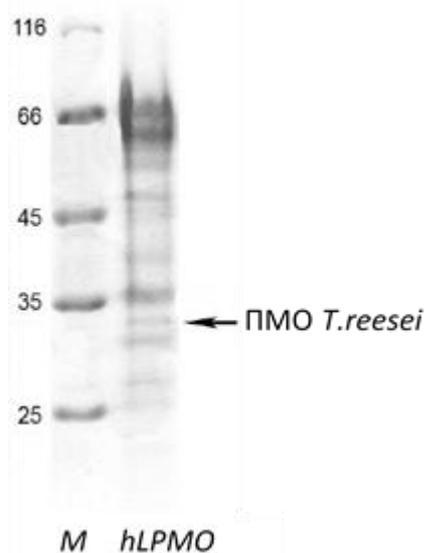


Рисунок 38 - Ds-Na-ПААГ-электрофорез препарата hLPMO.

В таблице 6 приведены удельные активности препарата hLPMO в сравнении с контрольным штаммом *P. verruculosum* B1-537 (исходным штаммом), выращенным на пшеничной муке с МКЦ (PV1) и на стандартной среде с целлюлозой без муки (PV2).

Таблица 6 - Удельные активности полученного ФП hLPMO в сравнении контролем, выращенным в различных условиях.

Субстрат	B1-537, стандартная среда (PV2)	B1-537, пшеничная мука с МКЦ (PV1)	hLPMO, пшеничная мука с МКЦ
Крахмал	0,20±0,02	0,57±0,03	0,37±0,03
МКЦ	0,80±0,03	0,78±0,03	0,64±0,03
КМЦ	17,1±0,6	8,9±0,4	8,2±0,3
Ксилан	18,0±0,9	26,5±1,2	27,6±1,1
<i>p</i> -NPG	1,1±0,1	2,1±0,1	1,0±0,1

Из полученных данных видно, что для препарата hLPMO, активность по отношению к крахмалу (глюкоамилазная активность) оказалась ниже, чем у контрольного, выращенного в тех же условиях, за счет экспрессии ПМО вместо глкоамилазы. Также в полученном препарате была несколько снижена активность по МКЦ, КМЦ и *p*-NPG относительно B1-537, полученного на муке

с МКЦ, однако уменьшение целлюлазной активности не превышало 18%. Ксиланазная активность hLPMO оказалась выше, чем у исходного штамма, однако её увеличение относительно В1-537, выращенного на пшеничной муке, можно считать незначительным. Несмотря на то, что  $\beta$ -глюкозидазная активность (по *p*-NPG в препарате hLPMO оказалась в 2 раза ниже, чем у препарата PV1, она была примерно на уровне препарата PV2, полученного на стандартной среде для данного продуцента. При этом активность по отношению к МКЦ, отражающая действие целлобиогидролаз, ключевых компонентов целлюлазного комплекса, в препарате hLPMO снизилась по сравнению с контрольным препаратом PV2 лишь на 20%. Поэтому можно считать, что базовый целлюлазный комплекс в препарате hLPMO, содержащей гетерологичную ПМО, в значительной мере сохранился.

После фракционирования hLPMO с помощью анионообменной хроматографии, было обнаружено, что ферментный препарат содержит около 3% гетерологичной ПМО *T. reesei*.

## **10.2. Осахаривающая способность нового ферментного препарата**

Препарат hBGL2 был получен коллегами по лаборатории аналогично препарату hLPMO; он гетерологично экспрессирует БГЛ *A. niger* под контролем промотора гена глюкоамилазы. Мы проводили опыты по изучению осаживающей способности ЦСС препаратами hBGL2, hLPMO, а также их смесью. В качестве контролей использовали препараты, продуцируемые исходным штаммом В1-537 на той же среде с пшеничной мукой (PV1), что и в случае hBGL2 и hLPMO, а также на стандартной среде с МКЦ без муки – PV2 (табл. 5). На Рисунке 39 приведены кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ. В данном случае в реакцию, в которой участвовал препарат hLPMO, добавляли 0,1 мг/мл ЦДГ *M. thermophila* в качестве донора электронов.

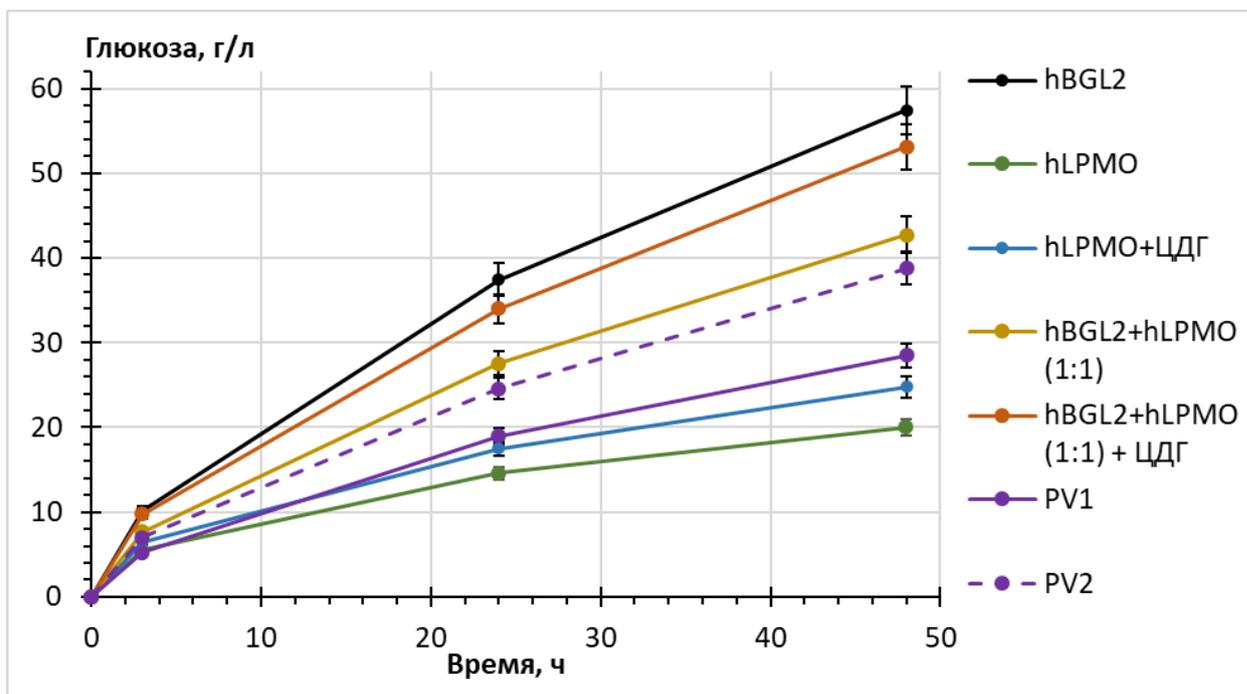


Рисунок 39 - Кинетические кривые накопления глюкозы при ферментативном гидролизе МКЦ. 50°C, pH 5,0. Концентрация субстрата 100 мг/мл, концентрация ФП - 0,5 мг/мл. [ЦДГ]=0,1 мг/мл.

При гидролизе МКЦ сам по себе препарат hLPMO давал невысокие выходы сахаров. Хотя добавка ЦДГ, активирующая действие ПМО, привела к увеличению выхода глюкозы на 25%, препарат был слабее контрольных препаратов PV1 и PV2 и тем более – слабее препарата hBGL2, который продемонстрировал наилучшие результаты в данном случае. При смешении hLPMO и hBGL2 в соотношении 1:1 при сохранении общей дозировки по белку и добавке ЦДГ конечный выход глюкозы составил 53,1 г/л, что оказалось существенно выше, чем для контрольных препаратов PV1 и PV2, но все еще несколько ниже, чем для одного препарата hBGL2 (57,4 г/л).

Однако при гидролизе осинового дерева для препарата hLPMO были получены несколько неожиданные позитивные результаты (Рисунок 40).

Препарат hLPMO, который даже в присутствии ЦДГ весьма слабо воздействовал на МКЦ, при гидролизе осинового дерева обеспечил выход глюкозы 46,1 г/л, что значительно выше выхода продукта для контрольных препаратов PV1 и PV2. При использовании же смеси hLPMO с hBGL2 (1:1) выход глюкозы оказался больше, чем в случае одного препарата hBGL2. Через

48 ч концентрация глюкозы достигла 59 г/л, что на 46% выше контроля PV2, выращенного на стандартной среде, и на 19% выше, чем для препарата hBGL2.

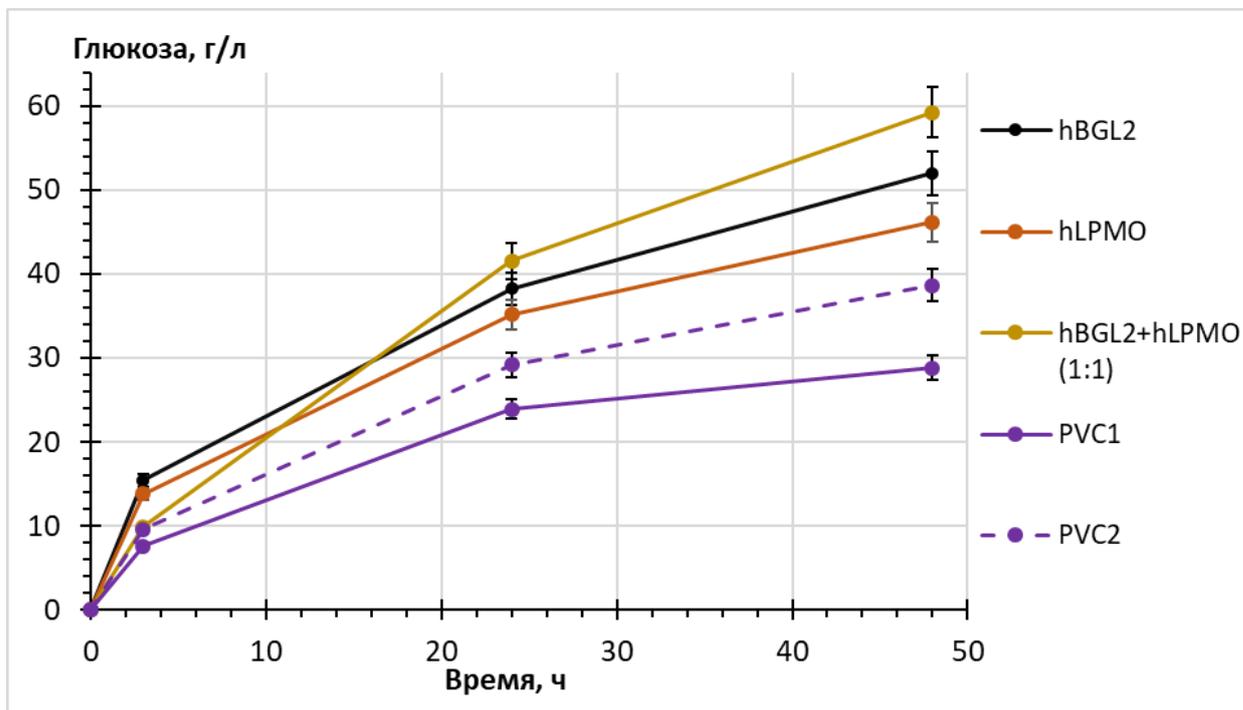


Рисунок 40 - Кинетические кривые накопления глюкозы при ферментативном гидролизе осинового субстрата, 50°C, pH 5,0. Концентрация субстрата 100 мг/мл, концентрация ФП - 0,5 мг/мл.

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, что открывает дальнейшие перспективы работы в этом направлении. Важно подчеркнуть, что использование относительно слабого промотора гена глюкоамилазы для экспрессии указанных ферментов позволило сохранить в значительной мере базовый уровень экспрессии ключевых целлюлаз, что в итоге и привело к заметному росту эффективности препаратов при осахаривании ЦСС. Дополнительное введение ПМО позволило нарушить поверхностную структуру лигноцеллюлозного субстрата, что увеличило его доступность для целлюлаз. Стоит также отметить, что ароматические соединения – строительные блоки лигнина, содержащиеся в составе

природного ЦСС (осиновой древесины) выступают эффективным донором электронов для ПМО, что дает им возможность работать на протяжении всего процесса гидролиза.

## **Глава 11. 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 [25, 26]. 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) [52]. Большинство из известных ПМО не имеют в своей структуре ЦСМ. Однако есть и такие ПМО, которые обладают ЦСМ, однако в случае этих ферментов, как уже отмечалось в разделе 3.8, достоверные данные о том, как ЦСМ влияет на их активность, практически отсутствуют в научной литературе. В предыдущих разделах диссертации 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 подвижный линкер присоединен ЦСМ от ЦБГІ *P. verruculosum* (Рисунок 41), исследовать свойства химерной ПМО-ЦСМ и изучить её влияние на комплексную деструкцию ЦСС в составе целлюлазного препарата.

Следует отметить, что на сегодняшний момент не проводилось работ по усовершенствованию каталитических характеристик ПМО, а работы, посвященные изучению влияния ЦСМ на эффективность ПМО, не давали однозначных и определенных результатов о роли данного структурного элемента [114, 115, 116].

```

gtgctcctccctttcgtcgagaaacagcgccctagacacagctcttgcgccatgctc
gcaaacggtagccatcgtcttctgagccgcccctcggcgtcaatggccactacacctgg
A N G A I V F L A A A L G V S G H Y T W
ccacgggttaacgacggcgccgactggcaacagatccgtaagcgggacaactggcaggac
P R V N D G A D W Q Q V R K A D N W Q D
aacggctacatcgggatgtcacatcaccacagatccgctgtttccagcggcccccctcc
N G Y V G D V T S P Q I R C F Q A T P S
ccggcccctcctcctcaacaccagccggcctcagcgtgacctactggcccaacccc
P A P S V L N T T A G S T V T Y W A N P
gacgtctaccacccgggactgtacagttttacatggccgcatcccgatggcggagac
D V Y H P G P V Q F Y M A R V P D G E D
atcaactcgtggaacggcgacggccatgtgattcaaggtatcagagaccatcctacc
I N S W N G D G A V W F K V Y E D H P T
tttggcactcagctcacatggccagcaggatagttttctctttctctttcttggaca
F G A Q L T W P S T intron 1

saagaaacaaggaacacacaaaagcggagactacgaagagatggaatagttcattccttctg
scacggcggacttgcagagcaagaactcattcgcgattcccatccccccatgcatcaatcc
G K S S F A V P I P P C I K S
ggctactacctcctccggcgggacaaatcggcctgcacgtcaccagagcgtagacgga
G X Y L L R A E Q I G L H V A Q S V G G
ggcagttctacatctcagcagcctcagcctcaccggcggcggcagcaccgacccg
A Q F Y I S C A Q L S V T G G G S T E P
ccgaacaaggtggccttcccggcgttacagtgacgacggaccgggcattctgatcaac
P N K V A F P G A Y S A T D P G I L I N
atctactaccctgttcccagctcctaccagaaccggccggccgctcttcagctcgggt
I Y X P V P T S Y Q N P G P A V F S C G
ggcagcactacttcttctactactataaacctcgaagacctctactactacttccagcact
G S T I S S I I I S K I S T I T S S T
gctaccggaactggaatttctcctcactatggtcaatgtgaggtcaggaatggactgg
A T G T G V A A H Y G Q C G G Q G W T G
cctaccacctgcgtagcgggtacacttgcaccgctcttgaacccttactactcgaatgc
P T I C A S G Y T C T V L N P Y Y S Q C
ttataa
L -

```

Рисунок 41 - Нуклеотидная и АК последовательности химерной ПМО-ЦСМ. Голубым маркером выделен линкер от ЦБГ *P. verruculosum*, связывающий ПМО и ЦСМ, фиолетовым – сам ЦСМ от ЦБГ *P. verruculosum*.

### 11.1 Генетическая инженерия химерного белка

На первом этапе была получена конструкция гена *eglE-cbhI<sub>cbd</sub>*, кодирующего химерную ПМО-ЦСМ. На Рисунке 42 показана электрофоретическая диаграмма в агарозном геле амплифицированных генов: фрагмента гена ЦБГ I *P. verruculosum*, кодирующего ЦСМ и линкер, гена ПМО *T. terrestris* и гена, полученного в результате сшивки предыдущих двух и кодирующего химерный белок.

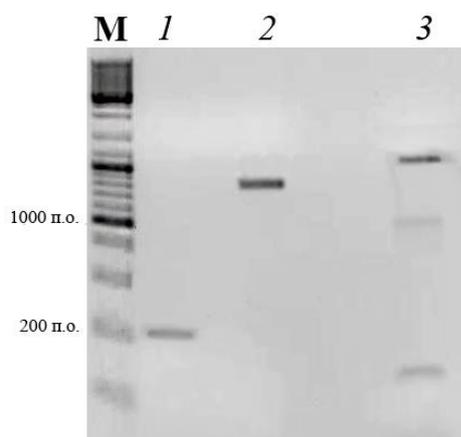


Рисунок 42 - Электрофорез в агарозном геле амплифицированных генов: М – маркер; 1 – ЦСМ и линкер от ЦБГ I *P. verruculosum*; 2 – ПМО *T. terrestris*; 3 – химерная ПМО-ЦСМ.

Молекулярная масса полученной конструкции оказалась равна сумме масс генов, кодирующих ЦСМ + линкер и ПМО. Далее полученный амплификат, соответствующий гену химерной ПМО-ЦСМ клонировали в вектор рUC-СВН1 в соответствии с методом независимого лигирования [119]. После клонирования в компетентные клетки *E. coli* MachI и наработки генетического материала по результатам секвенирования плазмид была отобрана одна, не имеющая нуклеотидных замен.

## 11.2. Первичный скрининг трансформантов и наработка культуральной жидкости, содержащей химерную ПМО-ЦСМ

Полученная плазида была котрансформирована с плазмидой рСТА10 в ауксотрофный штамм *P. verruculosum* B1-537 (*DniaD*), по методике, описанной в работе [124]. В результате отбора на селективной среде получили около сотни трансформантов. Согласно результатам ПЦР скрининга выбранных 36 колоний получили 24 трансформанта, несущих целевой ген. После 6 суток ферментации отобранных трансформантов в колбах Эрленмейера на стандартной среде получили только 6 клонов, экспрессировавших целевой белок в составе культуральной жидкости.

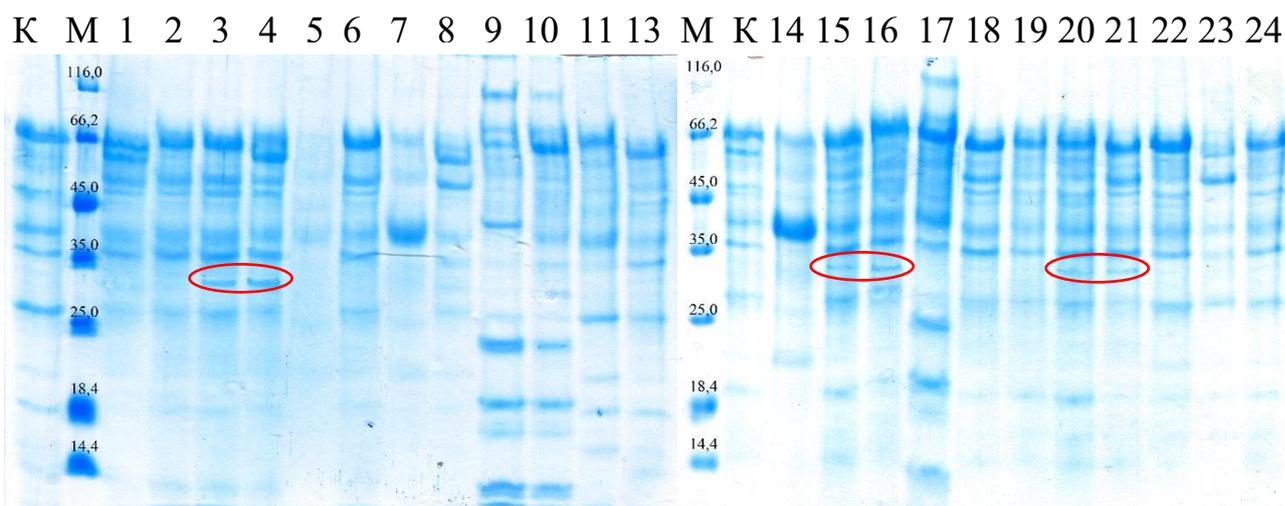


Рисунок 43 - Ds-Na-ПААГ-электрофорез культуральных жидкостей трансформантов: К – контроль (В1-537), 1-24 – полученные трансформанты; М – белки-маркеры с различной молекулярной массой (кДа), красным обведены полосы, соответствующие целевому белку.

Из этих шести трансформантов был выбран один, четвёртый, содержащий в составе культуральной жидкости наибольшее количество целевого белка, для повторного культивирования с целью выделения химерной ПМО-ЦСМ.

### 11.3. Выделение и идентификация ПМО-ЦСМ

Выделение химерной ПМО проводили из культуральной жидкости выбранного трансформанта по методике, описанной в пункте 6.3.5. Теоретический  $pI$  целевого белка оказался равным 5,6 ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)), что выше, чем для большинства компонентов культуральной жидкости штамма В1-537 [133]. Поэтому для выделения химерной ПМО-ЦСМ было решено использовать элюэнт с  $pH$  5,1. При разделении на анионообменном носителе MonoQ целевой белок выходил в не связавшейся с носителем фракции (проскоке), тогда как элюирование остальных белков культуральной жидкости модифицированного штамма В1-537 протекало в градиенте концентрации соли. Помимо целевого белка проскок содержал незначительное количество меньших по молекулярной массе примесей, которые удалось отделить с помощью гидрофобной

хроматографии, используя носитель Source 15Iso. На рисунке 44 приведена Ds-Na-ПААГ электрофореграмма выделенного белка в сравнении с исходной ПМО *T. terrestris*.

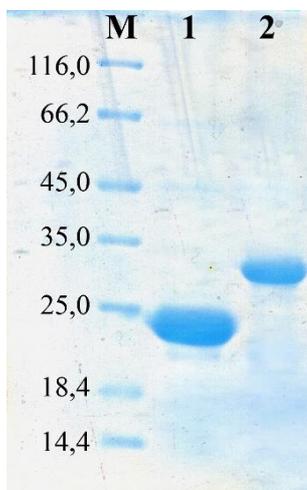


Рисунок 44 - Ds-Na-ПААГ-электрофорез выделенных ферментов: ПМО *T. terrestris* (1), ПМО-ЦСМ (2), М – белки-маркеры с различной молекулярной массой (в кДа – слева от М).

Молекулярная масса химерного белка составляла 30,3 кДа, что соответствует сумме масс ПМО *T. terrestris* и ЦСМ от ЦБГГ *P. verruculosum* с линкером. Также видно, что в процессе выделения удалось получить целевой белок высокой степени чистоты, однако в отличие от немутантной формы, итоговые количества белка были существенно ниже, 23 мг, так как содержание ПМО-ЦСМ в составе препарата было намного ниже и достигало лишь 8%.

Идентификацию химерной ПМО проводили методом пептидного картирования с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии. При анализе масс-спектра трипсинового гидролизата белка из соответствующей полосы геля было обнаружено 9 пептидов, массы которых совпадают с теоретическими, рассчитанными с помощью программы PeptideMass.

m/z	АК последовательность пептида
858	HYTWPR
873	Me-HYTWPR
870	SGYYLLR
1257 /1328 (Cys_PAM 126)	SSFAVPIPPCIK
1286	VNDGADWQQVR
2133	VYEDHPTFGAQLTWPSTGK
2134	ADNWQDNGYVGDVTSPQIR
2262	KADNWQDNGYVGDVTSPQIR
3701/3772 (Cys_PAM 156)	AEQIGLHVAQSVGGAQFYISCAQLSVTGGGSTEPPNK

Рисунок 45 - Аминокислотные последовательности пептидов, идентифицированные по данным МАЛДИ масс-спектрометрии триптических гидролизатов химерной ПМО-ЦСМ.

Степень покрытия аминокислотной последовательности идентифицированными пептидами составила 42%, что позволяет заключить о том, что был выделен именно целевой белок.

#### 11.4. Влияние присоединения ЦСМ на активность фермента и его субстратную специфичность ПМО

В результате присоединения на ЦСМ скорость потребления кислорода (ΔСПК) для ПМО *T. terrestris* при воздействии на аморфную целлюлозу возросла с 9,6 до 11,9 пмоль/мин (Рисунок 46). Таким образом, активность химерного фермента приблизилась к активности (ΔСПК) ПМО *T. reesei*, обладавшей собственным ЦСМ, которая составляла 13,4 пмоль/мин достигнуть не удалось.

Согласно литературным данным [97], а также результатам в разделе 7.2, ПМО из семейства AA9 обладают активностью по отношению к другим полисахаридным субстратам. Поэтому была изучено, как ЦСМ влияет на субстратную специфичность ПМО (Рисунок 46). ПМО из *T. reesei* обладала активностью по ксилоглюкану, однако не действовала на ксилан, КМЦ и β-глюкан. Исходная ПМО из *T. terrestris* также обладала небольшой активностью по отношению к ксилоглюкану 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 ксилоглюкану при этом возросла на порядок и превысила таковую для ПМО из *T. reesei*.

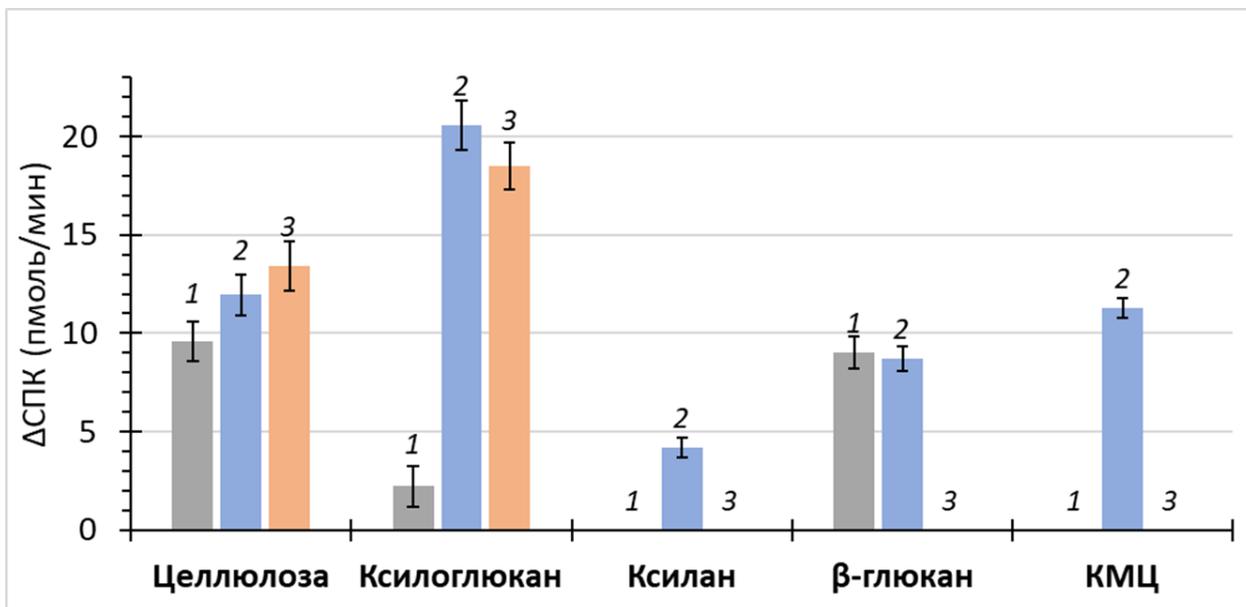


Рисунок 46 - Скорости потребления кислорода (СПК) исследуемыми ПМО (8 мкМ) при воздействии на различные полисахаридные субстраты (4 мг/мл) в присутствии 0,5 мМ аскорбиновой кислоты. 1 – ПМО *T. terrestris*; 2 – химерная ПМО-ЦСМ; 3 – ПМО *T. reesei*.

Таким образом, присоединение ЦСМ к ПМО *T. terrestris* не только увеличило её активность по отношению к целлюлозе на 24%, но и расширило субстратную специфичность фермента, что открывает ряд перспектив для изучения влияния химерной ПМО-ЦСМ на комплексную деструкцию природных видов растительного сырья, состоящего из различных полисахаридов.

### 11.5. Адсорбционные характеристики нового фермента

Присоединение к ПМО *T. terrestris* ЦСМ от ЦБГІ должно было повлиять на связывание фермента с целлюлозой. Поэтому проводили сравнение адсорбционной способности исследуемых ферментов, а также ЦБГІ *P. verruculosum*, из которой был взят ЦСМ, на МКЦ. Данные по степени адсорбции исследуемых ферментов представлены в Таблице 7.

Таблица 7 - Степень адсорбции исследуемых ПМО на МКЦ (0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0, 6°C).

Фермент	ЦБГГ <i>P.verruculosum</i>	ПМО <i>T.terrestris</i>	ПМО- ЦСМ	ПМО <i>T.reesei</i>	ПМО <i>M.thermophila</i>
Степень адсорбции	79±4%	46±3%	92±5%	84±3%	49±4%

Из полученных данных 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 [113, 38], в том числе ЦБГГ *P. verruculosum* (табл. 6). Как и следовало ожидать, присоединение к ПМО *T. terrestris* ЦСМ от ЦБГГ *P. verruculosum* привело к очень существенному - двукратному увеличению адсорбционной способности фермента.

#### 11.6. Анализ продуктов деструкции целлюлозы под действием ПМО-ЦСМ

Согласно данным работы [116], присоединение к ПМО ЦСМ может изменять состав продуктов действия фермента на субстрат. Из полученных хроматограмм, видно, что под действием ПМО ПМО-ЦСМ образуется глюкоза, целлобиоза, целлотриоза, целлотетраоза и глюконовая кислота. Однако если в образцах исходного фермента (см. рисунок 28) и его мутантной формы содержание целлобиозы, целлотриозы и целлотетраозы было сравнимым, то выходы глюкозы и глюконовой кислоты под действием ПМО-ЦСМ оказались существенно выше. Кроме того, в результате действия ПМО-ЦСМ содержание  $\text{Glc}_2\text{G1A}$  снизилось и, в отличие от исходного фермента, не было обнаружено целлопентаозы и  $\text{Glc}_4\text{G1A}$ . Тогда как в растворе присутствовал окисленный сахарид состава  $\text{Glc}_5\text{G1A}$ . Остальные не идентифицированные пики на хроматограммах по всей видимости

соответствуют сложным эфирам аскорбиновой кислоты и сахаров, а также эфирам окисленных сахаров и аскорбиновой кислоты.

При этом, при масс-спектрометрическом анализе продуктов реакции ПМО-ЦСМ не удалось обнаружить значимых различий с исходной ПМО *T. terrestris* (см. таблицу 4), что говорит о том, что присоединение ЦСМ не оказало влияния на специфичность окисления при деструкции целлюлозы. Однако увеличение выхода глюкозы, рост СПК и отсутствие на хроматограмме целлопентаозы и целлогексаозы говорит о том, что фермент с присоединением ЦСМ скорее всего приобрел увеличение активности по отношению к растворимым сахарам.

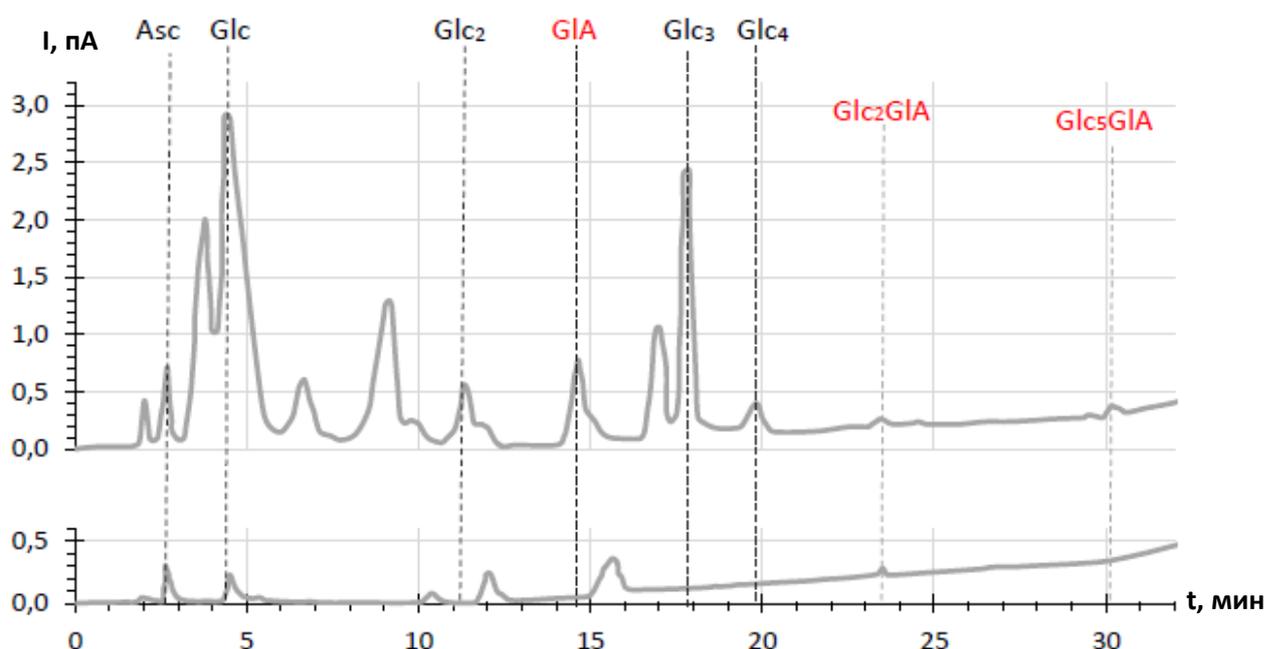


Рисунок 47 - НРАЕС хроматограмма продуктов деструкции аморфной целлюлозы под действием химерно ПМО-ЦСМ в сравнении с фоном субстрата и аскорбиновой кислоты. Черными пунктирными линиями обозначены олигосахариды, а серыми – идентифицированные окисленные олигосахариды. Asc – аскорбиновая кислота, Glc – глюкоза, Glc<sub>n</sub> – олигосахарид из n звеньев ангидроглюкозы, GIA – остаток альдоновой кислоты.

### 11.7. Изучение влияния химерной ПМО-ЦСМ на комплексную деструкцию ЦСС

Для изучения влияния химерной ПМО-ЦСМ на комплексную деструкцию ЦСС мы выбрали один из наиболее эффективных лабораторных препаратов hBGL2, содержащий гетерологичную БГЛ *A. niger*, экспрессированную под контролем промотора гена глюкоамилазы. Использование данной экспрессионной системы, как уже отмечалось выше, позволяет вводить в состав препарата небольшое количество белка, не нарушая при этом базовых характеристик комплекса. Изучение ПМО-ЦСМ мы проводили в сравнении с немутантной формой белка, т.е. ПМО *T. terrestris*, и с ПМО, содержащей собственный ЦСМ, а именно ПМО *T. reesei*. При гидролизе МКЦ в реакционную смесь в качестве источника электронов вносили ЦДГІ в количестве 2,1 мкМ. При деструкции осинового дерева, согласно полученным ранее результатам, внесение донора электронов не требуется. На Рисунке 48 представлены кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ, а также диаграмма выхода сахаров по истечении 48 ч.

Из анализа кинетических кривых видно, что ЦДГІ, как и следовало ожидать, понижает эффективность гидролиза. На отметке в 24 ч добавка ПМО *T. reesei* давала лучшие результаты, однако по истечении 48 ч максимальный выход глюкозы наблюдался уже для смеси hBGL2 с ПМО-ЦСМ. Выход глюкозы составил 68,5 г/л, что почти на 10% выше, чем для немутантной формы белка.

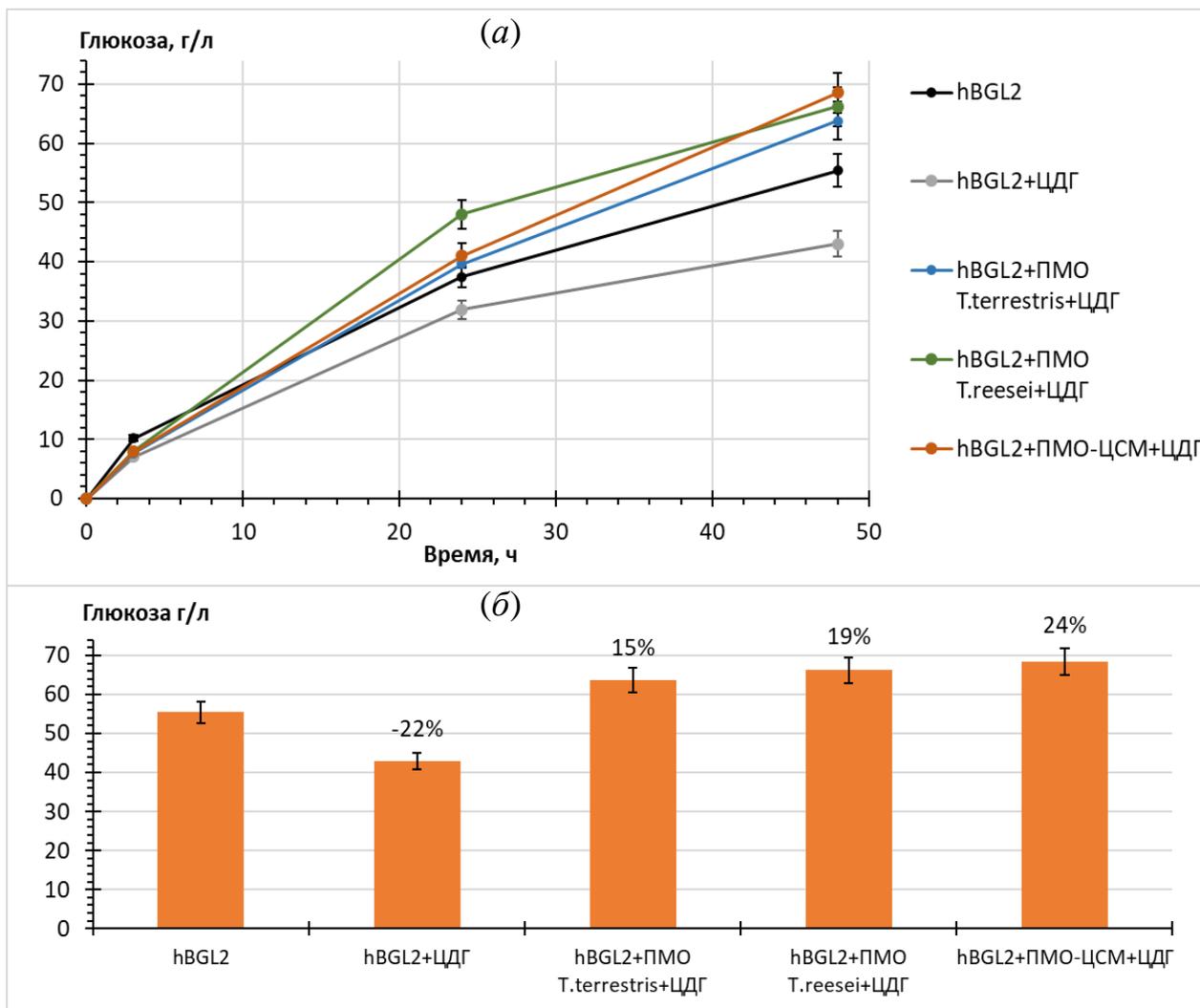


Рисунок 48 - Кинетические кривые накопления глюкозы (а) и выходы продукта (б) через 48 ч при ферментативном гидролизе МКЦ. 50°C, pH 5,0. Концентрация субстрата 100 мг/мл, [hBGL2]=0,5 мг/мл. В опытах с ПМО 10% целлюлазного препарата по белку заменяли очищенной ПМО, [ЦДГ]=2,1 мкМ. Цифры над барами диаграммы означают прирост выхода сахаров относительно hBGL2.

При гидролизе осиновой древесины преимущество химерной ПМО-ЦСМ оказалось еще более значительным, максимальные выходы глюкозы достигали 49,6 г/л, т.е. выход продукта был близок к 100% от теоретического. Однако в случае применения ПМО-ЦСМ данный показатель был достигнут за 24 часа, тогда как в случае ПМО *T. reesei* – за 48 часов. Следует отметить, что на отметке 24 ч выход глюкозы в случае добавки ПМО-ЦСМ были на 47% выше, чем у препарата hBGL2.

Таким образом, увеличение удельной активности и расширение субстратной специфичности ПМО за счет присоединения ЦСМ к ферменту из *T. terrestris* привело к существенному приросту выхода глюкозы при комплексном гидролизе как модельных, так и природных видов ЦСС, содержащих гемицеллюлозы и лигнин.

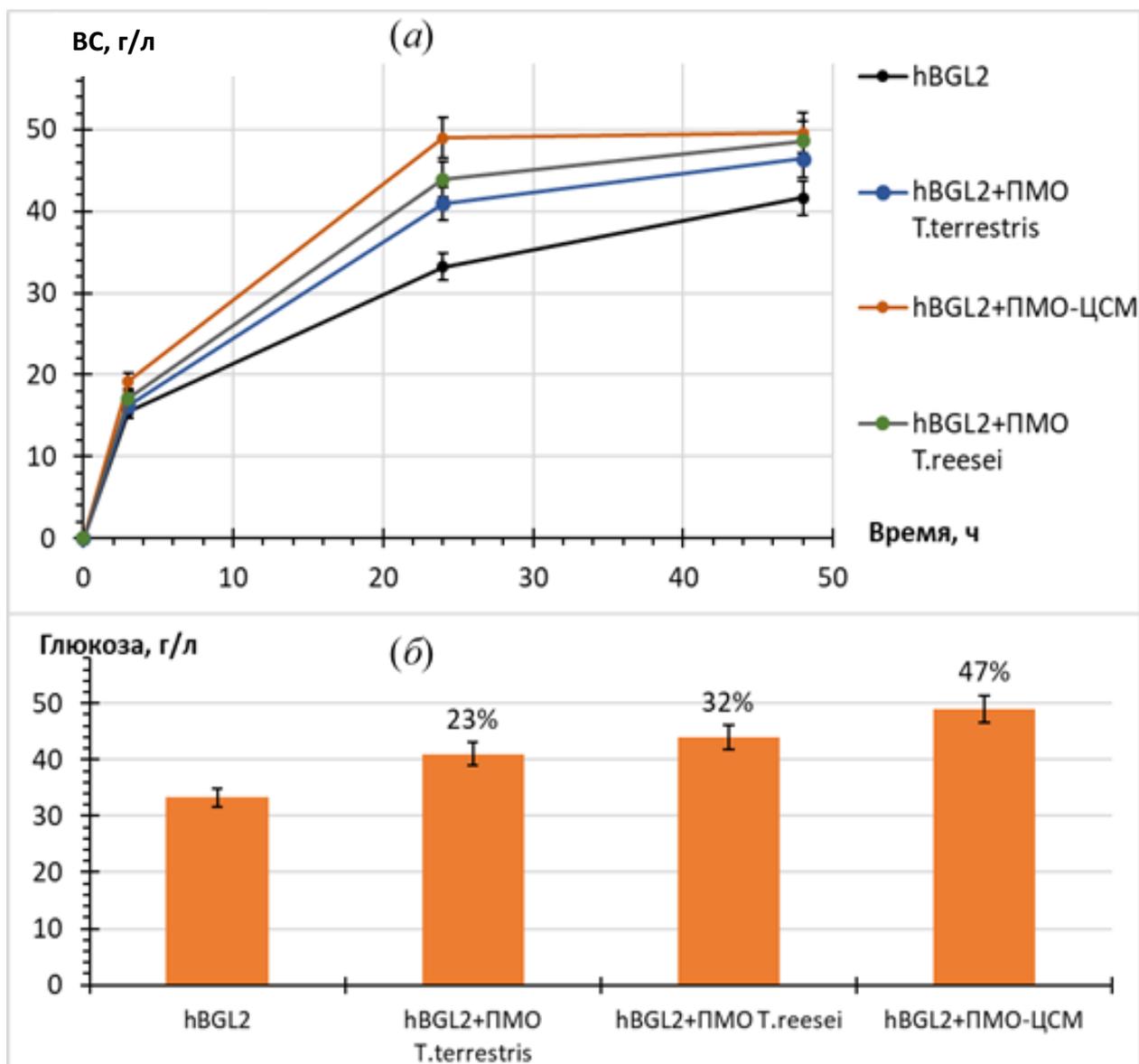


Рисунок 49 - Кинетические кривые накопления глюкозы (а) и выходы продукта (б) через 24 ч при ферментативном гидролизе измельченной осиновой древесины. 50°C, рН 5,0. Концентрация субстрата 80 мг/мл, [hBGL2]=0,5 мг/мл. В опытах с ПМО 10% целлюлазного препарата по белку заменяли очищенной ПМО. Цифры над барами диаграммы означают прирост выхода сахаров относительно hBGL2.

В целом, резюмируя данные, изложенные в этом разделе, можно констатировать, что результате использования методов генетической

инженерии был получен химерный белок, состоящий из ПМО *T. terrestris* и ЦСМ от ЦБГ I *P. verruculosum*. Сравнение свойств исходного рекомбинантного фермента и химерной ПМО-ЦСМ показало наличие у последней ряда интересных и полезных для практического применения приобретенных характеристик. Новый химерный фермент обладал более широкой субстратной специфичностью и повышенной активностью по отношению к целлюлозе. У химерной ПМО-ЦСМ появились активности по отношению к КМЦ и ксилану, а активность по ксилоглюкану возросла на порядок по сравнению с исходной ПМО. Применение химерной ПМО-ЦСМ в качестве добавки к целлюлазному препарату hBGL2 при сохранении общей дозировки ферментов привело к увеличению выхода продуктов при гидролизе МКЦ и измельченной осиновой древесины на 24 и 47%, соответственно, причем при деструкции древесины максимальный выход сахаров был достигнут через 24 ч реакции, в отличие от гидролиза указанным препаратом без добавки ПМО, длящегося 48 ч.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют сделать следующие 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  $\text{Cu}^{2+}$ .
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* В1-537. Использование препарата hLPMO в смеси с высокоэффективным препаратом hBGL2 на основе штамма *P. verruculosum*, осуществляющего экспрессию гетерологичной  $\beta$ -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 С-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 ксилоглюкану (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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Титунова Н.А., Кретович В.Л. Применение целлюлаз. В сб. Целлюлазы миеороорганизмов. Москва. 1981. С. 40-73.
2. Buckeridge M.S., Goldman G.H. Routes to Cellulosic Ethanol. New York: Springer. 2011. 261 p.
3. Gu C., Zhou Y., Liu L., Tan T., Deng L. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net // Bioresource Technology. 2013. V.131. P. 303-307.
4. Евилевич А.З., Ахмина Е.И., Раскин М.Н. Безотходное производство в гидролизной промышленности. Москва. 1982. С. 4-40.
5. Шарков В.И., Куйбина И.И., Соловьева Ю.П. и др. Количественный и химический анализ растительного сырья. Москва. 1976. С. 203.
6. Максимов В.Ф., Вольф И.В., Яковлева О.И. Борьба с загрязнениями окружающей среды в целлюлозно-бумажной промышленности. Москва. 1976. С. 30.
7. Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., et. al. The path forward for biofuels and biomaterials. // Science. 2006. V. 311. P. 484-489.
8. Albersheim P., Jones T.N. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes // Ann. Rev. Phytopathol. 1969. V. 7. P. 171-194.
9. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. Москва: Мир, 1986. С. 387.
10. Stephen A.M. Food polysaccharides and their applications. New York: Marcel Dekker Inc. 1995. 654 p.
11. Роговин З.А. Химия целлюлозы. Москва: Химия, 1972. С. 519.
12. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. Москва: Наука. 2007. С. 21.
13. Othmer K. Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons Inc. 2001. V. 13. 866 p.
14. Клесов А.А. Биотехнология ферментативного превращения целлюлозы. // Итоги науки и техники. Москва: ВИНТИ. 1988 Т. 12. С. 53.

15. Marchal R., Ropars M., Pourquié J., Fayolle F., Vandecasteele J.P. Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 2: Conversion into acetone-butanol. // *Bioresource Technol.* 1992. V. 42. P. 205-217.
16. Cullen D., Kersten P.J. *The Mycota III, Biochemistry and Molecular Biology of Lignin Degradation.* // 2nd ed. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 2004. P. 249-273.
17. McNeil M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P. Structure and function of the primary cell walls of plants // *Annu. Rev. Biochem.* 1984. V. 53. No. 625. P. 625-653.
18. Кальнина В.К., Бейнарт И.И., Ведерников Н.А. Клеточная стенка древесины и ее изменения при химическом воздействии. Рига. ЗИНАТНЕ. 1972. С. 73-105.
19. Ropas M., Marchal R., Porquie J., Wandecasteele P. Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures. // *Bioresource Technol.* 1992. V. 42. P. 197-204.
20. Schultz T.P., Rughani J.R., Meginnis G.D. Comparison of the pretreatment of sweetgum and white oak by steam-explosion and rapid steam hydrolysis-continuous (RASH) processes. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1989. V. 20. P. 9-28.
21. Cherry J.R., Fidantsef A.L. Directed evolution of industrial enzymes: an update // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. V. 14. P. 438-443.
22. Gusakov A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production // *Trends Biotechnol.* 2012. V. 29. P. 419-425.
23. Gusakov A.V. Sinitsyn. A.P. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass // *Biofuels.* 2013. V. 3, No. 4. P. 463-477.
24. Prior B.A., Day D.F. Hydrolysis of ammonia-pretreated sugar cane bagasse with cellulase, beta-glucosidase, and hemicellulase preparations // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008. V. 146. P. 151-164.
25. Clarke A.J. *Biodegradation of cellulose. Enzymology and biotechnology.* Lancaster: Technomic Publishing Company Inc., 1997. 272 p.

26. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизмы действия. // Итоги науки и техники. Серия Биотехнология. Москва: ВИНТИ. 1988. Т. 11. С. 8-149.
27. Schou C., Rasmussen G., Kalltoft M.B., Henrissat B., Schülein M. Stereochemistry, specificity and kinetics of the hydrolysis of reduced cellodextrins by nine cellulases. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 217. P. 947-953.
28. Karlsson J., Siika-aho M., Tenkanen M., Tjerneld F. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. // J. Biotechnol. 2002. V. 99. P. 63-68.
29. Марков А.В. Свойства ферментных комплексов, продуцируемых мутантными штаммами *Trichoderma reesei*. Москва: МГУ. 2003. 201 стр. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук.
30. Claeysens, M., van Tilbeurgh, H., Kamerling, P., Berg, J., Vrsanska, M., Biely, P. Studies of the cellulolytic system of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* QM 9414. Substrate specificity and transfer activity of endoglucanase I. // J. Biochem. 1990. V. 270. P. 251-256.
31. Ladisch M.R., Lin K.W., Voloch M., Tsao G.T. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass // Enzyme Microb. Technol. 1983. V. 5. P. 82-102.
32. Munoz I.G., Ubhayasekera W., Henriksson H., Szabo I., Pettersson G., Johansson G., Mowbray S.L., Ståhlberg J. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 angstrom resolution and homology models of the isozymes // J. Mol. Biol. 2001. V. 314. P. 1097-1111.
33. Wong Y., Fincher G.B., McLachlan G.M. Kinetic properties and substrate specificities of two cellulases from Auxin treated Pea Epicotyls. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 1402-1407.
34. Teeri T.T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. // Trends Biotechnol. 1997. V. 15. P. 160-167.

35. Клесов А.А., Рабинович М.Л., Сеницын А.П., Чурилова И.В., Григораш С.Ю. Ферментативный гидролиз целлюлозы. II. Свойства компонентов целлюлазных комплексов из различных источников // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. С. 1225-1241.
36. Knowles J.K.C., Lehtovaara P., Murray M., Sinnott M.L.. Stereochemical course of the action of the cellobioside hydrolases I and II of *Trichoderma reesei* // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1988. V. 21. P. 1401-1402.
37. Nystrom J.M., Andren R.K., Allen A.L. Enzymatic hydrolysis of cellulosic waste: the status of process technology and economic assessment // AIChE Symp. Ser. 1978. V. 74. P. 82-88.
38. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Salanovich T.N., Bukhtojarov F.E., et al. Purification, cloning and characterisation of two forms of thermostable and highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) produced by the industrial strain of *Chrysosporium lucknowense* // Enzyme and Microbial Technology. 2005. V. 36, No. 1. P. 57-59.
39. Sukumaran R.K., Singhania R.R., Mathew G.M. and Mathew P.A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production // Renewable Energy. 2009. V. 34. P. 421-424.
40. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Сеницын А.П. Выделение и свойства грибных  $\beta$ -глюкозидаз // Биохимия. 2009. Т. 74, No. 5. С. 699-709.
41. Bohlin C., Olsen S.N., Morant M. D., Patkar S., Borch K., Westh P. Comparative study of activity and apparent inhibition of fungal  $\beta$ -glucosidases // Biotechnol. Bioengin. 2010. V. 107, No. 6. P. 943.
42. Сеницын А.П., Митькевич О.В. Различия в кинетических свойствах прочно и слабо адсорбирующихся на целлюлозе целлюлолитических ферментов. // Биотехнология. 1987 Т 3. С. 227-233.
43. Сеницын А.П., Наджеми Б., Клесов А.А. Ферментативное получение глюкозы из целлюлозы: влияние ингибирования продуктами и изменение

- реакционной способности субстрата на скорость ферментативного гидролиза  
// Прикл. биохим. микробиол. 1987. Т. 17. С. 315-321.
44. Kumar G.S., Murthy D. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production // *Biotechnol. for Biofuels*. 2013 V. 6. P. 63.
45. Zifcalkova L, Baldrian P. Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose // *Fungal Ecology*. 2012. No. 5. P. 481-489.
46. Cragg S.M, Beckham G.T., Bruce N.C., et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life // *Current Opinion in Chemical Biology*. 2015. V. 29. P. 108-119.
47. Horn S. J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G.H. Novel enzymes for the degradation of cellulose // *Biotechnol. Biofuels*. 2012. V. 5. P. 45.
48. Arantes V., Saddler J.N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. // *Biotechnol. Biofuels*. 2011. V. 4. P. 3.
49. Chundawat S.P.S., Bellesia G., Uppugundla N., et al. Restructuring the crystalline cellulose hydrogen bond network enhances its depolymerization rate. // *Journal of American Chemical Society*. 2011. V. 133. P. 11163-11174.
50. Saloheimo M., Paloheimo M., Hakola S., Pere J., Swanson B., Nyysönen E., Bhatia A., Ward M., Penttilä M. Swollenin a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials // *European Journal of Biochemistry*. 2002. V. 269. P. 4202-4211.
51. Gourlay K., Hu J., Arantes V., Andberg M., Saloheimo M., Penttilä M., Saddler J. Aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass // *Bioresource Technology*. 2013. V. 142. P. 498-503.
52. Рабинович М.Л., Клесов А.А., Черноглазов В.М., Вьет В.Н., Березин И.В. Эффективность адсорбции целлюлолитических ферментов – фактор, определяющий реакционную способность нерастворимой (кристаллической) целлюлозы. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 260. С. 1481-1486.

53. Клесов А.А., Черноглазов В.М., Рабинович М.Л., Сеницын А.П. Роль адсорбционной способности эндоглюканазы в деградации кристаллической и аморфной целлюлозы // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. С. 643-651.
54. Raguz S., Yagüe E., Wood D.A., Thurston C.F. Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus* // Gene. 1992. V. 1. P. 183-190.
55. Armesilla A.L., Thurston CF, Yagüe E. CEL1: a novel cellulose binding protein secreted by *Agaricus bisporus* during growth on crystalline cellulose // FEMS Microbiol Lett. 1994. V. 3, No. 116. P. 293-299.
56. Yagüe E., Wood D.A., Thurston C.F. Regulation of transcription of the cell gene in *Agaricus bisporus* // Mol. Microbiol. 1994. V. 1, No. 12. P. 41-47.
57. Dotson W., Greenier J., Ding H. Polypeptides having cellulolytic enhancing activity and polynucleotides encoding same. // US20060005279 A1, Jan. 5, 2006.
58. Karkehabadi S., Hansson H., Kim S., Piens K., Mitchinson C., Sandgren M. The First Structure of a Glycoside Hydrolase Family 61 Member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å Resolution // J. Mol. Biol. 2008. V. 383, No. 1. P. 144-154.
59. Langston J.A., Shaghasi T., Abbate E., Xu F., Vlasenko E., Sweeney M.D. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61 // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77, No. 19. P. 7007-7015.
60. Quinlan R.J., Sweeney M.D., Leggio L.L., Otten H., et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components // Proc. Nat. Ac. of Sci. USA. 2011. V. 13, No. 87. P. 15079-15084.
61. Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S.J., Liu Z., Zhai H., Sørlie M., Eijsink V.G. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides // Science. 2010. V. 330, No. 6001. P. 219-222.
62. Carbohydrate active enzymes: [сайт]. URL: <http://www.cazy.org/AA9.html>.

63. Levasseur A., Drula E., Lombard V., Coutinho P.M., Henrissat B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes // *Biotechnol. Biofuels*. 2013. V. 6, No. 41.
64. Vaaje-Kolstad G., Horn S.J., van Aalten D.M., Synstad B., Eijsink V.G. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280, No. 31. P. 28492-28497.
65. Hemsworth G.R., Henrissat B., Davies G.J., Walton P.H. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases // *Nat. Chem. Biol.* 2014. V. 10, No. 2. P. 122-126.
66. Vu V.V., Beeson W.T., Spana E.A., Farquhar E.R., Marletta M.A. A family of starch-active polysaccharide monooxygenases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111, No. 38. P. 13822-13827.
67. Harris P.V., Welner D., McFarland K.C., Re E., et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family // *Biochemistry*. 2010. No. 49. P. 3305-3316.
68. Hemsworth G.R., Davies G.J., Walton P.H. Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases // *Current Opinion in Structural Biology*. 2013. V. 23. P. 660-668.
69. Leggio L., Welner D., Maria L.D. A structural overview of GH61 proteins – fungal cellulose degrading polysaccharide monooxygenases // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2012. V. 2. e201209019
70. Isaksen T., Westereng B., Aachmann F.L., Agger J.W., Kracher D., Kittl R., et al. C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides // *The J. Biol. Chem.* 2014. V. 289, No. 5. P. 2632–2642.
71. Davies G., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // *Structure*. 1995. V. 3. P. 853-859.
72. Asensio J.L., Arda A., Canada F.J., Jimenez-Barbero J. Carbohydrate–aromatic interactions // *Acc. Chem. Res.* 2013. Vol. 46. P. 946-954.

73. Li X., Beeson W.T., Phillips C.M., Marletta M.A., Cate Jamie H.D. Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases // *Structure*. 2012. V. 20. P. 1051-1061.
74. Vaaje-Kolstad G., Bøhle L.A., Gaseidnes S., Dalhus B., Bjørås M., Mathiesen G., Eijsink V.G.H. Characterization of the chitinolytic machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and high-resolution structure of its oxidative CBM33 enzyme // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 416. P. 239-254.
75. Vaaje-Kolstad G., Houston D.R., Riemen A.H.K., Eijsink V.G.H, van Aalten D.M.F. Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21 // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 11313-11319.
76. Martinez D., Challacombe J., Morgenstern I., Hibbett D., et al. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 1954-1959.
77. Fernandez-Fueyo E., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Floudas D., et al. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. P. 5458-5463.
78. Medie F.M., Davies G.J., Drancourt M., Henrissat B. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2012. V. 10. P. 227-234.
79. Harris P.V., Ditte W., McFarland K.C., Re E., Navarro J.C., et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and Function of // *Biochemistry*. 2010. V. 49. P. 3305–3316.
80. Quinlan R.J., Sweeney M.D., Lo Leggio L., Otten H., Poulsen J-C.N., et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011. V. 108. P. 15079-15084.
81. Westereng B., Ishida T., Vaaje-Kolstad G., Wu M., Eijsink V.G., Igarashi K., Samejima M., Stahlberg J., Horn S.J., Sandgren M. The putative endoglucanase

- PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose // PLoS ONE. 2011. No. 6. e27807.
82. Wu M., Beckham G.T., Larsson A.M., Ishida T., Kim S., et al. Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monooxygenase GH61D from the basidiomycota fungus *Phanerochaete chrysosporium* // J. Biol. Chem. 2013. No. 288. P. 12828-12839.
83. Hemsworth G.R., Taylor E.J., Kim R.Q., Gregory R.C., Lewis S.J., et al. The copper active site of CBM33 polysaccharide oxygenases // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. P. 6069-6077.
84. Phillips M.C., Beeson W.T., Cate J.H.D., Marletta M.A. Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. // ACS Chem. Biol. 2011. V. 6. P. 1399-1406.
85. Frommhagen M., Mutte S.K., Westphal A. Boosting LPMO driven lignocellulose degradation by polyphenol oxidase activated lignin building blocks // Biotechnol Biofuels. 2017. V. 10, No. 121. P. 1-16.
86. Kracher D., Scheiblbrandner S., Felice A.K.G, Breslmayr E. Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation oxidative degradation // Science. 2016. V. 352. P. 1098-1101.
87. Bissaro B., Røhr Å.K., Müller G., Chylenski P., Skaugen M., Forsberg Z., Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Eijsink V.G.H. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> // Nature Chem. Biol. 2017. V. 13. P. 1123–1128.
88. Westereng B., Agger J.W., Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Aachmann F.L., Stenstrøm Y.H., Eijsink V.G.H. Efficient separation of oxidized cello-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide monooxygenases // J. of Chromatography A. 2013. No. 1271P. 144-152.
89. Frandsen K.E.H., Simmons T.J., Dupree P., Poulsen J.C.N., Hemsworth G.R., et al. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases // Nature Chem. Biol. 2016. V. 12, № 4. P. 298-303.

90. Bey M., Zhou S., Poidevin L., Henrissat B., Coutinho P.M., Berrin J-G., Sigoillota J-C. Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (Family GH61) from *Podosporeaanserina* // Appl. Env. Microbiol. 2013. V. 79. P. 488-496.
91. Westereng B., Arntzena M.Ø., Aachmann F.L., Várnaia A., Eijsink V.G.H., Agger J.W. Simultaneous analysis of C1 and C4 oxidized oligosaccharides, the products of lytic polysaccharide monooxygenases acting on cellulose // Journal of Chromatography A. 2016. V. 1445. P. 46-54.
92. Borisova A.S., Isaksen T., Dimarogona M., Kognole A.A, et al. Structural and functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase with broad substrate specificity // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. P. 22955-22969.
93. Loose J.S.M., Forsberg Z., Fraaije M.W., Eijsink V.G.H., Vaaje-Kolstad G. A rapid quantitative activity assay shows that the *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA is an active lytic polysaccharide monooxygenase // FEBS Lett. 2014. V. 588.P. 3455-3440.
94. Agger J.W., Isaksen T., Várnai A., Vidal-Melgosa S., Willats W.G.T., et al. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation // Proc. Natl. Acad. Sci. 2014. V. 111, No. 17. P. 6287–6292.
95. Hori C., Igarashi K., Katayama A., Samejima M. Effects of xylan and starch on secretome of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on cellulose // FEMS Microbiol. Lett. 2011. V. 321. P. 14-23.
96. Ray A., Saykhedkar S., Ayoubi-Canaan P., Hartson S.D., Prade R., Mor A.J. *Phanerochaete chrysosporium* produces a diverse array of extracellular enzymes when grown on sorghum // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 93, No. 5. P. 2075-2089.
97. Frommhagen M., Sforza S., Westphal A.H, Visser J., Hinz S.W.A., et al. Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase // Biotechnol. Biofuels. 2015. V. 8, No. 101. P. 2-12.

98. Courtade G., Wimmer R., Røhr Å.K., Preims M., Felice A.K.G., et al. Interactions of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase with  $\beta$ -glucan substrates and cellobiose dehydrogenase // Proc. Natl. Acad. Sci. 2016. V. 113, No. 21. P. 5922–5927.
99. Ghatge S.S., Telke A.A., Waghmode T.R., Lee Y., et al. Multifunctional cellulolytic auxiliary activity protein HcAA10-2 from *Hahella chejuensis* enhances enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 3041–3055.
100. Patel I, Kracher D., Ma S., Garajova S., Haon M., Faulds C.B., Berrin J-G., Ludwig R., Record E. Salt responsive lytic polysaccharide monooxygenases from the mangrove fungus *Pestalotiopsis sp.* NCi6 // Biotechnology for Biofuels. 2016. V. 9. P. 108-120.
101. Frommhagen M., Koetsier M.J., Westphal A.H., Visser J., Sandra W., Hinz A., Vincken J.P., van Berkel W.J.H., Kabel M.A., Gruppen H. Lytic polysaccharide monooxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity // Biotechnol. Biofuels. 2016. V. 9, No. 186. P. 1-17.
102. Wilmot C.M. Polysaccharide monooxygenases: giving a boost to biofuel production // Structure. 2012. V. 20. P. 938-940.
103. Kim I.J., Nam K.H., Yun E.J., Kim S., Youn H.J. Optimization of synergism of a recombinant auxiliary activity 9 from *Chaetomium globosum* with cellulase in cellulose hydrolysis // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 8537-8547.
104. Chekushina A.V., Dotsemko G.S., Kondra'eva E.G., Sinitsyn A.P. Component composition of commercial enzyme preparations intended for bioconversion of plant raw material obtained using fungi of the genus *Trichoderma* // Biotekhnologiya. 2013. V. 3. P. 58-68.
105. Busk P.K., Lange L. Classification of fungal and bacterial lytic polysaccharide monooxygenases // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 368-381.

106. Busk P.K., Lange M., Pilgaard B., Lange L. Several genes encoding enzymes with the same activity are necessary for aerobic fungal degradation of cellulose in nature // PLoS ONE. 2014. V. 9, No. 12. e114138
107. Gardner J.G., Crouch L., Labourel A., Forsberg Z., Bukhman Y.V., Vaaje-Kolstad G., Gilbert H.J., Keating D.H. Systems biology defines the biological significance of redox-active proteins during cellulose degradation in an aerobic bacterium // Molecular Microbiology. 2014. V. 94, No. 5. P. 1121-1133.
108. Eibinger M., Ganner T., Bubner P., Rosker S., et al. Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. No. 52. P. 35929–35938.
109. Müller G., Várnai A., Johansen K.S., Eijsink V.G.H, Horn S.J. Harnessing the potential of LPMO containing cellulase cocktails poses new demands on processing conditions // Biotechnol. Biofuels. 2015. V. 8, No. 187. P. 1-9.
110. Ximenes E., Kim Y., Mosier N., Dien B., Ladisch M. Deactivation of cellulases by phenols. // Enzyme. Microb. Technol. 2011. V. 48. P. 54-60.
111. Michelin M., Ximenes E., Polizeli M.L.T.M., Ladisch M.R. Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities // Bioresource Technology. 2016. V. 199. P. 275–278.
112. Kim Y., Ximenes E., Mosier N.S., Ladisch M.R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass // Enzyme and Microbial Technology. 2011. V. 48. P. 408-415.
113. Tanghe M., Danneels B., Camattari A., Glieder A., Vandenberghe I., Devreese B., Stals I., Desmet T. Recombinant expression of *Trichoderma reesei* Cel61A in *Pichia pastoris*: optimizing yield and n-terminal processing // Mol. Biotechnol., 2015. V. 57. P. 1010-1017.
114. Forsberg Z., Mackenzie A., Sørli M., Røhr A.K., et. al. Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2014. V. 111. P. 8446–8451.

115. Arfi Y., Shamshoum M., Rogachev I., Peleg Y., Bayer E.A. Integration of bacterial lytic polysaccharide monoxygenases into designer cellulosomes promotes enhanced cellulose degradation. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111P. 9109–9114.
116. Crouch L., Labourel A., Walton, P., Davies J.G., Gilbert J.H. The contribution of non-catalytic carbohydrate binding modules to the activity of lytic polysaccharide monoxygenases // J. Biol. Chem. V. 294. 2016. P. 7439-7449.
117. Синицын А.П., Рожкова А.М., Синицына О.А. Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*, используемого в качестве хозяина, способ получения штамма гриба *Penicillium verruculosum*, 2008107784/13, 03 Март 2008.
118. Wood T.M. Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulose substrates // Methods in Enzymology. 1988. V. 160. P. 19-25.
119. Aslanidis C., de Jong P.J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). // Nucleic Acids Research. 1990. V. 18. P. 6069–6074.
120. Sambrook J., Russell D. Molecular cloning, a laboratory manual // Cold Spring Harbor Laboratory. 2001.
121. Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. N-Linked glycosylation of recombinant cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium verruculosum* and its effect on the enzyme activity // Biotechnol. Bioengin. 2016. V. 11. P. 283-291
122. Sanger F., Nicklen S., Chase A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
123. Мерзлов Д.А., Зоров И.Н., Доценко Г.С., Денисенко Ю.А., Рожкова А.М., Сатрутдинов А.Д., Рубцова Е.А., Кондратьева Е.Г, Синицын А.П. Свойства ферментных препаратов и гомогенных ферментов эндоглюканазы EG2 *Penicillium verruculosum* и эндоглюканазы LAM *Myceliophthora thermophila* // Биохимия. 2015. Т. 80, № 4. С. 556-567.

124. Aleksenko A., Makarova N., Nikolaev .I, Clutterbuck A. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene // Current Genetics. 1995. V. 28. P. 474-478.
125. James P.E. Proteome research: Mass Spectrometry. Berlin: Springer-Verlag. 2001. 274 p.
126. Forsberg Z., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Bunæs A.C., et al. Cleavage of cellulose by a CBM33 protein // Protein science. 2011. V. 20. P. 1479—1483.
127. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1952. V. 193. P. 265-275.
128. O'neill M.J., Watson E.S. Differential microcalorimeter, US3263484 A, April 4, 1962.
129. Privalov P.L., Potekhin S.A. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins // Methods Enzymol. V. 131. 1986. P. 4-5.
130. Medve J., Ståhlberg J., Tjerneld F. Adsorption and synergism of cellobiohydrolase I and II of *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. // Biotechnol. Bioengin. 1994. V. 44, No. 9. P. 1064-1073.
131. Rashid M.H., Siddiqui K.S. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Aspergillus niger* // Folia Microbiol. 1997. V. 42, No. 6. P. 544-550.
132. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Москва. ВИНТИ. 1988. Т. 25.С. 30-37.
133. Морозова В.В. Свойства целлюлолитических ферментов *Penicillium verruculosum* и их применение для осахаривания лигноцеллюлозного сырья // Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. Москва: МГУ. 2009.
134. Ludwig R., Salamon A., Varga J., Zamocky M., Peterbauer C.K., Kulbe K.D., Haltrich D. Characterisation of cellobiose dehydrogenases from the white-rot fungi

- Trametes pubescens* and *Trametes villosa* // Appl. Microbiol. Biotech. 2004. V. 64. P. 213-222.
135. Rappsilber J., Moniatte M., Nielsen M.L., Podtelejnikov A.V., Mann M. Experiences and perspectives of MALDI MS and MS/MS in proteomic research // Int. J. Mass Spectrometry. 2003. V. 226. P. 223-237.
136. Hemsworth, G. R., Davies, G. J., Walton, P. H. Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases // Curr. Opin. Struct. Biol. 2013. V. 23. P. 660-668.
137. Agger J.W., Isaksen T., Várnai A., Vidal-Melgosa S., Willats W.G.T., Ludwig R., Horn S.J., et al. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2014. V. 111. P. 6287-6292.
138. Frommhagen, M., Westphal, A.H., Hilgers, R. et al. Quantification of the catalytic performance of C1-cellulose-specific lytic polysaccharide monooxygenases // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 102, No 3. P. 1281-1295.
139. Chekushina A.V., Dotsenko G.S., Sinitsyn A.P. Comparing the efficiency of plant material bioconversion processes using biocatalysis based on *Trichoderma* and *Penicillium verruculosum* enzyme preparations // Catalysis in Industry. 2013. V. 5, No. 1. P. 98-104.
140. Cannella D., Möllers K.B., Frigaard N.-U., Jensen P.E., Bjerrum M.J., Johansen K.S., Felby C. Light-driven oxidation of polysaccharides by photosynthetic pigments and a metalloenzyme // Nature Communications. 2016. V. 7, No. 11134.
141. Eibinger M., Sattelkow J., Ganner T., Plank H., Nidetzky B. Single-molecule study of oxidative enzymatic deconstruction of cellulose // Nature Communications. 2017. V. 8, No. 894.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

При проведении исследований использовался анализатор Seahorse xFp, любезно предоставленный компанией Биохиммак. Также хочу поблагодарить сотрудника компании, кандидата биологических наук Демина Илью Сергеевича за консультации по работе на приборе.

Кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику лаборатории Структурной биохимии белка Клеймёнову Сергею Юрьевичу за проведение исследований по термоинаktivации изучаемых ферментов методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии.