

На правах рукописи



Доценко Анна Сергеевна

**Белковая инженерия сайтов N-гликозилирования
целлюлаз мицелиального гриба *Penicillium verruculosum***

03.01.06 — Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., проф. Сеницын А.П.

Москва - 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Растительная биомасса.....	10
1.2. Компонентный состав растительного сырья	11
1.3. Биотехнологическая переработка растительного сырья.....	14
1.3.1. Глубокая переработка растительного сырья	15
1.3.2. Ферментативный гидролиз растительного сырья	18
1.3.2.1. Ферменты целлюлолитического комплекса	19
1.3.2.2. Методы оптимизации процесса ферментативного гидролиза	21
1.4. Белковая инженерия целлюлаз.....	24
1.4.1. Основные направления белковой инженерии целлюлаз	25
1.4.2. Инженерия сайтов гликозилирования целлюлаз.....	27
1.4.2.1. Гликозилирование и его роль в структуре и функции целлюлаз	28
1.4.2.2. Инженерия сайтов N-гликозилирования целлюлаз	30
1.5. Целлюлолитический комплекс <i>Penicillium verruculosum</i>	31
1.5.1. Мицелиальный гриб <i>Penicillium verruculosum</i>	31
1.5.2. Целлюлазы <i>Penicillium verruculosum</i>	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1. Материалы.....	34
2.1.1. Микроорганизмы	34
2.1.2. Ферментные препараты	34
2.1.3. Субстраты.....	34
2.1.4. Реактивы.....	35
2.2. Методы	35
2.2.1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей	35
2.2.2. Моделирование трехмерных структур	36
2.2.3. Генная инженерия и микробиология.....	36
2.2.3.1. Амплификация и клонирование целевых генов	36
2.2.3.2. Трансформация штамма-реципиента <i>Penicillium canescens</i>	36
2.2.3.3. Культивирование грибных штаммов.....	37
2.2.3.4. Исследование внутриклеточной экспрессии	37
2.2.4. Выделение и очистка ферментов хроматографическими методами	38
2.2.5. Определение концентрации белка	38

2.2.6. Определение активности ферментов.....	38
2.2.7. Определение биохимических свойств ферментов	39
2.2.8. Определение гидролитической способности ферментов	40
2.2.9. Масс-спектрометрический анализ	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	42
3.1. Общая схема проведения экспериментов	42
3.2. Белковая инженерия эндоглюканазы II <i>Penicillium verruculosum</i>	45
3.2.1. Анализ аминокислотной последовательности ЭГII <i>Penicillium verruculosum</i>	45
3.2.2. Внесение мутаций в ген и получение плазмид.....	48
3.2.3. Получение грибных штаммов, продуцирующих мутантные формы ЭГII	48
3.2.4. Выделение и очистка ЭГII хроматографическими методами.....	53
3.2.5. Масс-спектрометрический анализ ЭГII	57
3.2.6. Анализ биохимических и каталитических свойств ЭГII.....	59
3.3. Белковая инженерия целлобиогидролазы II <i>Penicillium verruculosum</i>	70
3.3.1. Анализ аминокислотной последовательности ЦБГII <i>Penicillium verruculosum</i> ...	70
3.3.2. Внесение мутаций в ген и получение плазмид.....	73
3.3.3. Получение грибных штаммов, продуцирующих мутантные формы ЦБГII.....	74
3.3.4. Выделение и очистка ЦБГII хроматографическими методами	79
3.3.5. Масс-спектрометрический анализ ЦБГII.....	83
3.3.6. Анализ биохимических и каталитических свойств ЦБГII	84
3.4. Белковая инженерия целлобиогидролазы I <i>Penicillium verruculosum</i>	94
3.4.1. Анализ аминокислотной последовательности ЦБГI <i>Penicillium verruculosum</i>	94
3.4.2. Внесение мутаций в ген и получение плазмид.....	97
3.4.3. Получение грибных штаммов, продуцирующих мутантные формы ЦБГI	98
3.4.4. Выделение и очистка ЦБГI хроматографическими методами.....	102
3.4.5. Масс-спектрометрический анализ ЦБГI	107
3.4.6. Анализ биохимических и каталитических свойств ЦБГI.....	109
3.4.7. Исследование внутриклеточной экспрессии ЦБГI	116
3.5. Гидролиз ЦСМ под действием смесей целлюлаз <i>Penicillium verruculosum</i>	120
3.5.1. Выбор условий проведения гидролиза.....	120
3.5.2. Гидролиз ЦСМ под действием смесей ЭГII, ЦБГII и ЦБГI <i>Penicillium verruculosum</i>	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	144
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	157

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.к.	аминокислота
ВС	восстанавливающие сахара
ДДС-ЭФ	электрофорез в денатурирующих условиях
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЭФ	изоэлектрофокусирование
КЖ	культуральная жидкость
КМЦ	карбоксиметилцеллюлоза
КФ	классификация ферментов (код фермента)
МКЦ	микрочеточная целлюлоза
ПМО	полисахаридмонооксигеназы
<i>n</i> -НФ-β-Гал	<i>n</i> -нитрофенил-β-D-галактопиранозид
<i>n</i> -НФ-β-Глюк	<i>n</i> -нитрофенил-β-D-глюкопиранозид
<i>n</i> -НФ-β-Лак	<i>n</i> -нитрофенил-β-D-лактозид
<i>n</i> -НФ-β-Целл	<i>n</i> -нитрофенил-β-D-целлобиозид
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЭГ	полиэтиленгликоли
СП	степень полимеризации
ФП	ферментный препарат
ЦБГ	целлобиогидролаза
ЦСМ	целлюлозосодержащие материалы
ЭГ	эндоглюканаза
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота

Список сокращений названий ферментов

нативн. ЦБГ I	Немутантные нативные формы целлобиогидролазы I, целлобиогидролазы II и эндоглюканазы II <i>Penicillium verruculosum</i> , экспрессированные в <i>Penicillium verruculosum</i>
нативн. ЦБГ II	
нативн. ЭГ II	
рекомб. ЦБГ I	Немутантные рекомбинантные формы целлобиогидролазы I, целлобиогидролазы II и эндоглюканазы II <i>Penicillium verruculosum</i> , экспрессированные в <i>Penicillium canescens</i>
рекомб. ЦБГ II	
рекомб. ЭГ II	
рекомб. ЦБГ I X	Мутантные рекомбинантные формы целлобиогидролазы I, целлобиогидролазы II и эндоглюканазы II <i>Penicillium verruculosum</i> , экспрессированные в <i>Penicillium canescens</i> , X – аминокислотная замена
рекомб. ЦБГ II X	
рекомб. ЭГ II X	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Растительная биомасса является основным видом органической материи на Земле. Так же, как ископаемые энергоносители (нефть, уголь, природный газ), растительная биомасса может быть одним из основных источников энергии.

По сравнению с использованием ископаемых энергоносителей биотехнологическая переработка растительной биомассы для получения энергии характеризуется рядом преимуществ. Во-первых, запасы растительной биомассы значительно превосходят запасы ископаемых энергоносителей, кроме того, биомасса является возобновляемым ресурсом. Во-вторых, переработка растительной биомассы не вызывает загрязнение окружающей среды и изменение климата. В-третьих, биотехнологическая переработка растительного сырья позволяет получать не только топливо, но и разнообразные химические соединения, традиционно получаемые из нефти в результате химического синтеза.

Ключевой стадией биотехнологической переработки растительного сырья является гидролиз его полисахаридных компонентов до олиго- и моносахаридов. Наиболее эффективным способом гидролиза является гидролиз под действием целлюлолитических ферментов. Для осуществления эффективного гидролиза необходимо применение высокоактивных, стабильных и при этом коммерчески доступных ферментных препаратов (ФП).

В настоящее время для получения ФП с требуемыми свойствами применяются различные генно-инженерные подходы. Одним из таких подходов является осуществление белковой инженерии целлюлаз, в частности, белковая инженерия сайтов N-гликозилирования, что позволяет изменять каталитические и биохимические свойства целлюлаз. Тем не менее, до настоящего времени роль N-гликозилирования в структуре и функции целлюлаз остается малоизученной и не вполне понятной.

Цели исследования

Целью исследования было изучение влияния N-гликозилирования на каталитические и биохимические свойства рекомбинантных форм целлюлаз – целлобиогидролазы I (ЦБГИ), целлобиогидролазы II (ЦБГИI) и эндоглюканазы II (ЭГИI) из высокоактивного промышленного продуцента целлюлолитических ферментов *Penicillium verruculosum*, экспрессированных в *Penicillium canescens*.

Задачи исследования

- 1) Выявить сайты N-гликозилирования в целлюлазах ЦБГ1, ЦБГ2 и ЭГП *P.verruculosum* и определить тип и структуру N-связанных гликанов в ЦБГ1, ЦБГ2 и ЭГП *P.verruculosum*, экспрессированных в грибах рода *Penicillium* (*P.verruculosum* и *P.canescens*).
- 2) Методом сайт-направленного мутагенеза осуществить замены остатков аспарагина в составе сайтов N-гликозилирования на остатки аланина для удаления сайтов гликозилирования в рекомбинантных ЦБГ1, ЦБГ2 и ЭГП *P.verruculosum*, экспрессированных в *P.canescens*.
- 3) Исследовать влияние N-связанных гликанов на каталитические и биохимические свойства рекомбинантных целлюлаз ЦБГ1, ЦБГ2 и ЭГП *P.verruculosum*.
- 4) Сравнить гидролитическую способность смесей ЦБГ1, ЦБГ2 и ЭГП *P.verruculosum* различного состава и определить состав смеси, наиболее эффективной для гидролиза целлюлозосодержащих материалов (ЦСМ).

Методы исследования

При выполнении работы были использованы следующие методы: множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, пространственное моделирование белков и гликопротеинов, сайт-направленный мутагенез, культивирование и селекция микроорганизмов, анионообменная и гидрофобная хроматография, электрофорез в денатурирующих условиях, изоэлектрическое фокусирование, метод Шомоди-Нельсона, глюкозооксидазно-пероксидазный метод, метод Лоури, MALDI-TOF масс-спектрометрия.

Научная новизна

Впервые определены тип и структура N-связанных гликанов ЦБГ1, ЦБГ2 и ЭГП, экспрессированных в грибах рода *Penicillium* (*P.verruculosum* и *P.canescens*).

Впервые осуществлена белковая инженерия сайтов N-гликозилирования в рекомбинантных ЦБГ1, ЦБГ2 и ЭГП *P.verruculosum*, экспрессированных в *P.canescens*, определены каталитические и биохимические свойства мутантных форм ЦБГ1, ЦБГ2 и ЭГП с измененными сайтами N-гликозилирования (точечными заменами остатков аспарагина в составе сайтов гликозилирования на остатки аланина).

Показано, что изменение степени N-гликозилирования рекомбинантных целлюлаз *P.verruculosum* в результате удаления одного из сайтов N-гликозилирования не приводит к изменению термостабильности и значений температурных оптимумов каталитической активности. Влияние степени N-гликозилирования на значение pH-оптимума активности различно для целлюлозгидролаз (ЦБГ1 и ЦБГ2) и ЭГП. В случае ЦБГ1 и ЦБГ2 удаление одного из сайтов N-гликозилирования не приводило к изменению pH-оптимума

активности, однако в случае ЭГП изменение степени N-гликозилирования приводило к сдвигу рН-оптимума активности на 0,5 ед. в нейтральную область рН.

Показано, что в случае ЦБГП и ЦБГП N-связанные гликаны принимают участие в реализации процессивного механизма гидролиза. Удаление N-связанных гликанов, расположенных у входа в активный центр ферментов, позволяет увеличить их каталитическую активность, а удаление N-связанных гликанов, расположенных вдоль активного центра ферментов (т.е. между молекулой фермента и поверхностью ЦСМ), – приводит к уменьшению их каталитической активности.

В случае ЭГП удаление N-связанных гликанов, расположенных как у входа, так и у выхода из активного центра, позволяет увеличить каталитическую активность фермента.

Исследован синергизм между мутантными и немутантными формами ЦБГП, ЦБГП и ЭГП при их действии на ЦСМ. Изменение степени N-гликозилирования ЦБГП, ЦБГП и ЭГП *P.verruculosum* в результате удаления одного из сайтов N-гликозилирования не оказывает значительного влияния на степень синергизма. Использование смесей мутантных форм ферментов, характеризовавшихся увеличенной активностью, позволяет увеличить эффективность гидролиза под действием двойных и тройных смесей этих ферментов.

Практическая значимость

Получены мутантные формы рекомбинантных ЦБГП, ЦБГП и ЭГП *P.verruculosum* с увеличенной гидролитической способностью. Определен компонентный состав смесей ЦБГП, ЦБГП и ЭГП, обладающих наибольшей гидролитической способностью по отношению к ЦСМ. Полученные результаты имеют большое значение для разработки нового поколения мутантных штаммов – продуцентов высокоактивных целлюлаз на основе грибов рода *Penicillium*.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Все исследования проведены в соответствии с разработанными и опубликованными в научных изданиях методиками. Поиск гомологичных последовательностей и множественное выравнивание осуществлялся с использованием автоматизированных сервисов <http://www.uniprot.org/blast/> и <http://www.clustal.org/clustal2/>. Моделирование трехмерных структур белковых глобул осуществлялось с использованием программы SWISS-MODEL Швейцарского института биоинформатики, доступной с сервера ExPASy <http://swissmodel.expasy.org/>. Моделирование гликозилированных форм ферментов осуществлялось на базе полученных моделей белковых глобул и структур олигосахаридов с использованием программы Swiss-PdbViewer 4.1.0., доступной с сервера

ExPASy <http://www.expasy.org/resources>. Результаты исследований обработаны с использованием компьютерных программ Origin Pro 8, Bruker Daltonics FlexAnalysis 3.3, а также автоматизированных сервисов FindPept и GlycoMod tools (<http://www.expasy.org/tools/#proteome>). Расчёты проведены корректно.

Положения диссертации, выносимые на защиту

- 1) Определены тип и структура N-связанных гликанов целлюлаз, экспрессированных в грибах рода *Penicillium* (*P.verruculosum* и *P.canescens*). Показано, что N-связанные гликаны в целлюлазах (ЭГП, ЦБГІ, ЦБГІІ), экспрессированных в грибах рода *Penicillium* (*P.verruculosum* и *P.canescens*), представляют собой высокоманнозные олигосахариды, а также продукты их ферментативного «тримминга», согласно общей формуле $(\text{Man})_{0-14}(\text{GlcNAc})_2$.
- 2) Методом сайт-направленного мутагенеза осуществлены замены остатков аспарагина в составе сайтов N-гликозилирования на остатки аланина, получены мутантные формы ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП *P.verruculosum* с измененными сайтами N-гликозилирования.
- 3) Удаление одного из сайтов N-гликозилирования не оказывало значительного влияния на такие свойства ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП *P.verruculosum*, как термостабильность, температурный и рН-оптимумы, однако приводило к изменению удельной активности, а также выхода сахаров при гидролизе ЦСМ.
- 4) В случае ЦБГІ и ЦБГІІ *P.verruculosum* удаление N-связанных гликанов, расположенных у входа в активный центр ферментов, позволяет увеличить их каталитическую активность, а удаление N-связанных гликанов, расположенных вдоль активного центра ферментов – приводит к уменьшению их каталитической активности. Удаление N-связанного гликана, расположенного рядом с линкером, приводит к дестабилизации молекулы фермента в случае ЦБГІ и к значительному изменению свойств в случае ЦБГІІ.
- 5) В случае ЭГП *P.verruculosum* удаление N-связанных гликанов, расположенных на входе и выходе из активного центра, приводит к увеличению активности фермента. Общий эффект изменения активности в случае ЭГП оказался меньше, чем в случае ЦБГІ и ЦБГІІ.
- 6) Использование мутантных форм ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП *P.verruculosum* позволяет на 20-40% увеличить выход глюкозы при гидролизе ЦСМ под действием различных смесей целлюлаз. Состав смесей, оказавшихся наиболее эффективными при гидролизе ЦСМ, соответствует компонентному составу секретируемого комплекса *P.verruculosum*.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы изложены в 10 публикациях, в том числе 4 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и 6 тезисах материалов конференций.

Результаты работы были представлены на следующих научных конференциях и конкурсах: VIII Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2015 г.; International Conference «Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications», Moscow, 2015; Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2015», секция «Химия», подсекция Химия живых систем, нанобиоматериалы и нанобиотехнологии, Москва, 2015 г.; XIV Международная конференция молодых ученых «Леса Евразии», Вологда, 2014 г.; XV Международная конференция молодых учёных «Леса Евразии», Барнаул, 2015 г.; Весенний финал «У.М.Н.И.К.» МГУ – 2015, Москва, 2015 г.; The 17th European Congress on Biotechnology, Krakow, Poland, 2016.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Настоящая диссертационная работа представляет собой исследование, посвященное разработке генно-инженерного подхода для изменения степени N-гликозилирования целлюлаз, с целью улучшения биохимических и каталитических свойств целлюлаз для применения в процессах биоконверсии растительного сырья. Обзор литературы включает в себя описание свойств растительного сырья, принципов биотехнологической переработки сырья, описание биохимических и каталитических свойств целлюлаз, генно-инженерных подходов для улучшения этих свойств; кроме того, в обзоре рассмотрена роль гликозилирования в структуре и функции изучаемых ферментов. Анализ литературы позволил выяснить состояние проблемы по теме диссертации и определить направление исследования. Тем не менее, обзор литературы не претендует на полноту описания всех известных на настоящее время результатов по каждому из представленных в нем разделов.

1.1. Растительная биомасса

Растительная биомасса является основным видом органической материи на Земле. Так же, как ископаемые энергоносители (нефть, уголь, природный газ), растительная биомасса может быть одним из основных источников энергии.

По сравнению с использованием ископаемых энергоносителей биотехнологическая переработка растительной биомассы для получения энергии характеризуется рядом преимуществ. Во-первых, запасы растительной биомассы значительно превосходят запасы ископаемых энергоносителей, кроме того, биомасса является возобновляемым ресурсом. Общие запасы растительной биомассы составляют около одного триллиона тонн [1], ежегодный прирост биомассы в мире составляет 10-50 млрд тонн [2, 3], отходы сельскохозяйственных, целлюлозно-бумажных и деревообрабатывающих производств в мире превышают 3,5 млрд тонн в год [4]. Запасы нефти на Земле на настоящее время оцениваются в 239,8 млрд тонн или 1700,1 млрд баррелей, производство составляет порядка 87 млн баррелей/день, т.е. при сохранении современных темпов и технологии добычи существующие запасы нефти будут исчерпаны в течение 50 лет. Запасы природного газа оцениваются в 187,1 трлн куб.м при производстве порядка 3,5 трлн куб.м в год, запасы угля – 891,5 млрд тонн при производстве порядка 4 млрд тонн нефтяного эквивалента в год. При сохранении темпов использования эти ресурсы будут исчерпаны в течение 50-100 лет. Следует отметить, что использование возобновляемых источников энергии на настоящее время составляет 316,9 млн тонн нефтяного эквивалента в год, из

которых биотопливо составляет 70,8 млн тонн нефтяного эквивалента, что значительно меньше масштабов использования ископаемых энергоносителей [5].

Во-вторых, переработка ископаемых энергоносителей ведет к загрязнению окружающей среды и изменению климата [6]. Скорость глобального потепления достигла $0,20 \pm 0,05$ °C в год [7] и продолжает увеличиваться из-за возрастающей интенсивности промышленных процессов, изменение климата еще более усиливается выбросом в атмосферу парниковых газов (CO_2 , N_2O и метан), образующихся в процессе сжигания ископаемого топлива [8]. Скорость глобального потепления может показаться небольшой, однако согласно исследованиям, проводимым Межправительственной группой экспертов по изменению климата, сложившиеся на Земле экосистемы смогут выдержать суммарное повышение температуры в 2-4,5 °C [9]. Глобальное потепление уже привело к таянию льдов на Северном полюсе и повышению уровня мирового океана. Повышение уровня мирового океана приведет не только к затоплению прибрежных районов и сокращению площади суши, но и к сокращению пищевых ресурсов и ресурсов пресной воды из-за засоления грунтовых вод [9].

Альтернативным источником энергии, оказывающим меньшее отрицательное воздействие на окружающую среду, может стать биотопливо, получаемое из растительного сырья. Кроме того, биотехнологическая переработка растительного сырья позволяет получать не только топливо, но и разнообразные химические соединения, традиционно получаемые из нефти в результате химического синтеза.

Таким образом, растительная биомасса может быть использована в качестве источника энергии, альтернативного ископаемым энергоносителям, а также в качестве сырья для получения различных продуктов химической промышленности.

1.2. Компонентный состав растительного сырья

Основными компонентами растительной биомассы являются целлюлоза, гемицеллюлоза и лигнин. Эти компоненты ассоциированы друг с другом в трехмерную структуру, состав которой зависит от типа и источника сырья (Таблица 1).

Одним из основных компонентов клеточных стенок растений является целлюлоза. В таких целлюлозосодержащих материалах (ЦСМ), как древесина, однолетние растения, травы, водоросли, целлюлоза составляет 30-50% сухой массы. В большем количестве она содержится только в лубяных волокнах таких текстильных растений, как лён, рами (80-90%) и др., а также в волокнах хлопка (96-99%) [10]. По молекулярному строению целлюлоза представляет собой линейный полимер, состоящий из остатков глюкозы, соединенных β -1,4-D-гликозидными связями. Степень полимеризации (СП) нативной

целлюлозы составляет от 10 тыс. в древесине до 15 тыс. в хлопке [11], а молекулярная масса – более 1,5 млн Да [12].

Таблица 1. Содержание целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина в различных целлюлозосодержащих материалах (в процентах от сухой массы) [13-16].

ЦСМ / Компонент	целлюлоза	гемицеллюлоза	лигнин
<u>Твердые породы древесины</u>			
Белая береза	41	36,2	18,9
Тополь, осина	50,8-53,3	26,2-28,7	15,5-16,3
Красный клен	44,1	29,2	24
Смешанный тополь	41,7	20,2	29,3
<u>Мягкие породы древесины</u>			
Сосна <i>Pinus banksiana</i>	41,6	25,6	28,6
Сосна <i>Pinus pinaster</i>	42,9	17,6	30,2
Пихта	43,9	26,5	28,4
<u>Агропромышленные отходы</u>			
Пшеничная солома	32,9-50	24-35,5	8,9-17,3
Рисовая солома	36,2-47	19-24,5	9,9-24
Ячменная солома	33,8-37,5	21,9-24,7	13,8-15,5
Свекловичный жом	41	23	18
Кукурузные стебли	35-39,6	16,8-35	7-18,4
Стебли хлопчатника	38,4-42,6	20,9-34,4	21,5
Стебли сахарного тростника	40-41,3	27-37,5	10-20
Стебли сои	34,5	24,8	19,8
<u>Отходы целлюлозно-бумажной промышленности</u>			
Отходы переработки целлюлозы	60-70	10-20	5-10
Газетная бумага	40-55	25-40	18-30

Целлюлоза составляет примерно половину сухой массы ЦСМ и, благодаря своим химическим и физическим свойствам, а также надмолекулярной структуре, выполняет функцию основного структурного компонента клеточных стенок растений. Микрофибриллы целлюлозы, состоящие из полимерных цепей в кристаллической решетке, окружены матрицей из гемицеллюлоз и лигнина (Рис. 1) [17].

Макромолекулы целлюлозы агрегированы в пучки (микрофибриллы) и формируют однородные высокоупорядоченные кристаллические зоны (кристаллиты), которые чередуются с неоднородными, менее упорядоченными аморфными зонами [18]. Если в кристаллических зонах существует трехмерный дальний порядок в расположении цепей целлюлозы, то в аморфных зонах дальний порядок

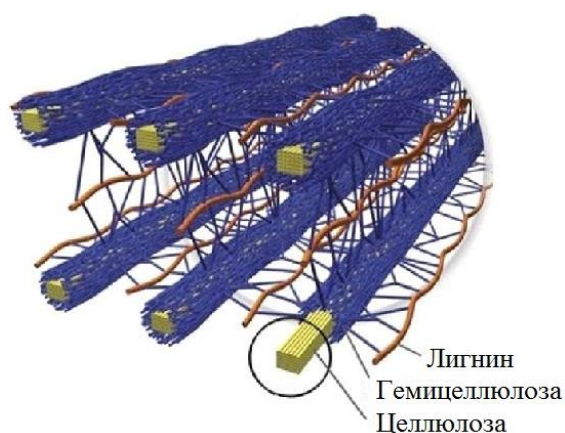


Рис. 1. Микрофибриллы целлюлозы, окруженные гемицеллюлозой и лигнином [17].

отсутствует и сохраняется лишь общая продольная направленность цепей. В аморфных участках целлюлоза более доступна для действия химических веществ или ферментов, чем в кристаллических участках [19]. Макромолекулы целлюлозы характеризуются индексом (степенью) кристалличности. Этот показатель отражает плотность упаковки целлюлозы и соотношение аморфных и кристаллических участков в ее структуре. От индекса кристалличности зависит эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы [20].

Вторым по распространенности в природе полисахаридом является гемицеллюлоза (20-40% сухой массы ЦСМ [11]). Гемицеллюлоза представляет собой гетерополимер пентоз (D-ксилоза, L-арабиноза) и гексоз (D-манноза, D-глюкоза, D-галактоза). В зависимости от источника (а также способов выделения) гемицеллюлозы могут иметь линейную или разветвленную структуру [21], в состав основной цепи могут входить D-глюкуроновая кислота, её 4-O-метиловый эфир, феруловая и *n*-кумаровая кислоты, а также присоединенные через сложноэфирные связи остатки уксусной кислоты [22]. Степень полимеризации гемицеллюлоз составляет 50-200, что значительно меньше степени полимеризации целлюлозы [22].

Функциональная роль гемицеллюлоз заключается в объединении полимерных компонентов в клеточные стенки. Гемицеллюлозы образуют переходный слой между целлюлозой, с которой они связываются посредством водородных связей, и лигнином, с которым связываются ковалентно посредством дикумаровых мостиков между лигнином и ксиланом.

Третий компонент ЦСМ – лигнин – составляет 20-30% сухой массы ЦСМ. Лигнин представляет собой смесь ароматических полимеров фенольной природы, построенных из мономерных звеньев, называемых фенилпропановыми структурными единицами [10]. В отличие от полисахаридов, относящихся к полиацеталам, у лигнина отсутствует единый тип связи между мономерными звеньями. Кроме углерод-кислородных связей С-О-С присутствуют и углерод-углеродные связи С-С между звеньями, характерные для карбоцепных полимеров [10]. Средняя молекулярная масса выделенных лигнинов составляет 1-20 тыс. Да, СП природных лигнинов трудно определить из-за сложного строения. Лигнин более устойчив к биологическому воздействию, чем полисахариды [17, 23].

1.3. Биотехнологическая переработка растительного сырья

Биотехнологии, наряду с информационными технологиями и нанотехнологиями, являются ключевым направлением развития экономики [24, 25]. Одним из перспективных направлений развития биотехнологии является создание систем биоконверсии возобновляемого растительного сырья в коммерчески значимые продукты [26].

Биотехнологическая переработка растительного сырья позволяет наиболее полно использовать все компоненты сырья для получения коммерческих продуктов. Биоконверсия сырья главным образом затрагивает полисахаридные компоненты и предполагает использование ферментов или их комплексов для гидролиза полисахаридов растительного сырья в технические сахара, а также микроорганизмов для трансформации сахаров в органические продукты (технические сахара, органические спирты и кислоты, простые углеводороды). Лигнин, входящий в состав растительного сырья, может быть использован для производства низкомолекулярных соединений для получения диспергентов, наполнителей, ионообменных материалов [27, 28]. Лигнин также может применяться для получения сополимеров и композиционных материалов, характеризующихся различной прочностью и твердостью, устойчивых к действию ультрафиолетового излучения и повышенных температур [17, 29].

Для биотехнологической переработки пригодны ЦСМ из различных источников: как специально выращиваемые сахаросодержащие культуры (такие как сахарная кукуруза, тростник, свекла), так и целлюлозосодержащие отходы различных производств. В первом случае выращивание культур для трансформации в биотопливо ставит под угрозу использование земли для выращивания продовольственных культур [30]. Использование для производства биотоплива целлюлозосодержащих отходов, возможно, позволит решить проблему конкурентного использования земельных ресурсов [31].

На настоящий момент количество целлюлозосодержащих отходов в России в области сельского хозяйства и лесного хозяйства превышает 40 млн тонн в год, в области переработки древесины – 5 млн тонн, в области целлюлозно-бумажного производства, издательской и полиграфической деятельности – 6 млн тонн [32]. Целлюлозосодержащие отходы практически не перерабатываются. Согласно плану «Развитие биотехнологий и генной инженерии» доля сырья, перерабатываемого с применением биотехнологических методов, должна увеличиться в лесопромышленном комплексе – с 5% в 2015 г. до 8% в 2018 г., а доля биомассы в общем объеме сырья, перерабатываемого в химической и нефтехимической промышленности, должна увеличиться с 5% в 2015 г. до 12% в 2018 г. [25].

1.3.1. Глубокая переработка растительного сырья

Таким образом, биотехнологическая переработка растительного сырья, т.е. создание химических производств и энергосистем на основе переработки ЦСМ, является экономически выгодной за счет получения коммерчески значимых продуктов с высокой стоимостью в процессе утилизации отходов промышленности и использования возобновляемого ресурса.

На Рис. 2 представлена принципиальная схема биотехнологической переработки ЦСМ в коммерчески значимые продукты [13, 26].

Первая стадия глубокой переработки ЦСМ – выбор источника ЦСМ – предполагает учет стоимости сырья, его количества и доступности, возможности концентрирования в районе производства, его технологических свойств и состава [13]. В зависимости от компонентного состава и применяемой технологии переработки ЦСМ делят на 3 группы: (1) крахмал- и сахаросодержащие культуры (кукуруза, картофель, сахарные тростник и свекла), (2) целлюлозосодержащие отходы производств, (3) водоросли [33]. ЦСМ первой группы характеризуются высоким содержанием сахаров, легки в переработке, однако обладают высокой стоимостью [13, 34]. ЦСМ второй группы являются отходами различных производств, их стоимость в основном определяется стоимостью сбора и концентрирования в районе переработки, они содержат значительное количество целлюлозы, тем не менее их переработка сложна из-за комплексного состава. ЦСМ третьей группы главным образом являются отходами очистных сооружений, они также могут специально выращиваться для трансформации в биотопливо [33]. В отличие от ЦСМ первых двух групп, основными компонентами которых являются сахара (30-95%), ЦСМ третьей группы обладают более сложным составом (до 30% сахара, 10-40% белки, 10-60% жиры). Поэтому, если для первых двух групп переработка заключается в выделении сахаров и их трансформации в различные продукты, то для третьей группы (в зависимости от доминирующего компонента в конкретном виде водорослей) сырье может быть источником белков и использоваться в качестве питательного продукта, может быть источником жиров и использоваться для производства биодизеля, или источником углеводов и использоваться для производства этанола [35-38].

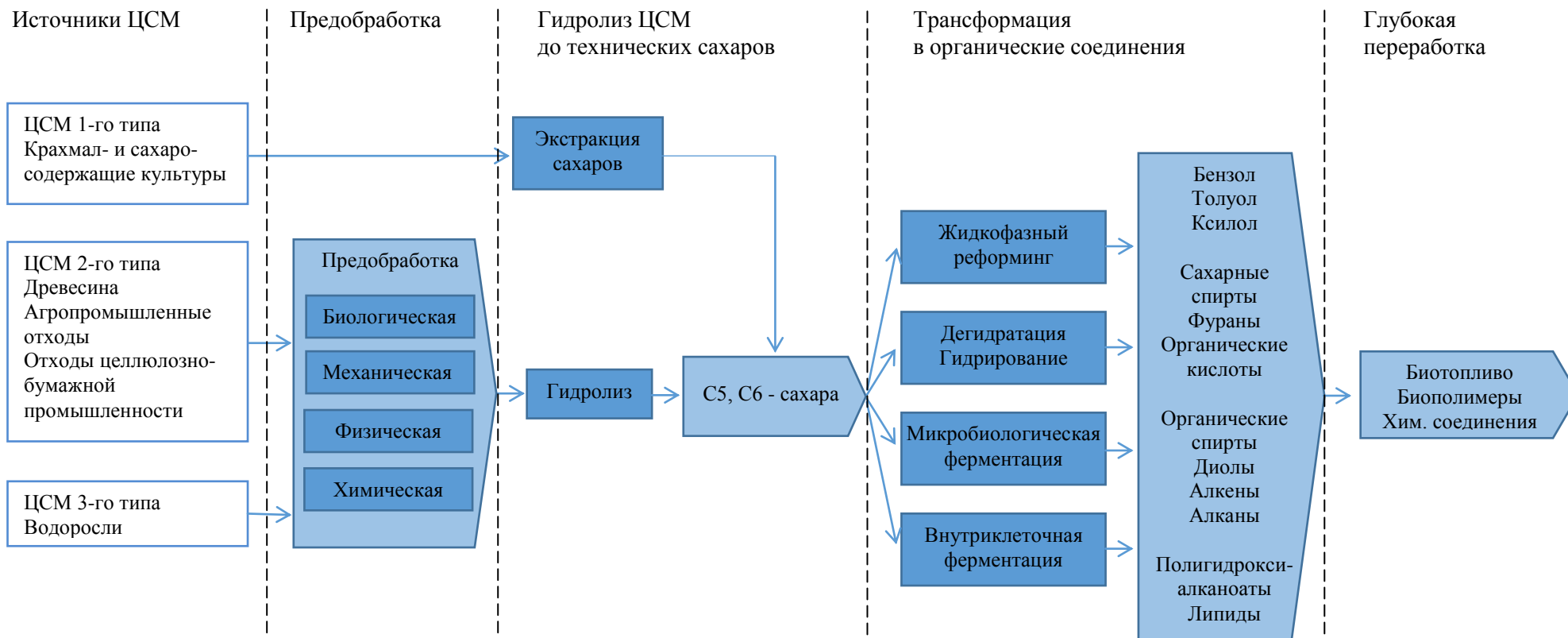


Рис. 2. Принципиальная схема биотехнологической переработки целлюлозосодержащих материалов.

Вторая стадия биотехнологической переработки заключается в осуществлении предобработки ЦСМ для увеличения их реакционной способности [39]. Реакционная способность природных ЦСМ как правило невелика из-за высокой степени кристалличности целлюлозы и высокого содержания лигнина. Макромолекулы целлюлозы с высокой степенью кристалличности медленно подвергаются действию ферментов или химических реагентов, а лигнин экранирует полисахариды от внешнего воздействия. Методы предобработки делятся на биологические, механические, физические и химические. Биологическая предобработка основана на использовании микроорганизмов, способных продуцировать разрушающие лигнин ферменты, однако такая предобработка продолжительна и малоэффективна, кроме того микроорганизмы в процессе предобработки частично утилизируют не только лигнин, но и полисахариды [27]. Механическое измельчение до размеров 0,4-50 мм позволяет увеличить площадь реакционной поверхности, а также уменьшить степень полимеризации и степень кристалличности целлюлозы, однако требует больших энергетических затрат [11]. При химической предобработке сырье обрабатывают кислотами, щелочами и органическими растворителями. Химическое воздействие может приводить к частичной деградации сахаров и лигнина, что может снижать эффективность последующего гидролиза и переработки в целевые продукты [40-43]. Физическая предобработка предполагает воздействие на сырье γ -лучей, повышенных или пониженных температуры и давления, ультразвука [44]. Большое развитие получил метод «парового взрыва», менее энергозатратный по сравнению с механическим измельчением [45-47].

Следующая стадия переработки – гидролиз ЦСМ до технических сахаров. Гидролиз предобработанных ЦСМ можно осуществлять под действием химических соединений или ферментных препаратов. Гидролиз под действием химических соединений, так же как и химическая предобработка, приводит к частичной деградации компонентов ЦСМ с образованием соединений, которые с одной стороны загрязняют целевые продукты переработки ЦСМ, а с другой – уменьшают эффективность дальнейшей трансформации сахаров за счет воздействия на ферменты и микроорганизмы. Трудоемким является разделение сахаров и используемых кислот [48]. Гидролиз под действием ФП проводится при более мягких, чем химический гидролиз, условиях и позволяет селективно разрушать гликозидные связи в полисахаридах. Поэтому в большинстве процессов глубокой переработки ЦСМ для гидролиза используются ФП, обладающие высокой активностью и селективностью действия.

Дальнейшая трансформация сахаров в результате микробиологического или химического воздействия позволяет получить органические спирты и кислоты, углеводы и углеводороды и другие химические соединения, которые могут быть использованы в различных областях промышленности.

Биоконверсия технических сахаров позволяет получать такие органические кислоты и спирты, как уксусная, молочная, лимонная, масляная, глюконовая кислоты и бутанол, изопропанол, глицерин, этиленгликоль, использующиеся в химической, пищевой и фармацевтической промышленности [4, 27].

Этанол, а также другие спирты, могут служить жидким топливом, возможно их использование в качестве добавки к бензину (10-85%) или в смеси с дизельным топливом [49, 50]. Фураны, органические соединения бензольного ряда, алкены используются в производстве полимеров (пластики, каучук, фурановые смолы, нейлон, полиуретаны и т.п.) [27]. Полимеры, полученные на основе молочной, янтарной, фумаровой кислот, производных гидроксиалканоатов, пропилена, этилена и ряда других органических соединений, являются биоразлагаемыми [51-53]. Основное на настоящее время использование биоразлагаемых полимеров заключается в изготовлении упаковочных материалов и деталей оборудования, быстро утилизируемых без образования токсичных продуктов [54]. Также биоразлагаемые полимеры используются для создания материалов, которые обладают уникальными свойствами и могут применяться в медицине. Например, полимеры на основе гидроксиалканоатов используются для создания биосовместимых материалов, такие полимеры обладают низкой аллергенностью, биоразлагаемы и при гидролизе не выделяют токсичных продуктов. Гидрогели на основе полимеров молочной кислоты используются для создания систем доставки лекарств [54].

1.3.2. Ферментативный гидролиз растительного сырья

Ключевой стадией биотехнологической переработки растительного сырья является гидролиз полисахаридных компонентов до олиго- и моносахаридов, доступных для дальнейшего химического или микробиологического воздействия. Как уже отмечалось выше, наиболее эффективным способом гидролиза полисахаридных компонентов в процессах глубокой переработки является гидролиз под действием ФП.

Целлюлоза является основным компонентом ЦСМ и главным источником гексоз, доступных для микробиологической трансформации, поэтому ферменты, обеспечивающие деструкцию целлюлозы, являются основными компонентами ферментных препаратов. Деструкция целлюлозы осуществляется главным образом в результате действия целлюлолитических ферментов, катализирующих гидролиз

целлюлозы до олиго- и моносахаридов. Помимо гидролитических ферментов в состав препаратов могут входить оксидоредуктазы – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Например, наличие в составе ферментных препаратов целлобиозодегидрогеназ позволяет увеличить эффективность гидролиза [55]. Открытые недавно медь-зависимые полисахаридмонооксигеназы (ПМО) способны оказывать значительное влияние на действие ферментов целлюлолитического комплекса. ПМО расщепляют гликозидные связи в произвольной позиции цепи и создают новые сайты для действия целлюлолитических ферментов [56, 57]. Показано, что ПМО значительно увеличивают гидролитическую способность ФП целлюлаз из грибных источников [58], тем не менее основными действующими компонентами таких препаратов являются целлюлолитические ферменты.

1.3.2.1. Ферменты целлюлолитического комплекса

В состав целлюлолитического комплекса входят ферменты, которые катализируют гидролиз гликозидных связей в целлюлозе с образованием олиго- и моносахаридов. По типу действия целлюлазы делят на эндо-и экзо-деполимеразы, первые катализируют гидролиз связей внутри полисахаридной цепи, вторые – гидролиз связей, расположенных на концах цепи [59].

К ферментам целлюлолитического комплекса относятся:

- эндо-1,4-β-глюканазы (КФ 3.2.1.4);
- экзо-1,4-β-глюканазы, или целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91 и КФ 3.2.1.176);
- экзо-1,4-β-глюкозидазы (экзо-1,4-β-D-глюкан-4-глюкогидролазы) (КФ 3.2.1.74);
- β-глюкозидазы (целлобиазы) (КФ 3.2.1.21) [2, 59].

Экзо-1,4-β-глюканазы катализируют гидролиз кристаллической формы целлюлозы, последовательно отщепляя целлобиозу от концов полисахаридной цепи, а эндо-1,4-β-глюканазы – гидролиз аморфной формы, расщепляя связи внутри цепи и создавая новые сайты для действия экзо-1,4-β-глюканаз, экзо-1,4-β-глюкозидазы и β-глюкозидазы катализируют гидролиз олигосахаридов до целлобиозы и целлобиозы до глюкозы.

Механизм действия целлюлолитического комплекса заключается в следующем. Эндоглюканазы адсорбируются на аморфных участках целлюлозы (а также лихенана, β-глюкана злаков, карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ)) и разрушают внутренние β-1,4-гликозидные связи, что приводит к образованию фрагментов полимерного субстрата и олигосахаридов. Затем экзоглюканазы, связываясь со свободным концом полисахарида, гидролизуют полимер до целлобиозы, которая переводится β-глюкозидазой в конечный продукт гидролиза целлюлозы – глюкозу. Гидролиз олигосахаридов, которые также

образуются в результате действия эндоглюканаз, до глюкозы катализируют экзо-1,4-β-глюкозидазы и β-глюкозидазы [60].

Ферменты целлюлолитического комплекса характеризуются широким спектром биохимических и каталитических свойств.

Эндоглюканазы проявляют большую активность по отношению к аморфным формам целлюлозы, а также к растворимым полимерам, содержащим β-1,4-гликозидные связи (например, лихенан, β-глюкан злаков, КМЦ), и низкую по сравнению с целлобиогидролазами активность по отношению к кристаллической целлюлозе. Для эндоглюканаз характерно большее сродство к β-олигосахаридам, имеющим в своем составе более 6 остатков глюкозы, чем к низкомолекулярным олигосахаридам [59, 61, 62].

Целлобиогидролазы отщепляют остатки целлобиозы от концов полисахаридной цепи, при этом целлобиогидролазы могут действовать как с восстанавливающего, так и с невосстанавливающего конца цепи. Целлобиогидролазы способны катализировать гидролиз как кристаллической, так и аморфной форм целлюлозы, тем не менее высокая активность по отношению к кристаллической целлюлозе является отличительной чертой ферментов этого типа [59, 63].

Экзо-1,4-β-глюкозидазы и **β-глюкозидазы** (целлобиазы) относятся к экзоглюканазам и могут гидролизовать β-D-гликозиды и целлобиозу, отщепляя глюкозу с невосстанавливающего конца полисахаридной цепи [64].

Большинство ферментов целлюлолитического комплекса являются гликопротеинами, они содержат углеводы, состоящие в основном из маннозы, в меньшей степени из глюкозы, галактозы и глюкозамина. Возможно наличие нескольких изоформ ферментов, отличающихся по степени гликозилирования, молекулярной массе и изоэлектрическим точкам [64].

Большинство эндо- и экзоглюканаз мицелиальных грибов проявляют максимальную активность при pH 4,0-5,5 [59, 65, 66]. Однако целлюлазы могут характеризоваться и pH-оптимумом активности, сдвинутым в более кислые значения pH (pH 2,5-3,0) [67, 68] или более щелочные значения pH (pH 5,5-9,0) [66, 69]. Температурный оптимум действия большинства эндо- и экзоглюканаз мицелиальных грибов находится в пределах 50-65°C [68-71], также описаны ферменты из термофильных микроорганизмов с температурным оптимумом действия 75°C [69]. β-Глюкозидазы проявляют максимальную активность при pH 4,3-5,0, реже – при 6,0-7,0. Температурный оптимум лежит в области 37-45°C [64].

1.3.2.2. Методы оптимизации процесса ферментативного гидролиза

Основные трудности, возникающие при глубокой переработке ЦСМ и определяющие ее низкую эффективность, заключаются в низком выходе технических сахаров на стадии ферментативного гидролиза и их высокой стоимости. Затраты на получение такого промежуточного продукта, как технические сахара, в итоге определяют стоимость конечных продуктов глубокой переработки – органических спиртов и кислот, углеводов и углеводородов, а также биотоплива и биопластика. При высокой стоимости получения технических сахаров их дальнейшее использование в производстве органических соединений становится неконкурентоспособным [72].

Высокая стоимость сахаров в первую очередь определяется высокой стоимостью применяющихся ферментов. Даже при значительном прогрессе и сокращении стоимости ферментов, достигнутых в недавнее время, высокая стоимость ферментов все еще остается главным препятствием на пути промышленной реализации переработки ЦСМ в биотопливо, биопластики и другие коммерчески значимые продукты [2]. Поэтому становится необходимым модифицировать ферменты или технологические процессы проведения гидролиза для увеличения выхода технических сахаров и снижения их стоимости. В свою очередь снижение стоимости получения технических сахаров откроет беспрецедентные возможности для производства из сахаров продуктов с высокой добавленной стоимостью в области фармацевтических препаратов, косметики, агрохимической промышленности и тонкого химического синтеза [72].

Для увеличения эффективности ферментативного гидролиза ЦСМ и снижения стоимости технических сахаров применяется несколько подходов, основными из которых являются проведение предобработки, оптимизация условий проведения гидролиза, улучшение свойств используемых ферментных препаратов, снижение стоимости и расхода ферментных препаратов [2]. Основные методы оптимизации суммированы в Таблице 2.

Предобработка ЦСМ позволяет увеличить реакционную способность ЦСМ и эффективность гидролиза. Методы предобработки были рассмотрены выше, стоит только отметить, что все технологические схемы переработки обязательно включают в себя эту стадию [73].

Таблица 2. Основные методы увеличения эффективности ферментативного гидролиза в процессах биотехнологической переработки ЦСМ.

Принцип	Методы	Результат
Проведение предобработки	Проведение биологической, механической, физической или химической предобработки	Увеличение реакционной способности сырья
Оптимизация условий гидролиза	Изменение параметров реакционной среды (Т, концентрация субстрата, рН, ионная сила раствора, наличие перемешивания) Изменение оптимумов действия ферментов Снижение ингибирования продуктами гидролиза	Увеличение выхода технических сахаров
Улучшение свойств ферментных препаратов	Поиск новых продуцентов Белковая инженерия ферментов Оптимизация компонентного состава ФП Конструирование штаммов	Увеличение выхода технических сахаров
Снижение стоимости ферментных препаратов	Увеличение продуктивности штамма Оптимизация условий и снижение стоимости культивирования	Снижение расходов на ферментные препараты
Снижение расхода (дозы потребления) ферментных препаратов	Иммобилизация Увеличение операционной стабильности ферментов	Снижение расходов на ферментные препараты

Оптимизация условий проведения ферментативного гидролиза заключается в подборе таких значений параметров реакционной среды, при которых достигается наибольшая эффективность гидролиза. Условия гидролиза влияют на активность и стабильность ферментов, также могут определять селективность их действия. Оптимизация условий гидролиза предполагает знание о биохимических и каталитических свойствах ферментов, входящих в состав использующихся ФП. Правильный выбор таких параметров, как температура, концентрация субстрата, значения рН и ионной силы, скорость перемешивания реакционной среды, позволяет значительно увеличить эффективность гидролиза и выход технических сахаров [72, 74].

Не стоит забывать, что комплексные ФП содержат различные ферменты, проявляющие максимальные активности при различных значениях температуры и рН. Белковая инженерия ферментов позволяет корректировать свойства отдельных ферментов в соответствии с требованиями проведения технологических процессов так, что все

ферменты комплекса проявляют максимум активности в одном диапазоне параметров реакционной среды [75, 76].

Снижение степени ингибирования также позволяет увеличить выход сахаров в процессе гидролиза. Все ферменты целлюлолитического комплекса подвержены ингибированию глюкозой, целлобиозой и олигосахаридами, накапливающимися в реакционной среде в результате гидролиза ЦСМ. Заметное уменьшение скорости гидролиза происходит уже при степени конверсии ЦСМ 5-10%. Для уменьшения эффектов ингибирования используются такие методы, как конверсия олигосахаридов и целлобиозы в глюкозу, т.к. из всех олигосахаридов глюкоза проявляет наименьшее ингибирующее действие, или удаление продуктов гидролиза путем их селективного выделения из реакционной среды или путем перевода сахаров в другие вещества в процессах одновременного гидролиза и микробиологической трансформации. К преимуществам одновременного проведения ферментативного гидролиза и микробиологической трансформации наряду с увеличением выхода целевого продукта за счет уменьшения эффекта ингибирования ферментов продуктами гидролиза полисахаридов относится также уменьшение продолжительности биокаталитической трансформации ЦСМ [77, 78]. Тем не менее, не только сахара, но и конечные продукты трансформации, т.е. органические спирты и кислоты, могут ингибировать ферментативную активность. Однако ингибирующий эффект, например, этанола на реакцию гидролиза целлюлозы до целлобиозы приблизительно в 10 раз меньше эффекта ингибирования целлобиозой, ингибирующий же эффект этанола на стадию гидролиза целлобиозы до глюкозы незначителен по сравнению с ингибирующим эффектом глюкозы [79, 80].

Улучшение свойств комплексных ФП может достигаться как за счет улучшения свойств отдельных ферментов комплекса, так и за счет оптимизации компонентного состава препаратов. Поиск новых ферментов или новых микроорганизмов, продуцентов уникальных ферментов, позволяет находить ферменты с увеличенной активностью, стабильностью, селективностью или уникальной субстратной специфичностью [81-84]. Белковая инженерия позволяет менять свойства уже известных ферментов, на порядок или несколько порядков увеличивая активность и операционную стабильность [85-87]. Так как компонентный состав различных ЦСМ может достаточно сильно различаться, то компонентный состав используемых ФП должен отвечать составу сырья [88, 89]. Подбор состава препарата, оптимального для переработки конкретного типа ЦСМ, осуществляют посредством сравнения гидролитической способности различных смесей отдельных ферментов. Последующая геновая инженерия продуцентов ферментов и

скрининг штаммов позволяет создать новый штамм микроорганизма, продуцирующего комплекс необходимых для переработки ЦСМ ферментов [90].

Снижения стоимости получения технических сахаров можно также добиться посредством снижения стоимости ферментных препаратов [2]. Ведущие мировые производители препаратов целлюлаз – компании Novozymes и Genencor/Danisco – при поддержке NREL сообщают о том, им удалось в 30 раз снизить стоимость ферментов, благодаря 6-кратному увеличению активности и 5-кратному сокращению издержек производства [91]. Снижение расхода ферментов также позволяет снизить стоимость процесса гидролиза ЦСМ [92]. Имобилизация ферментов позволяет многократно использовать ФП, а также увеличить их операционную стабильность. Стабильность ферментов также можно увеличить методами белковой инженерии [72, 85].

Часть из приведенных подходов требует изменения технологической схемы переработки ЦСМ, дополнительного оборудования либо на стадии переработки, либо на стадии получения ФП. В отличие от этих подходов белковая инженерия ферментов позволяет при сохранении уже существующих и используемых технологических схем получения ФП и переработки ЦСМ значительно увеличить эффективность гидролиза, значит, переработки в целом.

1.4. Белковая инженерия целлюлаз

Для глубокой переработки ЦСМ необходимо использовать высокоактивные, стабильные и при этом коммерчески доступные ФП. Значительный прогресс генно-инженерных методик привел к расширению промышленного производства ферментов и снижению их стоимости [72]. Белковая инженерия ферментов является перспективным и результативным способом получения ферментов с требуемыми и оптимизированными свойствами (активность, селективность, стабильность, субстратная специфичность, T- и pH- оптимумы действия).

Увеличение термостабильности, изменение T- и pH-оптимумов действия позволяют повысить операционную стабильность ферментов, а также сделать действие ферментов комплекса согласованным. Улучшение каталитических свойств ферментов позволяет увеличить активность и селективность, изменить субстратную специфичность действия отдельных ферментов или комплекса в целом, а также уменьшить подверженность ингибированию продуктами реакции [85, 87].

1.4.1. Основные направления белковой инженерии целлюлаз

Практическая реализация генно-инженерных методик предполагает применение одного из трех различных подходов: (1) рациональный дизайн, (2) направленная эволюция, (3) объединение двух первых подходов – направленная эволюция рационально выбранного участка аминокислотной цепи.

Метод рационального дизайна заключается в прогнозировании и осуществлении точечных аминокислотных замен с целью направленного изменения свойств ферментов. Осуществление этого метода требует знания аминокислотной последовательности и пространственного строения белка. Правильное определение аминокислотных остатков, ответственных за связывание с субстратом, осуществление катализа, поддержание трехмерной структуры и т.п., необходимо для прогнозирования и осуществления сайт-направленного мутагенеза. Осуществление подобного анализа и моделирования может быть основано на изучении кристаллографических данных о пространственном строении белка или множественном выравнивании аминокислотной последовательности исследуемого белка с а.к. последовательностями уже изученных белков [85, 93]. Метод рационального дизайна был применен для изменения биохимических свойств эндоглюканазы Egl-237 из *Bacillus sp.* KSMS-237, рН-оптимум активности мутантных форм был сдвинут в щелочную область и составлял 9,6-10 (рН-оптимум немутантной формы 9) [94]. Множественное выравнивание последовательностей ряда целлобиогидролаз (ЦБГ) из *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei* и *Humicola insolens* было использовано для выбора положений а.к. мутаций, последующее внесение множественных мутаций в структуру ЦБГ Cel6A из *T.reesei* и ЦБГ Cel6A *H.insolens* позволило в несколько раз уменьшить степень ингибирования глюкозой [95]. Компьютерное моделирование трехмерных структур и выравнивание последовательностей ЦБГ Cel7A из *Talaromyces emersonii* и *T.reesei* было использовано для выбора положений мутаций в Cel7A из *T.reesei*, внесение мутаций позволило уменьшить степень ингибирования активности Cel7A целлобиозой [96]. Мутация одного а.к. остатка в структуре ЦБГ Cel6A из *T.reesei* привела к увеличению термостабильности и сдвигу значения Т-оптимума на 5,6°C [97].

Метод направленной эволюции заключается в внесении в структуру фермента множества случайных а.к. замен и поиске мутантных форм с улучшенными свойствами. Этот метод основан на неинформационных подходах белковой инженерии, не использующих данные о структуре и свойствах ферментов. Неоспоримым достоинством этого метода является возможность применения к любым белкам, столь же неоспоримым недостатком – необходимость проведения скрининга нескольких десятков или сотен

тысяч мутантных форм белка на наличие положительных мутаций [92]. Метод направленной эволюции применяется при наличии простого и быстрого способа определения ферментативной активности или при возможности автоматизации процесса скрининга, тем не менее обнаружение мутантов с определенными улучшенными свойствами зависит от выбора свойств, по которым и будет производиться скрининг и оцениваться влияние мутаций [98, 99]. Применение этого метода позволяет многократно увеличивать активность и стабильность целлюлаз. Применение этого метода, например, позволило увеличить каталитическую активность ЭГ *B.subtilis* в 5 раз [100], в 7 раз увеличить термостабильность ЭГ *Clostridium cellulovorans* [101], изменить значение рН-оптимума активности ЭГШ *T.reesei* на 0,6 единиц [102], в 3,5 раза увеличить каталитическую активность β -глюкозидазы *P.furiosus* [103].

Направленная эволюция рационально выбранного участка аминокислотной последовательности объединяет возможности и преимущества двух первых методов. Компьютерное моделирование направленной эволюции позволяет значительно сократить число возможных мутантных форм и реализовывать на практике только наиболее вероятные для улучшения свойств ферментов [87, 104].

Метод рационального дизайна, в отличие от двух других рассмотренных подходов, позволяет направленно менять свойства ферментов, кроме того, он может применяться при изучении механизмов ферментативных реакций, определении значения различных аминокислотных остатков или элементов структуры для проявления биохимических и каталитических свойств.

Метод рационального дизайна, как уже отмечалось выше, использует информацию об а.к. последовательности ферментов, их пространственном строении и механизме действия. Подходы, реализуемые в рамках применения метода рационального дизайна, значительно отличаются для различных ферментов, в том числе целлюлаз. Если для ЭГ и β -глюкозидаз, специфическими субстратами которых являются растворимые полисахариды, рациональный дизайн в большинстве случаев затрагивает активный центр [105, 106], то для ЦБГ, катализирующих гидролиз в том числе и нерастворимых субстратов, дизайн затрагивает не только активный центр и участки внутри глобулы, но и поверхность белковой глобулы, т.к. свойства поверхности определяют способность ЦБГ связываться с нерастворимым субстратом [107]. Для ЦБГ показано, что петли, окружающие активный центр, принимают участие в реализации такого уникального свойства этих ферментов, как процессивность [107]. В случае нерастворимых субстратов большое влияние на проявление каталитической активности приобретает способность ЦБГ адсорбироваться на поверхности субстрата. Поэтому структура

целлюлозосвязывающего домена, а также линкера, соединяющего каталитический и целлюлозосвязывающий домены, в значительной степени определяет активность ЦБГ [108, 109].

Методом рационального дизайна белковой глобулы возможно увеличить термостабильность белков, при этом вносятся изменения в структуру белковой глобулы, наиболее распространенные подходы предполагают создание дисульфидных мостиков, гидрофобных ядер, увеличение стекинг-взаимодействия ароматических остатков, образование дополнительных водородных связей, ионных пар, добавление в последовательность остатков пролина и уменьшение энтропии денатурации, увеличение внутримолекулярного взаимодействия элементов вторичной структуры, уменьшение площади гидрофобных участков поверхности белковой глобулы, закрепление свободных концов а.к цепи. [85, 110], увеличение числа внутримолекулярных связей и увеличение жесткости структуры [111].

1.4.2. Инженерия сайтов гликозилирования целлюлаз

Большинство целлюлаз является гликопротеинами, в состав молекулы фермента входит не только полипептидная цепь, но и олигосахариды, ковалентно связанные с ней. Гликозилирование относится к посттрансляционным модификациям и может осуществляться по β -амидной группе остатков аспарагина (N-гликозилирование), входящих в состав N-X-S/T константных мотивов (X – любая аминокислота, кроме пролина), или β -гидроксильных групп остатков серина и треонина (O-гликозилирование) [112].

N-гликозилирование встречается главным образом при модификации каталитического домена целлюлаз, N-связанные гликаны могут состоять из нескольких десятков моносахаридных остатков, иметь разветвленную структуру и быть достаточно объемными, на поверхности белковой глобулы может быть несколько сайтов гликозилирования. O-гликозилирование осуществляется в основном при гликозилировании линкера, соединяющего каталитический и целлюлозосвязывающий домены. O-связанные гликаны могут состоять всего из одного или нескольких моносахаридных остатков. Т.к. аминокислотная последовательность линкера содержит большое число остатков серина и треонина, то число сайтов гликозилирования может составлять десять или более. Таким образом, линкер оказывается полностью покрытым короткими олигосахаридами, которые защищают полипептидную цепь от действия протеаз, при этом сохраняется необходимая подвижность линкера [93, 112].

Целлюлазы, секретируемые различными микроорганизмами, могут различаться степенью гликозилирования и структурой гликанов. Процессы N- и O-гликозилирования, осуществляемые в эндоплазматическом ретикулуме, консервативны для эукариотических клеток [113], однако дальнейшая модификация гликанов в аппарате Гольджи может сильно различаться для различных микроорганизмов [114]. Кроме того, обнаруженные в культуральной жидкости грибных штаммов α -маннозидазы и β -N-ацетилглюкозаминидазы способны осуществлять ферментативный «тримминг» гликанов на поверхности целлюлаз, в результате чего образуются гликаны различной длины [115].

N-Связанные гликаны, представляющие собой высокоманнозные олигосахариды, были обнаружены для ферментов, секретируемых штаммами родов *Trichoderma*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Для целлобиогидролаз (ЦБГ I и ЦБГ II) штаммов родов *Aspergillus* и *Trichoderma* состав N-связанных гликанов отвечает формуле $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$, где $x=5-20$ [112, 116-119], для ЭГ *T.reesei* N-связанные гликаны представляют собой структуры $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$ с $x=3-5$ или единичный остаток GlcNAc [117]. Для целлюлаз *T.reesei* и *A.oryzae* также было обнаружена возможность образования фосфорилированных производных олигосахаридов [115, 120]. Для α -L-арабинофуранозидаз *Penicillium canescens* N-связанные гликаны представляют собой высокоманнозные олигосахариды $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$, где $x=0-7$, или остатки GlcNAc и $(\text{GlcNAc})_2$ [121].

В то же время N-связанные гликаны могут представлять собой комплексные/гибридные структуры общей формулы $(\text{Hex})_x(\text{HexNAc})_y + (\text{Man})_z(\text{GlcNAc})_2$. Так, для различных ферментов, секретируемых *Chrysosporium lucknowense* (*Myceliophthora thermophila*), N-связанные гликаны представляют собой не высокоманнозные олигосахариды, как в случае штаммов родов *Trichoderma* и *Aspergillus*, а гибридные/комплексные гликаны общей структуры $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_x$ [119].

1.4.2.1. Гликозилирование и его роль в структуре и функции целлюлаз

Гликозилирование белковой глобулы оказывает влияние на все стадии формирования, секреции и проявления активности ферментов. N-Связанные гликаны принимают участие в осуществлении правильного фолдинга ферментов, а также в дальнейшей стабилизации белковой глобулы [122], в процессах распознавания и секреции [112]. Показано, что при модификации сайтов гликозилирования β -глюкозидазы из *Aspergillus terreus* уменьшается экспрессия фермента. При этом уровень синтеза мРНК остается неизменным, модифицированный гликопротеин синтезировался в клетке, но разрушался непосредственно перед секрецией. Для изученных мутантных форм

стабильность в процессах выделения и очистки, а также активность и термостабильность оказывается ниже по сравнению с ферментом дикого типа [122].

Тем не менее, фолдинг и секреция каталитически активных форм эндо- и экзоглюканаз *Cellulomonas fimi* могут осуществляться и без участия гликанов, например, в системах гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli*. При сохранении активности, температурной и рН-стабильности подобные ферменты обладали меньшей устойчивостью к действию протеаз [123]. Частичное дегликозилирование экзо- и эндоглюканаз *H.insolens* уменьшало их рН- и термостабильность без значительного изменения активности [124].

Гликозилирование в значительной степени влияет на стабильность целлюлаз, особенно на операционную стабильность в процессах глубокой переработки ЦСМ. Гликозилирование увеличивает устойчивость целлюлаз к агрегации, экранируя поверхность белковой глобулы от взаимодействия с другими глобулами, особенно в условиях технологических процессов с высокой концентрацией солей в реакционной среде. Также гликозилирование увеличивает растворимость целлюлаз, что может влиять на их устойчивость к агрегации [125]. Компьютерным моделированием показано, что моносахаридные остатки, ковалентно связанные с а.к. остатками белковой цепи и взаимодействующие с поверхностью белковой глобулы, могут стабилизировать расположенные рядом с сайтом гликозилирования элементы вторичной структуры и таким образом стабилизировать белковую структуру в целом [112, 126].

Гликозилирование целлюлаз в значительной степени определяет активность по отношению к нерастворимым субстратам. Для эффективного гидролиза ЦСМ необходима высокая способность целлюлаз адсорбироваться на поверхности нерастворимых полимеров [127]. Так, например, при гетерологичной экспрессии экзоглюканазы *T.reesei* в *A.niger* наблюдалось 6-кратное увеличение степени N-гликозилирования и незначительное увеличение степени O-гликозилирования, при этом рекомбинантные формы обладали большей адсорбционной способностью по отношению к кристаллической и аморфной формам целлюлозы и меньшей каталитической активностью по отношению к тем же субстратам по сравнению с нативной формой [109, 112]. При экспрессии экзоглюканазы *T.emersonii* в *Saccharomyces cerevisiae* увеличивалась степень N-гликозилирования каталитического домена, что в отличие от предыдущих рассмотренных экспериментов приводило к 30% увеличению активности по отношению к микрокристаллической целлюлозе и увеличению термостабильности [128].

Изменение степени гликозилирования линкера так же, как и гликозилирования каталитического домена, влияет на способность целлюлаз адсорбироваться на поверхности субстрата и проявлять каталитическую активность [129-131].

1.4.2.2. Инженерия сайтов N-гликозилирования целлюлаз

Белковая инженерия сайтов гликозилирования в структуре целлюлаз предполагает внесение точечных а.к. замен для создания или удаления сайтов гликозилирования с целью исследования значения отдельных сайтов в проявлении биохимических или каталитических свойств целлюлаз. Как уже отмечалось выше, N-гликозилирование встречается главным образом при модификации каталитического домена целлюлаз, а O-гликозилирование – при гликозилировании линкера, соединяющего каталитический и целлюлозосвязывающий домены [112]. В отличие от N-гликозилирования, O-гликозилирование защищает линкер от действия протеаз и участвует в поддержании доменной структуры целлюлаз, поэтому изменение O-гликозилирования оказывает влияние на стабильность целлюлаз [93, 112]. Роль N-гликозилирования целлюлаз изучена в меньшей степени, предполагается, что N-связанные гликаны могут принимать участие в осуществлении правильного фолдинга ферментов, в процессах стабилизации белковой глобулы, в процессах связывания с субстратом [112, 122, 130]. Таким образом, инженерия сайтов гликозилирования целлюлаз предполагает главным образом инженерию сайтов N-гликозилирования.

Для ЦБГ Cel7A *T.reesei* и *P.funiculosum*, экспрессированных в *A.niger*, было показано значительное влияние N-гликозилирования на проявление каталитических и биохимических свойств. Так, удаление с поверхности белковой глобулы Cel7A *T.reesei* гликана, расположенного рядом с активным центром, привело к увеличению каталитической активности на 70% по сравнению с немутантной формой. В структуре Cel7A *P.funiculosum*, напротив, как удаление с поверхности белковой глобулы сайта N-гликозилирования, так и создание нового сайта привело к увеличению активности, на 30% в случае удаления сайта и на 70% в случае создания дополнительного сайта. Сайты N-гликозилирования в структуре Cel7A *P.funiculosum* находятся рядом с активным центром и, вероятно, по-разному влияют на способность фермента связываться с субстратом и катализировать его гидролиз. При этом внесение мутаций уменьшало термостабильность Cel7A *T.reesei* и *P.funiculosum* [132]. Следует отметить, что роль N-гликозилирования в проявлении свойств целлюлаз мало исследована, поэтому необходимы дальнейшие исследования по белковой инженерии сайтов N-гликозилирования.

1.5. Целлюлолитический комплекс *Penicillium verruculosum*

1.5.1. Мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum*

Для глубокой переработки ЦСМ необходима деструкция полисахаридов до моносахаридов. Поскольку растительное сырье характеризуется сложным компонентным составом, то для его гидролиза требуются комплексные ФП. В промышленной биотехнологии в качестве продуцентов таких препаратов широкое распространение получили различные микроскопические грибы. Штаммы грибов рода *Trichoderma* играют ведущую роль среди промышленных продуцентов препаратов на основе целлюлаз [133-136], при этом штаммы грибов родов *Penicillium*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora*, *Chaetomium* и *Humicola* могут стать альтернативой штаммам рода *Trichoderma* [137-140].

Согласно исследованиям, ранее проведенным в нашей лаборатории, штаммы *P.verruculosum* могут стать достойной альтернативой штаммам *T.reesei*. ФП, полученные с использованием гриба *P.verruculosum*, сопоставимы по характеристикам с коммерческими целлюлолитическими ФП, полученными на основе штаммов *T.reesei* и являющимися в настоящее время одними из наиболее эффективных ФП для биоконверсии ЦСМ [89, 141].

Основные целлюлолитические ферменты, секретируемые *P.verruculosum*, описаны в работах [142-147]. Ферментный комплекс, секретируемый *P.verruculosum*, содержит более 20 ферментов, различающихся по биохимическим и каталитическим свойствам. Было показано, что основными ферментами в составе комплекса являются целлобиогидролазы, эндоглюканазы, β -глюкозидаза, ксилоглюканазы, ксиланазы, α -галактозидаза и глюкоамилаза. Молекулярные массы ферментов варьировали от 19 до 120 кДа, изоэлектрические точки изменялись в диапазоне от 2 до 5,8. Значения рН-оптимумов действия находились в узком диапазоне 4-5,5, температурные оптимумы варьировали в более широком диапазоне 50-80°C. Практически все ферменты комплекса были гликопротеинами, степень гликозилирования составляла от 4,13 до 48,3 % для различных ферментов.

1.5.2. Целлюлазы *Penicillium verruculosum*

В состав целлюлолитического комплекса *P.verruculosum* входят несколько целлобиогидролаз, эндоглюканаз и β -глюкозидаза. Основными в составе комплекса являются ЦБГІ, ЦБГІІ, ЭГІ, ЭГІІ, ЭГІІІ и β -глюкозидаза, идентифицированные как гликозид-гидролазы, принадлежащие к Cel7A, Cel6A, Cel7B, Cel5A, Cel12A и Cel3A соответственно [147]. В ферментном комплексе, секретируемом штаммом *P.verruculosum* B151, содержание ЦБГІ составляет 35%, ЦБГІІ – 34%, ЭГІІ – 8%, ЭГІ – 5%, ЭГІІІ – 2%,

β -глюкозидазы – 4%, на долю остальных гликозид-гидролаз приходится менее 12% [148]. Таким образом, основными целлюлолитическими ферментами в составе секретируемого комплекса являются ЦБГ I, ЦБГ II и ЭГ II.

В настоящее время ферменты делятся на семьи в соответствии с гомологией аминокислотных последовательностей и сходством пространственного строения. Для ферментов одной семьи характерно сходство а.к. последовательностей и пространственного строения, одинаковый механизм катализа [149]. Большинство известных грибных целлобиогидролаз принадлежат к 7-й и 6-й семьям гликозид-гидролаз, этим ферментам свойственна бифункциональная организация: молекула фермента состоит из двух доменов, каталитического и целлюлозосвязывающего, которые соединены гибким линкером.

Целлюлозосвязывающие домены грибных целлюлаз содержат 35-40 аминокислотных остатков и могут находиться как на С-конце а.к. цепи, как в молекуле ЦБГ I, так и на N-конце, как в молекуле ЦБГ II [59, 150, 151]. Линкеры представляют собой неупорядоченные пептиды длиной 6-100 аминокислотных остатков с высоким содержанием пролина, серина, треонина, глицина и аланина [150, 152]. Наличие остатков пролина придает структуре жесткость, а глицина и аланина – гибкость, необходимую для функционирования по принципу «шарнира», остатки серина и треонина, как правило, гликозилированы, что защищает линкер от действия протеаз [151], кроме того, линкер может принимать участие в связывании субстрата [59].

Каталитические домены целлюлаз осуществляют катализ гидролиза полисахаридных субстратов. В состав большинства каталитических доменов входит 200-500 аминокислотных остатков. Активные центры ЦБГ и ЭГ имеют вид «ущелья», в котором происходит связывание и гидролиз полисахаридной цепи. В структуре ЦБГ «ущелье» практически полностью закрыто пептидными петлями, в результате активный центр приобретает вид «туннеля», в структуре ЭГ активный центр остается более открытым для связывания субстрата [107, 153]. Благодаря такому строению активного центра ЦБГ действуют на субстрат по процессивному механизму. ЦБГ гидролизуют субстрат с концов полисахаридных цепей, после гидролиза гликозидной связи не происходит десорбции молекулы фермента с полисахаридной цепи, вместо этого цепь протягивается дальше вдоль «туннеля» активного центра, таким образом осуществляется последовательное отщепление остатков целлобиозы с концов цепи [107]. В структуре ЭГ активный центр более открыт для связывания субстрата, благодаря чему ЭГ способны адсорбироваться в любом месте полисахаридной цепи и катализировать гидролиз гликозидных связей внутри цепи [147].

При гидролизе целлюлозы ЦБГ I *P.verruculosum* отщепляет целлобиозу с восстанавливающего конца полисахаридной цепи, ЦБГ II *P.verruculosum* действует с невосстанавливающего конца. Благодаря тому, что петли, ограничивающие «туннель» активного центра ЦБГ I и ЦБГ II, сохраняют подвижность, ЦБГ I и ЦБГ II могут проявлять и эндоглюканазную активность, такое свойство более характерно для ЦБГ II, чем для ЦБГ I. ЦБГ I в отличие от ЦБГ II способна катализировать гидролиз низкомолекулярных субстратов, например, *n*-нитрофенольных производных целлобиозы и лактозы [147].

При гидролизе целлюлозы ЭГ II *P.verruculosum* гидролизует гликозидные связи внутри полисахаридной цепи, ЭГ II характеризуется высокой активностью по отношению к β -глюкану и карбоксиметилцеллюлозе и низкой активностью по отношению к микрокристаллической целлюлозе [147]. ЭГ I *P.verruculosum* в отличие от ЭГ II обладает еще и активностью по отношению к ксилоглюкану и *n*-нитрофенольным производным целлобиозы и лактозы, а ЭГ III – активностью по отношению к глюкуроноксиану. Из ЭГ I, ЭГ II и ЭГ III наибольшей термостабильностью характеризуется ЭГ II [147].

β -Глюкозидаза *P.verruculosum* в отличие от ЦБГ I и ЭГ способна катализировать не только гидролиз гликозидных связей, но и их синтез [146, 147]. Это приводит к тому, что при накоплении глюкозы в процессе гидролиза целлюлозы под действием комплекса целлюлаз происходит обратный синтез олигосахаридов из глюкозы. Поэтому β -глюкозидаза *P.verruculosum* не используется в процессах переработки растительного сырья.

Как уже отмечалось выше, механизм действия ферментов целлюлазного комплекса предполагает совместное действие эндо- и экзоцеллюлаз, а также экзо-1,4- β -глюкозидаз и β -глюкозидаз. При этом гидролиз целлюлозы начинается с атаки эндоглюканаз, которые неупорядоченно гидролизуют участки аморфной целлюлозы и создают свободные концы для действия целлобиогидролаз [154]. Такой порядок действия ЭГ I и ЦБГ I объясняет существование синергизма между этими ферментами, т.е. увеличение эффективности гидролиза субстрата при одновременном действии компонентов целлюлазного комплекса по сравнению с суммарным действием индивидуальных ферментов [155-158]. Также известен синергизм между прочно и слабо адсорбирующимися ферментами, прочно адсорбирующиеся целлюлазы способны осуществлять диспергирование кристаллической формы целлюлозы, переводя ее в форму, более доступную для действия слабо адсорбирующихся ферментов. Слабо адсорбирующиеся ферменты, в свою очередь, способны гидролизовать субстрат в зонах локализации прочно адсорбирующихся ферментов и таким образом облегчать их транспорт к новым участкам субстрата [159, 160].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Микроорганизмы

Для всех процедур клонирования целевых генов, а также для наработки ДНК в препаративных количествах использовали штамм *E.coli* MachI (Invitrogen, США).

Для получения геномной ДНК и амплификации целевых генов использовали штамм *P.verruculosum* B151.

Для трансформации и получения рекомбинантных штаммов использовали штамм-реципиент *P.canescens* PCA-10 $niaD^-$, дефектный по гену нитратредуктазы, штамм не способен расти на средах, содержащих в качестве источника азота нитрат натрия. Трансформация штамма-реципиента плазмидой pSTA-10 ($niaD^+$), несущей ген нитратредуктазы, приводит к комплементации дефектного гена и появлению у штамма способности расти на средах с нитратом натрия. Эта способность используется для селективного отбора трансформантов на средах с нитратом натрия [148].

2.1.2. Ферментные препараты

Для гидролиза клеточной стенки мицелия в процессе получения протопластов использовали препарат лизирующих ферментов из *T.harzianum* (Sigma, St.Louis, MO).

Для гидролиза целлобиозы в процессе гидролиза полисахаридных субстратов использовали β -глюкозидазу *A.niger*, выделенную из препарата F10 на основе гриба *P.verruculosum*, полученного в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (г. Пущино).

Для гидролиза белков в процессе масс-спектрометрического анализа использовали трипсин (Promega, Madison, WI), пепсин и химотрипсин (Sigma, St.Louis, MO).

2.1.3. Субстраты

В качестве субстратов для определения ферментативной активности использовали: микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) (PH-101, Sigma, St.Louis, MO), карбоксиметил-целлюлоза (КМЦ) (СМС, Sigma, St. Louis, MO), β -глюкан ячменя (Megazyme, Boronia, Australia), ксилан (Sigma, St.Louis, MO), *n*-НФ- β -D-глюкопиранозид (*n*-НФ- β -Глюк), *n*-НФ- β -D-галактопиранозид (*n*-НФ- β -Гал), *n*-НФ- β -D-лактозид (*n*-НФ- β -Лак) и *n*-НФ- β -D-целлобиозид (*n*-НФ- β -Целл) (Sigma, St.Louis, MO).

Для исследования гидролитической способности ФП в качестве субстратов использовали МКЦ (PH-101, Sigma, St.Louis, MO), β -глюкан ячменя (Megazyme, Boronia,

Australia), измельченную осиновою древесину (№122.2), измельчение проводили на лабораторной планетарной шаровой мельнице АГО-2 в ОАО «ГосНИИсинтезбелок».

2.1.4. Реактивы

Для амплификации целевых генов и получения экспрессионных конструкций использовали высокоточную и высокопроцессивную полимеразы, T4 полимеразу, буферы для осуществления ПЦР и клонирования (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

Выделение и очистку геномной ДНК проводили с использованием набора «Qiagen DNeasy Kit» (Qiagen, Valencia, CA). Выделение ПЦР-продукта и его очистку проводили с использованием наборов «QIAquick Gel Extraction Kit» и «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen, Valencia, CA). Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора «QIAprep Spin Miniprep Kit» (Qiagen, Valencia, CA).

Для скрининга бактериальных и грибных колоний использовали Red-TAQ полимеразу (Bioline, США) и Phire полимеразу (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

Для культивирования микроорганизмов использовали агаризованную среду Лурия-Бертани (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) и жидкую среду Лурия-Бертани (Ambresco, Ohio, USA), агар бактериологический (Panreac QUIMICA SAU, Испания), свекловичный жом, пептон (ДиаМ, Россия), неорганические соли марки ч.д.а. или х.ч. производства «Helicon» и «ДиаМ» (Россия).

Для изготовления пластин с полиакриламидным гелем для электрофореза в денатурирующих условиях или изоэлектрофокусирования использовали реактивы и наборы фирм «Reanal» (Венгрия), «Sigma» и «Bio-Rad Laboratories» (США). Окраску белка в геле производили красителем Coomassie-Brilliant Blue G-250 фирмы «Helicon» (Россия). В качестве стандартов для ДДС-электрофореза и изоэлектрофокусирования использовали смеси белков фирмы «Sigma» (St.Louis, MO) и «Thermo Fisher Scientific Inc.» (Waltham, MA).

Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а. и о.с.ч., производимых фирмами «Pharmacia Biotech», «Sigma», «Bio-Rad Laboratories» (США), «Helicon», «ДиаМ» и «Реахим» (Россия).

2.2. Методы

2.2.1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей

Поиск гомологичных последовательностей и множественное выравнивание осуществляли с использованием автоматизированных сервисов <http://www.uniprot.org/blast/> [161] и <http://www.clustal.org/clustal2/> [162].

2.2.2. Моделирование трехмерных структур

Моделирование трехмерных структур белковых глобул осуществляли с использованием программы SWISS-MODEL Швейцарского института биоинформатики, доступной с сервера ExPASy <http://swissmodel.expasy.org/> [163-165]. Моделирование гликозилированных форм ферментов осуществляли на базе полученных моделей белковых глобул и структур олигосахаридов (1xc6.pdb [166]) с использованием программы Swiss-PdbViewer 4.1.0., доступной с сервера ExPASy <http://www.expasy.org/resources>.

2.2.3. Генная инженерия и микробиология

2.2.3.1. Амплификация и клонирование целевых генов

Амплификацию целевых генов проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием геномной ДНК *P.verruculosum* в качестве матрицы. Амплификацию целевых генов проводили на амплификаторе «My Cycler» (Biorad, США). Клонирование генов в вектор PC1 [167] осуществляли с использованием метода независимого лигирования [168]. Рекомбинантные плазмиды трансформировали в клетки *E.coli*, после чего проводили скрининг клонов, а также наработку ДНК-материала. Последовательность гена подтверждали секвенированием плазмидной ДНК.

Для культивирования бактериальных культур использовали плотную и жидкую среду Луриа-Бертани, содержащую антибиотик ампициллин 100 мкг/мл, культивирование проводили в течение 12-15 часов (в течение ночи).

2.2.3.2. Трансформация штамма-реципиента *Penicillium canescens*

Для получения грибного мицелия проводили культивирование штамма-реципиента *P.canescens* PCA-10 niaD^- на минимальной среде в течение 12 часов при 30°C. Культивирование проводили на термостатируемой качалке «Multitron Standard» (Infors, Швейцария).

Для гидролиза клеточной стенки мицелия и получения протопластов использовали препарат лизирующих ферментов из *T.harzianum*, для стабилизации протопластов использовали бычий сывороточный альбумин (Sigma, St.Louis, MO) в соответствии с лабораторной методикой [169]. Выделение протопластов из гидролизата проводили с использованием центрифуги «Universal 320 R» (Hettich Lab Technology, Германия). Трансформацию осуществляли $\text{CaCl}_2/\text{ПЭГ}$ методом. Концентрацию протопластов определяли с использованием камеры Горяева, для одной трансформации использовали $3 \cdot 10^7$ протопластов, растворенных в 200 мкл буфера, 10 и 1 мкг целевой и котрансформационной ДНК соответственно. Для селективного отбора трансформантов

использовали среду, содержащую в качестве источника азота нитрат натрия. Трансформанты культивировали 5 суток при температуре 30°C, после чего методом ПЦР проводили первичный скрининг на наличие целевых генов.

2.2.3.3. Культивирование грибных штаммов

Культивирование грибных трансформантов проводили в течение 6 суток при 30°C в качалочных колбах с ферментационной средой для *P.canescens*, содержащей свекловичный жом 30 г/л, пептон 50 г/л и K_2HPO_4 25 г/л (объем среды 100 мл). Культивирование проводили на термостатируемой качалке «Multitron Standard» (Infors, Швейцария). Для трансформантов осуществляли скрининг на наличие целевой ферментативной активности, трансформанты с наибольшим уровнем активности и секреции белка культивировали в ферментерах объемом 3 л («Проинтех», Москва, Россия), культуральную жидкость (КЖ) лиофильно высушивали для получения ферментных препаратов (ФП).

2.2.3.4. Исследование внутриклеточной экспрессии

Культивирование грибных штаммов проводили на минимальной среде с добавлением арабинозы (10 мМ) в течение 6 суток при 30°C. Арабинозу добавляли для активации экспрессии целлюлаз. Культивирование проводили на термостатируемой качалке «Multitron Standard» (Infors, Швейцария).

Через 2, 4 и 6 суток отбирали пробы мицелия. Мицелий отделяли от раствора центрифугированием (5 мин, 5000 об/мин, +4°C) с использованием центрифуги «Universal 320 R» (Hettich Lab Technology, Германия), после чего отмывали мицелий от КЖ натрий-фосфатным буфером [170]. Процедуру растворения мицелия в буфере, центрифугирования и отделения мицелия от раствора повторяли 4 раза для удаления всех компонентов КЖ. Далее мицелий растворяли в лизирующем буфере (1М $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, 1М MgCl_2 , 50мМ ЭДТА, рН 7,5), содержащем ингибиторы протеолитической активности (ProteoBlock Protease Inibitor Cocktail, Fermentas, Литва) [171]. Клеточные стенки разрушали под действием ультразвука. Грибной мицелий дважды обрабатывали ультразвуком с частотой 35 кГц (Sonics & Materials Inc., Newtown, CI. USA) в течение 5 мин в ледяной воде [171]. Раствор, содержащий внутриклеточные белки, отделяли от клеточного дебриса центрифугированием (20 мин, 15000 об/мин, +4°C), белки осаждали 10% трихлоруксусной кислотой [172]. Осадок отделяли центрифугированием (7 мин, 13000 об/мин), промывали этанолом для удаления остатков трихлоруксусной кислоты и высушивали, после чего проводили ДДС-электрофорез выделенных белков [173].

2.2.4. Выделение и очистка ферментов хроматографическими методами

Гомогенные ферменты выделяли из ФП методами анионообменной и гидрофобной хроматографии. Фракционирование и очистку ферментов осуществляли с использованием хроматографической системы «АКТА UPC» (GE Healthcare, США).

Белки, содержащиеся в ферментных препаратах, предварительно осаждали в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (степень насыщения 80%) при 4°C в течение ночи. Осадок растворяли в стартовом буфере 10 мМ 2-[Бис-(2-гидроксиэтил)амино]-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол (Bis-tris) /HCl, pH 6,8 и 6,5 в случае выделения ЦБГ и ЭГ соответственно и подвергали обессоливанию с помощью колонки Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Фракционирование осуществляли с помощью анионообменной хроматографии на колонке с носителем Source 15Q (GE Healthcare, США). В качестве элюентов использовали 10 мМ Bis-tris/HCl и 10 мМ Bis-tris/HCl, 1М NaCl, pH 6,8 и 6,5 в случае выделения ЦБГ и ЭГ соответственно, фракционирование осуществляли в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,4 М.

Очистку полученных ферментов проводили с помощью гидрофобной хроматографии на колонке с носителем Source 15ISO (GE Healthcare, США). В качестве элюентов использовали 50 мМ Na-ацетатный буфер, 1,7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 5,0 и 50 мМ Na-ацетатный буфер, pH 5,0. Фракционирование осуществляли в линейно убывающем градиенте $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от 1,7 до 0 М. Обессоливание и концентрирование полученных фракций осуществляли с использованием мембранных колонок «VivaSpin 500» (Sartorius Stedium biotech, Германия).

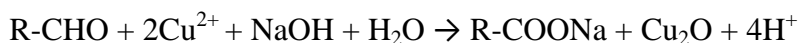
2.2.5. Определение концентрации белка

Концентрацию белка в КЖ, ФП, а также в растворах гомогенных ферментов определяли по методу Лоури с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина [174]. Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр «Varian Cary 50 UV-Vis» (Agilent Technologies, США).

2.2.6. Определение активности ферментов

Активность ферментов по отношению к полисахаридным субстратам (МКЦ, КМЦ, β -глюкан, ксилан) определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС), определяемым методом Шомоди-Нельсона. Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр «Varian Cary 50 UV-Vis» (Agilent Technologies, США).

BC определяли модифицированным методом Шомоди-Нельсона [175, 176]. Принцип метода заключается в следующем. BC, образовавшиеся при ферментативном гидролизе целлюлозы, сначала количественно окисляются реактивом Шомоди в щелочной среде (pH >9) при кипячении с образованием закиси меди:



Затем образовавшийся оксид меди (I) окисляется арсеномолибдатным реактивом Нельсона в кислой среде (pH <2) с образованием молибденовой сини, окраска которой устойчива в течение 24-36 часов. По оптической плотности получаемых растворов определяется концентрация BC.

Для определения ферментативной активности по отношению к МКЦ гидролиз субстрата проводили в течение 60 мин при концентрации субстрата 5 г/л, температуре 40°C и pH 5,0 (0,1 Na-ацетатный буфер) [177].

Для определения ферментативной активности по отношению к КМЦ гидролиз субстрата проводили в течение 5 мин при концентрации субстрата 5 г/л, температуре 50°C и pH 5,0 (0,05 Na-ацетатный буфер) [178].

Для определения ферментативной активности по отношению к β-глюкану и ксилану гидролиз субстрата проводили в течение 10 мин при концентрации субстрата 5 г/л, температуре 50°C и pH 5,0 (0,05 Na-ацетатный буфер) [178].

За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль BC за 1 минуту при концентрации субстрата 5 г/л [179].

Активность ферментов по отношению к *n*-нитрофенольным производным сахаров определяли по начальным скоростям образования *n*-нитрофенола. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль *n*-нитрофенола в минуту при концентрации субстрата 1 ммоль, pH 5,0 и температуре 40°C [177].

Для определения каталитических параметров действия ферментов проводили ферментативный гидролиз субстрата (β-глюкан) при одинаковой концентрации фермента и различной концентрации субстрата. Каталитические параметры рассчитывали из полученной зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата методом нелинейной регрессии с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен и программы Origin 8.0.

2.2.7. Определение биохимических свойств ферментов

Электрофорез в денатурирующих условиях (ДДС-электрофорез) проводили с использованием пластин с полиакриламидным гелем с концентрирующим (4%) и

разделяющим (12%) гелями. ДДС-электрофорез проводили с использованием системы «Mini Protean II» (Bio-Rad, США). Растворы ферментов предварительно обрабатывали 1% додецилсульфатом натрия и 5% β-меркаптоэтанолом при 100°C в течение 15-20 мин. Окраску белковых полос в гелях производили красителем Coomassie-Brilliant Blue G-250.

Для изучения зависимости активности ферментов от pH проводили определение активности ферментов по отношению к специфическому субстрату в диапазоне значений pH от 2,5 до 8,0. Для создания растворов с заданным значением pH использовали 0,1М универсальный буфер (CH₃COOH, H₃PO₄, H₃BO₃).

Для изучения температурного профиля активности ферментов проводили определение активности ферментов по отношению к специфическому субстрату в pH-оптimumе их действия при различных температурах в диапазоне 30-80°C.

Для изучения термостабильности раствор фермента в 0,1 М универсальном или Na-ацетатный буфере инкубировали при различных температурах в диапазоне 30-80°C. В процессе инкубации отбирали аликвоты растворов, в которых проводили определение остаточной активности ферментов по отношению к специфическому субстрату.

Для определения значений pI ферментов проводили изоэлектрическое фокусирование в 4% полиакриламидном геле с использованием стандартной смеси амфолинов (pH 2-12). Изоэлектрическое фокусирование проводили с использованием системы «Mini Protean II» (Bio-Rad, США). Окраску белковых полос в гелях производили красителем Coomassie-Brilliant Blue G-250.

Адсорбционную способность ферментов определяли при 6°C, концентрации МКЦ или измельченной древесины осины 25 г/л и концентрации ферментов 1 г/л в течение 30 мин (0,1М Na-ацетатный буфер, pH 5,0). Остаточную концентрацию белка определяли методом Лоури. Результаты выражали в процентах адсорбировавшегося белка от исходной концентрации в растворе [177].

2.2.8. Определение гидролитической способности ферментов

Для сравнения гидролитической способности ферментов проводили гидролиз полимерных субстратов (МКЦ, β-глюкан и измельченная древесина осины) под действием гомогенных ферментов или различных двойных и тройных смесей гомогенных ферментов.

Гидролиз полимерных субстратов проводили при 40-60°C в 0,1М Na-ацетатном буфере при постоянном перемешивании (1000 об/мин) с использованием термостатируемого шейкера TS-100 (Biosan, Латвия). Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 5 г/л по сухим веществам субстрата. Дозировка

гомогенных ферментов составляла от 5 до 20 мг белка на 1г сухих веществ субстрата. Дозировка смесей гомогенных ферментов составляла 10 мг общего белка на 1г сухих веществ субстрата. Для предотвращения бактериологического заражения в реакционную смесь добавляли ампициллин (концентрация в реакционной смеси 1 мМ) и азид натрия (концентрация в реакционной смеси 1 мМ). Для предотвращения ингибирования ферментов целлобиозой гидролиз проводили в присутствии избытка β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл) [147, 180].

Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы, центрифугировали 2 мин при 13400 об/мин, затем в супернатанте определяли концентрацию глюкозы. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом с использованием набора «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия), при калибровке использовали D-глюкозу («Реахим», Россия).

2.2.9. Масс-спектрометрический анализ

Из окрашенных белковых полос гелей, полученных в результате ДДС-электрофореза, вырезали кусочки геля $\sim 1 \text{ мм}^3$, которые соответствовали анализируемым ферментам. Протеолиз белков осуществляли под действием трипсина, химотрипсина или пепсина. Экстракцию полученных пептидов проводили с использованием 20%-ного ацетонитрила в деионизированной воде (смесь также содержала 0,1% трифторуксусной кислоты) [181]. MALDI-TOF масс-спектрометрию пептидов осуществляли на приборе «UltraflexXtreme» (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) в ЦКП Института Биохимии имени А.Н. Баха РАН.

Идентификацию белков, определение сайтов N-гликозилирования и структур N-связанных гликанов проводили с использованием сервисов FindPept и GlycoMod tools (<http://www.expasy.org/tools/#proteome>) [182, 183].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Общая схема проведения экспериментов

Основными ферментами целлюлолитического комплекса, обеспечивающими деструкцию целлюлозы, являются эндо-1,4- β -глюканазы и экзо-целлобиогидролазы. Ранее в нашей лаборатории ЦБГ I и ЦБГ II, ЭГ II, одни из основных ферментов в комплексе, секретируемом мицелиальным грибом *P.verruculosum*, были идентифицированы (классифицированы) как гликозид-гидролазы, принадлежащие к 7-й, 6-й и 5-й семьям соответственно (Cel7A, Cel6A и Cel5A) [147]. Для увеличения гидролитической способности ферментного комплекса, продуцируемого *P.verruculosum*, и увеличения эффективности ферментативного гидролиза ЦСМ следует улучшить каталитические и/или биохимические свойства ферментов целлюлолитического комплекса: ЦБГ I, ЦБГ II и ЭГ II. Изменение степени N-гликозилирования, как было рассмотрено выше, значительно изменяет свойства целлюлаз и в отличие от изменения степени O-гликозилирования не приводит к значительной потере стабильности. Поэтому для улучшения свойств целлюлаз ЦБГ I, ЦБГ II и ЭГ II была осуществлена белковая инженерия сайтов N-гликозилирования.

Белковая инженерия сайтов N-гликозилирования в структуре целлюлаз состояла из следующих этапов (Рис. 3):

- 1) поиск теоретических сайтов N-гликозилирования;
- 2) получение плазмидной ДНК, содержащей гены целлюлаз;
- 3) трансформация штамма-реципиента *P.canescens*, получение грибных штаммов, продуцирующих мутантные формы целлюлаз;
- 4) получение ФП;
- 5) анализ свойств мутантных форм целлюлаз по сравнению с немутантными, гидролиз ЦСМ под действием гомогенных ферментов.

Для определения теоретических сайтов N-гликозилирования был осуществлен поиск последовательностей N-X-T/S (X – любая аминокислота, кроме пролина), соответствующих сайтам гликозилирования. Также было построено множественное выравнивание для определения степени variability найденных сайтов гликозилирования.

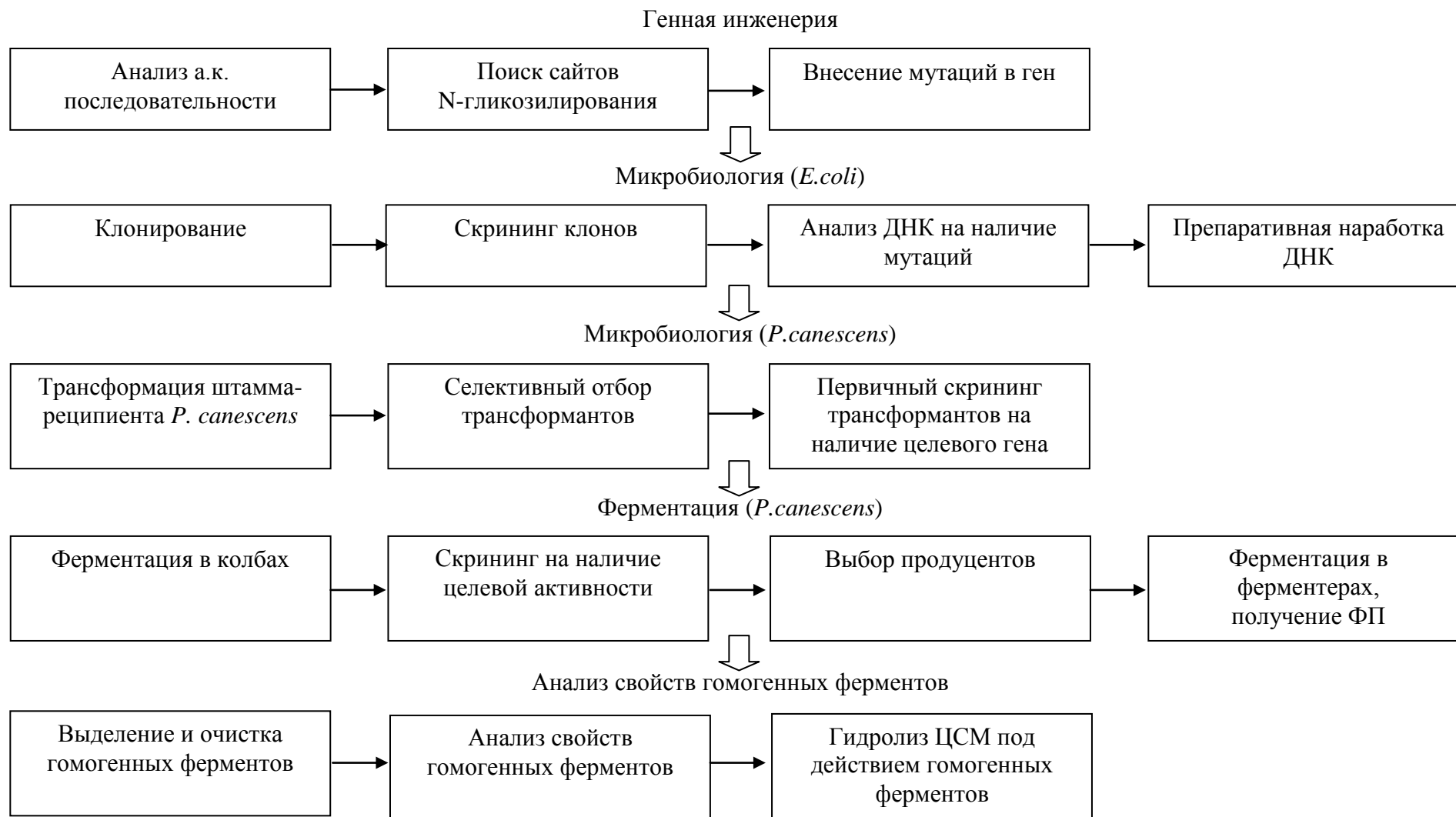


Рис. 3. Общая схема проведения экспериментов.

Далее с использованием геномной ДНК *P.verruculosum* были амплифицированы гены целевых ферментов ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІ, содержащие необходимые мутации. Остатки аспарагина, входящие в состав теоретических сайтов гликозилирования (и при наличии гликозилирования ковалентно связанные с гликанами), были заменены на остатки аланина. Из нескольких аминокислот, наиболее близких по свойствам к аспарагину, для осуществления замены был выбран аланин по следующим причинам. Среди всех аминокислот боковой радикал аланина наиболее близок по занимаемому объему к боковому радикалу аспарагина. Остаток аланина не несет заряда и не отличается от остатка аспарагина по подвижности остатка в полипептидной цепи. Другие похожие на аспарагин аминокислоты: глутамин, аспарагиновая кислота, лейцин и глицин – имеют ряд недостатков. Глутамин по объему бокового радикала превышает аспарагин, остаток аспарагиновой кислоты несет заряд, внесение в а.к. последовательность остатка глицина сильно увеличивает подвижность полипептидной цепи, что может повлиять на процессы фолдинга белковой глобулы. Боковой радикал лейцина является объемным и гидрофобным, наличие подобного остатка на поверхности белковой глобулы (а сайты гликозилирования находятся на поверхности) может повлиять на стабильность глобулы. Таким образом, из всех возможных а.к. замен замена аспарагин-аланин является оптимальной.

Плазмиды включали в себя структурную часть целевого гена, совмещенную с нуклеотидными последовательностями, кодирующими промоторную область (промоторная область ксиланазы А *P.canescens*), сигнальный пептид и терминаторную область (терминаторная область гена ЭГІІІ *P.canescens*), а также элементы, необходимые для репликации плазмид в клетках *E.coli* [167].

После клонирования и трансформации плазмид в клетки *E.coli* проводили скрининг клонов на наличие целевых генов, секвенирование плазмидной ДНК на наличие необходимых нуклеотидных замен и случайных мутаций и препаративную наработку ДНК. Трансформация штамма-реципиента *P.canescens* (лабораторный штамм для гетерологичной экспрессии [167]), позволила получить рекомбинантные штаммы – продуценты мутантных форм целлюлаз. На основе полученных штаммов были наработаны ФП, гомогенные ферменты были выделены и очищены с использованием методов ионообменной и гидрофобной хроматографии. Далее биохимические и каталитические свойства мутантных форм ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ были проанализированы по сравнению с немутантными формами. Различные двойные и тройные смеси ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ были использованы для гидролиза ЦСМ для выяснения степени значимости каждого из компонентов в гидролизе ЦСМ.

3.2. Белковая инженерия эндоглюканазы II *Penicillium verruculosum*

3.2.1. Анализ аминокислотной последовательности ЭГП *Penicillium verruculosum*

Множественное выравнивание было осуществлено для аминокислотных последовательностей ЭГП *P.verruculosum* и некоторых эндоглюканаз из 5-й семьи гликозид-гидролаз: *T.emersonii* (степень гомологии 73,0%), *Thermoascus aurantiacus* (66,5%), *A.oryzae* (64,6%) и *A.kawachii* (64,8%), для эндоглюканазы *T.aurantiacus* разрешена кристаллографическая структура. Множественное выравнивание было использовано для поиска теоретических сайтов N-гликозилирования, а также для поиска консервативных участков последовательности, которые могут быть значимы для проявления каталитических и биохимических (например, стабильность) свойств фермента.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ЭГП приведено на Рис. 4, нумерация аминокислотных остатков соответствует структуре белков без сигнального пептида.

Консервативными в структуре ЭГП *P.verruculosum* являются каталитически активные остатки глутаминовой кислоты Glu142-Glu249, а также остатки, находящиеся рядом с Glu142-Glu249 и формирующие трехмерную структуру активного центра. В катализе также принимают участие остаток Arg58, который стабилизирует Glu249, и остаток Tyr209, который находясь в «ущелье» активного центра, вероятно, изменяет форму гликозидного кольца субстрата и переводит его в более активную форму. Также консервативными являются остатки, отвечающие за связывание полисахаридной цепи за счет «стекинг-взаимодействия»: Trp183, Trp282, Trp287 и Trp288. Остатки His102, Asn141 и His207 возможно принимают участие в связывании низкомолекулярных субстратов и являются консервативными для рассмотренных структур [184-189].

В структуре ЭГП *P.verruculosum* есть три теоретических сайта N-гликозилирования, один из которых – Asn19 – является консервативным для рассмотренных структур и находится в консервативной области а.к. последовательности, два других – Asn42 и Asn194 – не консервативны и присутствуют только в некоторых из структур, Asn42 есть только в ЭГП *P.verruculosum* и *T.emersonii*, т.е. в наиболее близкой по гомологии к ЭГП *P.verruculosum* структуре. Asn194 есть в структурах ЭГП *P.verruculosum*, *T.emersonii* и *A.kawachii*.

Для ЭГ *T.aurantiacus* разрешена кристаллографическая структура и определены остатки, принимающие участие в связывании и гидролизе полисахаридной цепи [185]. Моделирование трехмерной структуры каталитического домена ЭГП *P.verruculosum* было осуществлено с помощью программы SWISS-MODEL Швейцарского института биоинформатики. При моделировании в качестве шаблона была использована структура ЭГ Cel5A из *T.aurantiacus* (1gzj.1.A.pdb) (степень гомологии каталитических доменов ЭГП *P.verruculosum* и *T.aurantiacus* 70,1%).

Трехмерная модель ЭГП *P.verruculosum* приведена на Рис. 5, два из трех теоретических сайтов N-гликозилирования находятся на поверхности белковой глобулы и могут быть доступны для гликозилирования. Сайт Asn19, напротив, находится внутри белковой глобулы в непосредственной близости от остатка Arg58, который принимает участие в катализе.

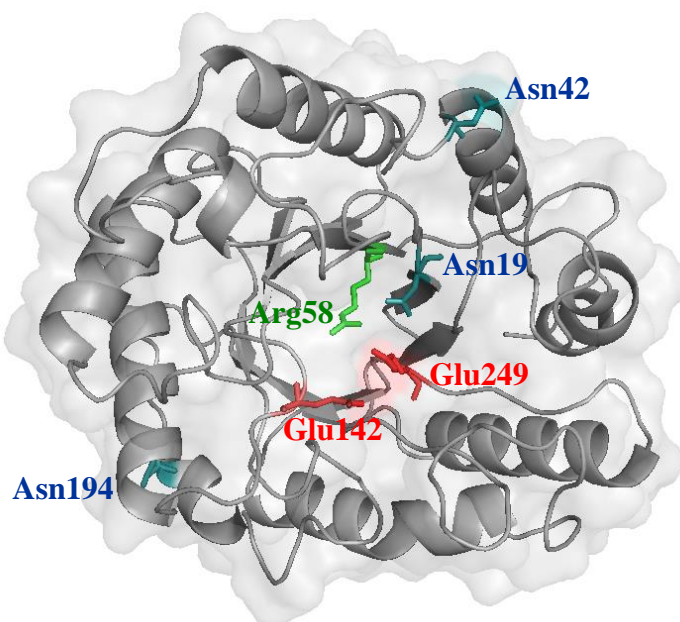


Рис. 5. Трехмерная модель каталитического домена ЭГП *P.verruculosum*. Красным цветом показаны каталитически активные остатки Glu142 и Glu249, зеленым – остаток Arg58, синим – остатки Asn19, Asn42 и Asn194, входящие в состав теоретических сайтов N-гликозилирования.

3.2.2. Внесение мутаций в ген и получение плазмид

Для амплификации гена *egII* и введения мутаций были разработаны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры (Таблица 3).

Таблица 3. Праймеры, использованные в работе (нуклеотиды, соответствующие точечной а.к. замене, подчеркнуты).

Назначение	Праймеры
Мутация N19A	EG2-N19A-fwd 5'- ata ggg ttc ggt tca <u>gcc</u> gag tcc gga gc - 3' EG2-N19A-rev 5'- ttc tgc tcc gga ctc <u>ggc</u> tga acc gaa cc - 3'
Мутация N42A	EG2-N42A-fwd 5'- tac acc ttc ccc <u>gcc</u> aca acg gcg atc cag ata c - 3' EG2-N42A-rev 5'- t ctg gat cgc cgt tgt <u>ggc</u> ggg gaa ggt gta gtc - 3'
Мутация N194A	EG2-N194A-fwd 5'- aac act gcc atg gtc <u>gcc</u> ctc act gac cct c - 3' EG2-N194A-rev 5'- at cag agg gtc agt gag <u>ggc</u> gac cat ggc agt - 3'

Методом ПЦР с использованием геномной ДНК *P.verruculosum* в качестве матрицы были амплифицированы фрагменты гена *egII*, содержащие необходимые мутации. Эти фрагменты далее были клонированы в шаттл-вектор, содержащий нуклеотидные последовательности, соответствующие промоторной области гена ксиланазы А *P.canescens* и терминаторной области гена ЭГШ *P.canescens*, а также необходимые генетические элементы для репликации в клетках *E.coli*. Далее полученные плазмиды были трансформированы в компетентные клетки *E.coli* для наработки ДНК. Последовательность гена, наличие необходимых мутаций и отсутствие случайных мутаций были подтверждены секвенированием плазмидной ДНК. В итоге были получены три плазмиды, содержащие ген *egII P.verruculosum* с одной из трех мутаций N19A, N42A и N194A.

Далее была проведена наработка ДНК в клетках *E.coli* для последующей котрансформации штамма-реципиента *P.canescens* PCA-10 *niaD*⁻, дефектного по гену нитратредуктазы, совместно с трансформирующей плазмидой pSTA10 (*niaD*⁺), несущей ген нитратредуктазы.

3.2.3. Получение грибных штаммов, продуцирующих мутантные формы ЭГШ

Штамм-реципиент *P.canescens* PCA-10 *niaD*⁻ был котрансформирован плазмидами, содержащими ген *egII P.verruculosum*, совместно с плазмидой pSTA10 (*niaD*⁺), несущей ген нитратредуктазы. Для каждой из осуществленных мутаций было получено по 20-30 трансформантов, был проведён первичный скрининг трансформантов на наличие гена *egII*, результат скрининга представлен в виде агарозного электрофореза ПЦР-продуктов на Рис. 6 (M – маркер, pDNA – положительный контроль по плазмидной ДНК, содержащей ген *egII*, *niaD* – отрицательный контроль по реципиентному штамму PCA-10 *niaD*⁻).

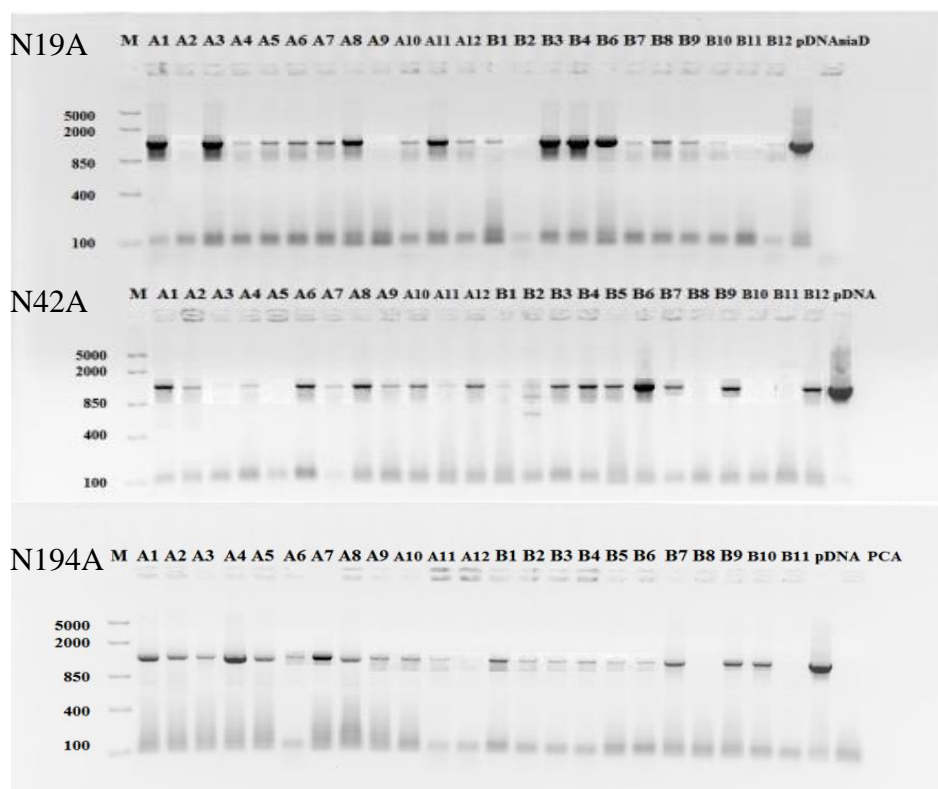


Рис. 6. ПЦР-скрининг трансформантов на наличие гена *egII P.verruculosum*, полученных в результате трансформации одной из трех плазмид (*egII-N19A*, *egII-N42A* и *egII-N194A*) (M – маркер, pDNA – положительный контроль по плазмидной ДНК, содержащей ген *egII*, *niaD* – отрицательный контроль по штамму-реципиенту PCA-10 *niaD*⁻).

ПЦР-скринингом проанализировано:

- ЭГП N19A **23** трансформанта, из них **19** оказались положительными
- ЭГП N42A **24** трансформанта, из них **18** оказались положительными
- ЭГП N194A **23** трансформанта, из них **20** оказались положительными

В результате ПЦР-скрининга были выявлены положительные клоны, содержащие вставки целевого гена ЭГП. Для ферментации отобраны клоны:

- ЭГП N19A A1, A3, A4-A8, A10-B1, B3, B4, B6-B9 (17 клонов)
- ЭГП N42A A1, A2, A4, A6-A12, B3-B7, B9, B12 (17 клонов)
- ЭГП N194A A1-A10, B1-B3, B7, B9, B10 (16 клонов)

Отобранные трансформанты культивировали на среде для *P.canescens* 6 суток (30°C, 215 об/мин). Пробы КЖ отбирали на 6 сутки, был проведен ДДС-электрофорез, также в КЖ были определены концентрация общего белка, значения целевой активности по отношению к КМЦ и базовой активности по отношению к ксилану.

ДДС-электрофореграммы КЖ трансформантов, содержащих ген *egII P.verruculosum* с одной из трех мутаций N19A, N42A и N194A, представлены на Рис. 7 (M – маркер, *niaD* – контроль по штамму-реципиенту *P.canescens*). На

электрофореграммах большинства трансформантов наблюдалась полоса, соответствующая белку с молекулярной массой (40 ± 5) кДа, что совпадало с молекулярной массой ЭГП *P.verruculosum* 39 кДа, и отсутствующая в КЖ исходного штамма-реципиента.

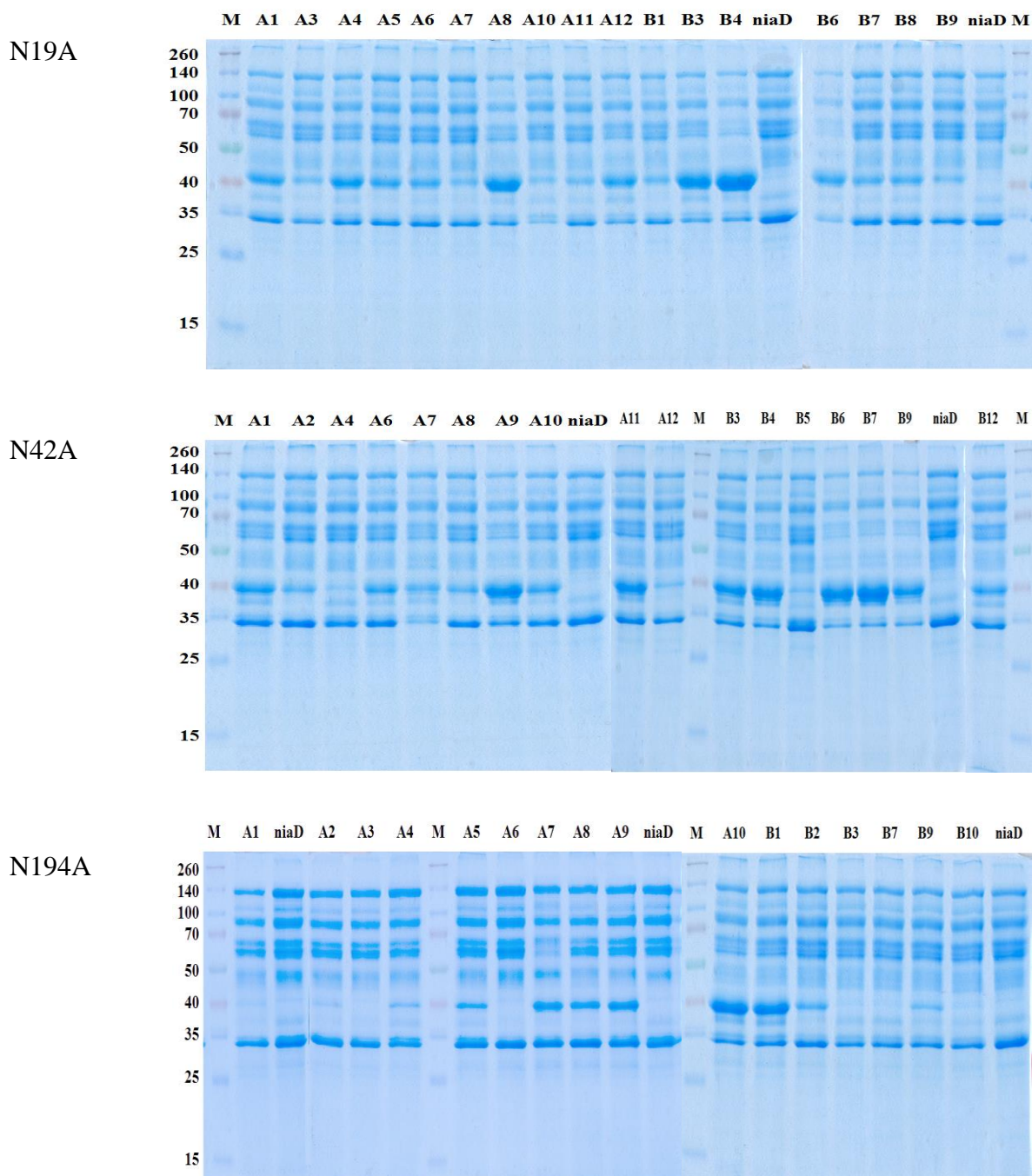
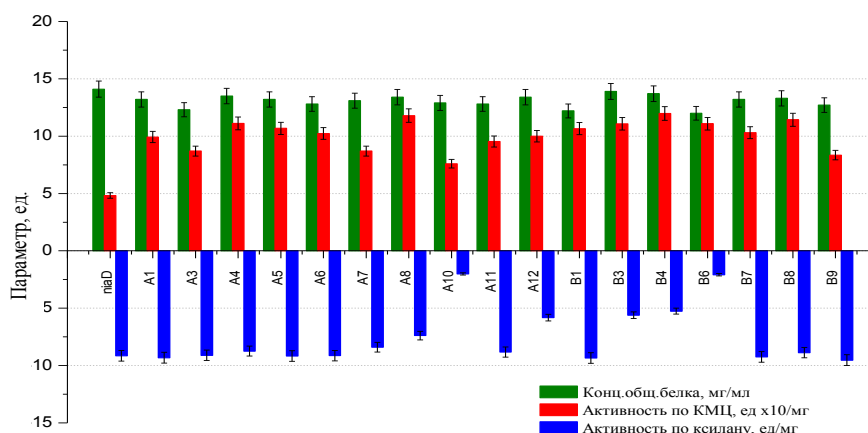


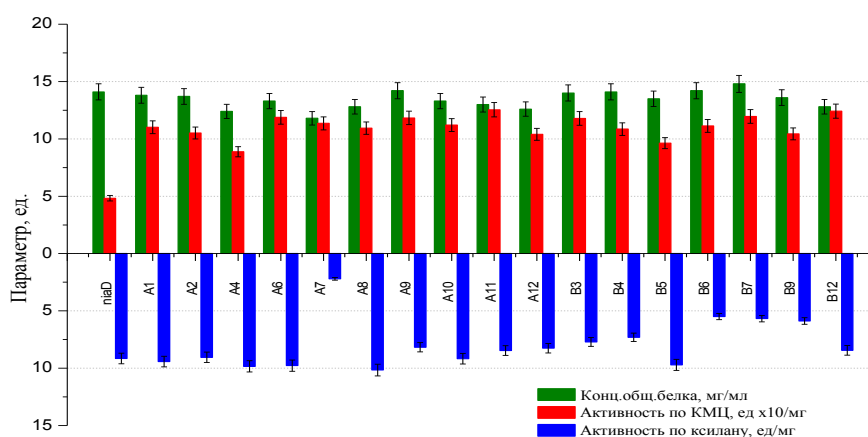
Рис. 7. ДДС-электрофореграммы КЖ трансформантов, содержащих ген *egII* *P.verruculosum* с одной из трех мутаций N19A, N42A и N194A (M – маркер, *niaD* – контроль по штамму-реципиенту *P.canescens*).

Значения концентрации общего белка и ферментативной активности по отношению к КМЦ и ксилану в КЖ трансформантов приведены на Рис. 8.

N19A



N42A



N194A

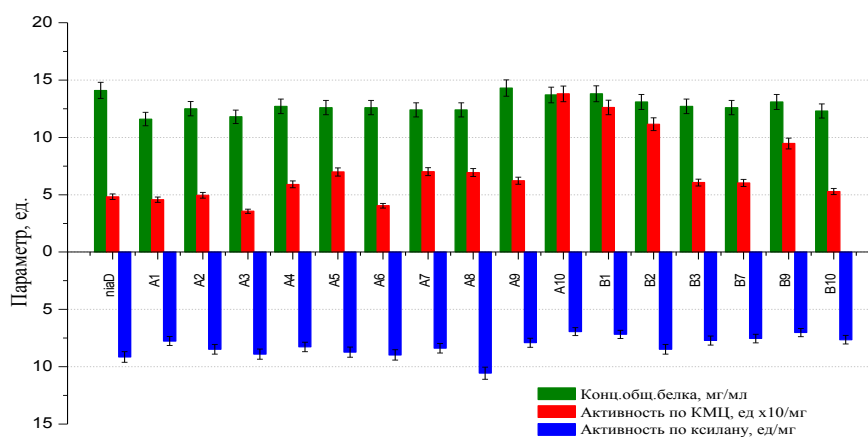


Рис. 8. Значения концентрации общего белка (мг/мл), ферментативной активности по отношению к КМЦ и ксилану (ед/мг общего белка) в КЖ трансформантов, содержащих ген *egII P.verruculosum* с одной из трех мутаций N19A, N42A и N194A (*niaD* – контроль по штамму-реципиенту *P.canescens*).

Для всех трансформантов уровень экспрессии общего белка был сравним с уровнем экспрессии контрольного штамма, следовательно, трансформация штамма-реципиента экспрессионными конструкциями, содержащими мутантный гетерологичный ген *egII* *P.verruculosum*, не привела к потере штаммом жизнеспособности и снижению продуктивности. Практически все трансформанты обладали большей активностью по отношению к специфическому для ЭГП субстрату КМЦ по сравнению с контрольным штаммом-реципиентом. Увеличение активности по отношению к КМЦ в КЖ трансформантов свидетельствовало об экспрессии и секреции ЭГП *P.verruculosum* в каталитически активной форме.

Активность по отношению к ксилану для всех трансформантов оказалась меньше или сравнима с активностью в КЖ контрольного штамма-реципиента. Экспрессионные конструкции, использовавшиеся для трансформации, содержали в качестве регуляторного элемента промоторную область гена ксиланазы А *P.canescens*, поэтому встройка целевого гена *egII* в геном штамма-реципиента происходила по механизму гомологичной рекомбинации и приводила к замещению гена ксиланазы А геном ЭГП, что выражалось в увеличении активности по отношению к КМЦ и уменьшении активности по отношению к ксилану в КЖ трансформантов.

Для ферментации в ферментерах и наработки ФП были выбраны трансформанты, характеризовавшиеся наибольшей среди трансформантов секрецией белка с молекулярной массой (40 ± 5) кДа, наибольшей среди трансформантов активностью по отношению к КМЦ и наименьшей – по отношению к ксилану: ЭГП N19A B4, N42A B7 и N194A A10.

3.2.4. Выделение и очистка ЭГП хроматографическими методами

В результате ферментации были получены ФП *P.canescens*, содержащие мутантные формы ЭГП *P.verruculosum* (рекомб. ЭГП N19A, N42A и N194A). Ранее в нашей лаборатории был получен ФП *P.canescens*, содержащий немутантную форму ЭГП *P.verruculosum* (рекомб. ЭГП) [190]. Рекомбинантные формы ЭГП, содержащиеся в этих ФП, были выделены из ФП методом ионообменной хроматографии и очищены методом гидрофобной хроматографии. Типичная хроматограмма и соответствующая ей ДДС-электрофореграмма, полученные в результате анионообменной хроматографии ФП, представлены на Рис. 9.

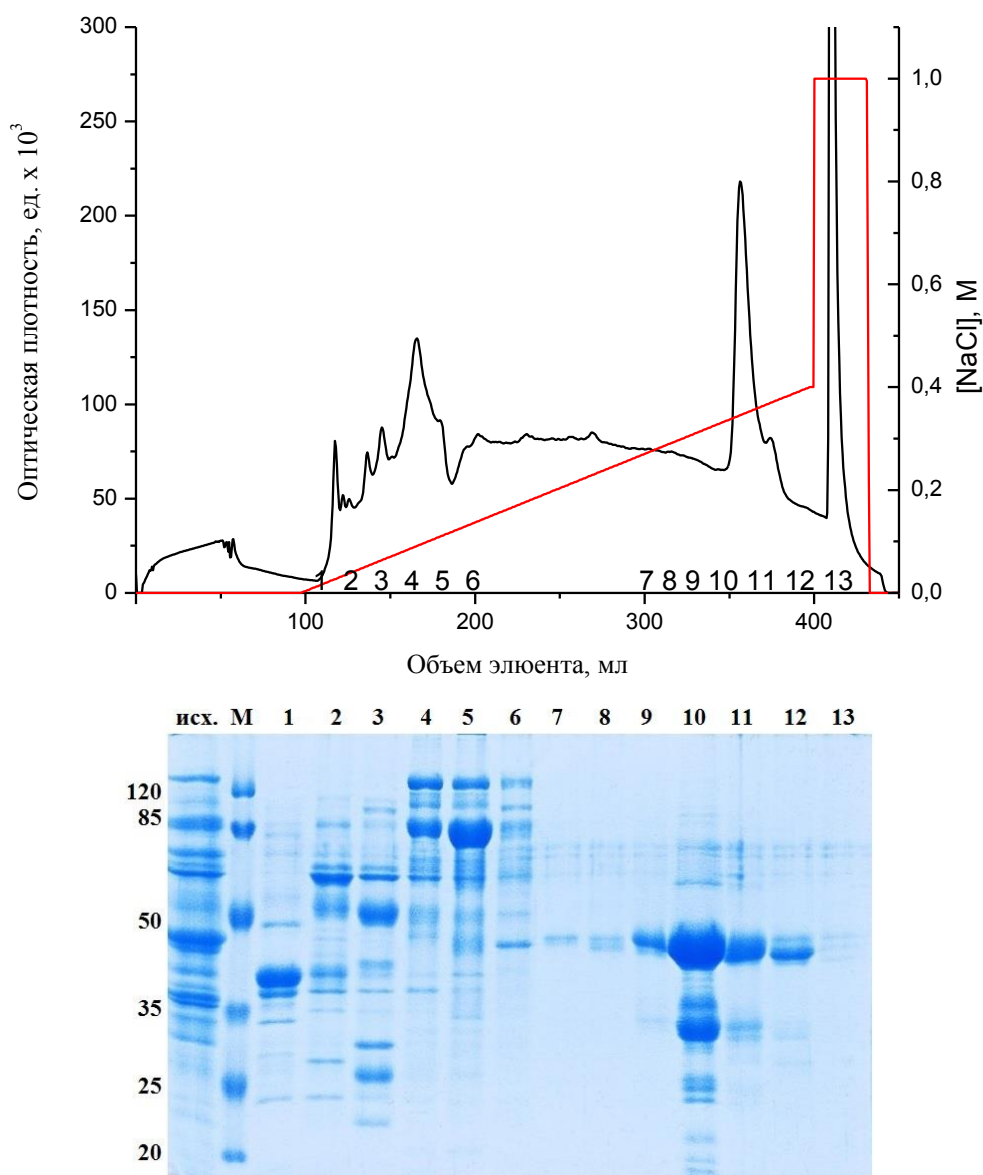


Рис. 9. Хроматограмма и ДДС-электрофореграмма фракций, полученных в результате анионообменной хроматографии ФП, содержащего мутантную форму ЭГП N19A *P.verruculosum* (M – маркер, исх. – исходный ФП до разделения белков методом анионообменной хроматографии).

Белки в фракциях 10-11 (концентрации NaCl в элюирующем растворе 0,3-0,4 М) по молекулярной массе и ферментативной активности соответствовали ЭГП *P.verruculosum*. Положение пика оптической плотности на хроматограммах, тем не менее, было различным для различных форм ЭГП (Рис. 10). На хроматограммах, полученных в результате анионообменной хроматографии ФП пик, соответствовавший ЭГП *P.verruculosum*, экспрессированной в *P.canescens* (рекомб. ЭГП), как и пик, соответствовавший ЭГП *P.verruculosum*, экспрессированной в *P.verruculosum* (нативн. ЭГП), находился в области концентраций NaCl 0,33-0,37 М [147]. Для рекомб. ЭГП и рекомб. ЭГП N19A положения пиков совпадали, для рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A пик оказался сдвинут в область больших концентраций NaCl 0,35-0,39 М (Рис. 10). Это возможно в том случае, если при изменении степени гликозилирования на поверхности белковой глобулы оказывается большее число отрицательно заряженных групп или поверхность белковой глобулы становится более открытой для взаимодействия с хроматографическим носителем, за счет чего молекулы рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A эффективнее удерживаются носителем.

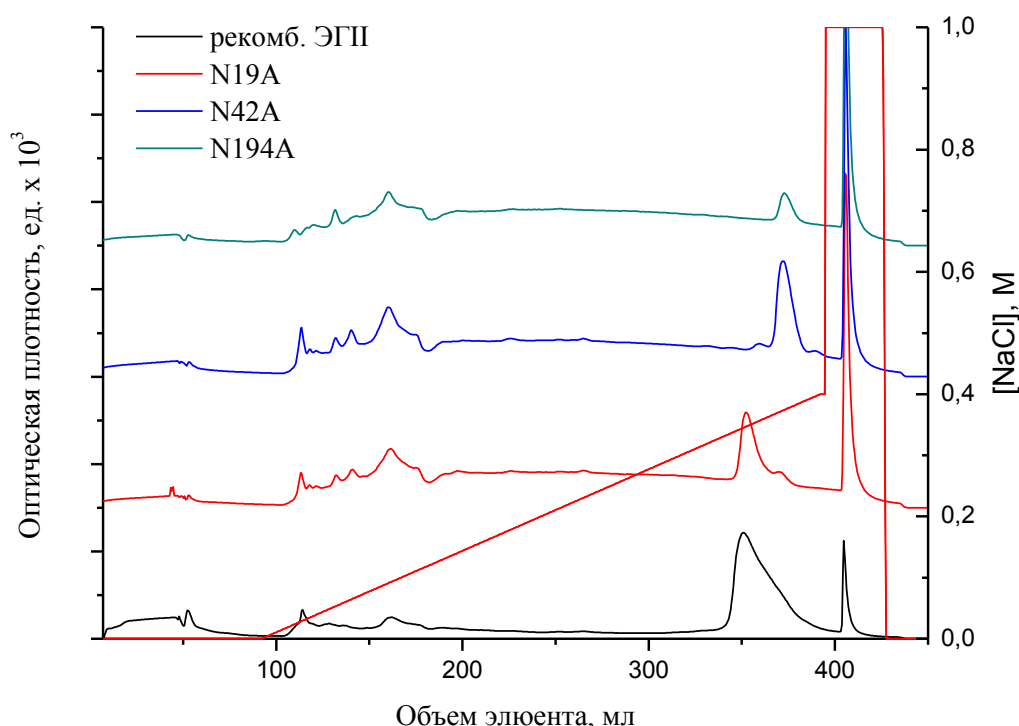


Рис. 10. Хроматограммы, полученные в результате анионообменной хроматографии ФП, содержащих рекомбинантные (немутантная и мутантные) формы ЭГП *P.verruculosum*.

Дальнейшее разделение фракций осуществляли методом гидрофобной хроматографии. Типичная хроматограмма и соответствующая ей ДДС-электрофореграмма, полученные в результате гидрофобной хроматографии фракций, представлены на Рис. 11.

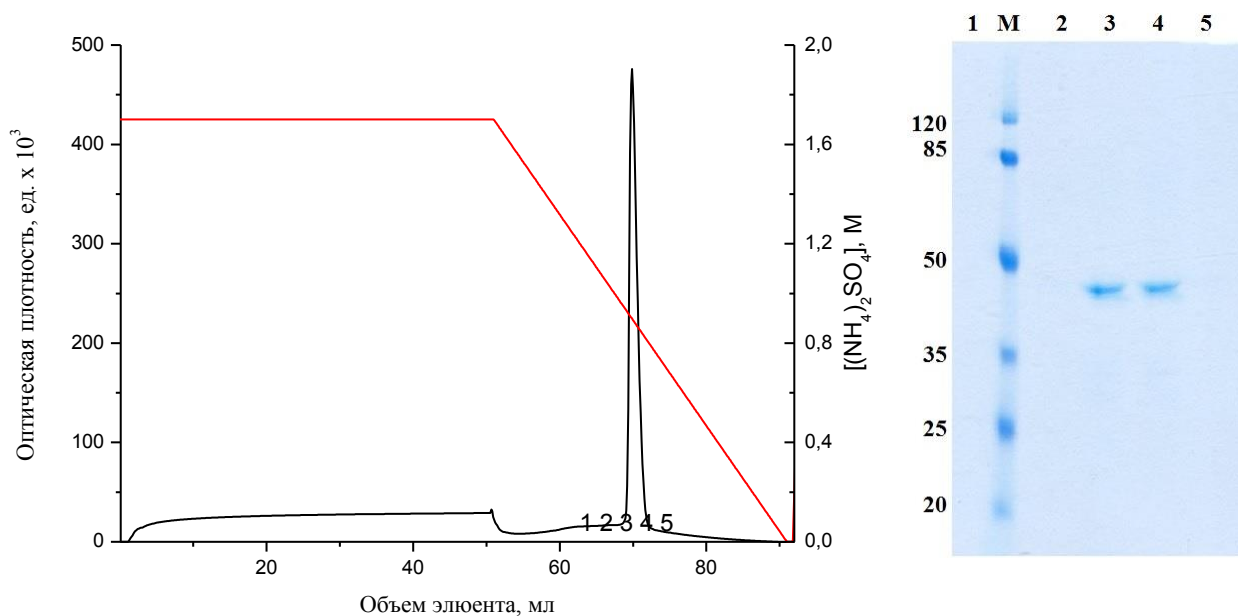


Рис. 11. Хроматограмма и ДДС-электрофореграмма фракций, полученных в результате гидрофобной хроматографии фракции анионообменной хроматографии ФП, содержащего мутантную форму ЭГП N194A *P.verruculosum*.

Положения пиков оптической плотности на хроматограммах отличались для различных форм ЭГП (Рис. 12). Положения пиков рекомб. ЭГП, нативн. ЭГП [147] и рекомб. ЭГП N19A совпадали (1,15-1,01 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), для рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A пик оказался сдвинут в область меньшей концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,01-0,83 М. В случае рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A это, возможно, означает, что на поверхности белковой глобулы оказывается больше гидрофобных участков или они становятся более доступны для взаимодействия с носителем по сравнению с рекомб. ЭГП и рекомб. ЭГП N19A.

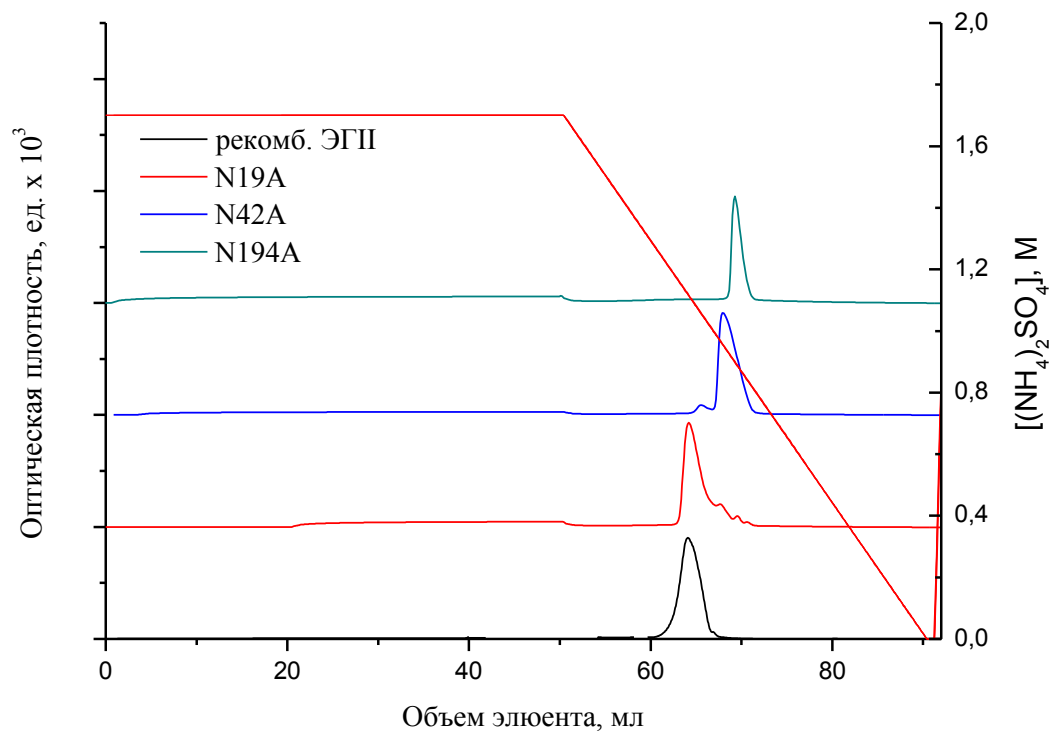


Рис. 12. Хроматограммы, полученные в результате гидрофобной хроматографии фракций ФП, содержащих рекомбинантные (немутантная и мутантные) формы ЭГП *P.verruculosum*.

Фракции, по молекулярной массе и ферментативной активности соответствовавшие ЭГП *P.verruculosum*, были сконцентрированы с использованием мембранных колонок. На Рис. 13 приведена ДДС-электрофореграмма гомогенных ферментов: немутантные (нат. – нативная форма, рек. – рекомбинантная форма) и мутантные формы ЭГП *P.verruculosum* (N19A, N42A и N194A). Масс-спектрометрический анализ полос, по массе соответствовавших ЭГП, позволил подтвердить структуру различных форм ЭГП, а также определить сайты N-гликозилирования и структуру N-связанных гликанов.

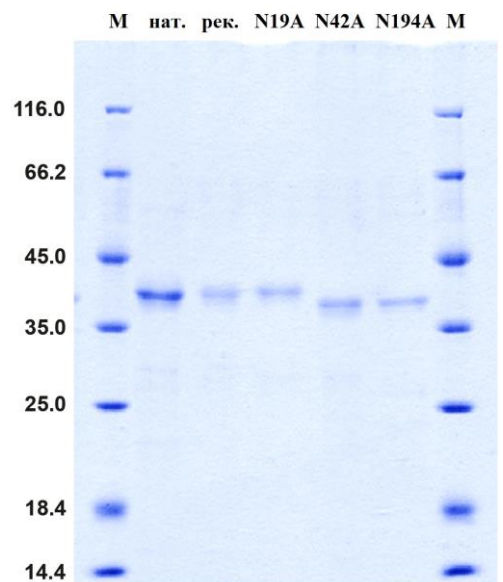


Рис. 13. ДДС-электрофореграмма немутантных и мутантных форм ЭГП *P.verruculosum*.

3.2.5. Масс-спектрометрический анализ ЭГП

Для всех выделенных рекомбинантных форм ЭГП (рекомб. ЭГП, рекомб. ЭГП N19A, N42A и N194A), а также для нативной формы ЭГП (нативн. ЭГП) масс-спектрометрическим анализом была подтверждена первичная структура, в случае мутантных форм подтверждено наличие необходимых а.к. замен (Рис. 14).

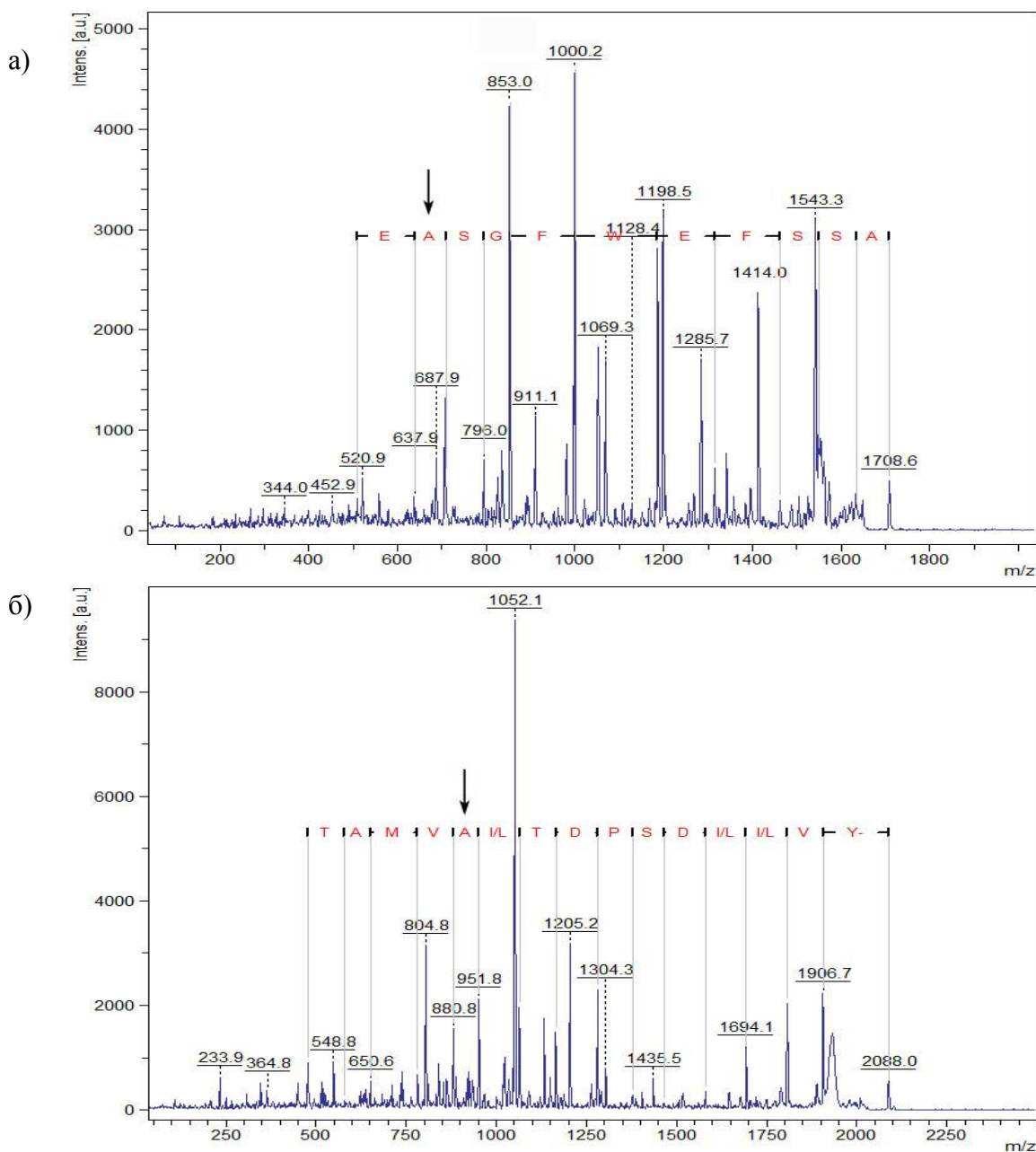


Рис. 14. Спектры фрагментации, подтверждающие наличие необходимых а.к. замен в мутантных формах рекомб. ЭГП. Спектр фрагментации пика с значением (а) m/z 1708,6, полученный в результате масс-спектрометрического анализа рекомб. ЭГП N19A (для расщепления использован химотрипсин), (б) m/z 2088,0, полученный в результате масс-спектрометрического анализа рекомб. ЭГП N194A (для расщепления использован химотрипсин), стрелкой указано положение необходимых мутаций.

Для форм рекомб. ЭГП N19A и N194A наличие необходимых мутаций подтверждено спектрами фрагментации (Рис. 14), для рекомб. ЭГП N42A спектр фрагментации получить не удалось, однако в масс-спектре был обнаружен пик с m/z 2037,0, подтверждающий наличие необходимой мутации.

В Приложении 1 приведены положения пиков, соответствующих пептидам ЭГП и подтверждающих наличие а.к. замен, а также положения пиков, соответствующих различным гликопептидам ЭГП.

Сайты N-гликозилирования и структуры N-связанных гликанов, установленные с использованием сервиса Glycomod, приведены в Таблице 4.

Таблица 4. Сайты N-гликозилирования и структура N-связанных гликанов, установленные с использованием сервиса GlycoMod, для рекомбинантных (немутантная и мутантные) и нативной форм ЭГП *P.verruculosum*.

Сайт N-гликозилирования	Структура N-связанных гликанов				
	рекомб. ЭГП	рекомб. ЭГП N19A	рекомб. ЭГП N42A	рекомб. ЭГП N194A	нативн. ЭГП
N19	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
N42	(Man) ₄₋₈ (GlcNAc) ₂	(Man) ₂₋₉ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₂₋₉ (GlcNAc) ₂	(Man) ₄₋₈ (GlcNAc) ₂
N194	(Man) ₁₋₈ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁₋₈ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁₋₈ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₁₋₈ (GlcNAc) ₂

н.д. – не детектировано

В результате масс-спектрометрического анализа N-гликозилирование было детектировано для сайтов N42 и N194, в случае сайта N19 гликозилирование обнаружено не было. В случае сайтов N42 и N194 N-связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды, при этом сайт N42 оказался гликозилирован в большей степени, чем сайт N194 (Таблица 4).

Для грибных целлюлаз показано, что N-связанные гликаны в большинстве случаев представляют собой высокоманнозные олигосахариды общей структуры (Man)_x(GlcNAc)₂, олигосахариды различной длины образуются в результате ферментативного «тримминга» под действием маннозидаз и некоторых других ферментов [112]. При этом для ЭГ характерна меньшая степень гликозилирования, чем для ЦБГ: для ЦБГ I и ЦБГ II штаммов родов *Aspergillus* и *Trichoderma* обнаружено N-гликозилирование с $x=5-20$ [112, 116-119], для ЭГ *T.reesei* N-связанные гликаны представляют собой структуры (Man)_x(GlcNAc)₂ с $x=3-5$ или единичный остаток GlcNAc [117]. Таким образом, невысокая степень

N-гликозилирования, обнаруженная для ЭГП *P.verruculosum*, хорошо согласуется с литературными данными. В то же время для ЭГ *C.lucknowense* (*M.thermophila*) N-связанные гликаны представляют собой не высокоманнозные олигосахариды, а гибридные/комплексные гликаны общей структуры $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_x$ [119], что свидетельствует о возможности реализации различных типов гликозилирования в грибных целлюлазах. То, что для ЭГП *P.verruculosum* обнаружены высокоманнозные гликаны, как для целлюлаз штаммов родов *Aspergillus* и *Trichoderma*, может свидетельствовать о одинаковых механизмах гликозилирования в штаммах этих родов.

3.2.6. Анализ биохимических и каталитических свойств ЭГП

Биохимические и каталитические свойства мутантных форм ЭГП *P.verruculosum* были проанализированы в сравнении с свойствами немутантных нативной и рекомбинантной форм ЭГП. Рекомбинантные мутантные (рекомб. ЭГП N19A, N42A и N194A) и немутантная (рекомб. ЭГП) формы ЭГП были выделены и очищены как описано выше, нативная немутантная форма ЭГП (нативн. ЭГП) была выделена и исследована в нашей лаборатории ранее [146, 147]. Для мутантных и немутантных форм ЭГП были определены такие биохимические свойства, как рН- и температурные оптимумы активности по отношению к специфическому субстрату β -глюкану, термостабильность, значения рI, степень адсорбции на МКЦ, и такие каталитические свойства, как ферментативная активность по отношению к ряду субстратов и каталитические параметры гидролиза β -глюкана.

Определение рН-профиля активности ферментов проводили путем измерения активности ферментов по отношению к специфическому субстрату β -глюкану в диапазоне значений рН от 2,5 до 7,0 (0,1 М универсальный буфер, 50°C). рН-Профили относительной активности приведены на Рис. 15.

Как видно из экспериментальных данных, мутантные и немутантные формы ЭГП *P.verruculosum* обладали схожими рН-профилями, однако оптимумы активности отличались: рН-оптимум активности для рекомб. ЭГП, нативн. ЭГП и рекомб. ЭГП N19A составлял 4,5, а для рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A составлял 5,0 (Рис. 15).

Как было показано выше, при выделении ферментов хроматографическими методами, свойства поверхности белковой глобулы для мутантных и немутантных форм значительно отличались. Возможно, свойства поверхности влияют на значение рН микроокружения белковой глобулы и, таким образом, влияют и на значение рН-оптимума активности.

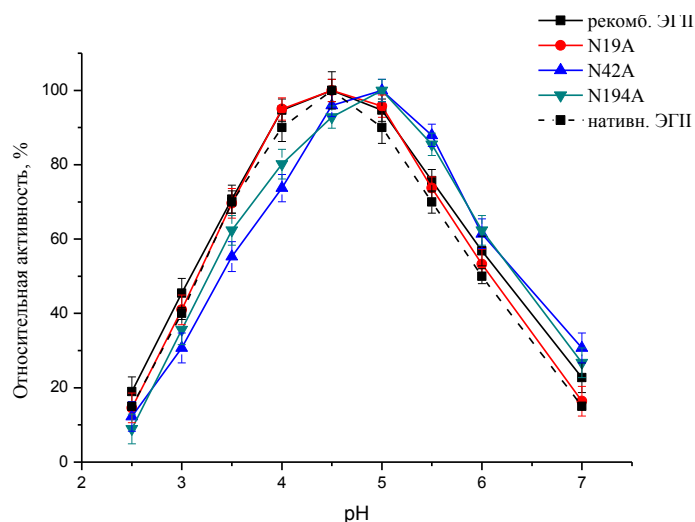


Рис. 15. pH-Профили относительной активности рекомбинантной немутантной (рекомб. ЭГП), рекомбинантных мутантных (N19A, N42A и N194A) и нативной немутантной (нативн. ЭГП) форм ЭГП *P.verruculosum* по отношению к β -глюкану (0,1 М универсальный буфер, 50°C).

Определение температурного профиля активности ферментов проводили путем измерения активности ферментов по отношению к β -глюкану в pH-оптимуме их действия (в данном случае использовали 0,1М универсальный буфер, pH 4,5 – для рекомб. ЭГП, нативн. ЭГП и рекомб. ЭГП N19A, pH 5,0 – для рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A) при различных температурах в диапазоне 30-80°C. На Рис. 16 приведены температурные профили активности ферментов по отношению к β -глюкану.

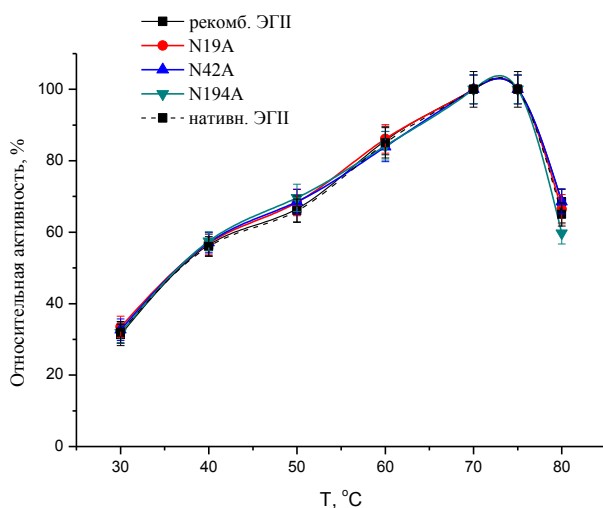


Рис. 16. Температурные профили относительной активности рекомбинантной немутантной (рекомб. ЭГП), рекомбинантных мутантных (N19A, N42A и N194A) и нативной немутантной (нативн. ЭГП) форм ЭГП *P.verruculosum* по отношению к β -глюкану (0,1 М универсальный буфер, pH 4,5 – для рекомб. ЭГП, нативн. ЭГП и рекомб. ЭГП N19A, pH 5,0 – для рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A).

Профили температурной зависимости оказались одинаковыми для мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum*, все формы характеризовались одинаковым температурным оптимумом активности 70°C.

Для исследования термостабильности растворы ферментов (0,1М универсальный буфер, рН 4,5 – для рекомб. ЭГП, нативн. ЭГП и рекомб. ЭГП N19A, рН 5,0 – для рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A) инкубировали при различных температурах в диапазоне 40-80°C. В процессе инкубации отбирали аликвоты инкубируемых растворов, в которых определяли остаточную активность по отношению к β -глюкану. Результаты отображали в виде зависимости остаточной активности (в процентах от исходной) от времени инкубации при определенной температуре.

Термостабильность мутантных и немутантных форм ЭГП оказалась одинаковой. На Рис. 17 показаны кривые термоинактивации различных форм ЭГП.

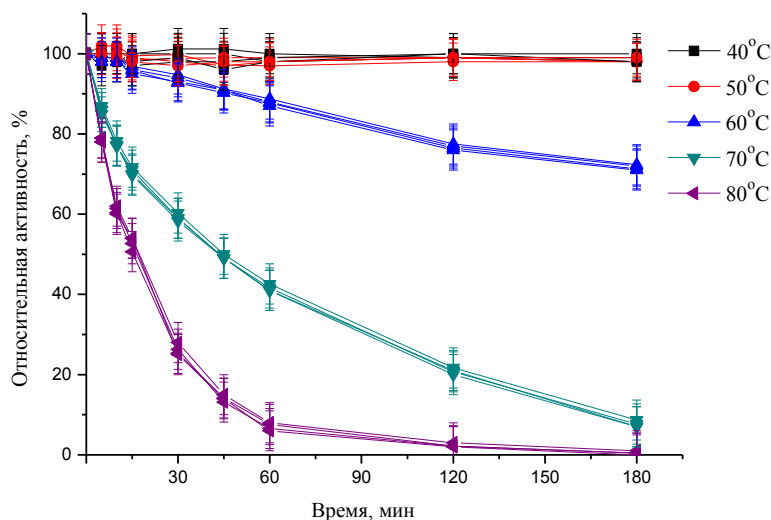


Рис. 17. Термостабильность рекомбинантной немутантной (рекомб. ЭГП), рекомбинантных мутантных (N19A, N42A и N194A) и нативной немутантной (нативн. ЭГП) форм ЭГП *P.verruculosum* при 40-80°C (0,1 М универсальный буфер, рН 4,5 – для рекомб. ЭГП, нативн. ЭГП и рекомб. ЭГП N19A, рН 5,0 – для рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A).

Мутантные и немутантные формы ЭГП были стабильны при 40 и 50°C в течение 3 ч, за 3 ч инкубации при 60°C все формы ЭГП сохранили (74±5)% активности, время полуинактивации при 70°C составило (45±3) мин, при 80°C (17±2) мин.

Для мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum* было осуществлено изоэлектрическое фокусирование, при этом значения pI всех форм оказались меньше или

равны 2, поэтому при использовании стандартных смесей амфолинов диапазона рН 2-11 оказалось невозможным точно определить значения рI форм. По результатам выделения белков хроматографическими методами, как было отмечено выше, возможно сделать лишь качественный вывод об изменении заряда поверхности форм, основываясь на сравнении положений пиков ЭГП на хроматограммах.

Для мутантных и немутантных форм ЭГП была определена активность по отношению к специфическим субстратам (β -глюкан и КМЦ), а также активность по отношению к неспецифическим субстратам (МКЦ, ксилан, *n*-НФ- β -Целл, *n*-НФ- β -Лак, *n*-НФ- β -Глюк). Результаты представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Активность мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum* по отношению к различным субстратам.

Субстрат	Активность, ед/мг				
	рекомб. ЭГП	рекомб. ЭГП N19A	рекомб. ЭГП N42A	рекомб. ЭГП N194A	нативн. ЭГП
β -глюкан	60 \pm 3	53 \pm 3	68 \pm 3	81 \pm 4	61 \pm 3
КМЦ	57 \pm 3	42 \pm 2	64 \pm 3	75 \pm 4	50 \pm 4
МКЦ	~0,008	~0,008	~0,008	~0,008	~0,008
ксилан	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
<i>n</i> -НФ- β -Целл	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
<i>n</i> -НФ- β -Лак	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
<i>n</i> -НФ- β -Глюк	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.

н.д. – не детектирована

Из трех осуществленных мутаций: N19A, N42A и N194A – положительными оказались мутации N42A и N194A. Мутация N194A привела к большему положительному эффекту (при гидролизе β -глюкана и КМЦ), чем N42A, и ни одна из мутаций не привела к изменению субстратной специфичности. Активность мутантных форм ЭГП N42A и N194A по отношению к специфическому субстрату КМЦ оказалась соответственно на 10% и 29% выше по сравнению с немутантной формой, активность по отношению к специфическому субстрату β -глюкану оказалась на 12% и 35% выше по сравнению с немутантной формой. Активность по отношению к неспецифическому субстрату МКЦ

практически не отличалась для мутантных и немутантной форм. Активность по отношению к ксилану, *n*-НФ- β -Целл, *n*-НФ- β -Лак, *n*-НФ- β -Глюк не была обнаружена.

Следует отметить, что каталитические свойства немутантных форм ЭГП, экспрессированных в *P.verruculosum* и *P.canescens*, как и биохимические свойства, оказались одинаковыми. Таким образом, экспрессия ЭГП *P.verruculosum* в *P.canescens* не привела к изменению свойств ЭГП.

Для мутантных и немутантных форм ЭГП были определены каталитические параметры гидролиза β -глюкана (Рис. 18, Таблица 6).

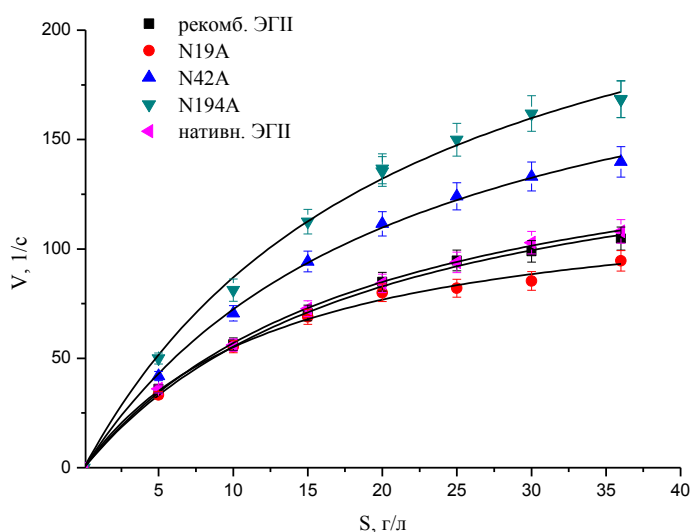


Рис. 18. Зависимость начальной скорости гидролиза β -глюкана под действием рекомбинантной немутантной (рекомб. ЭГП), рекомбинантных мутантных (N19A, N42A и N194A) и нативной немутантной (нативн. ЭГП) форм ЭГП *P.verruculosum* (50°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0) от концентрации субстрата.

Таблица 6. Каталитические параметры гидролиза β -глюкана под действием мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum* (50°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0).

Параметр	Форма ЭГП				
	рекомб. ЭГП	рекомб. ЭГП N19A	рекомб. ЭГП N42A	рекомб. ЭГП N194A	нативн. ЭГП
K_m (мг/мл)	20 ± 3	13 ± 2	21 ± 2	22 ± 2	19 ± 2
k_{cat} (с ⁻¹)	165 ± 10	127 ± 5	227 ± 7	275 ± 12	166 ± 12

Мутация N19A привела к уменьшению значений K_m и k_{cat} , мутации N42A и N194A привели к увеличению значения k_{cat} при сохранении значения K_m . Следует отметить, что остаток Asn19 находится внутри белковой глобулы рядом с каталитически активными

остатками Glu142, Glu249 и Arg58. Кроме того, Asn19 находится в консервативной области а.к. последовательности ЭГП. Вероятно, остаток Asn19 принимает участие в связывании субстрата и катализе гидролиза, поэтому мутация N19A приводит к уменьшению каталитических параметров гидролиза. Остатки Asn42 и Asn194 находятся соответственно у входа и выхода «ущелья» активного центра. Гликаны на поверхности белковой глобулы, присоединенные к этим сайтам, могут взаимодействовать с субстратом за счет образования водородных связей. Было возможным ожидать, что мутации N42A и N194A повлияют на эффективность связывания фермента с субстратом и, таким образом, повлияют на значение K_m . Однако, значения K_m оказались одинаковыми для мутантных N42A и N194A и немутантных форм. При этом значения k_{cat} для форм N42A и N194A оказались выше значений для немутантных форм, это возможно объяснить тем, что гликаны на поверхности белковой глобулы влияют на скорость диссоциации фермента с поверхности полисахаридной цепи, в этом случае отсутствие гликанов увеличивает скорость диссоциации.

Для различных форм ЭГП была определена адсорбционная способность по отношению к нерастворимому субстрату МКЦ (Таблица 7).

Таблица 7. Степень адсорбции мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum* (0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0, 6°C).

	Форма ЭГП				
	рекомб. ЭГП	рекомб. ЭГП N19A	рекомб. ЭГП N42A	рекомб. ЭГП N194A	нативн. ЭГП
Степень адсорбции, %	7,0 ± 0,3	7,6 ± 0,3	6,9 ± 0,2	7,1 ± 0,2	7,0 ± 0,3

Степень адсорбции для немутантных форм рекомб. ЭГП и нативн. ЭГП оказалась одинаковой. Степень адсорбции мутантных форм рекомб. ЭГП N19A, N42A и N194A оказалась сопоставима с степенью адсорбции рекомб. ЭГП.

Для сравнения осаживающей способности мутантных и немутантных форм ЭГП был осуществлен гидролиз полимерных субстратов (МКЦ, β-глюкан и измельченная древесина осина) под действием гомогенных ЭГП.

Исчерпывающий гидролиз β-глюкана был проведен при 50°C в 0,1М Na-ацетатном буфере, pH 4,5 – для рекомб. ЭГП, нативн. ЭГП и рекомб. ЭГП N19A, pH 5,0 – для рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A, в соответствии с pH-оптимумами активности ферментов по отношению к β-глюкану. Гидролиз был проведен под действием ЭГП в

присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл) для предотвращения ингибирования активности ЭГП продуктами гидролиза [147, 180].

Следует отметить, что при отсутствии в реакционной среде β -глюкозидазы олигосахариды, образующиеся в процессе гидролиза β -глюкана под действием ЭГП, ингибировали каталитическую активность ЭГП. Скорость гидролиза сильно уменьшалась уже при 10% конверсии субстрата, гидролиз практически прекращался через 1 ч, через 3 ч степень конверсии субстрата не превышала 18%.

Добавление в реакционную смесь β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл) позволило избежать ингибирования и полностью гидролизовать β -глюкан до глюкозы за 3 часа при концентрации ЭГП 0,01 мг/мл, что соответствовало дозировке 2 мг/г субстрата. Гидролитическая способность мутантных форм N42A и N194A оказалась выше, а формы N19A – ниже способности немутантных форм (Рис. 19).

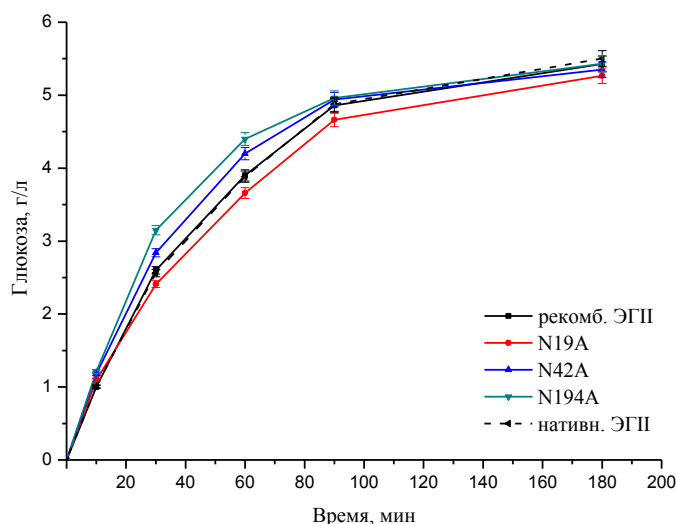


Рис. 19. Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе β -глюкана (5 мг/мл) под действием мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum* (50°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 4,5 – для рекомб. ЭГП, нативн. ЭГП и рекомб. ЭГП N19A, pH 5,0 – для рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A, в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), концентрация ЭГП 0,01 мг/мл.

На Рис. 20 приведены кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ под действием мутантных и немутантных форм ЭГП. В качестве контроля был также осуществлен гидролиз МКЦ под действием β -глюкозидазы *A.niger* (при отсутствии ЭГП).

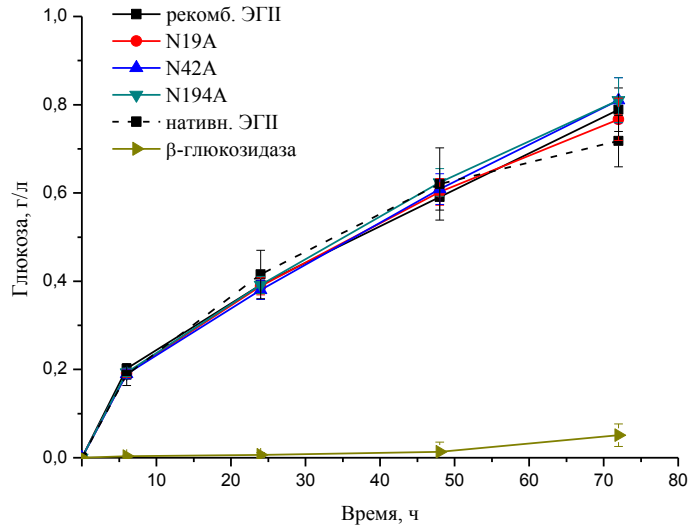


Рис. 20. Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ (5 мг/мл) под действием мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum*. (50°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0, в присутствии β-глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл)), концентрация ЭГП 0,1 мг/мл.

Гидролитическая способность мутантных и немутантных форм ЭГП по отношению к МКЦ оказалась значительно ниже гидролитической способности по отношению к β-глюкану. Это подтверждает, что МКЦ является неспецифическим субстратом для ЭГП, при этом гидролитическая способность различных форм ЭГП оказалась одинаковой.

Также был проведен гидролиз измельченной древесины осины под действием мутантных и немутантных форм ЭГП в присутствии β-глюкозидазы *A.niger*. Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе измельченной древесины осины под действием мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum* приведены на Рис. 21.

При концентрации ЭГП 0,025 мг/мл наибольшее различие в концентрации глюкозы наблюдалось через 24 ч гидролиза. Выход глюкозы в случае рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A был выше на 9,8 и 25% соответственно, в случае рекомб. ЭГП N19A – на 7,7% ниже по сравнению с рекомб. ЭГП и нативн. ЭГП. При концентрации ЭГП 0,1 мг/мл наибольшее различие в концентрации глюкозы наблюдалось также через 24 ч гидролиза. Выход глюкозы в случае рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A был выше на 10,5 и 26,9% соответственно, в случае рекомб. ЭГП N19A – на 10,2% ниже по сравнению с рекомб. ЭГП и нативн. ЭГП.

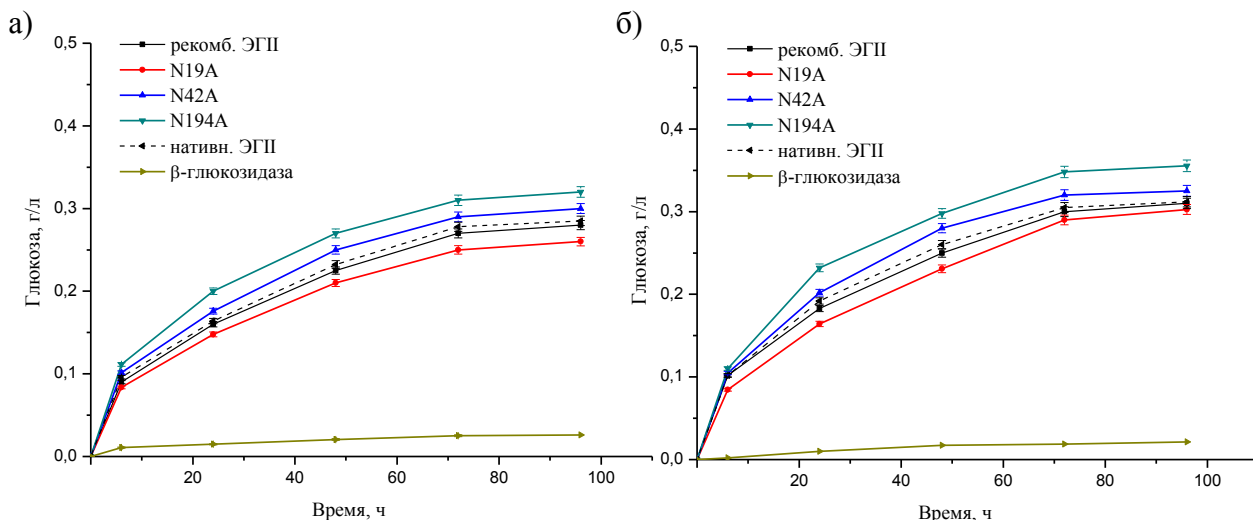


Рис. 21. Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе измельченной древесины осины (5 мг/мл) под действием мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum* (50°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 4,5 – для рекомб. ЭГП, нативн. ЭГП и рекомб. ЭГП N19A, рН 5,0 – для рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A, в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), концентрация ЭГП 0,025 мг/мл (а) и 0,1 мг/мл (б).

Выход глюкозы при гидролизе измельченной древесины осины под действием мутантных и немутантных форм ЭГП при концентрации ЭГП 0,025 мг/мл и 0,1 мг/мл, что соответствовало дозировке ферментов 5 и 20 мг на 1 г субстрата, не превышал 15% от теоретически возможного. Согласно литературным данным [147] для эффективного гидролиза ЦСМ необходимо в первую очередь разрушить кристаллическую форму целлюлозы, поэтому низкий выход глюкозы при гидролизе древесины осины может определяться низкой активностью ЭГП по отношению к МКЦ.

Следует также отметить, что увеличение дозировки ЭГП с 5 до 20 мг на 1 г субстрата при гидролизе древесины осины незначительно увеличивало выход глюкозы. Возможно, это определяется низкой доступностью для действия ЭГП аморфной целлюлозы в составе ЦСМ и низкой активностью ЭГП по отношению к кристаллической форме целлюлозы.

В структуре ЭГП *P.verruculosum* было найдено три теоретических сайта N-гликозилирования: N19, N42 и N194. Для исследования роли каждого из сайтов в проявлении биохимических и каталитических свойств в структуру ЭГП были внесены точечные аминокислотные замены, приводящие к удалению одного из сайтов гликозилирования. Три мутантные формы ЭГП: N19A, N42A и N194A – были выделены и исследованы.

Масс-спектрометрическим анализом мутантных и немутантных форм ЭГП было показано, что два из трех теоретических сайтов гликозилированы: N42 и N194. Также масс-спектрометрическим анализом была определена структура N-связанных гликанов. N-Связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды структуры $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$, где x составлял 1-9.

Мутантные и немутантные формы ЭГП *P.verruculosum* обладали схожими рН-профилями, однако оптимумы активности отличались: рН-оптимум активности для немутантных форм, нативн. ЭГП и рекомб. ЭГП, и мутантной формы рекомб. ЭГП N19A составлял 4,5, а для мутантных форм рекомб. ЭГП N42A и рекомб. ЭГП N194A составлял 5,0. Мутантные и немутантные формы характеризовались одинаковыми Т-профилями активности и термостабильностью.

Две из трех осуществленных мутаций оказались положительными, внесение в структуру ЭГП мутаций N42A и N194A привело к увеличению каталитической активности по отношению к КМЦ и β -глюкану и гидролитической способности по отношению к β -глюкану и измельченной древесине осины.

На Рис. 22 приведена трехмерная модель ЭГП из *P.verruculosum*, два из трех теоретических сайтов N-гликозилирования находятся на поверхности белковой глобулы и гликозилированы. Сайт Asn19, напротив, находится внутри белковой глобулы в непосредственной близости от остатка Arg58, который принимает участие в катализе. Аминокислотная замена N19A, вероятно, изменяет структуру активного центра, что приводит к уменьшению каталитической активности ЭГП.

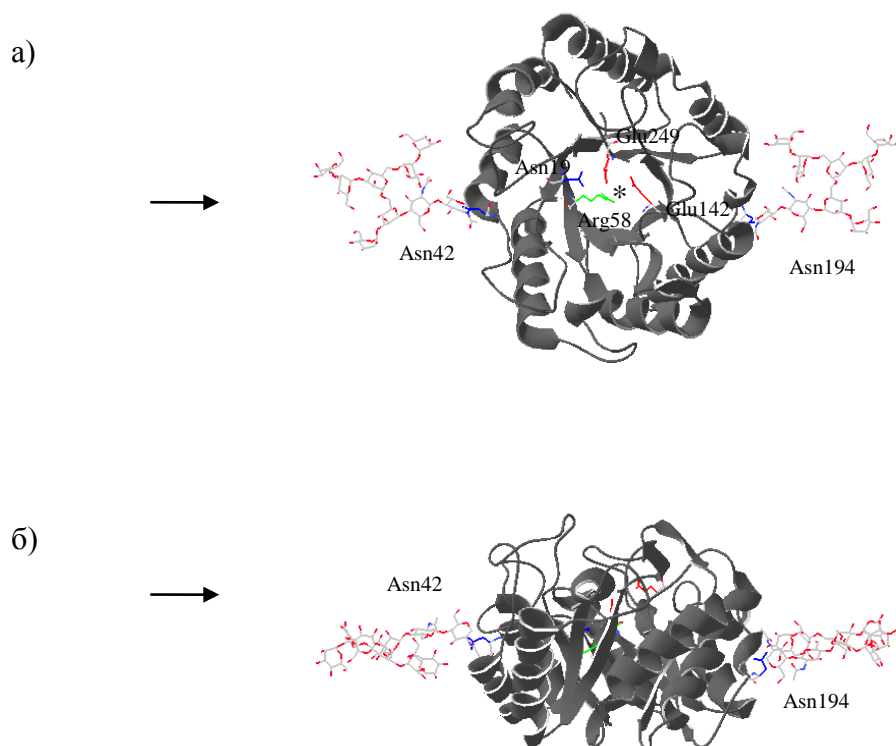


Рис. 22. Трехмерная модель ЭГП *P.verruculosum* с N-связанными гликанами структуры $(\text{Man})_7(\text{GlcNAc})_2$. Серым цветом указана а.к. последовательность, красным цветом указаны атомы кислорода в составе N-связанных гликанов и каталитически активные остатки Glu142 и Glu249, зеленым – остаток Arg58, синим – остатки Asn19, Asn42 и Asn194, входящие в состав теоретических сайтов N-гликозилирования, знаком * указан активный центр, стрелками показано направление полисахаридной цепи субстрата: а) вид со стороны активного центра, б) вид сбоку.

Сайты Asn42 и Asn194 находятся соответственно у входа и выхода «ущелья» активного центра. Гликаны на поверхности белковой глобулы, присоединенные к этим сайтам, могут взаимодействовать с субстратом за счет образования водородных связей и, вероятно, влияют на скорость диссоциации фермента с поверхности полисахаридной цепи, в этом случае отсутствие гликанов увеличивает скорость диссоциации, что приводит к увеличению каталитической активности.

3.3. Белковая инженерия целлюбиогидролазы II *Penicillium verruculosum*

3.3.1. Анализ аминокислотной последовательности ЦБГ II *Penicillium verruculosum*

Множественное выравнивание было осуществлено для аминокислотных последовательностей ЦБГ II *P.verruculosum* и целлюбиогидролаз из 6-й семьи гликозид-гидролаз *T.cellulolyticus* (степень гомологии с ЦБГ II *P.verruculosum* 94,5%), *P.brasilianum* (76,6%), *A.niger* (72,3%), *A.kawachii* (71,9%), *T.harzianum* (60,8%) и *T.reesei* (62,6%). Для ЦБГ *T.reesei* разрешена кристаллографическая структура. Множественное выравнивание было использовано для поиска теоретических сайтов N-гликозилирования, а также для поиска консервативных участков последовательности, которые могут быть значимы для проявления каталитических свойств фермента.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ЦБГ II приведено на Рис. 23, нумерация аминокислотных остатков здесь и далее соответствует структуре белков без сигнального пептида. Для ЦБГ II *T.reesei* (*Hypocrea jecorina*) разрешена кристаллографическая структура и определены остатки, принимающие участие в связывании и гидролизе полисахаридной цепи [191].

Консервативными в структуре ЦБГ II *P.verruculosum* являются каталитически активные остатки аспарагиновой кислоты Asp165-Asp211-Asp391, а также остатки, находящиеся рядом с каталитически активными и формирующие трехмерную структуру активного центра. Также консервативными являются остатки, отвечающие за связывание полисахаридной цепи за счет «стекинг-взаимодействия» и водородных связей. «Стекинг-взаимодействие» с гликозидными кольцами субстрата осуществляется за счет ароматических остатков Trp123, Trp259 и Trp357, функция остатка Trp262 состоит в направлении полисахаридной цепи в «туннель» активного центра. Водородные связи осуществляются за счет остатков Tyr159, который находится рядом с каталитически активным остатком Asp165 в консервативной области а.к. последовательности, и Thr218, который находится у входа в «туннель». Также в связывании субстрата, возможно, принимают участие остатки Asn215, Tyr91, Trp354 и His404, расположенные на поверхности «туннеля» активного центра. Остатки Asn215, Tyr91, Trp354 и His404 являются консервативными для всех рассмотренных структур и, возможно, принимают участие в связывании субстрата [191-194]. В структуре ЦБГ II *P.verruculosum* есть четыре пары остатков цистеина, которые образуют четыре S-S связи, эти остатки консервативны.

UniProtKB G3XUK0, *A.kawachii* UniProtKB G7XQ80, *T.harzianum* UniProtKB A0A0G0AEM7 и *T.reesei* UniProtKB P07987). Красным цветом выделены каталитически активные остатки аспарагиновой кислоты, зеленым – остатки, принимающие участие в связывании субстрата и катализе, желтым – остатки цистеина, участвующие в образовании S-S-связей, синим – теоретические сайты N-гликозилирования, серым – сигнальный пептид. Остатки, образующие целлюлозосвязывающий домен, подчеркнуты сплошной линией, остатки, образующие линкер, подчеркнуты пунктирной линией. Высококонсервативные области аминокислотных последовательностей выделены знаком *. Нумерация с учетом сигнального пептида указана в скобках.

Два остатка аспарагина, соответствующие теоретическим сайтам гликозилирования Asn219 и Asn265 в структуре ЦБГП *P.verruculosum*, в структурах ЦБГП *P.brasilianum*, *A.niger*, *A.kawachii*, *T.harzianum* и *T.reesei* не гликозилированы и принимают участие в фиксации полисахаридной цепи за счет водородных связей [191]. Только в двух из рассмотренных структур – в структурах ЦБГП *P.verruculosum* и *T.cellulolyticus*, обладающей наибольшей степенью гомологии с ЦБГП *P.verruculosum*, – эти остатки входят в состав консервативной последовательности Asn-Xxx-Thr/Ser (Xxx – любая аминокислота, кроме Pro), характерной для сайта N-гликозилирования, и могут быть гликозилированы. Тем не менее, остатки Asn219 и Asn265 являются консервативными для всех рассмотренных структур.

В структуре ЦБГП *T.reesei* есть три сайта N-гликозилирования, два из которых – Asn14 и Asn310 – есть только в структурах ЦБГП *T.harzianum* и *T.reesei*, сайт Asn289 не только есть во всех рассмотренных структурах, но и входит в состав консервативной области а.к. последовательности. Еще один возможный сайт N-гликозилирования (Asn395 в структуре ЦБГП *P.verruculosum*) есть в некоторых из структур.

Таким образом, три из четырех возможных сайтов N-гликозилирования в структуре ЦБГП *P.verruculosum* содержат консервативные остатки Asn: Asn219, Asn265 и Asn279. Четвертый теоретический сайт N-гликозилирования – Asn395 – не консервативен.

Моделирование трехмерной структуры каталитического домена ЦБГП было осуществлено с помощью программы SWISS-MODEL Швейцарского института биоинформатики. При моделировании в качестве шаблона была использована структура ЦБГП *T.reesei* (1qk0.1.pdb) (степень гомологии каталитических доменов ЦБГП *P.verruculosum* и *T.reesei* составила 68,0%).

Трехмерная модель каталитического домена ЦБГП *P.verruculosum* приведена на Рис. 24, все четыре теоретических сайта N-гликозилирования находятся на поверхности

белковой глобулы и могут быть доступны для гликозилирования. Два сайта N-гликозилирования – Asn219 и Asn265 – находятся у входа в «туннель» активного центра, сайт Asn279 находится на боковой поверхности глобулы, сайт Asn395 расположен на петле, ограничивающей «туннель» активного центра.

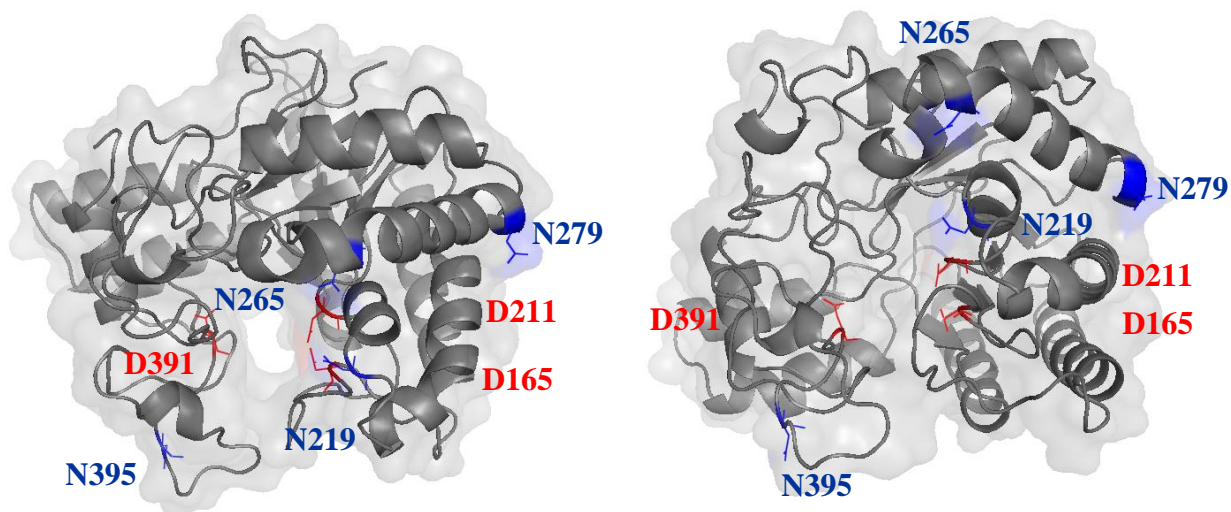


Рис. 24. Трехмерная модель каталитического домена ЦБГП *P.verruculosum*. Красным цветом показаны каталитически активные остатки Asp165-Asp211-Asp391, синим – остатки Asn219, Asn265, Asn279 и Asn395, входящие в состав теоретических сайтов N-гликозилирования.

3.3.2. Внесение мутаций в ген и получение плазмид

Для амплификации гена *cbhII* и введения мутаций были разработаны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры (Таблица 8).

Таблица 8. Праймеры, использованные в работе (нуклеотиды, соответствующие точечным а.к. заменам, подчеркнуты).

Назначение	Праймеры
Мутация N219A	CBH2-N219A-fwd 5'-aat atg gtt acc <u>gcc</u> ttg tct aca gcc - 3' CBH2-N219A-rev 5'-t ggc tgt aga caa <u>ggc</u> ggt aac cat att ggc tag ac - 3'
Мутация N265A	CBH2-N265A-fwd 5'-tt gga tgg tct gcc <u>gcc</u> ctc aca cca gct gct - 3' CBH2-N265A-rev 5'-tg agc agc tgg tgt gag <u>ggc</u> ggc aga cca tcc - 3'
Мутация N279A	CBH2-N279A-fwd 5'-tt gca aca gtc tat aag <u>gcc</u> gca agt gct cct gc - 3' CBH2-N279A-rev 5'-tgc tgc agg agc act tgc <u>ggc</u> ctt ata gac tgt tgc - 3'
Мутация N395A	CBH2-N395A-fwd 5'-at ggt acc tca <u>gcc</u> agt tcc tct act cg - 3' CBH2-N395A-rev 5'-acg agt aga gga act <u>ggc</u> tga ggt acc atc a - 3'

Методом ПЦР с использованием геномной ДНК *P.verruculosum* в качестве матрицы были амплифицированы фрагменты гена *cbhII*, содержащие необходимые мутации. Эти фрагменты далее были клонированы в шаттл-вектор, содержащий нуклеотидные последовательности, соответствующие промоторной области гена ксиланазы А *P.canescens* и терминаторной области гена ЭГШ *P.canescens*, а также необходимые генетические элементы для репликации в клетках *E.coli*. Далее полученные плазмиды были трансформированы в компетентные клетки *E.coli* для наработки ДНК. Последовательность гена, наличие необходимых мутаций и отсутствие случайных мутаций были подтверждены секвенированием плазмидной ДНК. Таким образом, были получены 4 плазмиды, содержащие ген *cbhII P.verruculosum* с одной из мутаций N219A, N265A, N279A и N395A.

Далее была проведена наработка ДНК в клетках *E.coli* для последующей котрансформации штамма-реципиента *P.canescens* PCA-10 *niaD*⁻, дефектного по гену нитратредуктазы, совместно с трансформирующей плазмидой pSTA10 (*niaD*⁺), несущей ген нитратредуктазы.

3.3.3. Получение грибных штаммов, продуцирующих мутантные формы ЦБГП

Штамм-реципиент *P.canescens* PCA-10 *niaD*⁻ был котрансформирован плазмидами, содержащими ген *cbhII P.verruculosum*, совместно с плазмидой pSTA10 (*niaD*⁺), несущей ген нитратредуктазы. Для каждой из четырех осуществленных мутаций было получено по 30-40 трансформантов, был проведён первичный скрининг трансформантов на наличие гена *cbhII*, результат скрининга представлен в виде агарозного электрофореза ПЦР-продуктов на Рис. 25 (M – маркер, pDNA – положительный контроль по плазмидной ДНК, содержащей ген *cbhII*, *niaD* – отрицательный контроль по штамму-реципиенту PCA-10 *niaD*⁻).

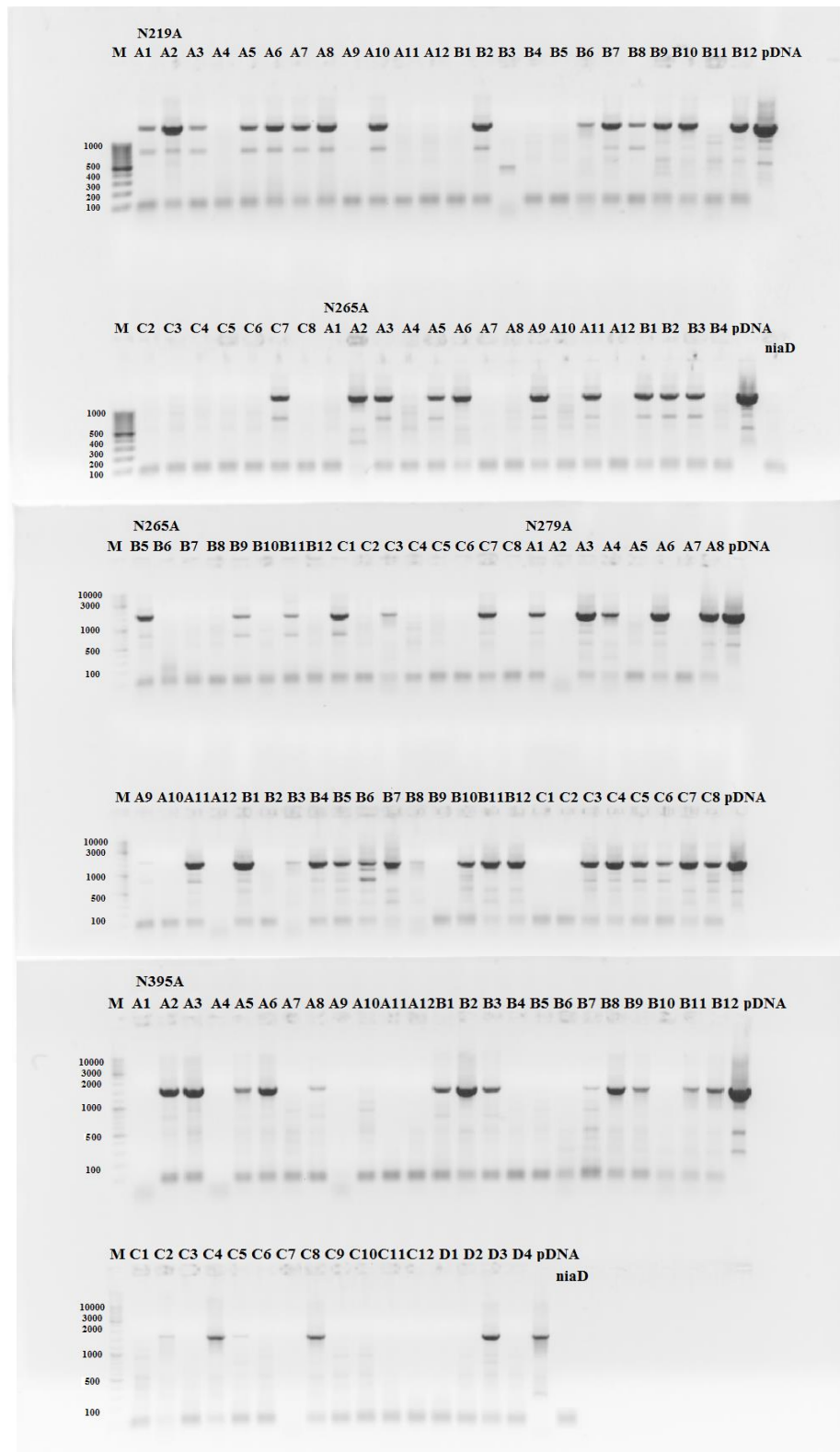


Рис. 25. ПЦР-скрининг трансформантов на наличие гена *cbhII* *P.verruculosum*, полученных в результате трансформации одной из четырех плазмид (*cbhII*-N219A, *cbhII*-N265A, *cbhII*-N279A и *cbhII*-N395A) (M – маркер, pDNA – положительный контроль по плазмидной ДНК, содержащей ген *cbhII*, niaD – отрицательный контроль по реципиентному штамму PCA-10 niaD⁻).

ПЦР-скринингом проанализировано:

ЦБГП N219A	32 трансформанта, из них 16 оказались положительными
ЦБГП N265A	32 трансформанта, из них 15 оказались положительными
ЦБГП N279A	32 трансформанта, из них 20 оказались положительными
ЦБГП N395A	40 трансформантов, из них 18 оказались положительными

В результате ПЦР-скрининга были выявлены положительные клоны, содержащие вставки целевого гена ЦБГП. Для ферментации отобраны клоны:

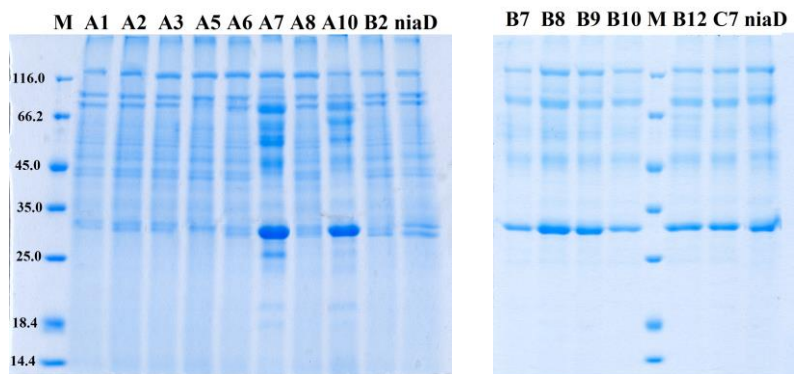
ЦБГП N219A	A1-A3, A5-A8, A10, B2, B7-B10, B12, C7 (15 клонов)
ЦБГП N265A	A2, A3, A5, A6, A9, A11, B1-B3, B5, B9, B11, C1, C3, C7 (15 клонов)
ЦБГП N279A	A1, A3, A4, A6, A8, A11, B1, B4, B5-B7, C5-C8 (15 клонов)
ЦБГП N395A	A2, A3, A5, A6, A8, B1-B3, B8, B9, B11, B12, C4, C8, B3 (15 клонов)

Отобранные трансформанты культивировали на среде для *P.canescens* 6 суток (30°C, 215 об/мин). Пробы КЖ отбирали на 6 сутки, был проведен ДДС-электрофорез, также в КЖ были определены концентрация общего белка, значения целевой активности по отношению к МКЦ и базовой активности по отношению к ксилану.

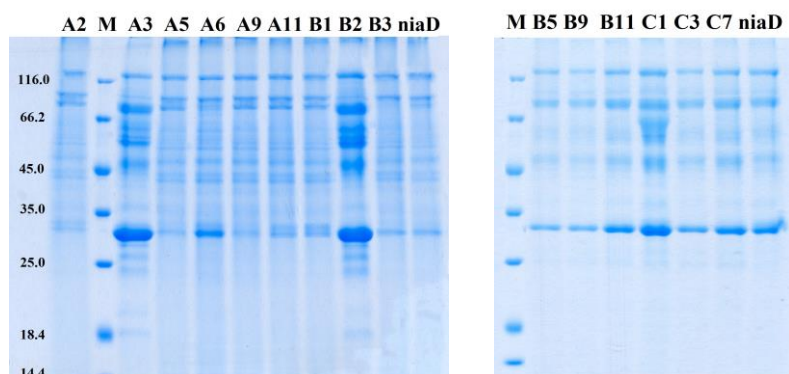
ДДС-электрофореграммы КЖ трансформантов, содержащих ген *cbhII* *P.verruculosum* с одной из четырех мутаций N219A, N265A, N279A и N395A, представлены на Рис. 26 (M – маркер, *niaD* – контроль по штамму-реципиенту *P.canescens*). На электрофореграммах нескольких из трансформантов наблюдалась полоса, соответствующая белку с молекулярной массой (60±5) кДа, что совпадало с молекулярной массой ЦБГП *P.verruculosum* 60 кДа, и отсутствующая в КЖ исходного штамма-реципиента.

Значения концентрации общего белка и ферментативной активности по отношению к МКЦ и ксилану в КЖ трансформантов приведены на Рис. 27. Для всех трансформантов уровень экспрессии общего белка был сравним с уровнем экспрессии контрольного штамма, следовательно, трансформация штамма-реципиента экспрессионными конструкциями, содержащими мутантный гетерологичный ген *cbhII* *P.verruculosum*, не привела к потере штаммом жизнеспособности и снижению продуктивности. Тем не менее, только некоторые из трансформантов обладали большей активностью по отношению к специфическому для ЦБГП субстрату МКЦ по сравнению с контрольным штаммом-реципиентом. Увеличение активности по отношению к МКЦ в КЖ некоторых из трансформантов свидетельствовало об экспрессии и секреции этими трансформантами ЦБГП *P.verruculosum* в каталитически активной форме.

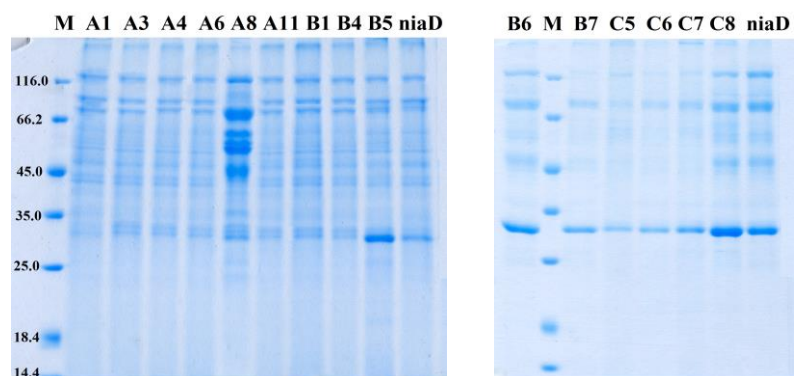
N219A



N265A



N279A



N395A

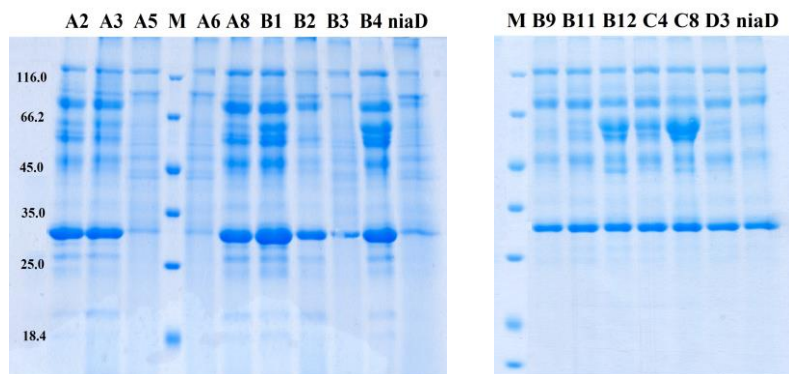
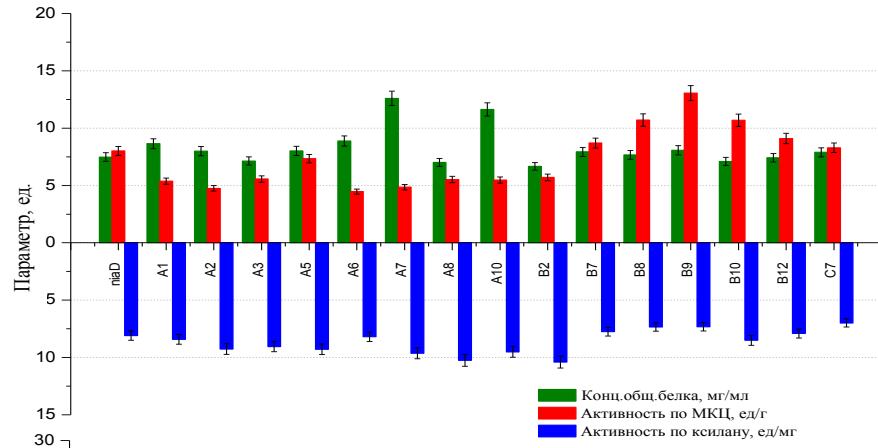
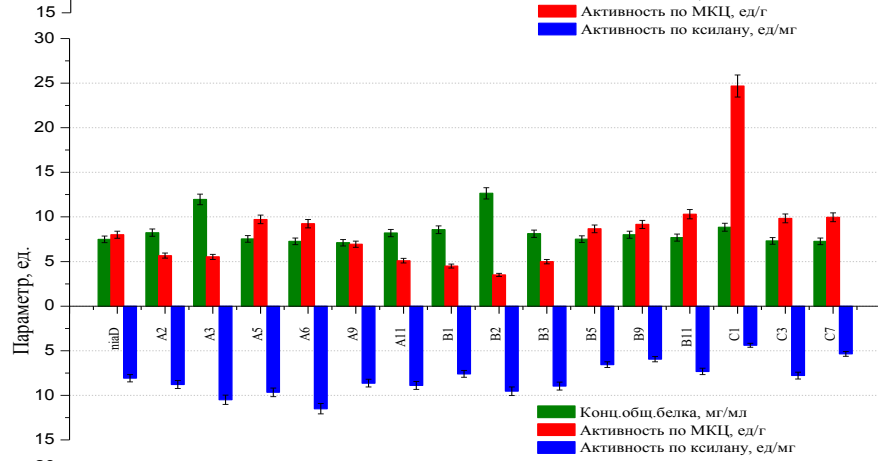


Рис. 26. ДДС-электрофореграммы КЖ трансформантов, содержащих ген *cbhII* *P.verruculosum* с одной из четырех мутаций N219A, N265A, N279A и N395A (M – маркер, *niaD* – контроль по штамму-реципиенту *P.canescens*).

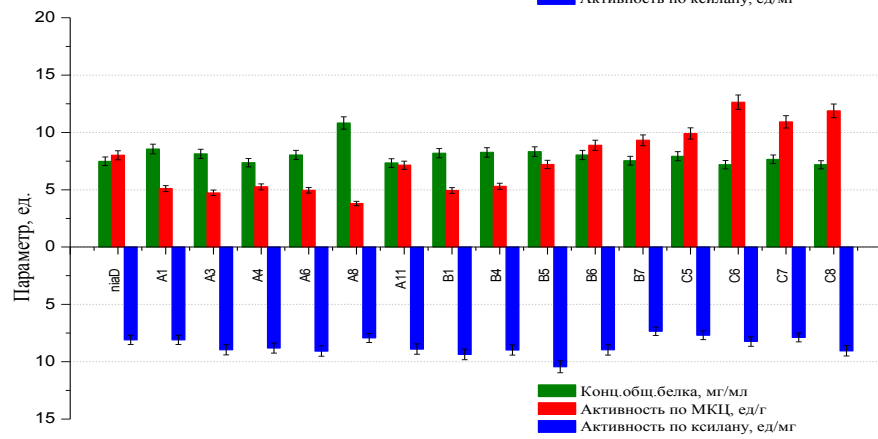
N219A



N265A



N279A



N395A

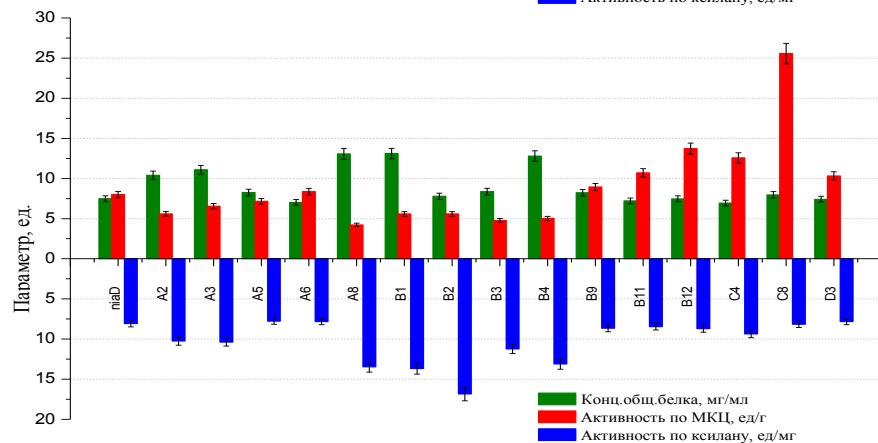


Рис. 27. Значения концентрации общего белка (мг/мл), ферментативной активности по отношению к МКЦ и ксилану (ед/мг общего белка) в КЖ трансформантов, содержащих ген *cbhII* *P.verruculosum* с одной из четырех мутаций N219A, N265A, N279A и N395A (*niaD* – контроль по штамму-реципиенту *P.canescens*).

Активность по отношению к ксилану только для некоторых из трансформантов оказалась меньше активности в КЖ контрольного штамма-реципиента. Экспрессионные конструкции, использовавшиеся для трансформации, содержали в качестве регуляторного элемента промоторную область гена ксиланазы А *P.canescens*, поэтому встройка целевого гена *cbhII* в геном штамма-реципиента происходила по механизму гомологичной рекомбинации и приводила к замещению гена ксиланазы А геном ЦБГП, что при значительной эффективности встройки должно выражаться в увеличении активности по отношению к МКЦ и уменьшении активности по отношению к ксилану в КЖ трансформантов. Небольшое число трансформантов, для которых наблюдалось увеличение активности по отношению к МКЦ и уменьшение активности по отношению к ксилану, могло быть следствием низкой копияности встройки гена *cbhII* или появлению дефектного гена при неправильной гомологичной рекомбинации. Т.к. исследование закономерностей гомологичной рекомбинации не являлось целью данной работы, то получение нескольких трансформантов, секретировавших ЦБГП в каталитически активной форме, было вполне достаточным для анализа свойств мутантных форм ЦБГП.

Для ферментации в ферментерах и наработки ФП были выбраны трансформанты, характеризовавшиеся наибольшей среди трансформантов секрецией белка с молекулярной массой (60±5) кДа, наибольшей среди трансформантов активностью по отношению к МКЦ и наименьшей – по отношению к ксилану: ЦБГП N219A A10, N265A C1, N279A A8 и N395A C8.

3.3.4. Выделение и очистка ЦБГП хроматографическими методами

В результате ферментации в ферментерах были получены ФП *P.canescens*, содержащие мутантные формы ЦБГП *P.verruculosum* (рекомб. ЦБГП N219A, N265A, N279A и N395A). Ранее в нашей лаборатории был получен ФП *P.canescens*, содержащий немутантную форму ЦБГП *P.verruculosum* (рекомб. ЦБГП) [190]. Рекомбинантные формы ЦБГП, содержащиеся в этих ФП, были выделены из ФП методом анионообменной хроматографии и очищены методом гидрофобной хроматографии. Типичная хроматограмма и соответствующая ей ДДС-электрофореграмма, полученные в результате анионообменной хроматографии ФП, представлены на Рис. 28.

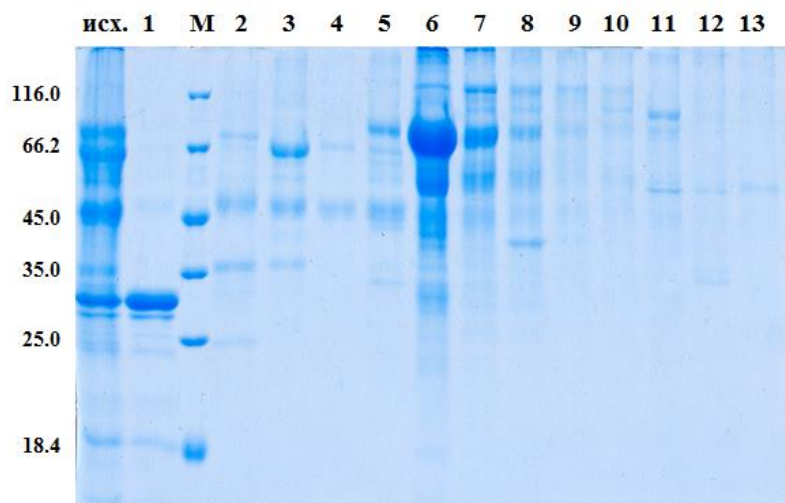
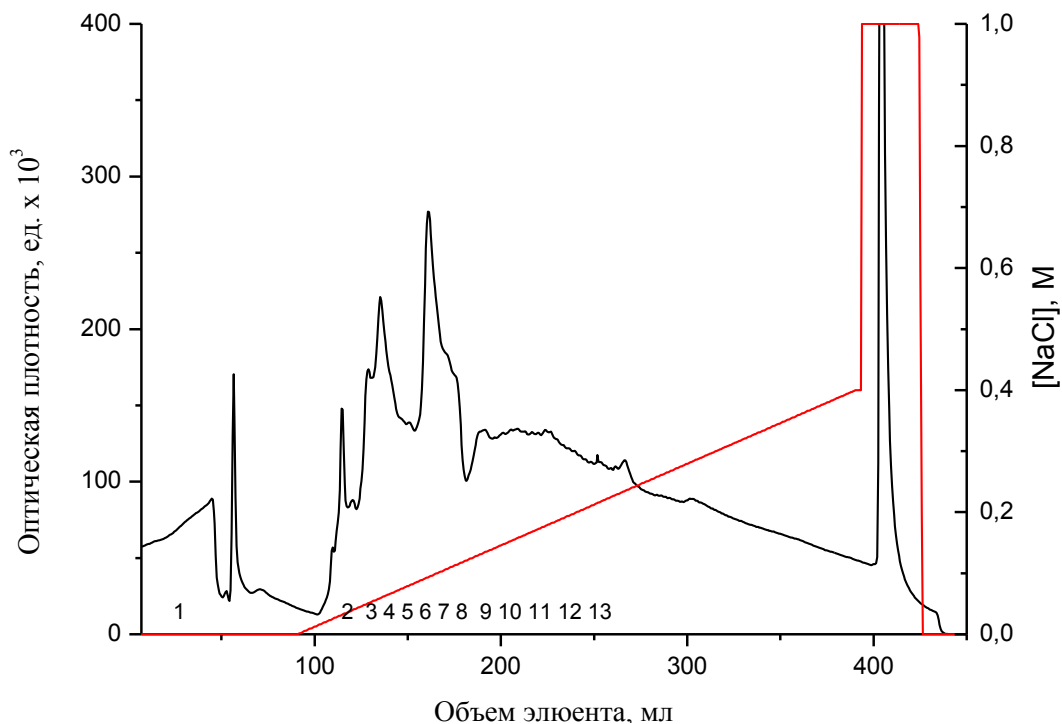


Рис. 28. Хроматограмма и ДДС-электрофореграмма фракций, полученных в результате анионообменной хроматографии ФП, содержащего мутантную форму ЦБГП N265A *P.verruculosum* (М – маркер, исх. – исходный ФП до разделения белков методом анионообменной хроматографии).

Белки в фракции 3 (концентрация NaCl в элюирующем растворе 0,044-0,056 М) по молекулярной массе и ферментативной активности соответствовали рекомб. ЦБГП N265A *P.verruculosum*. Положение пика оптической плотности на хроматограммах, тем не менее, было различным для различных форм ЦБГП (Рис. 29). Пики, соответствовавшие рекомб. ЦБГП и рекомб. ЦБГП N265A, находились в области концентрации NaCl 0,044-0,056 М, что совпадало с положением пика для нативн. ЦБГП [147]. Для двух других мутантных форм рекомб. ЦБГП N219A и рекомб. ЦБГП N279A пик оказался

сдвинут в область меньших концентраций NaCl 0,041-0,052 М, для рекомб. ЦБГП N395A пик, напротив, оказался сдвинут в область больших концентраций NaCl 0,152-0,167 М. Таким образом, внесение различных мутаций в структуру ЦБГП привело к различным эффектам в изменении поверхностного заряда белковой глобулы или изменении степени доступности поверхности для взаимодействия с хроматографическим носителем.

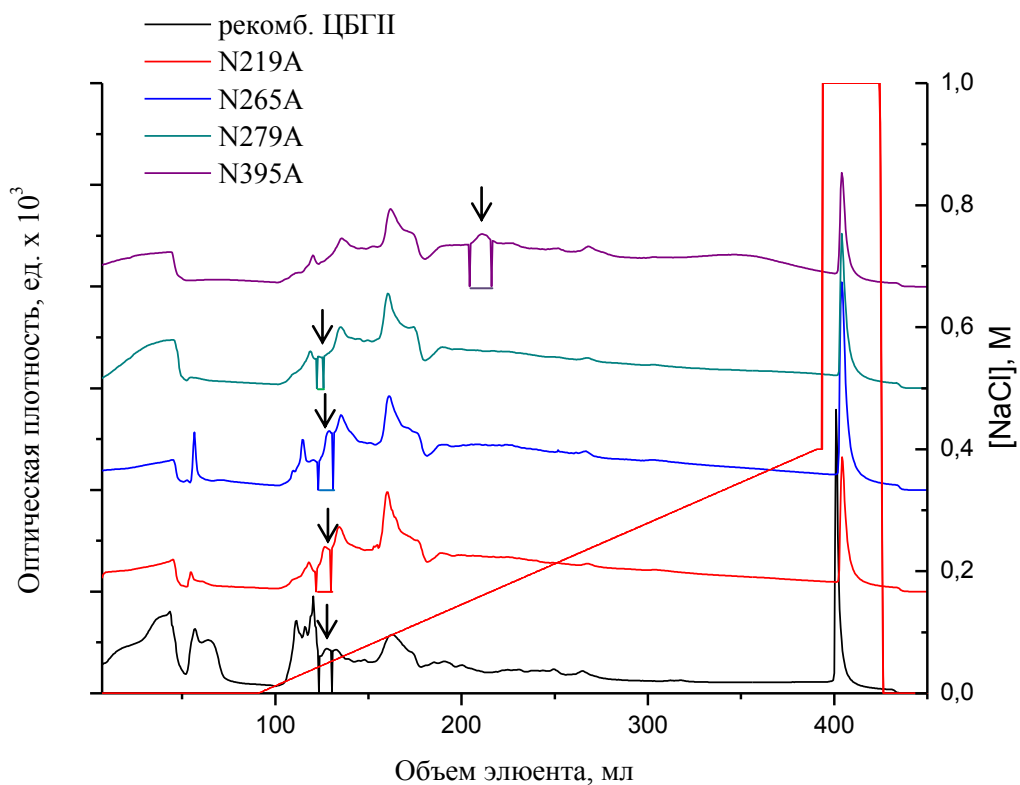


Рис. 29. Хроматограммы, полученные в результате анионообменной хроматографии ФП, содержащих рекомбинантные (немутантная и мутантные) формы ЦБГП *P. verruculosum*.

Дальнейшее разделение фракций осуществляли методом гидрофобной хроматографии. Типичная хроматограмма и соответствующая ей ДДС-электрофореграмма, полученные в результате гидрофобной хроматографии фракций, представлены на Рис. 30.

Положения пиков оптической плотности на хроматограммах отличались для различных форм ЦБГП (Рис. 31). Пики, соответствовавшие рекомб. ЦБГП и рекомб. ЦБГП N219A, находились в области концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,43-0,35 М, что совпадало с положением пика для нативн. ЦБГП [147]. Пики, соответствовавшие трем другим мутантным формам рекомб. ЦБГП N265A, N279A и N395A, оказались сдвинуты в область меньшей концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и находились в области 0,39-0,28 М, 0,34-0,17 М и 0,35-0,23 М соответственно. В случае форм рекомб. ЦБГП N265A, N279A и N395A это, возможно, означает, что в результате внесения мутаций в структуру ЦБГП для

взаимодействия с носителем оказываются доступными больше гидрофобных участков, чем в случае формы рекомб. ЦБГП N219A.

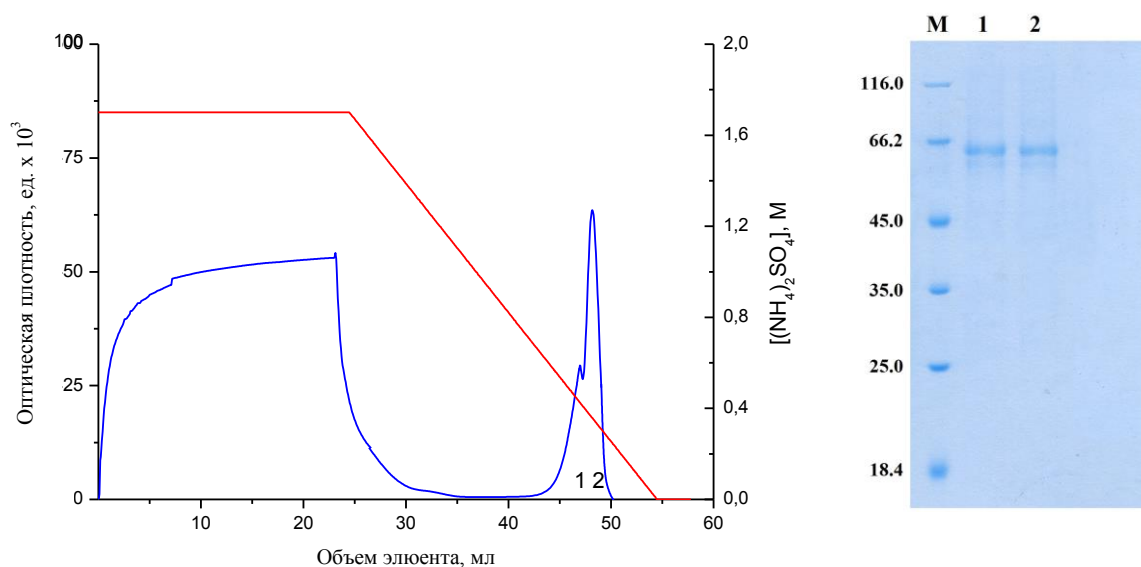


Рис. 30. Хроматограмма и ДДС-электрофореграмма фракций, полученных в результате гидрофобной хроматографии фракции 3 анионообменной хроматографии ФП, содержащего мутантную форму ЦБГП N265A *P.verruculosum*.

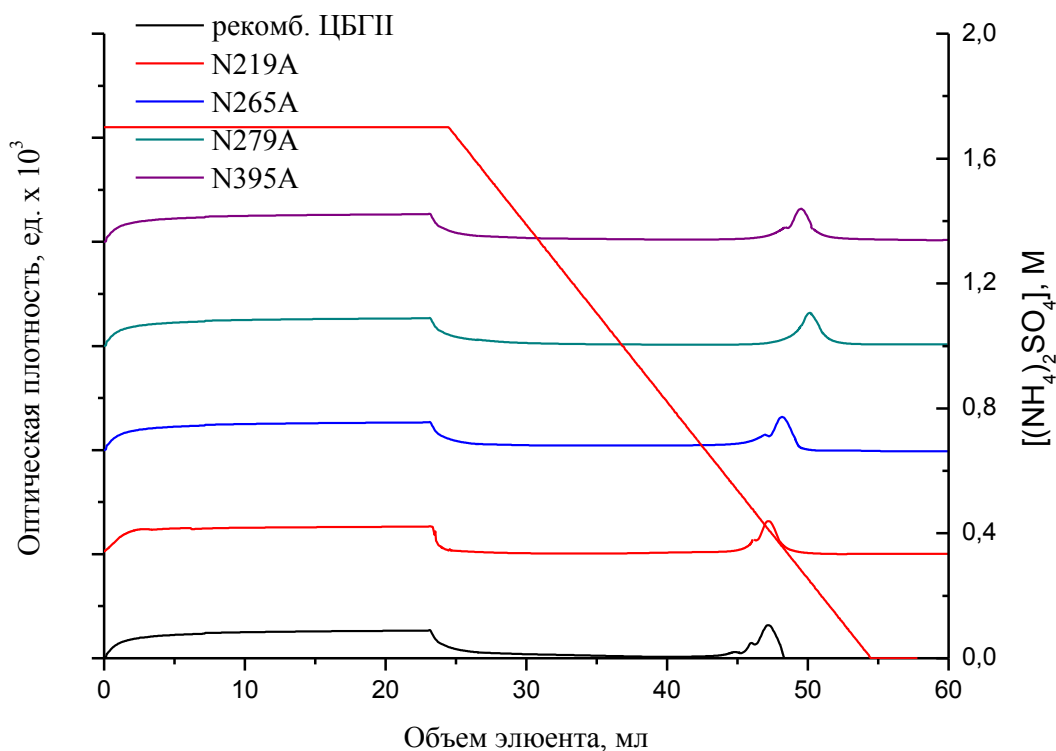


Рис. 31. Хроматограммы, полученные в результате гидрофобной хроматографии фракций ФП, содержащих рекомбинантные (немутантная и мутантные) формы ЦБГП *P.verruculosum*.

Фракции, содержавшие белки, по молекулярной массе и ферментативной активности соответствовавшие ЦБГП *P.verruculosum*, были обессолены и сконцентрированы с использованием мембранных колонок. На Рис. 32 приведена ДДС-электрофореграмма гомогенных ферментов: рекомбинантные немутантная и мутантные формы ЦБГП. Масс-спектрометрический анализ полос, по массе соответствовавших ЦБГП, позволил подтвердить структуру различных форм ЦБГП, а также определить сайты N-гликозилирования и структуру N-связанных гликанов.

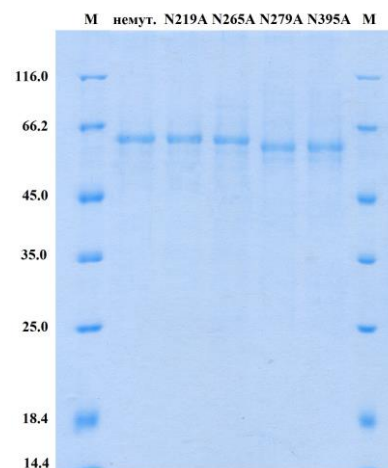


Рис. 32. ДДС-электрофореграмма немутантных и мутантных форм ЦБГП *P.verruculosum*.

3.3.5. Масс-спектрометрический анализ ЦБГП

Для всех выделенных рекомбинантных форм ЦБГП (рекомб. ЦБГП, рекомб. ЦБГП N219A, N265A, N279A и N395A), а также для нативной формы ЦБГП (нативн. ЦБГП) масс-спектрометрическим анализом была подтверждена первичная структура, в случае мутантных форм подтверждено наличие необходимых а.к. замен. В Приложении 2 приведены положения пиков, соответствующих пептидам ЦБГП и подтверждающих наличие а.к. замен, а также положения пиков, соответствующих различным гликопептидам ЦБГП.

Сайты N-гликозилирования и структуры N-связанных гликанов, установленные с использованием сервиса Glycomod, приведены в Таблице 9.

Таблица 9. Сайты N-гликозилирования и структура N-связанных гликанов, установленные с использованием сервиса Glycomod, для рекомбинантных (немутантная и мутантные) и нативной форм ЦБГП *P.verruculosum*.

Сайт N-гликозилирования	Структура N-связанных гликанов					
	рекомб. ЦБГП	рекомб. ЦБГП N219A	рекомб. ЦБГП N265A	рекомб. ЦБГП N279A	рекомб. ЦБГП N395A	нативн. ЦБГП
N219	(Man) ₃₋₆ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₀₋₉ (GlcNAc) ₂	(Man) ₀₋₁₀ (GlcNAc) ₂	(Man) ₀₋₆ (GlcNAc) ₂	(Man) ₂₋₇ (GlcNAc) ₂
N265	(Man) ₀₋₁₀ (GlcNAc) ₂	(Man) ₀₋₁₀ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₂₋₁₀ (GlcNAc) ₂	(Man) ₂₋₁₀ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁₋₉ (GlcNAc) ₂
N279	(Man) ₁₋₁₃ (GlcNAc) ₂	(Man) ₄₋₁₀ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁₋₉ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₀₋₁₃ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁₋₁₃ (GlcNAc) ₂
N395	(Man) ₁₋₁₃ (GlcNAc) ₂	(Man) ₄₋₁₄ (GlcNAc) ₂	(Man) ₃₋₁₃ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁₋₁₃ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₅₋₁₅ (GlcNAc) ₂

В результате масс-спектрометрического анализа N-гликозилирование было детектировано для всех теоретических сайтов гликозилирования. N-Связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды общей структуры $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$. Сайты N279 и N395 оказались гликозилированы в большей степени, чем сайты N219 и N265 (Таблица 9).

Для грибных целлюбиогидролаз показано, что N-связанные гликаны в большинстве случаев представляют собой высокоманнозные олигосахариды общей структуры $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$, для одного и того же фермента реализуются различные значения x , т.к. в результате ферментативного «тримминга» под действием маннозидаз и некоторых других ферментов образуются олигосахариды различной длины [112]. Для ЦБГ I и ЦБГ II штаммов родов *Aspergillus* и *Trichoderma* обнаружено N-гликозилирование с $x=5-20$, также N-связанные гликаны могут представлять собой остатки $(\text{GlcNAc})_1$ или $(\text{GlcNAc})_2$ [112, 116-119]. В литературе отмечена возможность реализации различной степени гликозилирования для разных сайтов [117]. Таким образом, структуры N-связанных гликанов, обнаруженные для ЦБГ II *P.verruculosum*, хорошо согласуются с литературными данными.

3.3.6. Анализ биохимических и каталитических свойств ЦБГ II

Биохимические и каталитические свойства мутантных форм ЦБГ II *P.verruculosum* были проанализированы в сравнении с свойствами немутантных нативной и рекомбинантной форм ЦБГ II. Рекомбинантные мутантные (рекомб. ЦБГ II N219A, N265A, N279A и N395A) и немутантная (рекомб. ЦБГ II) формы ЦБГ II были выделены и очищены как описано выше, нативная немутантная форма ЦБГ II (нативн. ЦБГ II) была выделена и исследована в нашей лаборатории ранее [147]. Для мутантных и немутантных форм ЦБГ II были определены такие биохимические свойства, как pH- и температурные оптимумы активности по отношению к специфическому субстрату МКЦ, термостабильность, значения pI , степень адсорбции на МКЦ, и такие каталитические свойства, как ферментативная активность по отношению к ряду субстратов.

Определение pH-профиля активности ферментов проводили путем измерения активности ферментов по отношению к специфическому субстрату МКЦ в диапазоне значений pH от 2,5 до 8,0 (0,1 М универсальный буфер, 40°C). pH-Профили относительной активности приведены на Рис. 33. Как видно из экспериментальных данных, мутантные и немутантные формы ЦБГ II *P.verruculosum* обладали одинаковыми pH-профилями с оптимумом активности при pH 4,0.

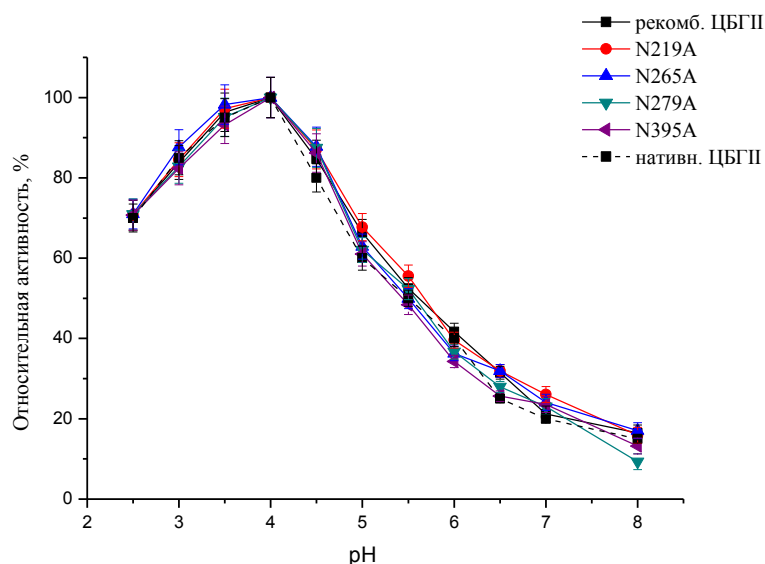


Рис. 33. pH-Профили относительной активности рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГII), рекомбинантных мутантных (N219A, N265A, N279A и N395A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГII) форм ЦБГII *P.verruculosum* по отношению к МКЦ (0,1 М универсальный буфер, 40°C).

Определение температурного оптимума активности ферментов проводили путем измерения активности ферментов по отношению к МКЦ в pH-оптимуме (0,1 М универсальный буфер, pH 4,0) при различных температурах в диапазоне 30-80°C. На Рис. 34 приведены температурные профили активности ферментов по отношению к МКЦ.

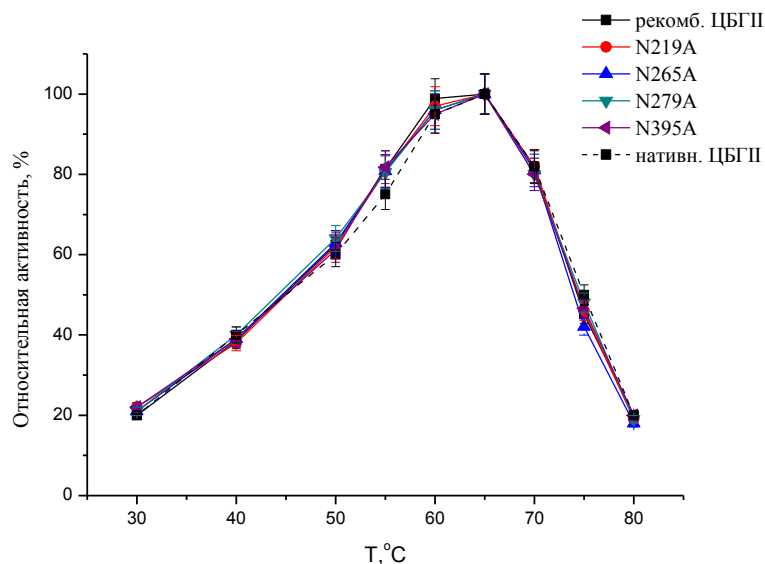


Рис. 34. Температурные профили относительной активности рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГII), рекомбинантных мутантных (N219A, N265A, N279A и N395A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГII) форм ЦБГII *P.verruculosum* по отношению к МКЦ (0,1 М универсальный буфер, pH 4,0).

Полученные профили зависимости активности ферментов от температуры оказались одинаковыми для всех мутантных и немутантных форм ЦБГП *P.verruculosum*, все формы характеризовались оптимумом активности 65°C.

Для исследования термостабильности растворы ферментов инкубировали при различных температурах в диапазоне 40-65°C. В процессе инкубации отбирали аликвоты инкубируемых растворов, в которых определяли остаточную активность по отношению к МКЦ. Результаты отображали в виде зависимости остаточной активности (в процентах от исходной) от времени инкубации при данной температуре.

Термостабильность мутантных и немутантных форм ЦБГП оказалась одинаковой. На Рис. 35 показаны кривые термоинактивации различных форм ЦБГП.

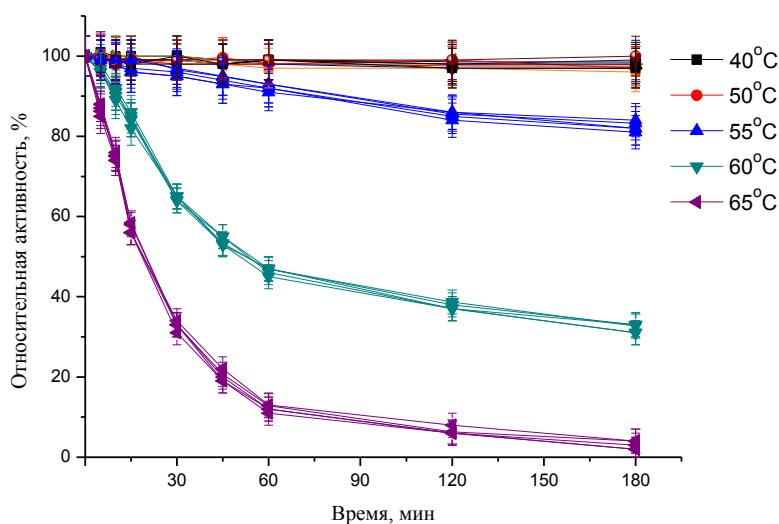


Рис. 35. Термостабильность рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГП), рекомбинантных мутантных (N219A, N265A, N279A и N395A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГП) форм ЦБГП *P.verruculosum* при 40-65°C (0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0).

Мутантные и немутантные формы ЦБГП были стабильны при 40 и 50°C в течение 3 ч, при 55°C формы сохранили (85±5)% активности, время полуинактивации при 60°C составило (52±3) мин, при 65°C – (20±1) мин.

Для мутантных и немутантных форм ЦБГП *P.verruculosum* было осуществлено изоэлектрофокусирование (Рис. 36).

Значения pI для рекомб. ЦБГП и для рекомб. ЦБГП N395A оказались одинаковыми и составили 4,2, что совпало с значением pI для нативной формы. Значения pI для мутантных форм рекомб. ЦБГП N219A, N265A и N279A оказались сдвинутыми в щелочную область. Значения pI для рекомб. ЦБГП N219A и рекомб. ЦБГП N265A

оказались одинаковыми и составили 4,3. Значение pI для рекомб. ЦБГП N279A составило 5,5, что сильно отличалось от pI немутантных форм.

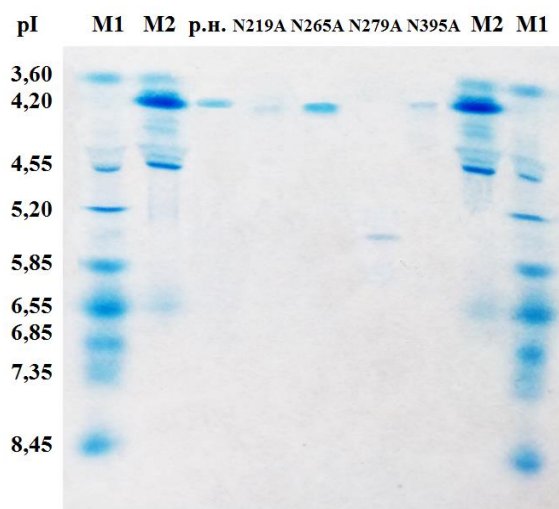


Рис. 36. Изоэлектрическое фокусирование различных форм ЦБГП *P.verruculosum*: р.н. – рекомбинантная немутантная форма, N219A, N265A, N279A и N395A – рекомбинантные мутантные формы ЦБГП.

В результате внесения в структуру ЦБГП различных мутаций значение pI изменилось в различной степени, что свидетельствует о неэквивалентности различных N-связанных гликанов при формировании pI. Наибольшее изменение pI наблюдалось при внесении мутации N279A. Следует напомнить, что N279 находится в консервативной области а.к. цепи ЦБГП и, вероятно, является значимым для правильного фолдинга белковой молекулы. В случае, если N-связанный гликан в положении N279, влияет на процесс фолдинга, то его удаление могло привести к изменению трехмерной структуры и, как следствие, pI. Внесение мутаций N219A и N265A привело к одинаковому изменению pI, что может быть объяснено одинаковой структурой N-связанных гликанов в положениях N219 и N265, а также близкой локализацией двух этих гликанов на поверхности ЦБГП. Внесение мутации N395A не привело к заметному изменению pI, это возможно объяснить тем, что изменение pI зависит не только от структуры и свойств N-связанных гликанов, но и от свойств поверхности белковой глобулы, открываемой для взаимодействия с растворителем в результате удаления с поверхности объемного гликана.

Для различных форм ЦБГП была определена адсорбционная способность ферментов по отношению к МКЦ (Таблица 10).

Таблица 10. Степень адсорбции мутантных и немутантных форм ЦБГП *P.verruculosum* (0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0, 6°C).

	Форма ЦБГП					
	рекомб. ЦБГП	рекомб. ЦБГП N219A	рекомб. ЦБГП N265A	рекомб. ЦБГП N279A	рекомб. ЦБГП N395A	нативн. ЦБГП
Степень адсорбции, %	80±3	66±3	73±4	57±3	70±4	82±3

Степень адсорбции для рекомб. ЦБГП и нативн. ЦБГП оказалась практически одинаковой. Для мутантных форм рекомб. ЦБГП N219A, N265A, N279A и N395A степень адсорбции оказалась меньше, чем для немутантных рекомб. ЦБГП и нативн. ЦБГП. Среди мутантных форм наименьшей степенью адсорбции характеризовалась рекомб. ЦБГП N279A, степень адсорбции рекомб. ЦБГП N265A и рекомб. ЦБГП N395A оказалась очень близкой, рекомб. ЦБГП N219A характеризовалась средней среди мутантных форм степенью адсорбции. Таким образом, N-связанные гликаны принимают участие в связывании специфического для ЦБГП субстрата МКЦ, при этом степень участия различается для гликанов, связанных с различными сайтами гликозилирования.

Для мутантных и немутантных форм ЦБГП была определена активность по отношению к различным полисахаридным (МКЦ, КМЦ, β-глюкан, ксилан) и синтетическим (*n*-НФ-β-Целл, *n*-НФ-β-Лак, *n*-НФ-β-Глюк) субстратам. Результаты представлены в Таблице 11.

Таблица 11. Активность мутантных и немутантных форм ЦБГП *P.verruculosum* по отношению к различным субстратам.

Субстрат	Активность, ед/мг					
	рекомб. ЦБГП	рекомб. ЦБГП N219A	рекомб. ЦБГП N265A	рекомб. ЦБГП N279A	рекомб. ЦБГП N395A	нативн. ЦБГП
МКЦ	0,19±0,01	0,24±0,01	0,22±0,01	0,040±0,005	0,14±0,01	0,20±0,01
β-глюкан	3,0±0,2	3,7±0,2	3,5±0,2	2,4±0,1	3,0±0,2	3,2±0,3
КМЦ	2,1±0,1	2,7±0,1	2,3±0,1	1,61±0,08	2,1±0,2	2,0±0,1
ксилан	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
<i>n</i> -НФ-β-Целл	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
<i>n</i> -НФ-β-Лак	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
<i>n</i> -НФ-β-Глюк	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.

н.д. – не детектирована

Из четырех осуществленных мутаций: N219A, N265A, N279A и N395A – положительными оказались мутации N219A и N265A. Мутация N219A привела к большему положительному эффекту (при гидролизе МКЦ, β -глюкана и КМЦ), чем N265A, и ни одна из мутаций не привела к изменению субстратной специфичности. Активность мутантных форм рекомб. ЦБГП N219A и рекомб. ЦБГП N265A по отношению к специфическому субстрату МКЦ оказалась соответственно на 26% и 16% выше по сравнению с немутантной формой, активность по отношению к неспецифическому субстрату КМЦ оказалась на 29% и 10% выше по сравнению с рекомб. ЦБГП, аналогичная закономерность наблюдалась и при гидролизе β -глюкана.

Мутации N279A и N395A привели к уменьшению активности. Активность мутантных форм рекомб. ЦБГП N279A и рекомб. ЦБГП N395A по отношению к специфическому субстрату МКЦ оказалась соответственно на 80% и 24% ниже по сравнению с рекомб. ЦБГП. Активность мутантной формы рекомб. ЦБГП N279A по отношению к неспецифическому субстрату КМЦ оказалась на 20% ниже по сравнению с рекомб. ЦБГП, для рекомб. ЦБГП N395A активность не изменилась, аналогичная закономерность наблюдалась и при гидролизе β -глюкана.

Активность по отношению к ксилану, *n*-НФ- β -Целл, *n*-НФ- β -Лак, *n*-НФ- β -Глюк не была обнаружена ни для мутантных, ни для немутантных форм.

Следует отметить, что каталитические свойства рекомб. ЦБГП и нативн. ЦБГП, как и биохимические свойства, оказались одинаковыми. Таким образом, экспрессия ЦБГП *P.verruculosum* в *P.canescens* не привела к изменению свойств ЦБГП.

Для сравнения осахаривающей способности мутантных и немутантных форм ЦБГП был осуществлен гидролиз полисахаридных субстратов (МКЦ и измельченная древесина осины) под действием гомогенных ЦБГП.

На Рис. 37 приведены кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ под действием мутантных и немутантных форм ЦБГП в присутствии β -глюкозидазы *A.niger*. β -Глюкозидаза была добавлена в реакционную смесь для предотвращения ингибирования активности ЦБГП продуктами гидролиза [147, 180].

При гидролизе МКЦ рекомб. ЦБГП N219A и рекомб. ЦБГП N265A оказались более эффективными, а рекомб. ЦБГП N279A и рекомб. ЦБГП N395A – менее эффективными по сравнению с рекомб. ЦБГП. Выход глюкозы через 48 ч гидролиза оказался на 27 и 16% выше в случае рекомб. ЦБГП N219A и рекомб. ЦБГП N265A и на 86 и 35% ниже в случае рекомб. ЦБГП N279A и рекомб. ЦБГП N395A по сравнению с рекомб. ЦБГП. Такое же соотношение концентраций глюкозы, как и через 48 ч гидролиза, наблюдалось и через 72 и 96 ч гидролиза.

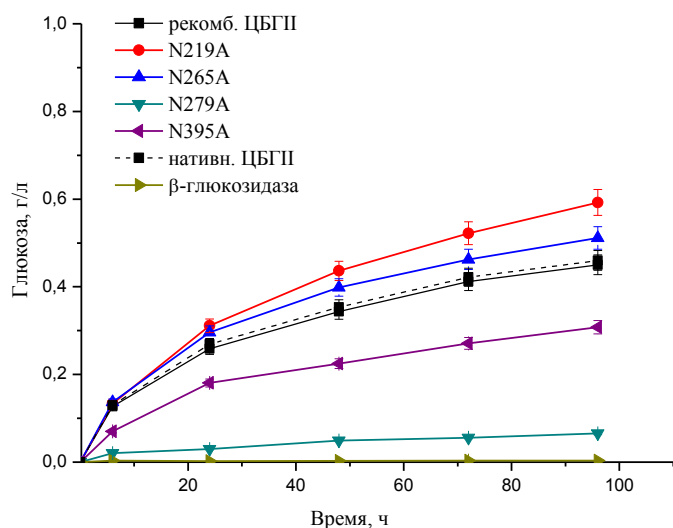


Рис. 37. Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ (5 мг/мл) под действием рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГII), рекомбинантных мутантных (N219A, N265A, N279A и N395A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГII) форм ЦБГII *P.verruculosum* (40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0, в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл)), концентрация ЦБГII 0,1 мг/мл.

Также был проведен гидролиз измельченной древесины осины под действием мутантных и немутантных форм ЦБГII в присутствии β -глюкозидазы *A.niger*. Кинетические кривые накопления глюкозы приведены на Рис. 38.

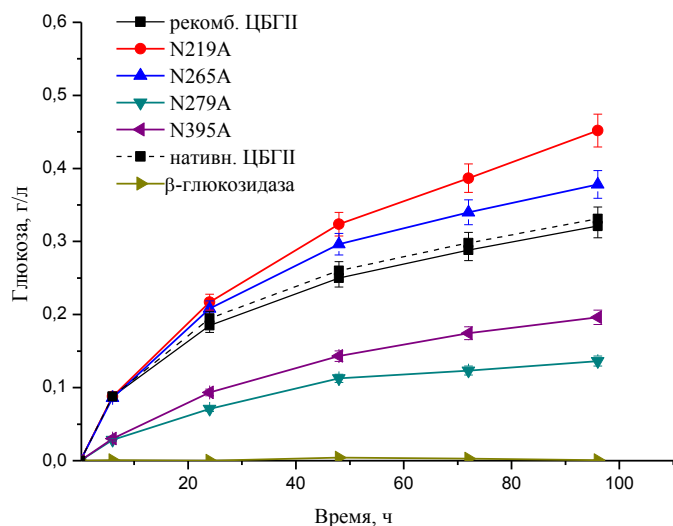


Рис. 38. Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе измельченной древесины осины (5 мг/мл) под действием рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГII), рекомбинантных мутантных (N219A, N265A, N279A и N395A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГII) форм ЦБГII *P.verruculosum* (40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0, в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл)), концентрация ЦБГII 0,1 мг/мл.

При гидролизе измельченной древесины осины так же, как и при гидролизе МКЦ, рекомб. ЦБГП N219A и рекомб. ЦБГП N265A оказались более эффективными, а рекомб. ЦБГП N279A и рекомб. ЦБГП N395A – менее эффективными по сравнению с рекомб. ЦБГП. Выход глюкозы через 48 ч гидролиза оказался на 29 и 18% выше в случае рекомб. ЦБГП N219A и рекомб. ЦБГП N265A и на 55 и 43% ниже в случае рекомб. ЦБГП N279A и рекомб. ЦБГП N395A по сравнению с рекомб. ЦБГП. Через 72 и 96 ч гидролиза такое же соотношение концентраций глюкозы, как и через 48 ч гидролиза, наблюдалось для всех мутантных форм, кроме рекомб. ЦБГП N219A. Выход глюкозы через 72 и 96 ч гидролиза в случае рекомб. ЦБГП N219A оказался на 34 и 41% выше по сравнению с рекомб. ЦБГП. Возможно, это определяется тем, что в процессе гидролиза измельченной древесины осины, как и при гидролизе всех ЦСМ комплексного состава, происходит изменение компонентного состава субстрата и доступности отдельных компонентов для действия ферментов, в результате чего изменяется эффективность ферментативного гидролиза.

В структуре ЦБГП *P.verruculosum* было найдено четыре теоретических сайта N-гликозилирования: N219, N265, N279 и N395. Для исследования роли каждого из сайтов в проявлении биохимических и каталитических свойств в структуру ЦБГП были внесены точечные аминокислотные замены, приводящие к удалению одного из сайтов гликозилирования. Четыре мутантные формы ЦБГП: N219A, N265A, N279A и N395A – были выделены и исследованы.

Масс-спектрометрическим анализом мутантных и немутантных форм ЦБГП было показано, что все теоретические сайты гликозилированы. Также масс-спектрометрическим анализом была определена структура N-связанных гликанов. N-Связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды структуры $(Man)_x(GlcNAc)_2$, где x составлял 0-10 для сайтов N219 и N265, 0-15 для сайтов N279 и N395.

Мутантные и немутантные формы ЦБГП *P.verruculosum* характеризовались одинаковыми рН- и Т-профилями активности и термостабильностью.

Две из четырех осуществленных мутаций оказались положительными, внесение в структуру ЦБГП мутаций N219A и N265A привело к увеличению каталитической активности по отношению к МКЦ, КМЦ и β -глюкану и гидролитической способности по отношению к МКЦ и измельченной древесине осины.

Трехмерная модель каталитического домена ЦБГII *P.verruculosum* приведена на Рис. 39, все четыре теоретических сайта N-гликозилирования находятся на поверхности белковой глобулы и могут быть доступны для гликозилирования. Два сайта N-гликозилирования – N219 и N265 – находятся у входа в «туннель» активного центра, сайт N279 находится на боковой поверхности глобулы рядом с линкером, соединяющим каталитический и целлюлозосвязывающий домены, сайт N395 расположен на петле, ограничивающей «туннель» активного центра.

При связывании субстрата объемные гликаны в положении N219 и N265 могут препятствовать попаданию полисахаридной цепи в активный центр и таким образом создавать стерические затруднения для связывания субстрата. Удаление N-связанных гликанов в случае сайтов N219 и N265, вероятно, привело к увеличению каталитической активности.

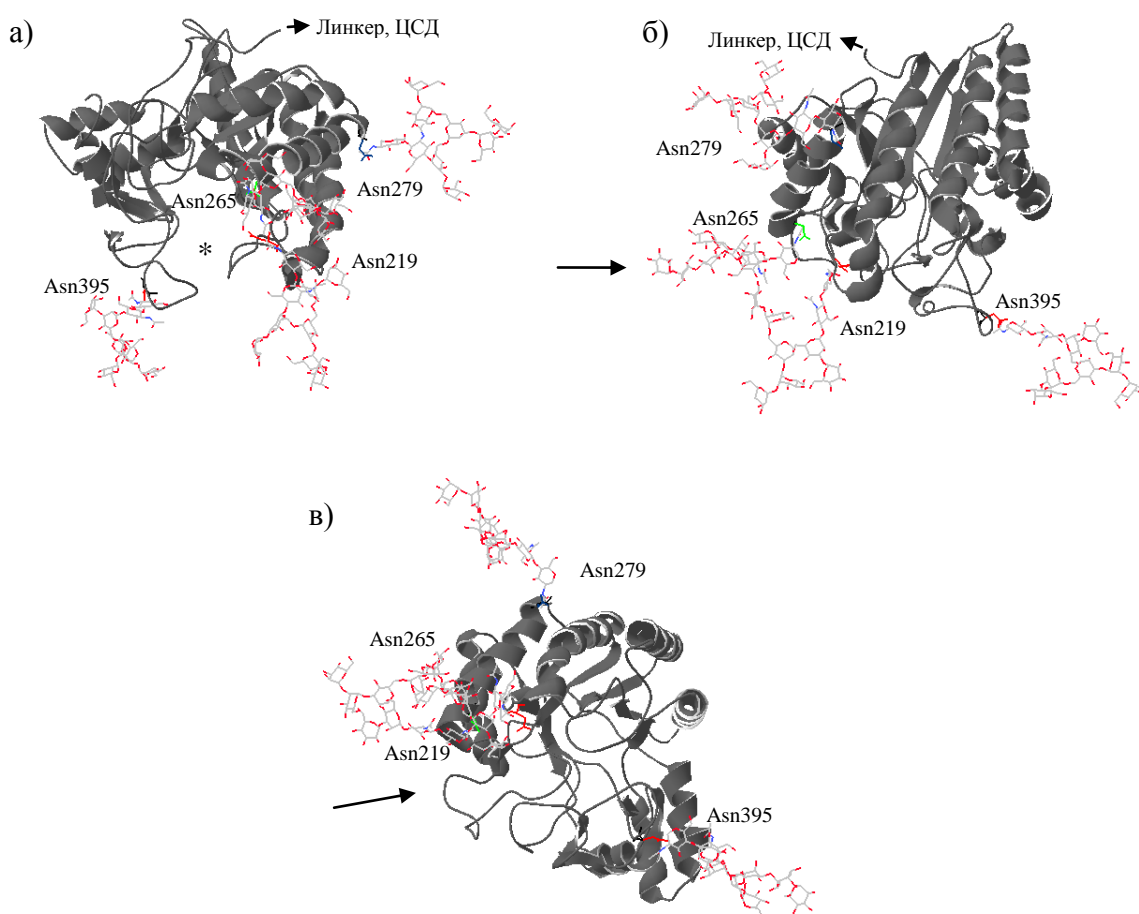


Рис. 39. Трехмерная модель каталитического домена ЦБГII *P.verruculosum* с N-связанными гликанами структуры $(\text{Man})_7(\text{GlcNAc})_2$. Серым цветом указана а.к. последовательность, красным цветом указаны атомы кислорода в составе N-связанных гликанов, знаком * указан активный центр, стрелками показано направление полисахаридной цепи субстрата: а) вид со стороны входа в активный центр, б) вид сбоку, в) вид снизу.

Кроме того, при процессивном гидролизе полисахаридного субстрата гликан в положении N219 может взаимодействовать с полисахаридной цепью за счет образования водородных связей и влиять на проявление такого свойства ЦБГII, как процессивность. Удаление N-связанного гликана в этом случае, вероятно, привело к увеличению каталитической активности, а также гидролитической способности.

Из Рис. 39 также видно, что три сайта N-гликозилирования: N219, N265 и N395 – расположены на одной линии, практически параллельной направлению полисахаридной цепи субстрата в активном центре ЦБГII. Подобное расположение сайтов гликозилирования на поверхности белковой глобулы может быть связано с участием N-связанных гликанов в обеспечении правильной ориентации каталитического домена ЦБГII на поверхности микрофибрилл целлюлозы. Поэтому удаление сайта гликозилирования N395 привело к уменьшению активности ЦБГII.

Сайт N279 расположен рядом с гликозилированным линкером, соединяющим каталитический и целлюлозосвязывающий домены. Удаление сайта в этом случае, вероятно, привело к нарушению правильной ориентации каталитического и целлюлозосвязывающего домена и потере каталитической активности по отношению к МКЦ. Каталитическая активность по отношению к КМЦ и β -глюкану при этом сохранилась, что объясняется возможностью каталитического домена связываться с этими субстратами и осуществлять гидролиз.

3.4. Белковая инженерия целлюлозогидролазы I *Penicillium verruculosum*

3.4.1. Анализ аминокислотной последовательности ЦБГ I *Penicillium verruculosum*

Множественное выравнивание было осуществлено для аминокислотных последовательностей ЦБГ I *P. verruculosum* и некоторых целлюлозогидролаз из 7-й семьи гликозид-гидролаз: *T. funiculosus* (*P. funiculosum*) (степень гомологии 90,7%), *A. fumigatus* (67,9%), *A. niger* (65,2%) и *T. reesei* (62,5%), для которых также известна кристаллическая структура. Множественное выравнивание было использовано для поиска теоретических сайтов N-гликозилирования, а также консервативных участков последовательности, которые могут быть значимы для проявления каталитических и биохимических свойств фермента.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ЦБГ I приведено на Рис. 40, нумерация а.к. остатков соответствует структуре белков без сигнального пептида.

Консервативными в структуре ЦБГ I *P. verruculosum* являются каталитически активные остатки Glu209-Asp211-Glu214, остаток Glu123 также возможно принимает участие в катализе. «Стекинг-взаимодействие» активного центра с полимерным субстратом осуществляется за счет остатков триптофана Trp38, Trp40, Trp371 и Trp380, эти остатки являются консервативными для рассмотренных структур. Остатки тирозина Tyr51, Tyr82, Tyr374 (в структуре ЦБГ I *A. fumigatus* остаток заменен на His) и Tyr385 возможно принимают участие в связывании низкомолекулярных и полимерных субстратов [195-199].

В структуре ЦБГ I *P. verruculosum* было найдено 4 теоретических сайта N-гликозилирования. Аналогичные сайты присутствуют и в структурах рассмотренных ЦБГ I, однако ни один из этих сайтов не является консервативным для рассмотренных структур. Согласно литературным данным сайты Asn270 и Asn384 в ЦБГ I *T. reesei* (сайт Asn384 соответствует Asn388 в ЦБГ I *P. verruculosum*) и Asn45, Asn388 и Asn430 в ЦБГ I *P. funiculosum* (что соответствует сайтам Asn45, Asn388 и Asn430 в ЦБГ I *P. verruculosum*) гликозилированы. Мутация N384A, осуществленная в ЦБГ I *T. reesei*, привела к увеличению каталитической активности на 70% по сравнению с немутантной формой. Мутации N45A, N388A и N430A, осуществленные в ЦБГ I *P. funiculosum*, привели к увеличению активности на 30% по сравнению с немутантной формой, кроме того, создание нового сайта гликозилирования в результате внесения в структуру мутации A196S также привело к увеличению активности, на 70% по сравнению с немутантной формой [132]. Таким образом, белковая инженерия сайтов N-гликозилирования ЦБГ I *T. reesei* и *P. funiculosum* позволила увеличить каталитическую активность ЦБГ I.

```

ЦБГІ P.v.      -MSALNSFNMYKSALILGSLLATAGAQQIGTYTAETHPSLSWSTCKSGGSCTTNAGSIVL 34 (59)
ЦБГІ P.f.      -MSALNSFNMYKSALILGSLLATAGAQQIGTYTAETHPSLSWSTCKSGGSCTTNSGAILL 34 (59)
ЦБГІ A.f.      MLASTFSYRMYKTALILAALLGSGQAQQVGTSQLAEVHPSMTWQSC TAGGSC TTNNGKVVI 34 (60)
ЦБГІ A.n.      ---MSSFQIYRAALLL-SILATANAQQVGTYYTETHPSLWQTCTSDGSC TTNNDGEVVI 34 (55)
ЦБГІ T.r.      -----MYRKLAVISAFLATARAQSACTLQSETHPPLTWQCKSSGGTCTQQTGSVVI 34 (51)
                :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*

ЦБГІ P.v.      DANRWVHGVNTSTNCYTGNWTNTAICTDTCACQDCALDGADYSGTYGITTSGNLSRLN 94 (119)
ЦБГІ P.f.      DANRWVHGVNTSTNCYTGNWTNTAICTDTCASQDCALDGADYSGTYGITTSGNLSRLN 94 (119)
ЦБГІ A.f.      DANRWVHKVGDYTCYTGNTWDTTICPDDATCASNCALEGANYESYGVTFASGNLSRLN 94 (120)
ЦБГІ A.n.      DANRWVHSTSSATNCTGNEWDTSICTDDVTCAANCALDGATYEATYGVTTSGSELRLN 94 (115)
ЦБГІ T.r.      DANRWVTHATNSSNCTYDGNWTSSTLCPDNETCAKNCCLDGAAYASTYGVTTSGNSLSIG 94 (111)
                ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ЦБГІ P.v.      FVTG---SNVGSRTYLMADNTHYQMFDLLNQEFFFTVDVSNLPCGLNGLYFVTMDADGG 151 (176)
ЦБГІ P.f.      FVTG---SNVGSRTYLMADNTHYQIFDLLNQEFFFTVDVSNLPCGLNGLYFVTMDADGG 151 (176)
ЦБГІ A.f.      FVTTSQKKNIGSRLYMMKDDSTYEMFKLLNQEFFFDVDVSNLPCGLNGLYFVAMDADGG 154 (180)
ЦБГІ A.n.      FVTQSSKNIGSRLYLMSDSDNYELFKLQEFFFDVDVSNLPCGLNGLYFVAMDADGG 154 (175)
ЦБГІ T.r.      FVTQSAQKNVGARLYLMSADTTYQEFFLLGNFFSFDVDVSNLPCGLNGLYFVAMDADGG 154 (171)
                *** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ЦБГІ P.v.      VSKYPNNKAGAQYGVGYCDSQCPRDLKFIHQANIEGWVSTNNNTGIGNHGS CAELF 211 (236)
ЦБГІ P.f.      VSKYPNNKAGAQYGVGYCDSQCPRDLKFIAGQANVEGWTPTSTNNNTGIGNHGS CAELF 211 (236)
ЦБГІ A.f.      MSKYPTNKAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFIHQANVEGWQPSNDANAGTGNHGS CAELF 214 (240)
ЦБГІ A.n.      TSEYSGNKAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFIHQANVEGWQPSNDANAGTGNHGS CAELF 214 (235)
ЦБГІ T.r.      VSKYPTNTAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFIHQANVEGWQPSNDANAGTGNHGS CAELF 214 (231)
                * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ЦБГІ P.v.      IWEANSVSEALTPHPCDTPGQTVCTGDACGGTYS--SNRYGGTCDPDGCFNPNYRLGVTD 269 (294)
ЦБГІ P.f.      IWEANSISEALTPHPCDTPGLTVC TADDCGGTYS--SNRYAGTCDPDGCFNPNYRLGVTD 269 (294)
ЦБГІ A.f.      IWEANSISTAFTHPCDTPGQVMCTGDACGGTYS--SDRYGGTCDPDGCFNPNYRQGNKT 272 (298)
ЦБГІ A.n.      VWEANSISNAFTAHPDVSQTMCDGDSGGTYSASGDRYSGTCDPDGCDYNPNYRLGNTD 274 (295)
ЦБГІ T.r.      IWEANSISEALTPHPCDTPVQEI CEGDGGTYS--DNRVGGTCDPDGCDWPNYRLGNTS 272 (289)
                :***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ЦБГІ P.v.      FYGSGK--TVDTTKPFTVVTQFVTS DGTSTGSLSEIRRYVQNGVVIQPPSSKISGISGN 327 (352)
ЦБГІ P.f.      FYGSGK--TVDTTKPFTVVTQFVTD DGTSSGSLSEIRRYVQNGVVIQPPSSKISGISGN 327 (352)
ЦБГІ A.f.      FYGPGM--TVDTTKKFTVVTQFITDDGTS SGTLKEIKRFYVQNGKVI PNSESTWTVGSGN 330 (356)
ЦБГІ A.n.      FYGPGM--TVDTNSPFTVVTQFITDDGTS SGTLKEIKRKYVQNGVI PNSESTWTVGSGN 332 (353)
ЦБГІ T.r.      FYGPGSSFTLDTTKKTLLVVTQFETS-----GAINRYVQNGVTFQQPNAELGYSYGN 324 (341)
                *** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ЦБГІ P.v.      VINSAFCAELSTFGETASFTNHGGLTNMGAALKTMGMVLSLWDDYAVDMLWLDSTYPT 387 (412)
ЦБГІ P.f.      VINSDFCAELSAFGETASFTNHGGLKNGMSALEAGMVLVMSLWDDYVSNMLWLDSTYPA 387 (412)
ЦБГІ A.f.      SITTEYCTAQKSLFQDQNVFEKHGGLGEMGAALAQGMVLSLWDDHSANMLWLDSDNYPT 390 (416)
ЦБГІ A.n.      SITSAFCESEKTLFGDENVFDKHGGLGEMGEAMAKGMVLSLWDDYAADMLWLDSDYFP 392 (413)
ЦБГІ T.r.      ELNDYCTAEAEAFGGS-SFSDKGLTQFKKATSGGMVLSLWDDYVYANMLWLDSTYPT 383 (400)
                : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ЦБГІ P.v.      NAT-GTPGAARGSCPTTSGDPKTVAEQSGSAYVIYSDIRVGPINSTFSGSSTGGSTTSS- 445 (470)
ЦБГІ P.f.      NET-GTPGAARGSCPTTSGNPKTVESQSGSSYVFS DIKVGPFNSTFSGGTSTGGSTTTT 446 (471)
ЦБГІ A.f.      TASSTTPGVARGTCDISSGVPADVEANHPDAYVVYVSNIKVGPIGSTFNSGGSNPFGGTTTT 450 (476)
ЦБГІ A.n.      NSSASTPGVARGTCTDSDGVPATVEAESPNAYVYVSNIKVGPIGSTYSSGSSSGSSSSS 452 (473)
ЦБГІ T.r.      NETSSTPGAVRGSCSTSSGVPQVESQSPNAKVTFVSNIKVGPIGSTGNPSSGNPFGGNRG 443 (460)
                . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ЦБГІ P.v.      ---T-----TITSKTSTTTSSSTATGTGVAAHYQCGGQGWGTGPTTCASGYTCTVLPNPYS 497 (522)
ЦБГІ P.f.      ASGT-----TSTKASTTSSSTSTGTGVAAHWQCGGQGWGTGPTTCASGTTCTVLPNPYS 501 (526)
ЦБГІ A.f.      TTTT-----QPTTTTTAGNPGGTGVAQHYGQCGGIGWTGPTTCASPYTCQKLNDDYS 503 (529)
ЦБГІ A.n.      SSSTTTKATSTTLKTTSTSSGSSSTSAQAQYQCGGQGWGTGPTTCVSGYTCYENAYYS 512 (533)
ЦБГІ T.r.      TTTTRR-----PAT--TTGSSPGPTQSHYQCGGIGYSGPTTCASGTTCTVLPNPYS 493 (510)
                * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ЦБГІ P.v.      QCL 500 (525)
ЦБГІ P.f.      QCL 504 (529)
ЦБГІ A.f.      QCL 506 (532)
ЦБГІ A.n.      QCL 515 (536)
ЦБГІ T.r.      QCL 513 (496)
                ***

```

Рис. 40. Выравнивание аминокислотных последовательностей ЦБГІ *P.verruculosum* и некоторых целлюбиогидролаз из 7-й семьи гликозид-гидролаз (целлюбиогидролазы *T.funiculosus* (*P.funiculosum*) UniProtKB Q8WZJ4, *A.fumigatus* UniProtKB Q4WM08, *A.niger* UniProtKB Q9UVS8 и *T.reesei* UniProtKB P62694). Красным цветом выделены

каталитически активные остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот, зеленым – остатки, принимающие участие в связывании субстрата и катализе, желтым – остатки цистеина, участвующие в образовании S-S-связей, синим – теоретические сайты N-гликозилирования, серым – сигнальный пептид. Остатки, образующие целлюлозосвязывающий домен, подчеркнуты сплошной линией, остатки, образующие линкер, подчеркнуты пунктирной линией. Высококонсервативные области аминокислотных последовательностей выделены знаком *. Нумерация с учетом сигнального пептида указана в скобках.

Моделирование трехмерной структуры ЦБГІ *P.verruculosum* было осуществлено с использованием программы SWISS-MODEL Швейцарского института биоинформатики. При моделировании в качестве шаблона была использована структура ЦБГІ Cel7A *T.emersonii* (3pfzA.pdb) (степень гомологии каталитических доменов ЦБГІ 71,1%). Полученная трехмерная модель каталитического домена ЦБГІ *P.verruculosum* представлена на Рис. 41.

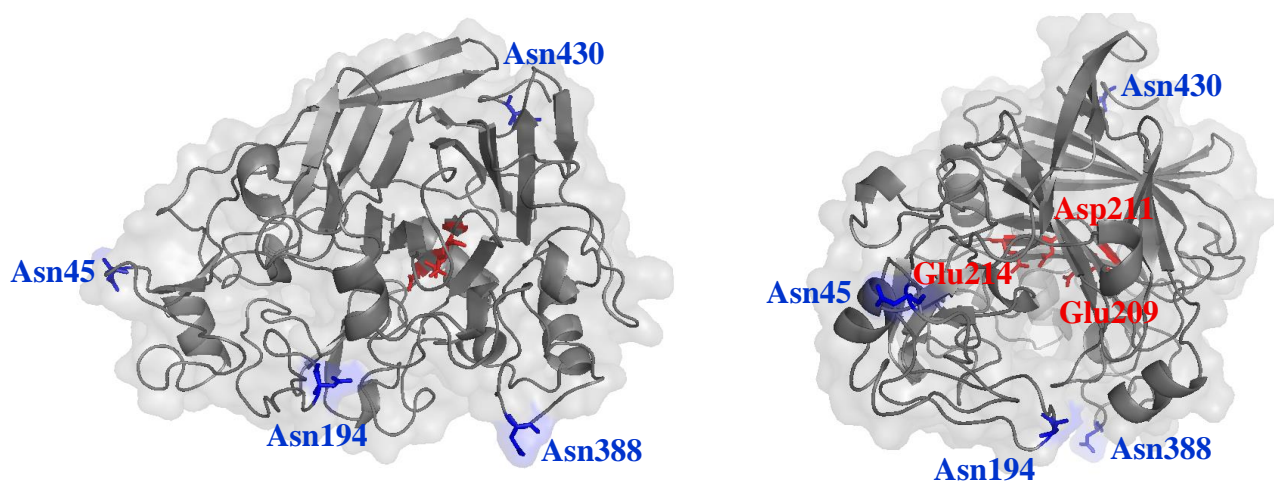


Рис. 41. Трехмерная модель каталитического домена ЦБГІ *P.verruculosum*. Красным цветом показаны каталитически активные остатки Glu209-Asp211-Glu214, синим – остатки аспарагина Asn45, Asn194, Asn388 и Asn430, входящие в состав теоретических сайтов N-гликозилирования.

Все теоретические сайты N-гликозилирования в структуре ЦБГІ *P.verruculosum* находятся на поверхности белковой глобулы и могут быть доступны для гликозилирования. Сайт Asn45 находится у входа в «туннель» активного центра, два сайта Asn194 и Asn388 находятся на поверхности петель, ограничивающих «туннель», а сайт

Asn430 расположен рядом с началом линкера, соединяющего каталитический и целлюлозосвязывающий домены. Таким образом, все теоретические сайты гликозилирования расположены в областях белковой глобулы, важных для проявления каталитических свойств, и могут влиять на ферментативную активность.

3.4.2. Внесение мутаций в ген и получение плазмид

Для амплификации гена *cbhI* и введения мутаций были разработаны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры (Таблица 12).

Таблица 12. Праймеры, использованные в работе (нуклеотиды, соответствующие точечной а.к. замене подчеркнуты).

Назначение	Праймеры
<i>Мутация N45A</i>	CBH1-N45A-fwd 5'- t cat ggt gtc <u>gcc</u> acc agc acc aac tgc tac ac - 3' CBH1-N45A-rev 5'- t gta gca gtt ggt gct ggt <u>ggc</u> gac acc atg aac - 3'
<i>Мутация N194A</i>	CBH1-N194A-fwd 5'- tgg gta tcc tcc acc <u>gcc</u> aac tcc aac ac - 3' CBH1-N194A-rev 5'- t gtt gga gtt <u>ggc</u> ggt gga gga tac cca - 3'
<i>Мутация N388A</i>	CBH1-N388A-fwd 5'- ac agc act tac ccc aca <u>gcc</u> gca act ggc ac - 3' CBH1-N388A-rev 5'- gt gcc agt tgc <u>ggc</u> tgt ggg gta agt gct gt - 3'
<i>Мутация N430A</i>	CBH1-N430A-fwd 5'- agg gtt ggt cca atc <u>gcc</u> tct act ttc agc - 3' CBH1-N430A-rev 5'- gct gaa agt aga <u>ggc</u> gat tgg acc aac cct - 3'

Методом ПЦР с использованием геномной ДНК *P.verruculosum* в качестве матрицы были амплифицированы фрагменты гена *cbhI*, содержащие необходимые мутации. Эти фрагменты далее были клонированы в шаттл-вектор, содержащий нуклеотидные последовательности, соответствующие промоторной области гена ксиланазы А *P.canescens* и терминаторной области гена ЭГШ *P.canescens*, а также необходимые генетические элементы для репликации в клетках *E.coli*. Далее полученные плазмиды были трансформированы в компетентные клетки *E.coli* для наработки ДНК. Последовательность гена, наличие необходимых мутаций и отсутствие случайных мутаций были подтверждены секвенированием плазмидной ДНК. Таким образом, были получены 4 плазмиды, содержащие ген *cbhI* *P.verruculosum* с одной из мутаций N45A, N194A, N388A и N430A.

Далее была проведена наработка ДНК в клетках *E.coli* для последующей котрансформации штамма-реципиента *P.canescens* PCA-10 *niaD*⁻, дефектного по гену нитратредуктазы, совместно с трансформирующей плазмидой pSTA10 (*niaD*⁺), несущей ген нитратредуктазы.

3.4.3. Получение грибных штаммов, продуцирующих мутантные формы ЦБГГ

Штамм-реципиент *P.canescens* PCA-10 *niaD*⁻ был котрансформирован плазмидами, содержащими ген *cbhI* *P.verruculosum*, совместно с плазмидой pSTA10 (*niaD*⁺), несущей ген нитратредуктазы. Для каждой из четырех осуществленных мутаций было получено по 35-40 трансформантов, был проведён первичный скрининг трансформантов на наличие гена *cbhI*, результат скрининга представлен в виде агарозного электрофореза ПЦР-продуктов на Рис. 42 (M – маркер, pDNA – положительный контроль по плазмидной ДНК, содержащей ген *cbhI*, *niaD* – отрицательный контроль по штамму-реципиенту PCA-10 *niaD*⁻).

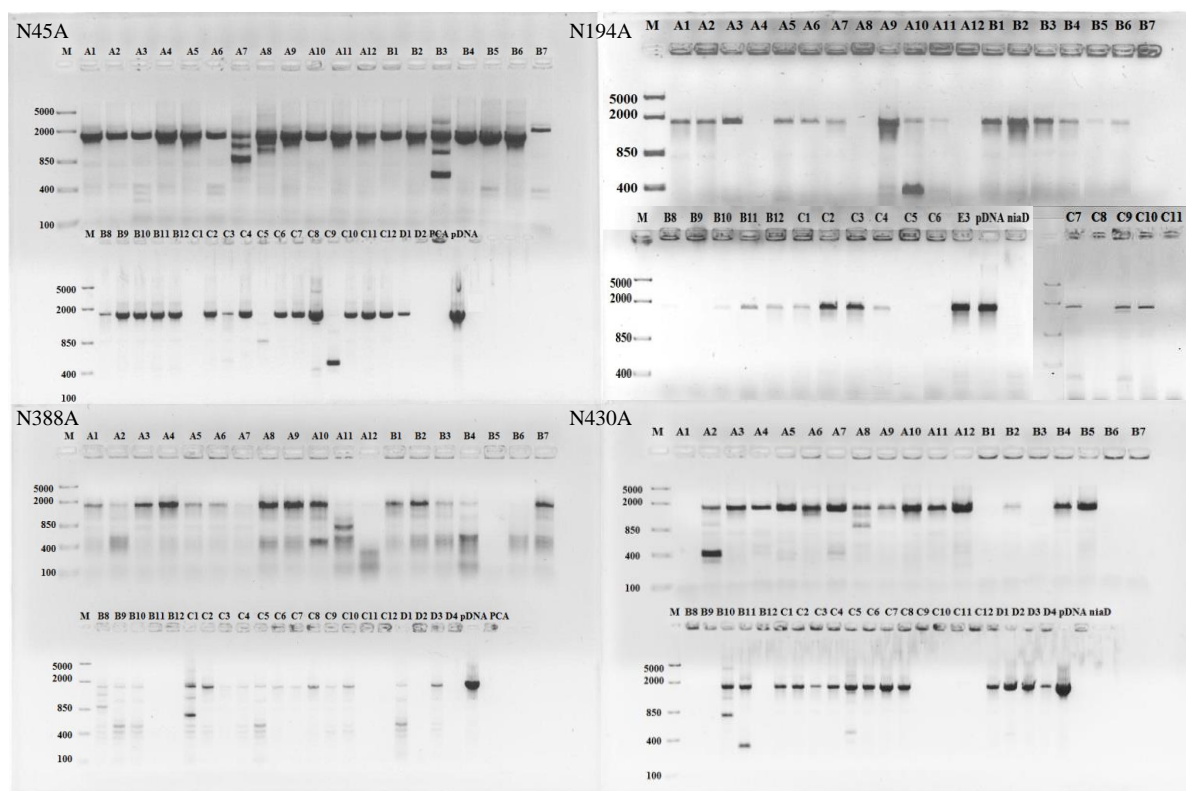


Рис. 42. ПЦР-скрининг трансформантов на наличие гена *cbhI* *P.verruculosum*, полученных в результате трансформации одной из четырех плазмид (*cbhI*-N45A, *cbhI*-N194A, *cbhI*-N388A и *cbhI*-N430A) (M – маркер, pDNA – положительный контроль по плазмидной ДНК, содержащей ген *cbhI*, *niaD* – отрицательный контроль по штамму-реципиенту PCA-10 *niaD*⁻).

ПЦР-скринингом проанализировано:

ЦБГГ N45A	38 трансформантов, из них 34 оказались положительными
ЦБГГ N194A	36 трансформантов, из них 26 оказались положительными
ЦБГГ N388A	40 трансформантов, из них 31 оказался положительным
ЦБГГ N430A	40 трансформантов, из них 28 оказались положительными

В результате ПЦР-скрининга были выявлены положительные клоны, содержащие вставки целевых генов ЦБГІ. Для ферментации выбраны клоны:

ЦБГІ N45A A1-A12, B1-B12, C1-C4, C6-C8, C10-C12, D1 (35 клонов)

ЦБГІ N194A A1-A3, A5-A7, A9-A11, B1-B6, B10-B12, C1-C4, C7, C9-C10, E3 (26 клонов)

ЦБГІ N388A A1, A3-A6, A8-A9, B1-B2, B7, C1-C2, C8, C10 (14 клонов)

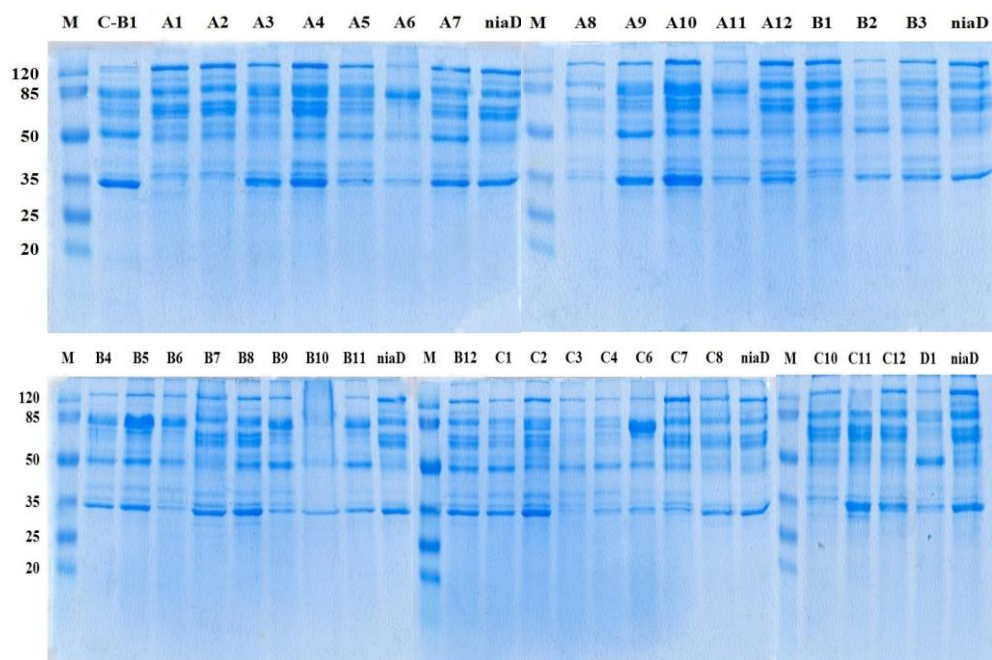
ЦБГІ N430A A3, A4-A7, A10-A12, B5, C1-C4, C6-C8, D1-D3 (19 клонов)

Выбранные трансформанты культивировали на среде для *P.canescens* 6 суток (30°C, 215 об/мин). Пробы КЖ отбирали на 6 сутки, был проведен ДДС-электрофорез, также в КЖ были определены концентрация общего белка, значения целевой активности по отношению к МКЦ и базовой активности по отношению к ксилану.

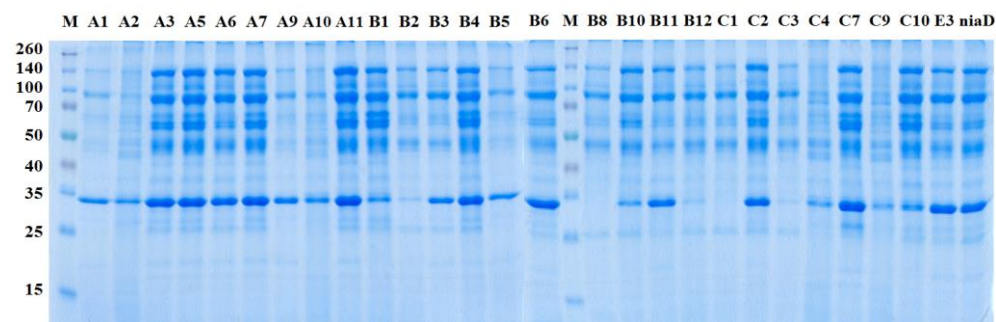
ДДС-электрофореграммы КЖ трансформантов, содержащих ген *cbhI* *P.verruculosum* с одной из четырех мутаций N45A, N194A, N388A и N430A, представлены на Рис. 43 (M – маркер, *niaD* – контроль по штамму-реципиенту *P.canescens*).

На электрофореграммах нескольких из трансформантов наблюдалась полоса, соответствующая белку с молекулярной массой (70±5) кДа, что совпадало с молекулярной массой ЦБГІ *P.verruculosum* 66 кДа. Следует отметить, что для большинства трансформантов положение гетерологичной ЦБГІ на ДДС-электрофореграммах совпадало с положением базовых белков, секретируемых штаммом-реципиентом *P.canescens*.

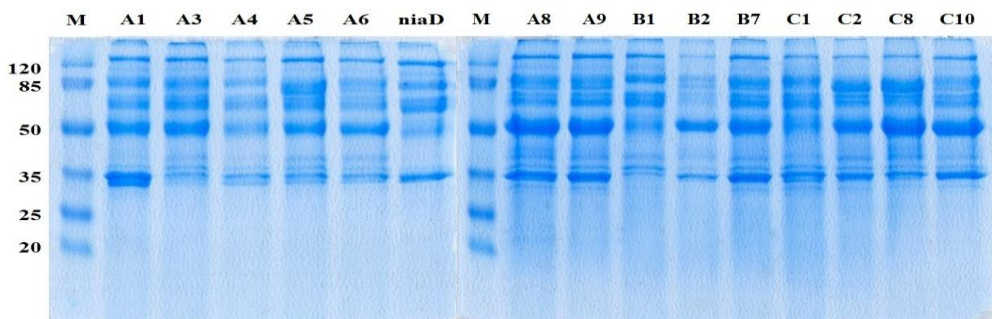
N45A



N194A



N388A



N430A

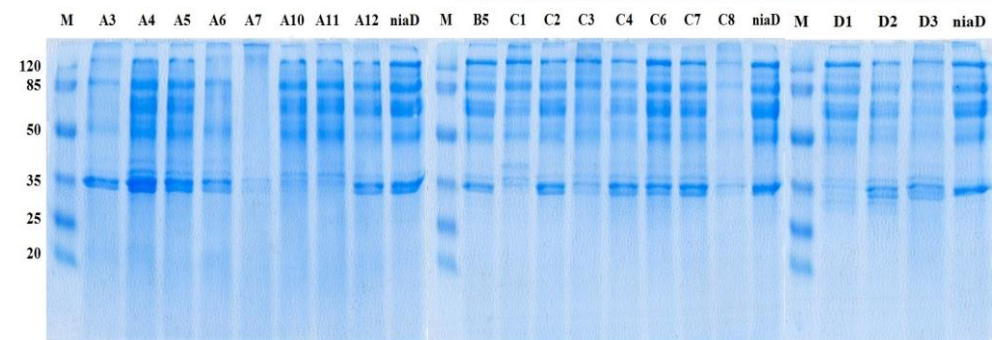


Рис. 43. ДДС-электрофореграммы КЖ трансформантов, содержащих ген *cbhI* *P.verruculosum* с одной из четырех мутаций N45A, N194A, N388A и N430A (M – маркер, С-В1 – контроль по ФП ЦБГІ, экспрессированной в *P.canescens*, *niaD* – контроль по штамму-реципиенту *P.canescens*).

Значения концентрации общего белка и ферментативной активности по отношению к МКЦ и ксилану в КЖ трансформантов приведены на Рис. 44.

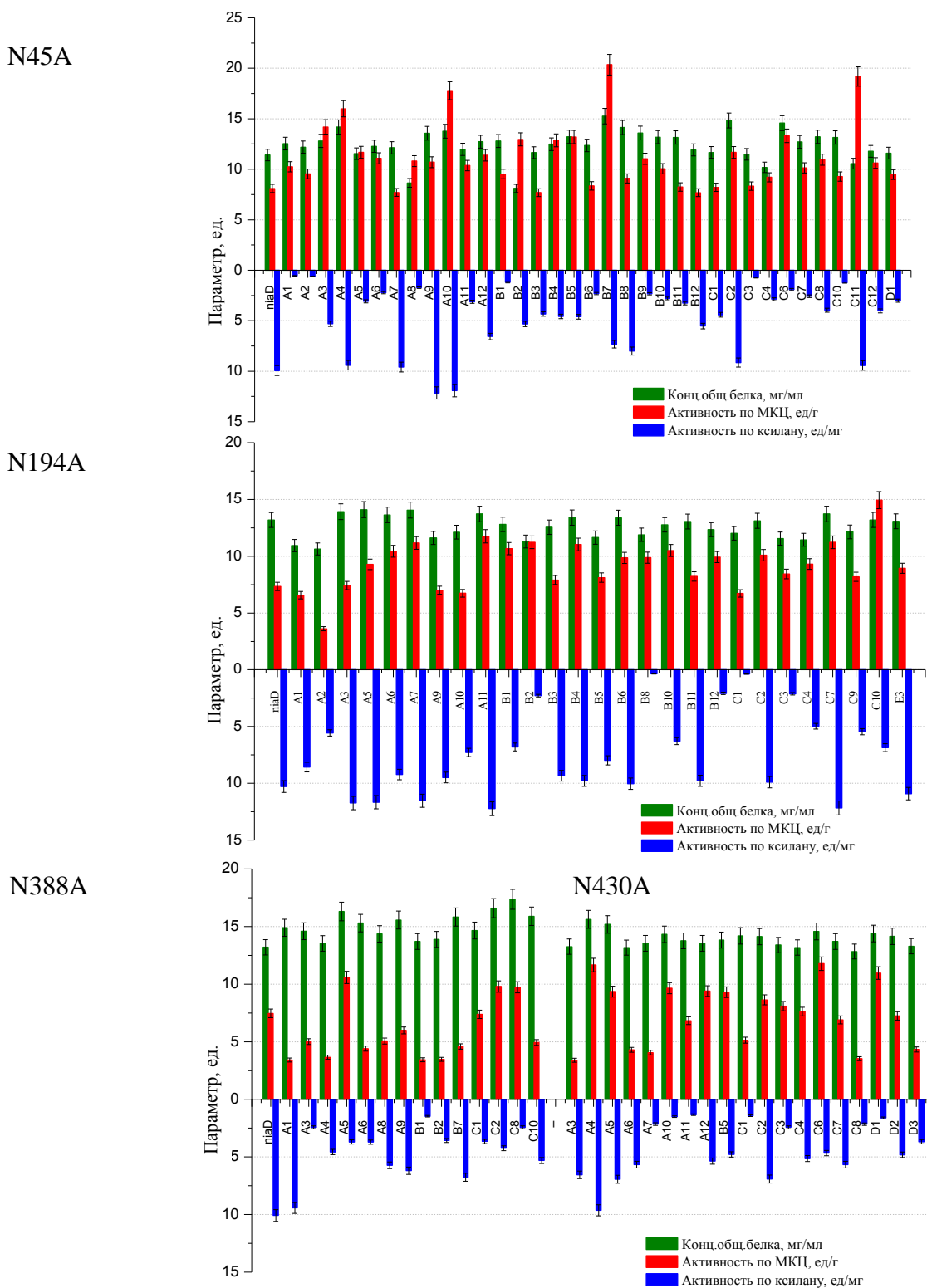


Рис. 44. Значения концентрации общего белка (мг/мл), ферментативной активности по отношению к МКЦ и ксилану (ед/мг общего белка) в КЖ трансформантов, содержащих ген *cbhI* *P.verruculosum* с одной из четырех мутаций N45A, N194A, N388A и N430A (*niaD* – контроль по штамму реципиенту *P.canescens*).

Для всех трансформантов уровень экспрессии общего белка был сравним с уровнем экспрессии контрольного штамма, следовательно, трансформация штамма-реципиента экспрессионными конструкциями, содержащими мутантный гетерологичный ген *cbhI* *P.verruculosum*, не привела к потере штаммом жизнеспособности и снижению продуктивности. Тем не менее, только некоторые из трансформантов обладали большей активностью по отношению к специфическому для ЦБГІ субстрату МКЦ по сравнению с контрольным штаммом-реципиентом. Следует отметить, что для грибных целлюбиогидролаз характерен невысокий уровень активности по отношению к МКЦ (0,1-0,2 ед/мг [147]), поэтому секреция гетерологичной ЦБГІ может не приводить к заметному увеличению ферментативной активности в КЖ.

Активность по отношению к ксилану для большей части трансформантов оказалась меньше активности в КЖ контрольного штамма-реципиента, что свидетельствовало о высокой эффективности (множественности) встройки гена *cbhI* в геном штамма-реципиента. Как уже отмечалось выше, экспрессионные конструкции, использовавшиеся для трансформации, содержали в качестве регуляторного элемента промоторную область гена ксиланазы А *P.canescens*, поэтому встройка целевого гена *cbhI* в геном штамма-реципиента происходила по механизму гомологичной рекомбинации и приводила к замещению гена ксиланазы А геном ЦБГІ, что при значительной эффективности встройки должно выражаться в увеличении активности по отношению к МКЦ и уменьшении активности по отношению к ксилану в КЖ трансформантов.

Для ферментации в ферментерах и наработки ФП были выбраны трансформанты, характеризовавшиеся наибольшей среди трансформантов секрецией белка с молекулярной массой (70±5) кДа, наибольшей среди трансформантов активностью по отношению к МКЦ и наименьшей – по отношению к ксилану: ЦБГІ N45A A6, N194A C10, N388A C8 и N430A A10, D1.

3.4.4. Выделение и очистка ЦБГІ хроматографическими методами

В результате ферментации в ферментерах были получены ФП *P.canescens*, содержащие мутантные формы ЦБГІ *P.verruculosum* (рекомб. ЦБГІ N45A, N194A, N388A и N430A). Ранее в нашей лаборатории был получен ФП *P.canescens*, содержащий немутантную форму ЦБГІ *P.verruculosum* (рекомб. ЦБГІ) [190]. Рекомбинантные формы ЦБГІ, содержащиеся в этих ФП, были выделены из ФП методом анионообменной хроматографии и очищены методом гидрофобной хроматографии. Типичная хроматограмма и соответствующая ей ДДС-электрофореграмма, полученные в результате анионообменной хроматографии ФП, представлены на Рис. 45.

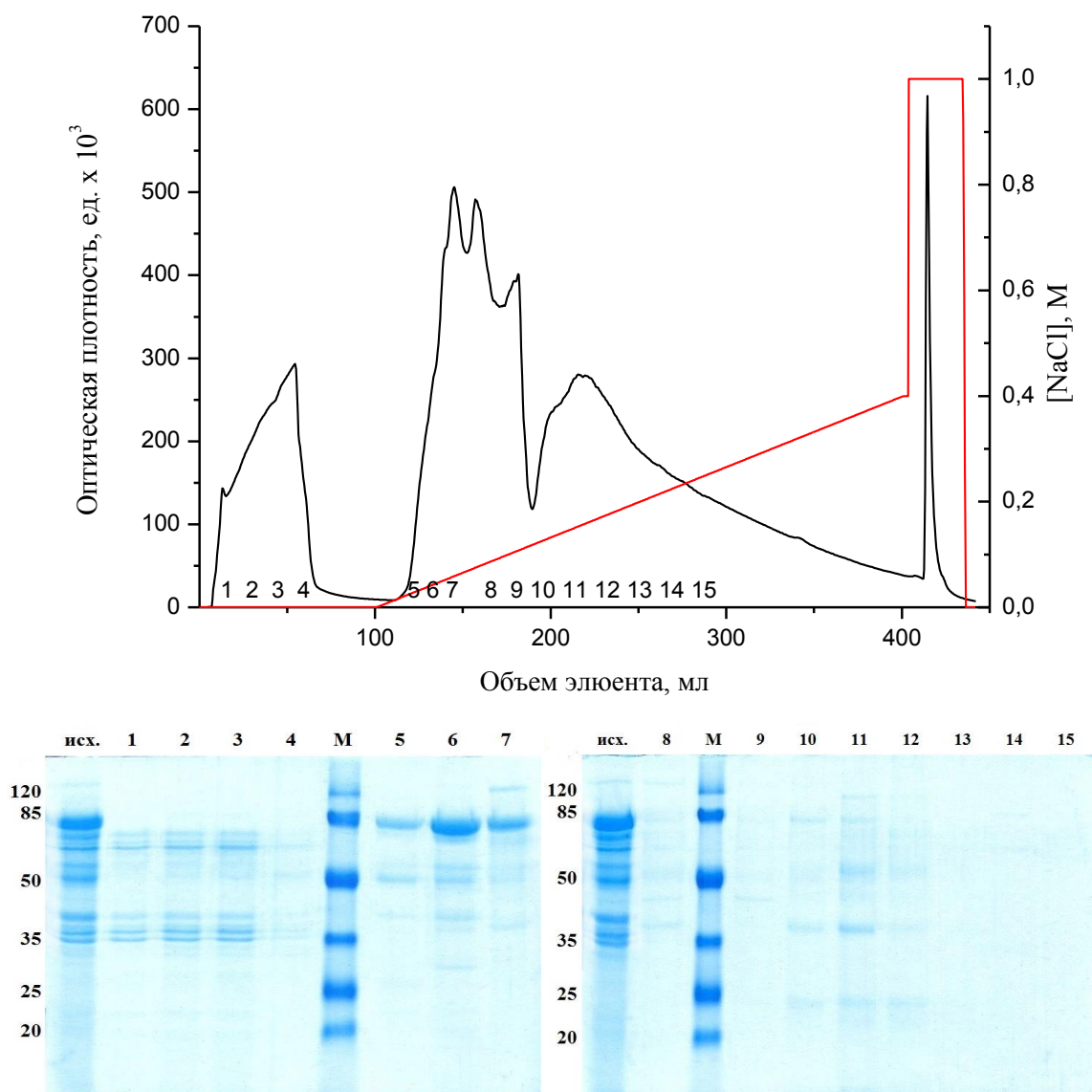


Рис. 45. Хроматограмма и ДДС-электрофореграмма фракций, полученных в результате анионообменной хроматографии ФП, содержащего мутантную форму ЦБГІ N45A *P.verruculosum* (M – маркер, исх. – исходный ФП до разделения белков методом анионообменной хроматографии).

Белки в фракциях 5-7 (концентрация NaCl в элюирующем растворе 0,04-0,09 M) по молекулярной массе и ферментативной активности соответствовали ЦБГІ N45A *P.verruculosum*. Положение пика оптической плотности на хроматограммах, тем не менее, было различным для различных форм ЦБГІ (Рис. 46). Пик, соответствовавший рекомб. ЦБГІ, находился в области концентрации NaCl 0,056-0,077 M, что совпадало с положением пика для нативн. ЦБГІ [147]. Для рекомб. ЦБГІ N45A и рекомб. ЦБГІ N194A пик оказался сдвинут в область меньших концентраций NaCl: 0,046-0,067 M и 0,050-0,060 M соответственно. Для рекомб. ЦБГІ N388A пик, напротив, оказался сдвинут в область больших концентраций NaCl 0,081-0,097 M. Таким образом, внесение

различных мутаций в структуру ЦБГІ привело к различным эффектам в изменении поверхностного заряда белковой глобулы или изменении степени доступности поверхности для взаимодействия с хроматографическим носителем.

Мутантная форма рекомб. ЦБГІ N430A не была обнаружена в составе ни одного из ФП, полученных в результате ферментации трансформантов с вставкой мутантного гена ЦБГІ N430A.

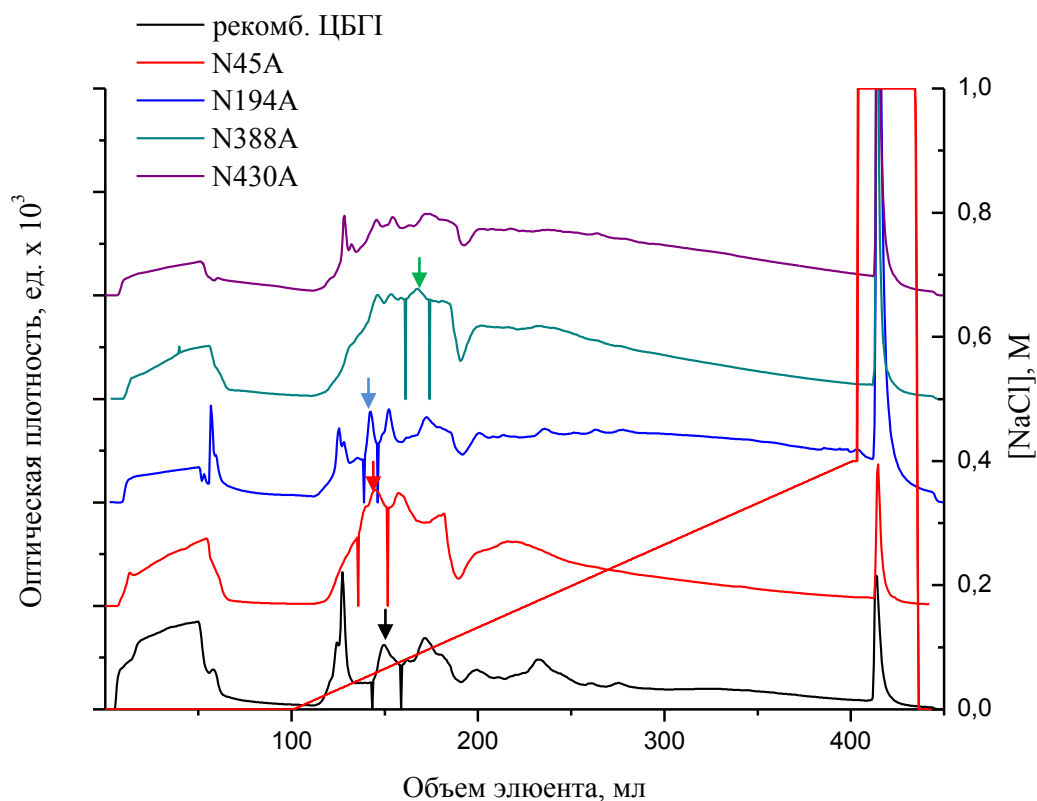


Рис. 46. Хроматограммы, полученные в результате анионообменной хроматографии ФП, содержащих рекомбинантные (немутантная и мутантные) формы ЦБГІ *P.verruculosum*.

Дальнейшее разделение фракций осуществляли методом гидрофобной хроматографии. Типичная хроматограмма и соответствующая ей ДДС-электрофореграмма, полученные в результате гидрофобной хроматографии фракций, представлены на Рис. 47.

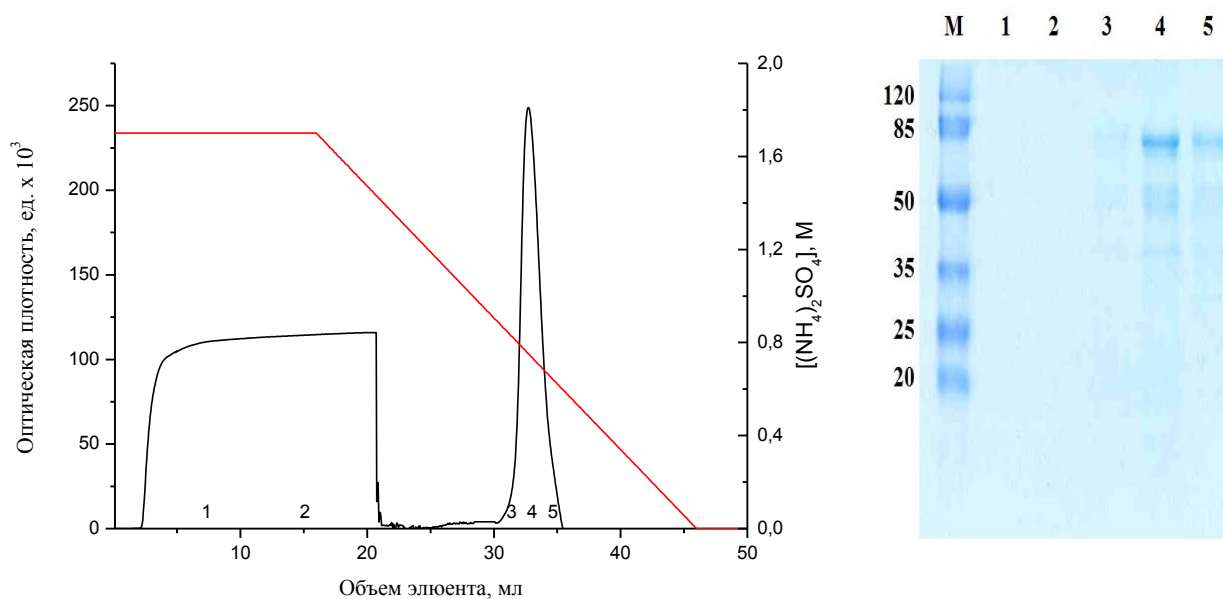


Рис. 47. Хроматограмма и ДДС-электрофореграмма фракций, полученных в результате гидрофобной хроматографии фракции 6 анионообменной хроматографии ФП, содержащего мутантную форму ЦБГІ N45A *P.verruculosum*.

Положения пиков оптической плотности на хроматограммах отличались для различных форм ЦБГІ (Рис. 48). Пики, соответствовавшие рекомб. ЦБГІ и рекомб. ЦБГІ N45A, находились в области концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,87-0,72 М, что совпадало с положением пика для нативн. ЦБГІ [147]. Пики, соответствовавшие рекомб. ЦБГІ N194A и рекомб. ЦБГІ N388A, оказались сдвинуты в область меньшей концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и находились в области 0,81-0,63 М. В случае рекомб. ЦБГІ N194A и рекомб. ЦБГІ N388A это, возможно, означает, что в результате внесения мутаций в структуру ЦБГІ для взаимодействия с носителем оказывается доступным больше гидрофобных участков, чем в случае рекомб. ЦБГІ N45A.

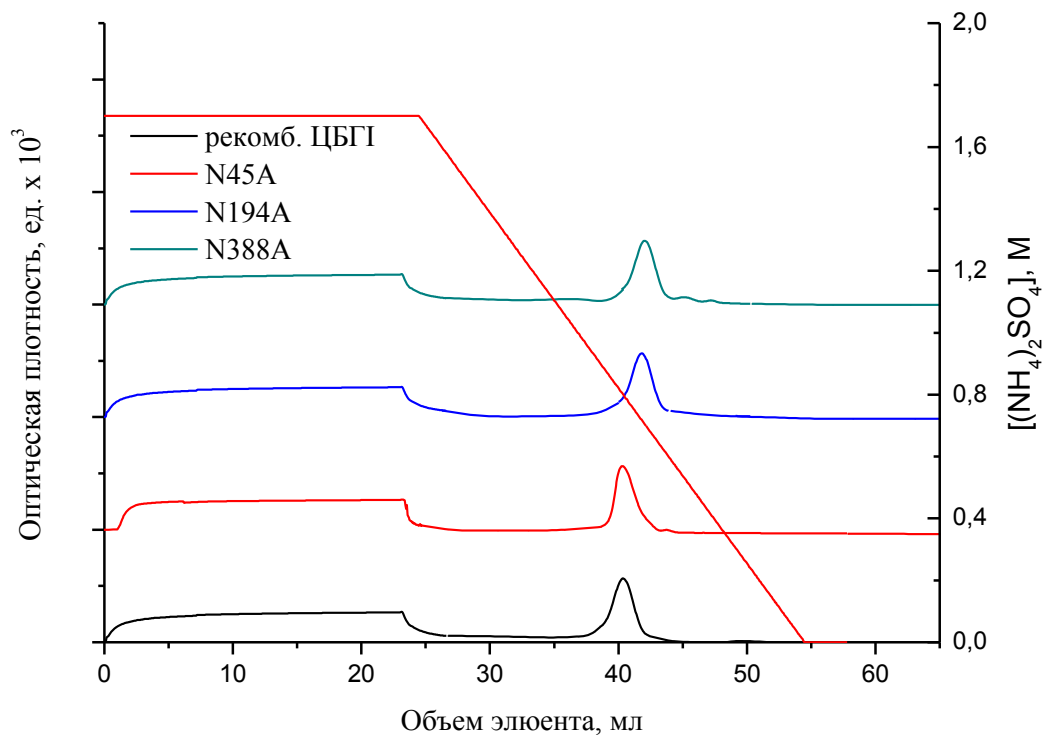


Рис. 48. Хроматограммы, полученные в результате гидрофобной хроматографии фракций ФП, содержащих рекомбинантные (немутантная и мутантные) формы ЦБГ *P. verruculosum*.

Фракции, по молекулярной массе и ферментативной активности соответствовавшие ЦБГ *P. verruculosum*, были обессолены и сконцентрированы с использованием мембранных колонок. На Рис. 49 приведена ДДС-электрофореграмма гомогенных ферментов: немутантная и мутантные формы ЦБГ *P. verruculosum*. Масс-спектрометрический анализ полос, по массе соответствовавших ЦБГ, позволил подтвердить структуру различных форм ЦБГ, а также определить сайты N-гликозилирования и структуру N-связанных гликанов.

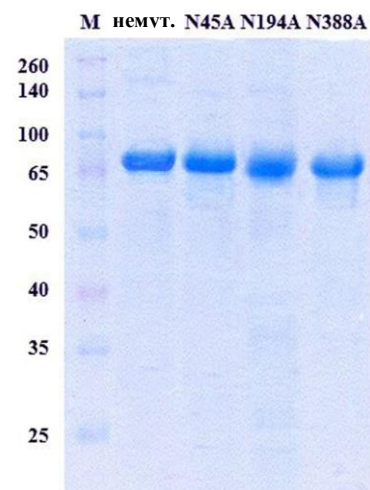


Рис. 49. ДДС-электрофореграмма немутантных и мутантных форм ЦБГ *P. verruculosum*.

3.4.5. Масс-спектрометрический анализ ЦБГГ

Для всех выделенных рекомбинантных форм ЦБГГ (рекомб. ЦБГГ, рекомб. ЦБГГ N45A, N194A и N388A) а также для нативной формы ЦБГГ (нативн. ЦБГГ) масс-спектрометрическим анализом была подтверждена первичная структура, в случае мутантных форм подтверждено наличие необходимых а.к. замен. В Приложении 3 приведены положения пиков, соответствующих пептидам ЦБГГ и подтверждающих наличие а.к. замен. В Приложении 3 также приведены положения пиков, соответствующих различным гликопептидам ЦБГГ. В качестве примера на Рис. 50 приведен масс-спектр рекомб. ЦБГГ, содержащий серии пиков, различающихся на массу ангидроманнозного остатка (162 Да) и принадлежащих гликопептидам с различной длиной олигосахаридной цепи.

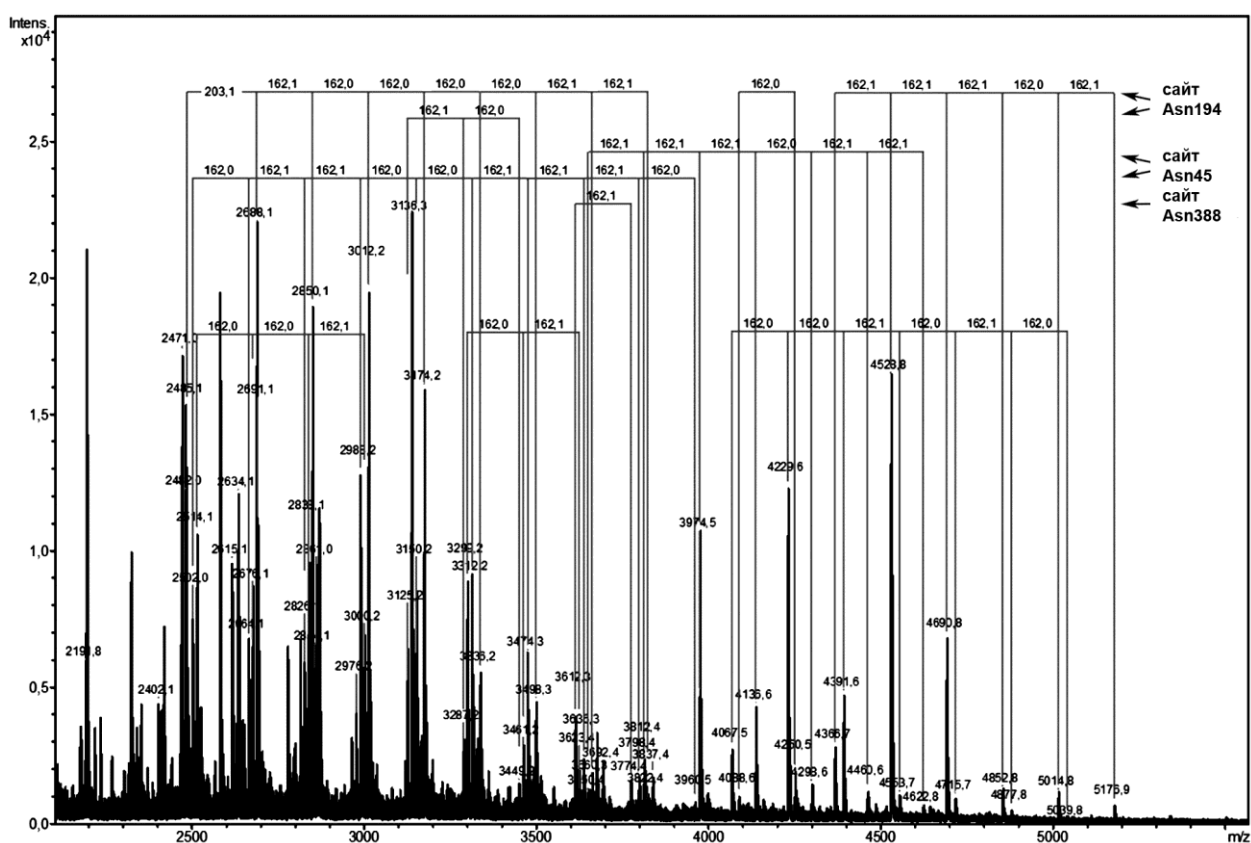


Рис. 50. Масс-спектр рекомб. ЦБГГ (для гидролиза использован пепсин). Серии пиков, различающихся на массу ангидроманнозного остатка (162 Да), соответствуют гликопептидам с различной длиной олигосахаридной цепи.

Сайты N-гликозилирования и структуры N-связанных гликанов, установленные с использованием сервиса Glycomod, приведены в Таблице 13.

Таблица 13. Сайты N-гликозилирования и структура N-связанных гликанов, установленные с использованием сервиса Glycomod, для рекомбинантных (немутантная и мутантные) и нативной форм ЦБГІ *P.verruculosum*.

Сайт N-гликозилирования	Структура N-связанных гликанов				
	рекомб. ЦБГІ	рекомб. ЦБГІ N45A	рекомб. ЦБГІ N194A	рекомб. ЦБГІ N388A	нативн. ЦБГІ
N45	(Man) ₀₋₁₃ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₁₋₈ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁₋₁₂ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁₋₁₀ (GlcNAc) ₂
N194	(Man) ₀₋₁₃ (GlcNAc) ₂	(Man) ₀₋₁₄ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₀₋₉ (GlcNAc) ₂	(Man) ₀₋₁₀ (GlcNAc) ₂
N388	(Man) ₁₁₋₁₂ (GlcNAc) ₂	(Man) ₂₋₁₁ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁₋₁₃ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₂₋₁₃ (GlcNAc) ₂

Для расщепления ЦБГІ были использованы различные протеазы (трипсин, химо tripsин, пепсин), это позволило не только подтвердить а.к. последовательность полученных мутантных форм и наличие необходимых а.к. замен, но и определить сайты гликозилирования и структуры N-связанных гликанов.

В случае сайтов N45, N194 и N388 N-связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды с числом остатков маннозы до 14. Все возможные гомологичные олигосахариды, которые могут образовываться в результате «тримминга» высокоманнозных олигосахаридов, включая мономерный и димерный остатки GlcNAc и (GlcNAc)₂, были также обнаружены в масс-спектрах. Серии гомологичных гликанов, связанных с сайтами гликозилирования, вероятно, образуются в результате последовательного «тримминга» высокоманнозных олигосахаридов под действием α-маннозидаз и β-N-ацетил-гексоаминидаз, которые содержатся в КЖ *P.canescens*, использованного для гетерологичной экспрессии [121].

В случае сайта N430 гликозилирования установлено не было. Этот а.к. остаток расположен в области а.к. последовательности, граничащей с областью линкера, что затрудняет масс-спектрометрический анализ гликопептидов. Область линкера содержит большое число остатков серина и треонина и может быть в значительной степени O-гликозилирована, что защищает область линкера от действия протеаз, а также приводит

к образованию гликопептидов с большой молекулярной массой, характеризующихся небольшой интенсивностью сигнала при масс-спектрометрическом анализе.

3.4.6. Анализ биохимических и каталитических свойств ЦБГГ

Биохимические и каталитические свойства мутантных форм ЦБГГ *P.verruculosum* были проанализированы в сравнении с свойствами немутантных форм ЦБГГ. Рекомбинантные формы (рекомб. ЦБГГ, рекомб. ЦБГГ N45A, N194A и N388A) были выделены и очищены как описано выше, нативная форма (нативн. ЦБГГ) была выделена и исследована в нашей лаборатории ранее [146, 147]. Для мутантных и немутантных форм ЦБГГ были определены такие биохимические свойства, как рН- и температурные оптимумы активности по отношению к специфическому субстрату МКЦ, термостабильность, значения рI, степень адсорбции на МКЦ, и такие каталитические свойства, как ферментативная активность по отношению к ряду субстратов.

Определение рН-профиля активности ферментов проводили путем измерения активности ферментов по отношению к специфическому субстрату МКЦ в диапазоне значений рН от 2,5 до 8,0 (0,1 М универсальный буфер, 40°C). рН-Профили относительной активности приведены на Рис. 51. Как видно из экспериментальных данных, мутантные и немутантные формы ЦБГГ *P.verruculosum* обладали одинаковыми рН-профилями с оптимумом активности при рН 4,0.

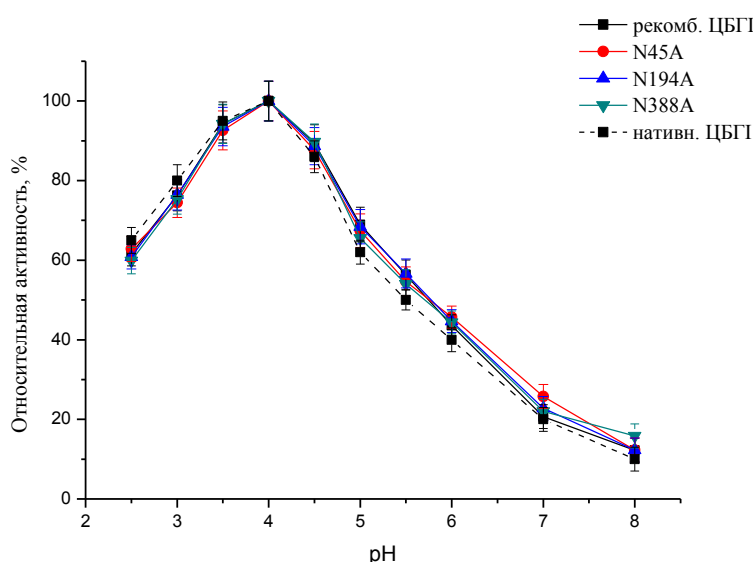


Рис. 51. рН-Профили относительной активности рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГГ), рекомбинантных мутантных (N45A, N194A и N388A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГГ) форм ЦБГГ *P.verruculosum* по отношению к МКЦ (0,1 М универсальный буфер, 40°C).

Определение температурного оптимума активности ферментов проводили путем измерения активности ферментов по отношению к МКЦ в рН-оптимуме (0,1 М универсальный буфер, рН 4,0) при различных температурах в диапазоне 30-80°C. На Рис. 52 приведены температурные профили активности ферментов по отношению к МКЦ.

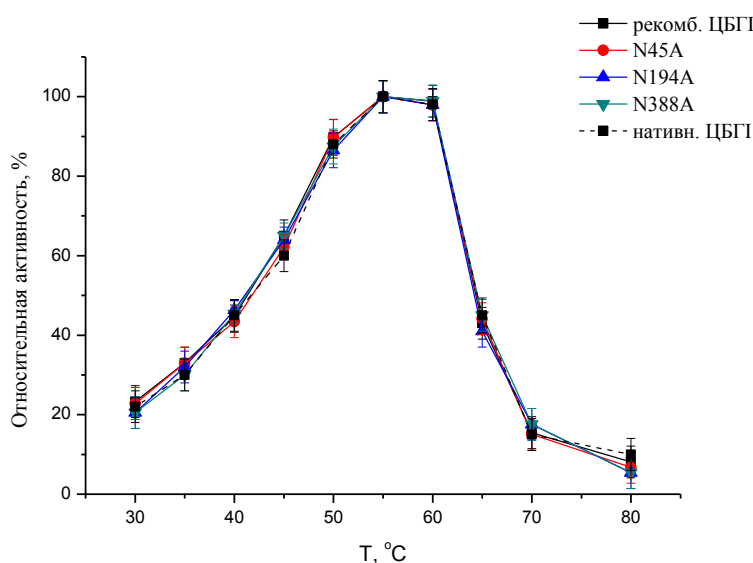


Рис. 52. Температурные профили относительной активности рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГ), рекомбинантных мутантных (N45A, N194A и N388A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГ) форм ЦБГ *P.verruculosum* по отношению к МКЦ (0,1 М универсальный буфер, рН 4,0).

Полученные профили зависимости активности ферментов от температуры оказались одинаковыми для всех мутантных и немутантных форм ЦБГ *P.verruculosum*, все формы характеризовались оптимумом активности 55°C.

Для исследования термостабильности растворы ферментов инкубировали при различных температурах в диапазоне 40-65°C. В процессе инкубации отбирали аликваты инкубируемых растворов, в которых определяли остаточную активность по отношению к МКЦ. Результаты отображали в виде зависимости остаточной активности (в процентах от исходной) от времени инкубации при данной температуре.

Термостабильность мутантных и немутантных форм ЦБГ оказалась одинаковой. На Рис. 53 показаны кривые термоинактивации различных форм ЦБГ.

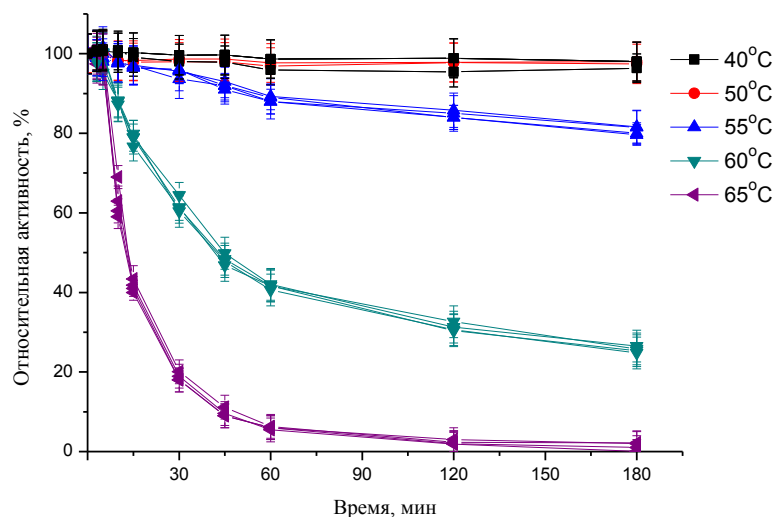


Рис. 53. Термостабильность рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГ), рекомбинантных мутантных (N45A, N194A и N388A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГ) форм ЦБГ *P.verruculosum* при 40-65°C (0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0).

Мутантные и немутантные формы ЦБГ были стабильны при 40 и 50°C в течение 3 ч, при 55°C формы сохраняли (82±5)% активности, время полуинактивации при 60°C составило (45±4) мин, при 65°C – (13±1) мин.

Для мутантных и немутантной форм ЦБГ *P.verruculosum* было осуществлено изоэлектрическое фокусирование (Рис. 54).

Значения рI для рекомб. ЦБГ и рекомб. ЦБГ N45A оказались одинаковыми и составили 4,3, что совпало с значением рI для нативн. ЦБГ [147]. Значения рI для рекомб. ЦБГ N194A и рекомб. ЦБГ N388A оказались сдвинутыми в кислую область и составили 3,8 и 3,9 соответственно.

Внесение различных мутаций в структуру ЦБГ привело к различному изменению рI, при этом влияние мутаций N194A и N388A оказалось соизмеримым, что возможно объяснить сходством в структуре и локализации N-связанных гликанов в положениях N194 и N388. Влияние мутации N45A значительно отличалось от влияния мутаций N194A и N388A, что свидетельствует о неэквивалентности свойств N-связанных гликанов в положениях N45 и N194 (N388).

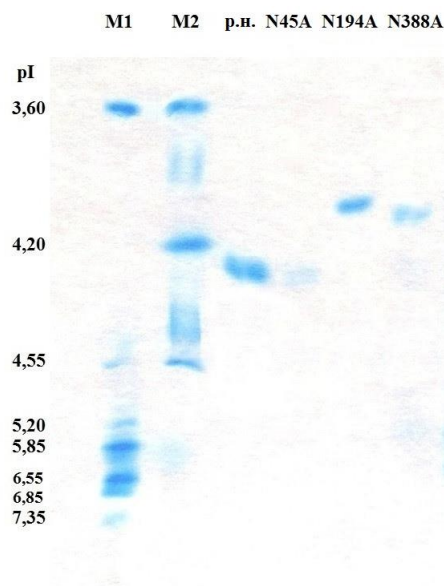


Рис. 54. Изоэлектрическое фокусирование различных форм ЦБГ *P.verruculosum*: р.н. – рекомбинантная немутантная форма, N45A, N194A и N388A – рекомбинантные мутантные формы ЦБГ.

Для мутантных и немутантных форм ЦБГ была определена степень адсорбции ферментов по отношению к МКЦ (Таблица 14).

Таблица 14. Степень адсорбции мутантных и немутантных форм ЦБГ *P.verruculosum* (0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0, 6°С).

	Форма ЦБГ				
	рекомб. ЦБГ	рекомб. ЦБГ N45A	рекомб. ЦБГ N194A	рекомб. ЦБГ N388A	нативн. ЦБГ
Степень адсорбции, %	88±4	85±4	78±4	80±4	88±4

Степень адсорбции для рекомб. ЦБГ, нативн. ЦБГ и рекомб. ЦБГ N45A форм оказалась одинаковой. Степень адсорбции для рекомб. ЦБГ N194A и рекомб. ЦБГ N388A оказалась меньше по сравнению с рекомб. ЦБГ.

Для мутантных и немутантных форм ЦБГ была определена активность по отношению к различным полисахаридным (МКЦ, КМЦ, β-глюкан, ксилан) и синтетическим (*n*-НФ-β-Целл, *n*-НФ-β-Лак, *n*-НФ-β-Глюк) субстратам. Результаты представлены в Таблице 15.

Таблица 15. Активность мутантных и немутантных форм ЦБГІ *P.verruculosum* по отношению к различным субстратам.

Субстрат	Активность, ед/мг				
	рекомб. ЦБГІ	рекомб. ЦБГІ N45A	рекомб. ЦБГІ N194A	рекомб. ЦБГІ N388A	нативн. ЦБГІ
МКЦ	0,20±0,01	0,22±0,01	0,17±0,01	0,19±0,01	0,21±0,01
КМЦ	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
β-глюкан	0,047±0,002	0,117±0,005	0,044±0,002	0,041±0,002	0,050±0,002
ксилан	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
<i>n</i> -НФ-β-Лак	0,028±0,001	0,038±0,001	0,036±0,001	0,039±0,001	0,025±0,001
<i>n</i> -НФ-β-Глюк	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
<i>n</i> -НФ-β-Гал	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.

н.д. – не детектирована

Из осуществленных мутаций положительной оказалась мутация N45A. Активность рекомб. ЦБГІ N45A по отношению к специфическому субстрату МКЦ оказалась на 10% выше по сравнению с рекомб. ЦБГІ, активность рекомб. ЦБГІ N194A оказалась на 15% ниже по сравнению с рекомб. ЦБГІ, активность рекомб. ЦБГІ N388A оказалась сопоставима с активностью рекомб. ЦБГІ. Для рекомб. ЦБГІ N45A изменилась субстратная специфичность, активность по β-глюкану оказалась на 150% выше по сравнению с рекомб. ЦБГІ.

Для сравнения осаживающей способности мутантных и немутантных форм ЦБГІ был осуществлен гидролиз полисахаридных субстратов (МКЦ и измельченная древесина осины) под действием гомогенных ЦБГІ.

На Рис. 55 приведены кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ под действием мутантных и немутантных форм ЦБГІ в присутствии β-глюкозидазы *A.niger*. β-Глюкозидаза была добавлена в реакционную смесь для предотвращения ингибирования активности ЦБГІ продуктами гидролиза [147, 180].

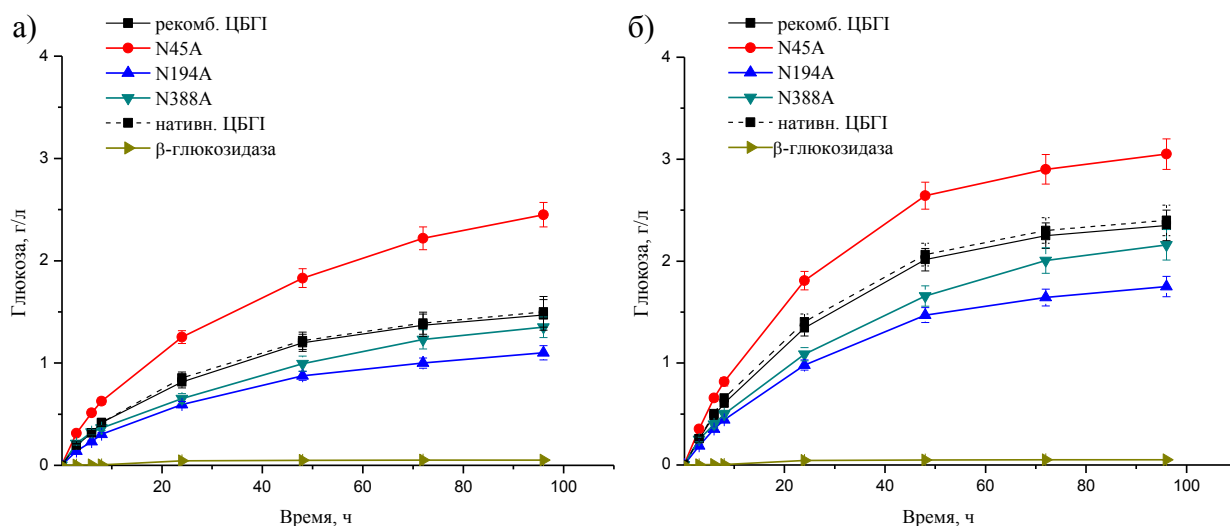


Рис. 55. Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ (5 мг/мл) под действием рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГ), рекомбинантных мутантных (N45A, N194A и N388A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГ) форм ЦБГ *P.verruculosum* (40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0, в присутствии β-глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл)), концентрация ЦБГ 0,1 мг/мл (а), 0,2 мг/мл (б).

При гидролизе МКЦ рекомб. ЦБГ N45A оказалась более эффективной, а рекомб. ЦБГ N194A и рекомб. ЦБГ N388A – менее эффективными по сравнению с рекомб. ЦБГ и нативн. ЦБГ. При концентрации ЦБГ 0,1 мг/мл выход глюкозы через 48 ч гидролиза оказался на 53% выше в случае рекомб. ЦБГ N45A и на 27 и 12% ниже в случае рекомб. ЦБГ N194A и рекомб. ЦБГ N388A по сравнению с рекомб. ЦБГ. Такое же соотношение концентраций глюкозы, как и через 48 ч гидролиза, наблюдалось и через 72 и 96 ч гидролиза. Увеличение концентрации ЦБГ до 0,2 мг/мл привело к изменению соотношений выходов глюкозы: выход глюкозы оказался на 31% выше в случае рекомб. ЦБГ N45A и на 27 и 15% ниже в случае рекомб. ЦБГ N194A и рекомб. ЦБГ N388A по сравнению с рекомб. ЦБГ.

Также был проведен гидролиз измельченной древесины осины под действием мутантных и немутантных форм ЦБГІ в присутствии β -глюкозидазы *A.niger*. Кинетические кривые накопления глюкозы приведены на Рис. 56.

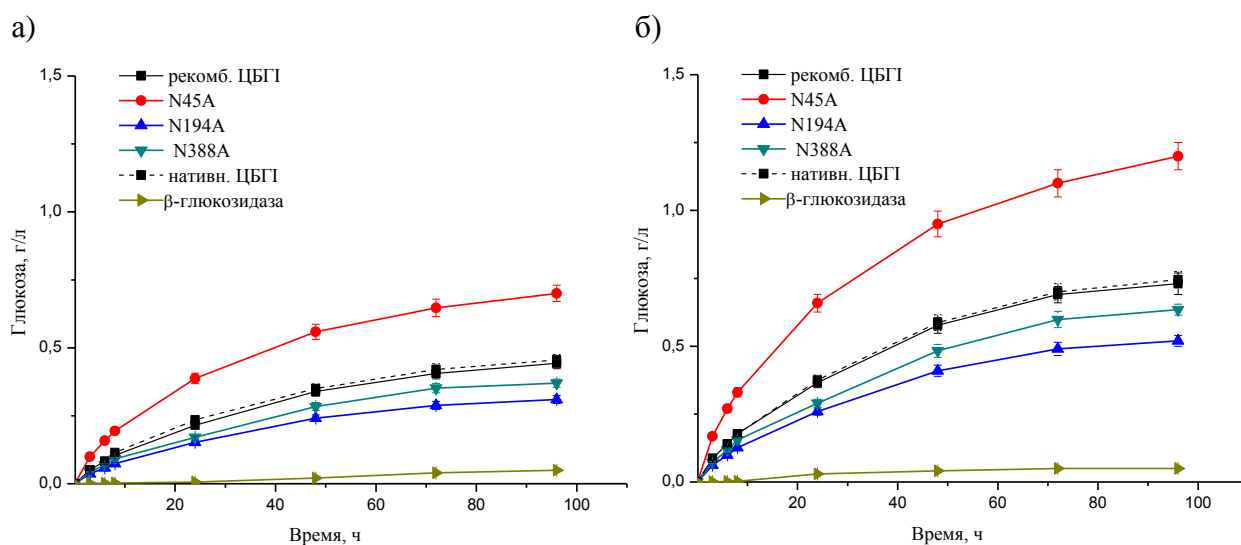


Рис. 56. Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе измельченной древесины осины (5 мг/мл) под действием рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГІ), рекомбинантных мутантных (N45A, N194A и N388A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГІ) форм ЦБГІ *P.verruculosum* (40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0, в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл)), концентрация ЦБГІ 0,1 мг/мл (а), 0,2 мг/мл (б).

При гидролизе измельченной древесины осины так же, как и при гидролизе МКЦ, рекомб. ЦБГІ N45A оказалась более эффективной, а рекомб. ЦБГІ N194A и рекомб. ЦБГІ N388A – менее эффективными по сравнению с рекомб. ЦБГІ и нативн. ЦБГІ. Выход глюкозы через 48 ч гидролиза оказался на 60% выше в случае рекомб. ЦБГІ N45A и на 29 и 16% ниже в случае рекомб. ЦБГІ N194A и рекомб. ЦБГІ N388A по сравнению с рекомб. ЦБГІ. Через 72 и 96 ч гидролиза такое же соотношение концентраций глюкозы, как и через 48 ч гидролиза, наблюдалось для всех мутантных форм, как при концентрации ферментов 0,1 мг/мл, так и при концентрации 0,2 мг/мл.

3.4.7. Исследование внутриклеточной экспрессии ЦБГГ

Из четырех мутантных форм рекомб. ЦБГГ: N45A, N194A, N388A и N430A – были выделены три формы: N45A, N194A и N388A. В случае мутантной формы N430A были получены грибные штаммы, содержащие вставку гена *cbhI*, однако при ферментации в КЖ штаммов мутантная форма рекомб. ЦБГГ N430A обнаружена не была. Для выяснения причин отсутствия секреции формы ЦБГГ N430A были проведены исследования по ее внутриклеточной экспрессии. В случае, если в грибных клетках есть экспрессия ЦБГГ, т.е. происходит синтез белка, также осуществляются процессы его фолдинга и пост-трансляционной модификации, но сайт N-гликозилирования влияет на стабильность фермента после его секреции, то фермент возможно обнаружить внутри клеток. В случае, если сайт N-гликозилирования влияет и на процессы фолдинга и/или пост-трансляционной модификации, то фермент разрушается внутри клеток и обнаружить его невозможно.

Суть использованного метода исследования заключается в следующем. Грибной штамм культивировали на среде, содержащей индуктор синтеза целлюлаз, далее мицелий отделяли от КЖ и тщательно отмывали от КЖ. Клеточные стенки разрушали под действием ультразвука, после чего содержимое клеток отделяли от клеточного дебриса центрифугированием, внутриклеточные белки осаждали трихлоруксусной кислотой и анализировали методом ДДС-электрофореза.

Исследования внутриклеточной экспрессии рекомб. ЦБГГ N430A были проведены для двух грибных штаммов, содержащих вставку гена *cbhI*-N430A. В качестве отрицательного контроля был использован штамм-реципиент *P.canescens* PCA-10 *niaD*⁻, в качестве положительного контроля – штамм, продуцирующий мутантную форму рекомб. ЦБГГ N45A. Пробы отбирали на 2, 4 и 6 сутки культивирования штаммов, ДДС-электрофореграммы внутриклеточных белков представлены на Рис. 57.

На ДДС-электрофореграммах внутриклеточных белков грибных штаммов, содержащих ген *cbhI*-N430A, не было обнаружено полос, которые отсутствовали в контроле по штамму-реципиенту и которые могли бы принадлежать гетерологичному белку ЦБГГ N430A. Для всех белков в диапазоне 50-90 кДа был проведен масс-спектрометрический анализ (с использованием протеазы трипсина). В спектрах образцов с молекулярной массой 60-70 кДа были обнаружены пики, возможно принадлежащие ЦБГГ N430A, однако спектры фрагментации не подтвердили принадлежность пептидов ЦБГГ N430A. В тех же образцах были обнаружены пики, принадлежащие α -L-арабинофуранозидазе А 70 кДа *P.canescens*. α -L-Арабинофуранозидазы являются одними из основных ферментов в комплексе, секретиромом *P.canescens* [121],

обнаружение в образцах α -L-арабинофуранозидазы А является подтверждением применимости использованной методики для исследования внутриклеточной экспрессии.

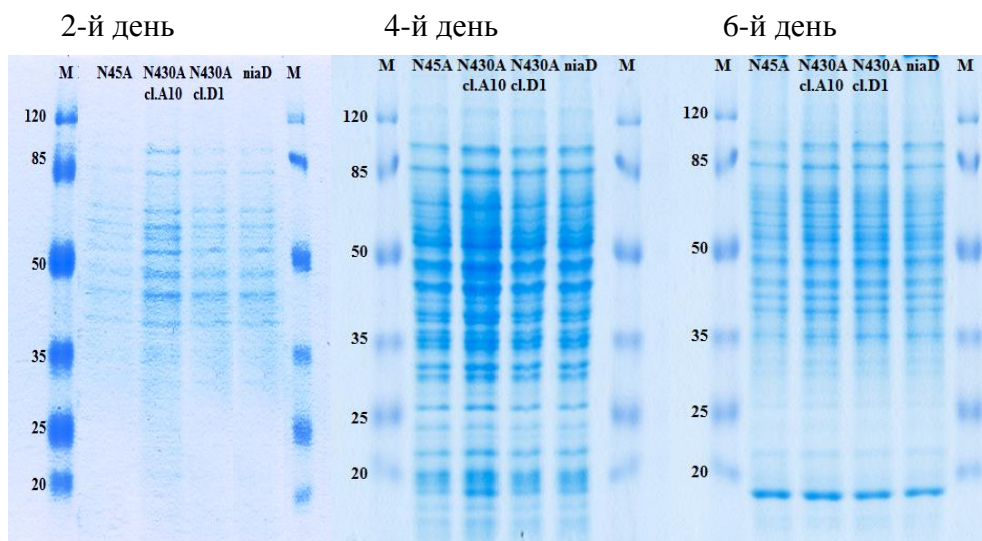


Рис. 57. ДДС-электрофореграммы внутриклеточных белков грибных штаммов, содержащих ген *cbhI*-N45A и *cbhI*-N430A *P.verruculosum* (M – маркер, *niaD* – контроль по штамму-реципиенту *P.canescens*).

Таким образом, мутантная форма ЦБГІ N430A не была обнаружена в грибных клетках. Вероятно, сайт N-гликозилирования N430 влияет на процессы фолдинга и/или пост-трансляционной модификации, мутантная форма фермента разрушается внутри клеток и обнаружить ее невозможно. Информативными в таком случае могли бы быть исследования по определению уровня синтеза мРНК, эти исследования следует провести на дальнейших этапах работы.

В структуре ЦБГІ *P.verruculosum* было найдено четыре теоретических сайта N-гликозилирования: N45, N194, N388 и N430. Для исследования роли каждого из сайтов в проявлении биохимических и каталитических свойств в структуру ЦБГІ были внесены точечные аминокислотные замены, приводящие к удалению одного из сайтов гликозилирования. Мутантные формы ЦБГІ N45A, N194A и N388A были выделены и исследованы, мутантная форма N430A не экспрессировалась и/или не секретировалась (исследования, проведенные по внутриклеточной экспрессии, показали отсутствие формы N430A в клетках мутантных штаммов).

Масс-спектрометрическим анализом мутантных и немутантных форм ЦБГІ были детектированы три сайта N-гликозилирования: N45, N194 и N388. Также масс-спектрометрическим анализом была определена структура N-связанных гликанов. N-Связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды структуры $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$, где x составлял 0-14.

Мутантные формы N45A, N194A и N388A характеризовались теми же значениями рН- и Т-оптимумов, что и немутантные формы. Эти мутантные формы обладали той же термостабильностью, что и немутантные формы. Тем не менее, мутантные формы отличались от немутантных по значениям удельных активностей и гидролитической способности. Мутантная форма N45A характеризовалась большей активностью по отношению к МКЦ и большей гидролитической способностью по отношению к МКЦ и измельченной древесине осины по сравнению с немутантными формами. Мутантные формы N194A и N388A, наоборот, характеризовались меньшей активностью по отношению к МКЦ и меньшей гидролитической способностью по отношению к МКЦ и измельченной древесине осины по сравнению с немутантными формами.

На Рис. 58 приведена трехмерная модель каталитического домена ЦБГІ *P.verruculosum* с N-связанными гликанами структуры $(\text{Man})_7(\text{GlcNAc})_2$. Сайт N45 расположен у входа в «туннель» активного центра. При связывании субстрата объемный гликан в положении N45 может препятствовать попаданию полисахаридной цепи в активный центр и таким образом создавать стерические затруднения для связывания субстрата. Кроме того, при процессивном гидролизе полисахаридного субстрата гликан в положении N45 может взаимодействовать с полисахаридной цепью за счет образования водородных связей и влиять на проявление такого свойства ЦБГІ, как процессивность. Удаление N-связанного гликана в этом случае, вероятно, привело к увеличению каталитической активности, а также гидролитической способности.

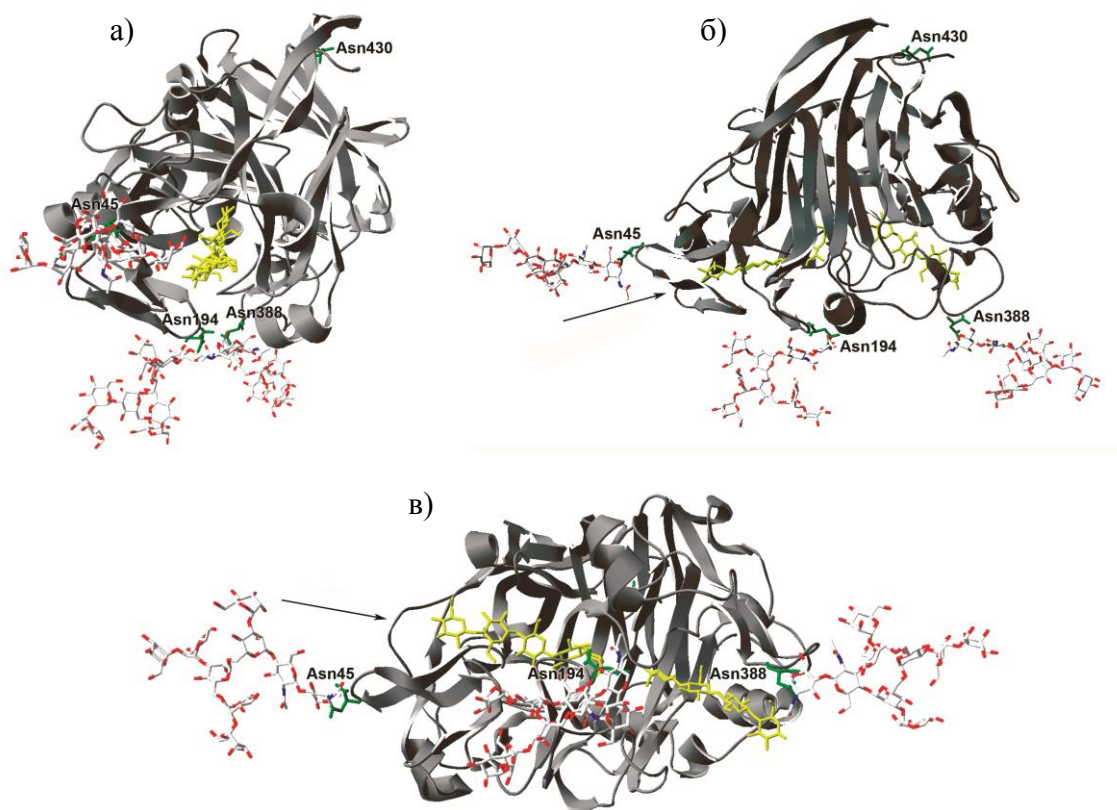


Рис. 58. Трехмерная модель каталитического домена ЦБГІ *P.verruculosum* с N-связанными гликанами структуры $(\text{Man})_7(\text{GlcNAc})_2$. Зеленым цветом указаны сайты N-гликозилирования, красным цветом указаны атомы кислорода в составе N-связанных гликанов, желтым цветом показаны молекулы целлопентаозы и целлотриозы в активном центре ЦБГІ, стрелками показано направление полисахаридной цепи субстрата: а) вид со стороны входа в активный центр, б) вид сбоку, в) вид снизу.

Из Рис. 58 также видно, что три сайта N-гликозилирования: N45, N194 и N388 – расположены на одной линии, практически параллельной направлению полисахаридной цепи субстрата в активном центре ЦБГІ. Подобное расположение сайтов гликозилирования на поверхности белковой глобулы может быть связано с участием N-связанных гликанов в обеспечении правильной ориентации каталитического домена ЦБГІ на поверхности микрофибрилл целлюлозы, поэтому удаление сайтов гликозилирования N194 и N388 привело к уменьшению активности ЦБГІ.

3.5. Гидролиз ЦСМ под действием смесей целлюлаз *Penicillium verruculosum*

Для сравнения гидролитической способности смесей индивидуальных ферментов различного состава и определения состава наиболее активной смеси был осуществлен гидролиз МКЦ и измельченной древесины осины под действием различных двойных и тройных смесей целлюлаз, как мутантных, так и немутантных форм (рекомб. ЭГП, рекомб. ЦБГП и рекомб. ЦБГГ). Из мутантных форм целлюлаз для гидролиза были выбраны формы рекомб. ЭГП N194А, рекомб. ЦБГП N219А и рекомб. ЦБГГ N45А как формы, характеризовавшиеся наибольшей каталитической активностью среди всех мутантных форм.

3.5.1. Выбор условий проведения гидролиза

Для проведения гидролиза под действием смесей целлюлаз необходимо было выбрать такие условия, как значения рН и Т, концентрация субстрата и дозировка ферментов.

Исследованные целлюлазы *P.verruculosum* характеризовались различными значениями рН- и Т-оптимумов активности по отношению к специфическим субстратам, а также различной термостабильностью (Таблица 16).

Таблица 16. Биохимические свойства мутантных и немутантных форм ЭГП, ЦБГП и ЦБГГ *P.verruculosum*.

Параметр	ЭГП		ЦБГП		ЦБГГ	
	рекомб. ЭГП	рекомб. ЭГП N194А	рекомб. ЦБГП	рекомб. ЦБГП N219А	рекомб. ЦБГГ	рекомб. ЦБГГ N45А
рН-оптимум	4,5	5,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Т-оптимум	70°C	70°C	65°C	65°C	55°C	55°C
t _{1/2} , мин, 60°C	-	-	52±3	52±3	45±4	45±4
t _{1/2} , мин, 65°C	-	-	20±1	20±1	13±1	13±1
t _{1/2} , мин, 70°C	45±3	45±3	-	-	-	-
t _{1/2} , мин, 80°C	17±2	17±2	-	-	-	-

Для проведения гидролиза ЦСМ под действием смесей целлюлаз было выбрано значение рН 4,5, как среднее значение рН-оптимумов активности исследованных целлюлаз.

ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ сильно различались по значениям Т-оптимума и термостабильности. Наиболее термостабильной оказалась ЭГП, значение Т-оптимума для ЭГП составляло 70°C, для ЦБГП и ЦБГІ значения Т-оптимума составляли 65 и 55°C соответственно, при этом все целлюлазы были стабильны при 40 и 50°C в течение как минимум 3 ч.

Следует отметить, что при глубокой переработке ЦСМ процессы ферментативного гидролиза и микробиологической трансформации часто проводят одновременно для увеличения выхода сахаров за счет уменьшения эффекта ингибирования ферментов продуктами гидролиза полисахаридов, а также уменьшения продолжительности биокаталитической трансформации ЦСМ [77]. При этом гидролитические ферменты проявляют наибольшую активность при ~50°C, а микроорганизмы – при 30-37°C. Оптимальной температурой при одновременном проведении ферментативного гидролиза и микробиологической трансформации может быть температура 40°C, поэтому для проведения гидролиза ЦСМ была выбрана именно эта температура Т=40°C.

Для проведения гидролиза была выбрана концентрация ЦСМ 5 г/л.

При ферментативном гидролизе ЦСМ дозировка ФП составляет 1-10 мг белка на 1 г субстрата, именно такая загрузка препарата является экономически оправданной, позволяя осуществлять эффективный гидролиз ЦСМ при небольших затратах на использование ферментов [82]. Для двойных/тройных смесей гомогенных ферментов нами была выбрана дозировка 10 мг общего белка на 1 г субстрата.

Таким образом, для проведения гидролиза под действием смесей целлюлаз были выбраны следующие условия: рН 4,5, температура 40°C, концентрация субстрата 5 г/л и дозировка ферментов 10 мг общего белка на 1 г субстрата.

3.5.2. Гидролиз ЦСМ под действием смесей ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ *Penicillium verruculosum*

Гидролиз МКЦ и измельченной древесины осины был осуществлен под действием двойных смесей ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ, массовая доля ферментов в смеси варьировалась от 0 до 100%. Для предотвращения ингибирования активности ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ целлобиозой гидролиз проводился в присутствии β-глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл) [147, 180]. Гидролиз проводили в течение 72 ч, через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию глюкозы.

При гидролизе МКЦ под действием смесей как мутантных, так и немутантных форм ЭГП-ЦБГІ и ЭГП-ЦБГП максимальный выход глюкозы достигался при массовой доле целлобиогидролаз более 80%. Это возможно объяснить тем, что МКЦ является специфическим субстратом для ЦБГІ и ЦБГП и неспецифическим – для ЭГП. Тем не

менее, МКЦ, содержит также и аморфную целлюлозу (степень кристалличности использованной для гидролиза МКЦ составляет 66-72% [200]), поэтому наблюдается синергизм действия ЭГП и целлобиогидролаз: ЭГП, действуя на аморфные участки целлюлозы, создает новые сайты для действия целлобиогидролаз (Рис. 59).

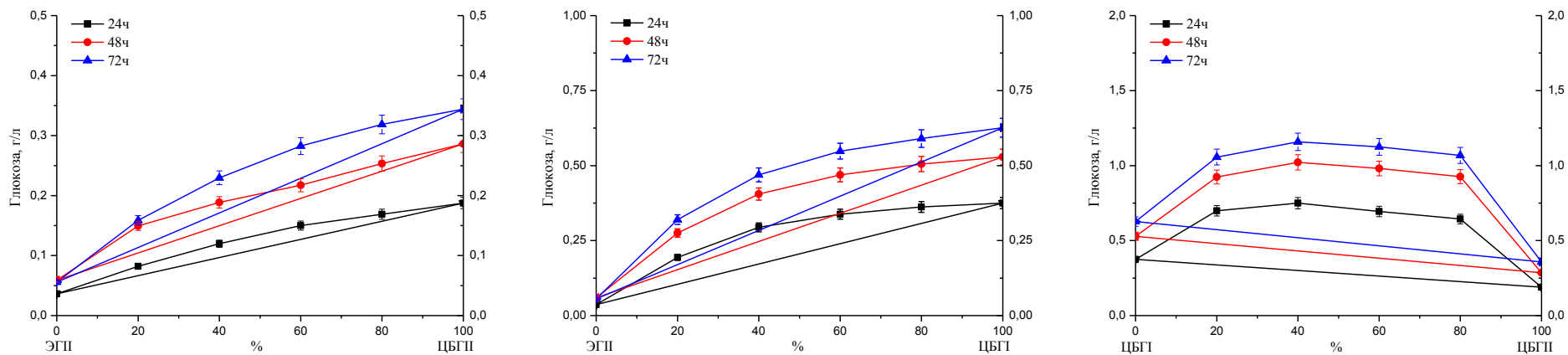
Наиболее эффективная из смесей ЦБГП-ЦБГІ имела компонентный состав 40% ЦБГП и 60% ЦБГІ (Рис. 59), из чего возможно сделать два вывода: 1) ЦБГІ и ЦБГП сопоставимы по степени важности для эффективного гидролиза МКЦ; 2) ЦБГІ имеет большее значение для эффективного гидролиза МКЦ, что возможно связано с ее большей адсорбционной способностью по отношению к МКЦ [201].

Использование мутантных форм ЦБГІ, ЦБГП и ЭГП позволило увеличить выход глюкозы при гидролизе МКЦ (Таблица 17). При этом использование двойных смесей мутантных форм ЦБГП-ЭГП, ЦБГІ-ЭГП и ЦБГІ-ЦБГП, оказавшихся наиболее эффективными при гидролизе МКЦ, приводило к сопоставимому увеличению выхода глюкозы через 72 ч гидролиза по сравнению с немутантными формами (30-35%). Через 24 и 48 ч наиболее эффективными двойными смесями оказались смеси, в состав которых входила ЦБГІ. Это возможно объяснить тем, что для гидролиза кристаллической целлюлозы (которая составляет 66-72% такого субстрата, как МКЦ [200]) в первую очередь необходимо действие прочно сорбирующихся целлюлаз (т.е. ЦБГІ), способных осуществлять диспергирование участков кристаллической целлюлозы и увеличивать ее доступность для действия других целлюлаз.

Таблица 17. Компонентный состав двойных смесей ЦБГІ, ЦБГП и ЭГП *P.verruculosum*, оказавшихся наиболее эффективными при гидролизе МКЦ, и выход глюкозы в результате гидролиза.

Двойная смесь	Компонентный состав, %			Концентрация глюкозы для смеси мутантных форм по сравнению с смесью немутантных форм, %		
	ЦБГІ	ЦБГП	ЭГП	24 ч	48 ч	72 ч
ЦБГП - ЭГП	-	60	40	126±10	128±10	130±10
	-	80	20	129±10	130±10	132±11
ЦБГІ - ЭГП	60	-	40	137±11	138±11	135±11
	80	-	20	138±11	137±11	135±11
ЦБГІ - ЦБГП	60	40	-	138±11	137±11	135±11
	40	60	-	134±11	132±11	132±11

а)



б)

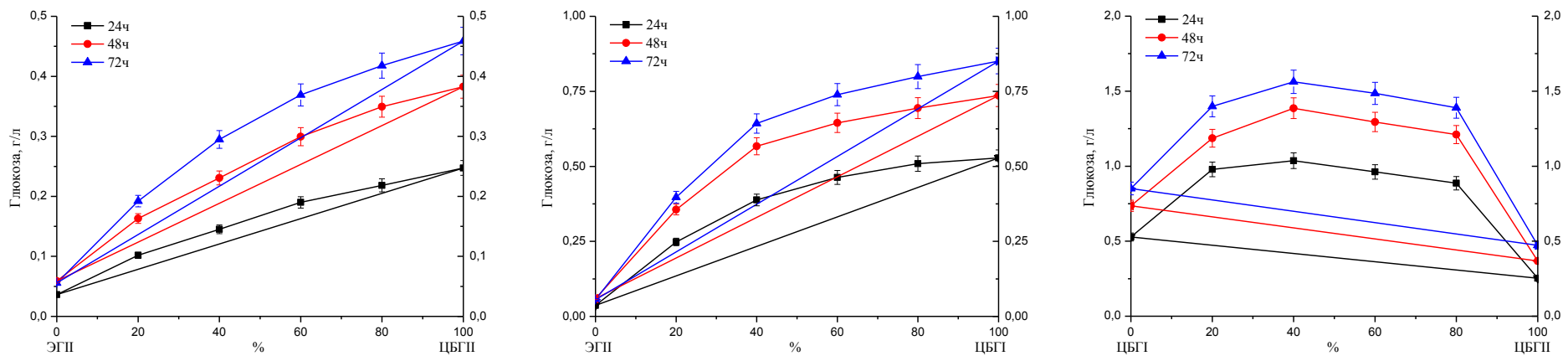


Рис. 59. Синергические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ (5 мг/мл) под действием двойных смесей немутантных (а) и мутантных (б) форм ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ *P.verruculosum* (40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 4,5, в присутствии β-глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), дозировка ферментов 10 мг общего белка на 1 г субстрата).

Для определения степени синергизма между различными целлюлазами на основании концентрации глюкозы в реакционной смеси рассчитывали коэффициенты синергического действия $K_{\text{син}}$:

$$K_{\text{син}} = [\text{Глюкоза}]_{1+2} / (X \times [\text{Глюкоза}]_1 + (1-X) \times [\text{Глюкоза}]_2),$$

где $[\text{Глюкоза}]_{1+2}$ – концентрация глюкозы через 24/48/72 ч гидролиза под действием смеси ферментов 1 и 2 (10 мг общего белка на 1 г субстрата), $[\text{Глюкоза}]_1$ – концентрация глюкозы через 24/48/72 ч гидролиза под действием фермента 1 (10 мг белка на 1 г субстрата), $[\text{Глюкоза}]_2$ – концентрация глюкозы через 24/48/72 ч гидролиза под действием фермента 2 (10 мг белка на 1 г субстрата), X – массовая доля фермента 1 в смеси ферментов 1 и 2.

При гидролизе МКЦ смеси мутантных и немутантных форм исследованных целлюлаз характеризовались значениями $K_{\text{син}}$, одинаковыми в пределах погрешности проведения эксперимента. Таким образом, внесение мутаций в структуру ЭГП, ЦБГП и ЦБГ не оказало влияния на синергизм в действии этих целлюлаз.

Следует отметить, что основными причинами возникновения синергизма в действии целлюлаз являются следующие: 1) снятие одним ферментом ингибирующего воздействия продуктов гидролиза целлюлозы на другие ферменты комплекса (например, ингибирующее действие целлобиозы на активность эндо- и экзоглюканаз устраняется β -глюкозидазой); 2) прямое влияние целлюлаз на активность друг друга при образовании фермент-ферментного ассоциата; 3) реализация кинетических особенностей последовательно-параллельно действующей полиферментной системы, т.е. продукт действия одного фермента является субстратом для других ферментов [179]. Теоретическое рассмотрение этих возможностей показало, что с наибольшей вероятностью реализуется третья из перечисленных причин.

Ингибирование активности ЭГП, ЦБГП и ЦБГ целлобиозой исключено, т.к. гидролиз проводился в присутствии β -глюкозидазы, кроме того, в литературе отсутствуют указания на наличие ингибирования целлюлаз олигосахаридами – промежуточными продуктами гидролиза целлюлозы [179].

В случае, если между рассматриваемыми целлюлазами образовывался фермент-ферментный ассоциат, то удаление с поверхности белковой глобулы объемного гликана в результате мутагенеза сайтов N-гликозилирования безусловно повлияло бы на эффективность связывания ферментов в ассоциат и, как следствие, повлияло бы на значения $K_{\text{син}}$, чего, однако, обнаружено не было.

При реализации кинетических особенностей последовательно-параллельно действующей полиферментной системы на значения $K_{\text{син}}$ может влиять изменение

субстратной специфичности ферментов в результате внесения мутаций [202]. В случае ЭГП и ЦБГП внесение мутаций N194A и N219A соответственно привело к увеличению каталитической активности без изменения субстратной специфичности. В случае ЦБГП внесение мутации N45A привело к увеличению каталитической активности по отношению к специфическому субстрату и изменению субстратной специфичности, для мутантной формы ЦБГП значительно увеличилась активность по отношению к неспецифическому субстрату β -глюкану. Тем не менее, активность мутантной и немутантной форм ЦБГП по отношению к β -глюкану существенно (более чем на 2 порядка) меньше активности мутантной и немутантной форм ЭГП. Вероятно, изменение в субстратной специфичности ЦБГП при таком соотношении активностей ЦБГП и ЭГП не оказало влияния на значение $K_{\text{син}}$.

В отличие от максимального выхода глюкозы максимальный синергетический эффект при гидролизе МКЦ под действием смесей ЭГП и ЦБГП наблюдался при массовой доле ЦБГП 20% и составлял $1,4 \pm 0,1$. Аналогичная закономерность наблюдалась при гидролизе МКЦ под действием смесей ЭГП и ЦБГП. Наибольший синергетический эффект наблюдался так же при массовой доле ЦБГП 20% и составлял $1,8 \pm 0,1$. Большее значение синергетического эффекта для смесей ЭГП-ЦБГП по сравнению с ЭГП-ЦБГП возможно объяснить тем, что ЦБГП не обладает эндоглюканазной активностью в отличие от ЦБГП. Аналогичный эффект был обнаружен для целлюлаз *H.insolens*. $K_{\text{син}}$ в действии эндоглюканазы и целлобиогидролазы, не обладавшей эндоглюканазной активностью, был выше, чем $K_{\text{син}}$ в действии эндоглюканазы и целлобиогидролазы, характеризовавшейся небольшой эндоглюканазной активностью. Причиной уменьшения значения $K_{\text{син}}$ может быть конкуренция двух ферментов с эндоглюканазной активностью за центры связывания при гидролизе целлюлозы [203].

При гидролизе МКЦ под действием смесей ЦБГП и ЦБГП наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГП 80% и составлял $2,8 \pm 0,1$. Большее значение синергетического эффекта для смесей ЦБГП-ЦБГП по сравнению с ЭГП-ЦБГП(II) возможно объяснить тем, что ЦБГП в отличие от ЭГП, обладающей высокой эндо- и низкой экзоглюканазной активностями, характеризуется значительными и эндо-, и экзоглюканазной активностями.

Синергизм в действии экзоглюканаз известен для ЦБГП и ЦБГП из *T.reesei* [204], а также для целлюлаз из *H.insolens* и *T.emersonii* [111]. Причинами появления синергизма может быть влияние целлюлаз на мобильность друг друга при связывании с целлюлозой [205], а также наличие у ЦБГП небольшой эндоглюканазной активности [203]. Следует

также отметить, что ЦБГ I и ЦБГ II взаимодействуют с различными центрами связывания на целлюлозе [82, 155], поэтому для ЦБГ I и ЦБГ II отсутствует конкуренция за субстрат.

Возможно предположить следующий механизм действия ЦБГ I и ЦБГ II при гидролизе МКЦ. ЦБГ I и ЦБГ II независимо друг от друга связываются соответственно с восстанавливающим и невосстанавливающим концами полисахаридных цепей. ЦБГ I и ЦБГ II способны осуществлять процессивный гидролиз полисахаридов, однако процессивность свойственна ЦБГ I в большей степени, чем ЦБГ II. ЦБГ II в свою очередь обладает большей мобильностью, чем ЦБГ I (соответственно ЦБГ II характеризуется меньшей адсорбционной способностью по отношению к МКЦ, чем ЦБГ I). ЦБГ II способна связываться с участками аморфной целлюлозы и катализировать гидролиз гликозидных связей. После гидролиза гликозидной связи ЦБГ II, вероятно, не диссоциирует с поверхности полисахаридной цепи, а продолжает ее гидролиз по процессивному механизму. При этом в результате гидролиза аморфной целлюлозы создаются новые сайты связывания для ЦБГ I. ЦБГ I относится к прочно адсорбирующимся целлюлазам и способна осуществлять диспергирование кристаллической целлюлозы, переводя ее в более реакционноспособное состояние [206, 207]. В результате аморфизованная целлюлоза может далее подвергаться гидролизу под действием слабо адсорбирующихся целлюлаз.

Таким образом, 1) ЦБГ I и ЦБГ II характеризуются сравнимой гидролитической способностью по отношению к МКЦ; 2) ЦБГ II способна катализировать гидролиз полисахаридных цепей, создавая новые сайты для действия ЦБГ I; 3) ЦБГ I способна катализировать гидролиз полисахаридных цепей и осуществлять диспергирование кристаллической целлюлозы, создавая новые сайты для действия ЦБГ II; 4) при этом ЦБГ I и ЦБГ II взаимодействуют с различными центрами связывания на целлюлозе и не конкурируют за субстрат.

Полученные значения $K_{\text{син}}$ хорошо согласуются с литературными данными для действия других грибных целлюлаз. Изучение синергизма в действии целлюлаз *T. viride* при гидролизе измельченной хлопковой целлюлозы показало, что коэффициент синергизма в значительной степени зависит от соотношения концентраций этих ферментов. Наибольшее значение $K_{\text{син}}$ составляло 1,9, при этом значение $K_{\text{син}}$ уменьшалось с увеличением относительной концентрации ЦБГ. Было показано, что синергизм в действии целлюлаз *T. viride* на нерастворимую целлюлозу являлся проявлением кинетических закономерностей последовательно-параллельно действующей полиферментной системы [158, 208, 209]. Для целлюлаз, секретируемых штаммами рода *Trichoderma*, было показано, что значение $K_{\text{син}}$ зависит от степени полимеризации (СП)

целлюлозы. Так, при гидролизе МКЦ (СП ~ 300) значение $K_{\text{син}}$ составляло 1,5-2,5, при гидролизе хлопка (СП > 2000) – 2,0-2,5. Также значение $K_{\text{син}}$ зависело от степени кристалличности целлюлозы, доступности целлюлозы для действия ферментов, от продолжительности гидролиза и концентрации ферментов [210, 211]. Для целлюлаз, секретируемых *C.lucknowense*, было показано, что значения $K_{\text{син}}$ при гидролизе хлопка могут достигать 2,6-2,8 [212].

Также был осуществлен гидролиз МКЦ под действием тройных смесей ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ, массовая доля ферментов в смеси варьировалась от 0 до 100% (Рис. 60). Гидролиз проводили в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл) [147, 180] в течение 72 ч, через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию глюкозы.

Наиболее эффективными оказались смеси с компонентным составом ЦБГІ-ЦБГП-ЭГП 40%-40%-20% и 60%-20%-20%. Ферментный комплекс, секретируемый штаммом *P.verruculosum* В151, имеет состав ЦБГІ-ЦБГП-ЭГП 35%-34%-8%, на долю остальных гликозид-гидролаз приходится 23% [148]. Таким образом, компонентный состав тройной смеси ЦБГІ-ЦБГП-ЭГП 40%-40%-20% близок к компонентному составу секретируемого комплекса. Типичный компонентный состав целлюлолитических комплексов, продуцируемых *T.reesei*, – ЦБГІ-ЦБГП-ЭГІ 60%-20%-12%, на долю остальных гликозид-гидролаз приходится 8% [211]. Компонентный состав тройных смесей ЦБГІ *T.emersonii*, ЦБГП *H.insolens* и ЭГП *T.reesei*, оказавшихся наиболее эффективными при гидролизе МКЦ, имеет вид ЦБГІ-ЦБГП-ЭГП 50-70%–10-40%–10-40%, при этом наибольший выход сахаров достигался при использовании смеси состава ЦБГІ-ЦБГП-ЭГП 56%-28%-16% [111]. Таким образом, компонентный состав тройных смесей ЦБГІ-ЦБГП-ЭГП *P.verruculosum*, оказавшихся наиболее эффективными для гидролиза МКЦ, соответствует компонентному составу ФП, использующихся для биоконверсии ЦСМ.

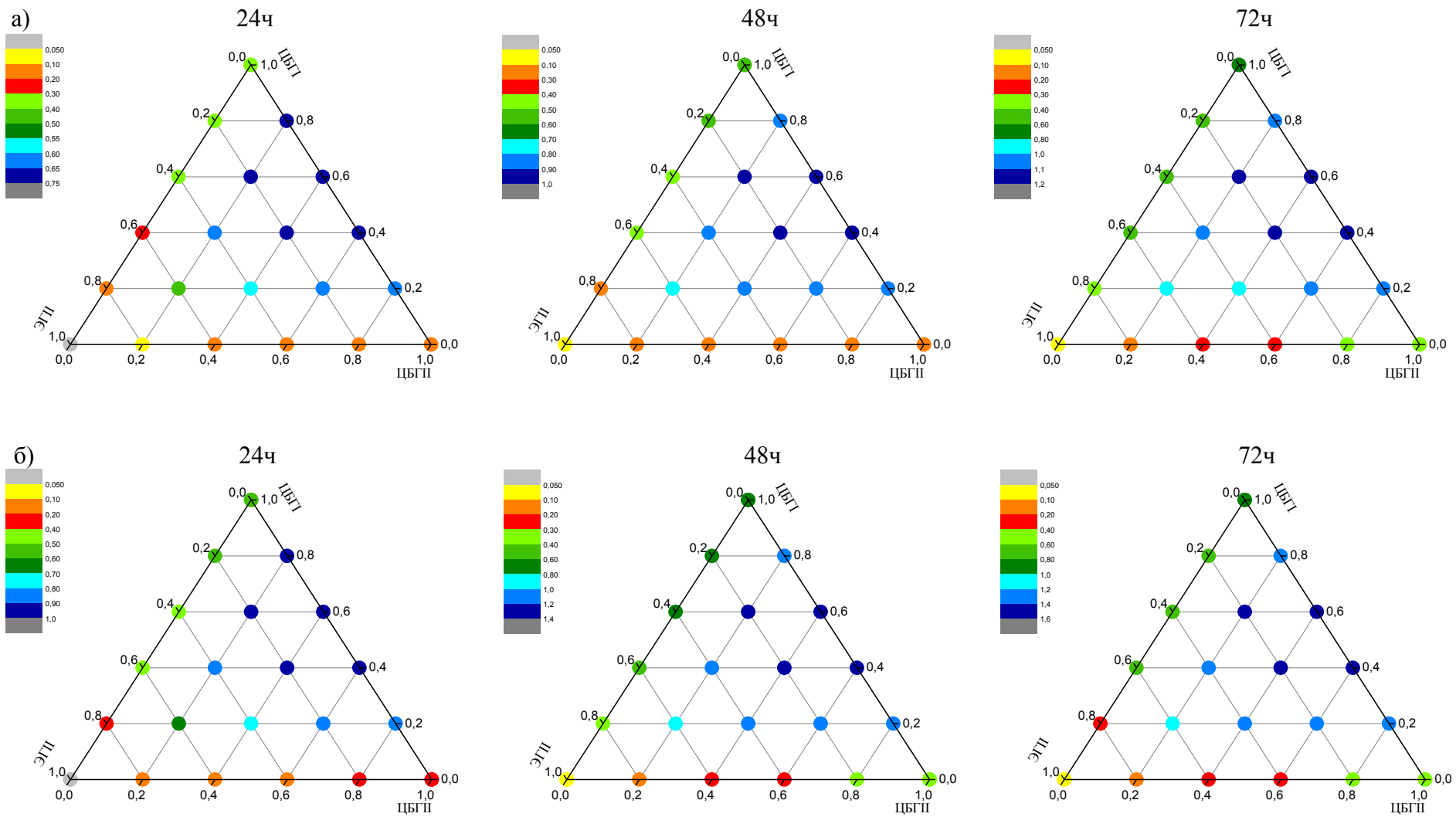


Рис. 60. Тройные диаграммы, отражающие выход глюкозы при гидролизе МКЦ (5 мг/мл) под действием тройных смесей немутантных (а) и мутантных (б) форм ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ *P.verruculosum* (40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 4,5, в присутствии β-глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), дозировка ферментов 10 мг общего белка на 1 г субстрата).

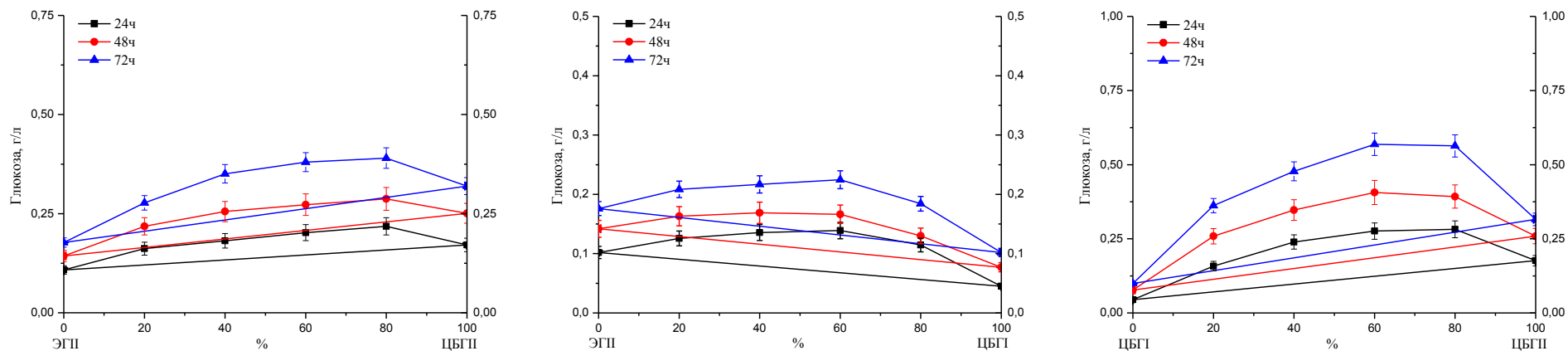
Также был осуществлен гидролиз измельченной древесины осины под действием двойных и тройных смесей ЭГII, ЦБГII и ЦБГI, массовая доля ферментов в смеси варьировалась от 0 до 100%. Гидролиз проводили в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл) [147, 180] в течение 72 ч, через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию глюкозы.

Выход глюкозы при гидролизе измельченной древесины осины оказался меньше, чем выход глюкозы при гидролизе МКЦ (Рис. 61). Это определяется как меньшим по сравнению с МКЦ содержанием целлюлозы в древесине осины, так и отрицательным действием лигнина на активность целлюлаз – лигнин экранирует полисахариды от действия целлюлаз, а также адсорбирует целлюлазы, что приводит к их инактивации [82].

При гидролизе измельченной древесины осины под действием смесей как мутантных, так и немутантных форм ЭГII-ЦБГI и ЭГII-ЦБГII максимальный выход глюкозы достигался при массовой доле целлобиогидролаз более 60% – т.е. для эффективного гидролиза древесины осины (а также других ЦСМ) необходимо в первую очередь разрушить кристаллическую форму целлюлозы. Аналогичная закономерность была обнаружена для целлюлаз *T.reesei* (Cel7A (ЦБГI), Cel6A (ЦБГII) и Cel5A (ЭГII)) при гидролизе предобработанной пшеничной соломы, наибольшей гидролитической способностью обладали двойные смеси с соотношением ЦБГI(II)-ЭГII от 80%-20% до 95%-5% [213].

При гидролизе измельченной древесины осины под действием смесей как мутантных, так и немутантных форм ЦБГII-ЦБГI максимальный выход глюкозы достигался при массовой доле ЦБГII 60%. Компонентный состав смеси ЦБГII-ЦБГI, оказавшейся наиболее эффективной при гидролизе древесины осины, отличался от компонентного состава смеси ЦБГII-ЦБГI, оказавшейся наиболее эффективной при гидролизе МКЦ (40% ЦБГII и 60% ЦБГI). Это возможно объяснить тем, что ЦБГII в отличие от ЦБГI проявляет заметную эндоглюканазную активность и поэтому более эффективна при гидролизе субстрата комплексного состава. Аналогичная закономерность была обнаружена для целлюлаз *T.reesei* (Cel7A (ЦБГI), Cel6A (ЦБГII)) при гидролизе предобработанной пшеничной соломы, наибольшей гидролитической способностью обладали двойные смеси с соотношением ЦБГI-ЦБГII от 40%-60% до 60%-40% [213].

а)



б)

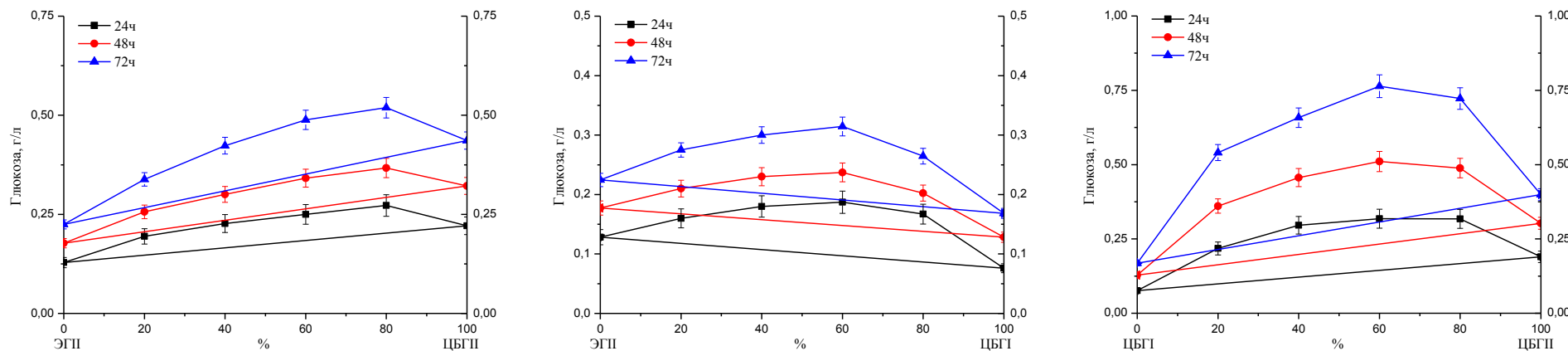


Рис. 61. Синергические кривые накопления глюкозы при гидролизе измельченной древесины осины (5 мг/мл) под действием двойных смесей немутантных (а) и мутантных (б) форм ЭГII, ЦБГII и ЦБГI *P.verruculosum* (40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 4,5, в присутствии β-глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), дозировка ферментов 10 мг общего белка на 1 г субстрата).

Состав двойных смесей ЦБГII-ЦБГI, характеризовавшихся наибольшей гидролитической способностью, оказался различным при гидролизе МКЦ и древесины осины. Это возможно объяснить различной адсорбционной способностью этих целлюлаз: ЭГII, ЦБГII и ЦБГI отличались по адсорбционной способности по отношению к МКЦ и древесине осины (Таблица 18).

Таблица 18. Адсорбционная способность мутантных и немутантных форм ЭГII, ЦБГII и ЦБГI *P.verruculosum* по отношению к МКЦ и измельченной древесине осины (6°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0).

Субстрат	ЭГII		ЦБГII		ЦБГI	
	рекомб. ЭГII	рекомб. ЭГII N194A	рекомб. ЦБГII	рекомб. ЦБГII N219A	рекомб. ЦБГI	рекомб. ЦБГI N45A
МКЦ	7,0±0,3	7,1±0,2	80±3	66±3	88±4	85±4
древесина осины	3,7±0,2	4,0±0,2	62±3	46±3	78±4	76±4

ЭГII, ЦБГII и ЦБГI характеризовались меньшей адсорбционной способностью по отношению к измельченной древесине осины по сравнению с адсорбционной способностью по отношению к МКЦ. Для грибных целлюлаз известно, что их адсорбционная способность по отношению к целлюлозе выше, чем по отношению к ЦСМ [82, 214].

Следует отметить, что при гидролизе МКЦ наибольшей гидролитической способностью обладала ЦБГI – наиболее прочно сорбирующийся на МКЦ фермент из исследованных целлюлаз. При гидролизе древесины осины, напротив, наибольшей гидролитической способностью обладала ЦБГII – слабо сорбирующийся на МКЦ фермент. Из этого возможно сделать вывод, что при гидролизе древесины осины (а также, вероятно, других ЦСМ) слабо сорбирующиеся целлобиогидролазы проявляют значительную активность. ЭГII, хотя и является наиболее слабо сорбирующимся на МКЦ и древесине осины ферментом из исследованных целлюлаз, проявляет небольшую гидролитическую способность по отношению к древесине осины. Это является еще одним подтверждением того, что для эффективного гидролиза ЦСМ необходимо в первую очередь разрушить кристаллическую форму целлюлозы.

Как и при гидролизе МКЦ, при гидролизе измельченной древесины осины использование мутантных форм ЦБГI, ЦБГII и ЭГII позволило увеличить выход глюкозы

(Таблица 19). При этом, как и при гидролизе МКЦ, использование двойных смесей мутантных форм ЦБГII-ЭГII, ЦБГI-ЭГII и ЦБГI-ЦБГII, оказавшихся наиболее эффективными при гидролизе измельченной древесины осины, приводило к сопоставимому увеличению выхода глюкозы через 48 и 72 ч гидролиза по сравнению с немутантными формами (25-40%). Через 24 ч гидролиза наибольшее увеличение выхода глюкозы при гидролизе под действием мутантных форм по сравнению с немутантными формами наблюдалось для смесей, в состав которых входит ЭГII.

Таблица 19. Компонентный состав двойных смесей ЦБГI, ЦБГII и ЭГII *P.verruculosum*, оказавшихся наиболее эффективными при гидролизе измельченной древесины осины, и выход глюкозы в результате гидролиза.

Двойная смесь	Компонентный состав, %			Концентрация глюкозы для смеси мутантных форм по сравнению с смесью немутантных форм, %		
	ЦБГI	ЦБГII	ЭГII	24 ч	48 ч	72 ч
ЦБГII - ЭГII	-	60	40	124±10	125±10	128±10
	-	80	20	125±10	128±10	133±11
ЦБГI - ЭГII	40	-	60	133±11	136±11	138±11
	60	-	40	135±11	138±11	140±11
ЦБГI - ЦБГII	40	60	-	118±9	126±10	135±11
	20	80	-	116±9	125±10	128±10

При гидролизе древесины осины, как и при гидролизе МКЦ, мутантные и немутантные смеси исследованных целлюлаз характеризовались значениями $K_{\text{син}}$, одинаковыми в пределах погрешности проведения эксперимента. Таким образом, внесение мутаций в структуру ЭГII, ЦБГII и ЦБГI не оказало влияния на синергизм в действии этих целлюлаз.

При гидролизе измельченной древесины осины под действием смесей ЭГII и ЦБГII наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГII 20% и составлял $1,3 \pm 0,1$. Аналогичная закономерность наблюдалась при гидролизе измельченной древесины осины под действием смесей ЭГII и ЦБГI. Наибольший синергетический эффект наблюдался так же при массовой доле ЦБГI 20% и составлял $1,7 \pm 0,1$. Больше значение синергетического эффекта для смесей ЭГII-ЦБГI по сравнению

с ЭГП-ЦБГП возможно объяснить тем, что ЦБГП не обладает эндоглюканазной активностью в отличие от ЦБГП.

При гидролизе измельченной древесины осины под действием смесей ЦБГП и ЦБГП наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГП 40% и составлял $2,5 \pm 0,1$. Большее значение синергетического эффекта для смесей ЦБГП-ЦБГП по сравнению с ЭГП-ЦБГП(II), как и при гидролизе МКЦ, возможно объяснить тем, что ЦБГП в отличие от ЭГП, обладающей высокой эндо- и низкой экзоглюканазной активностями, характеризуется значительными и эндо-, и экзоглюканазной активностями.

Значения $K_{\text{син}}$ действия целлюлаз при гидролизе древесины осины оказались незначительно меньше соответствующих значений при гидролизе МКЦ. При гидролизе ЦСМ комплексного состава наибольшее влияние на значение $K_{\text{син}}$ оказывают два фактора: степень доступности целлюлозы для действия ферментов и СП целлюлозы. Уменьшение степени доступности целлюлозы приводит к уменьшению значения $K_{\text{син}}$, увеличение СП приводит к увеличению значения $K_{\text{син}}$ [211]. ЦСМ, по сравнению с МКЦ, характеризуются меньшей степенью доступности и большей СП целлюлозы. Таким образом, при гидролизе ЦСМ могут реализовываться противоположные тенденции: увеличение $K_{\text{син}}$ из-за увеличения СП, уменьшение $K_{\text{син}}$ из-за уменьшения степени доступности целлюлозы. Результирующее значение $K_{\text{син}}$ является отражением двух этих тенденций.

Также был осуществлен гидролиз измельченной древесины осины под действием тройных смесей ЭГП, ЦБГП и ЦБГП, массовая доля ферментов в смеси варьировалась от 0 до 100%. Гидролиз проводили в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл) [147, 180] в течение 72 ч, через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию глюкозы.

Наиболее эффективными оказались смеси с компонентным составом ЦБГП-ЦБГП-ЭГП 40%-40%-20% и 20%-60%-20% (Рис. 62), что соответствует, как отмечалось выше, компонентному составу секретлируемого комплекса *P.verruculosum* B151.

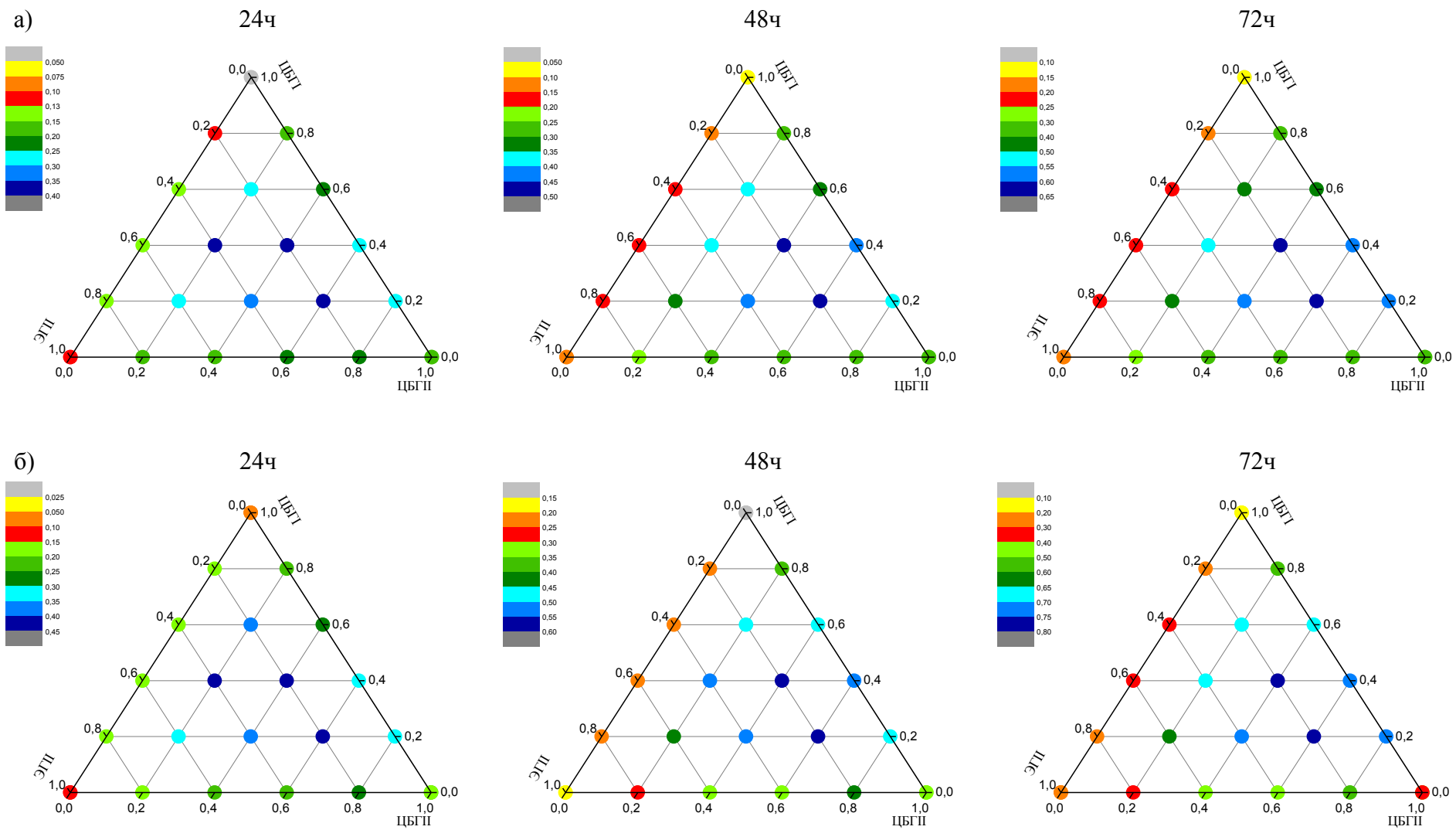


Рис. 62. Тройные диаграммы, отражающие выход глюкозы при гидролизе измельченной древесины осины (5 мг/мл) под действием тройных смесей немутантных (а) и мутантных (б) форм ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ *P.verruculosum* (40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 4,5, в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), дозировка ферментов 10 мг общего белка на 1 г субстрата).

При гидролизе таких ЦСМ, как предобработанные пшеничная солома и жом сахарного тростника, под действием тройных смесей целлюлаз *T.reesei* (Cel7A (ЦБГ), Cel6A (ЦБП) и Cel5A (ЭП)), наибольшей гидролитической способностью обладали смеси с соотношением экзо- и эндоглюканаз от 80:20 до 90:10, тройная смесь с наибольшей гидролитической способностью имела состав ЦБГ-ЦБП-ЭП 54%-36%-10% [213]. Увеличение каталитической активности или термостабильности ЦБП значительно меняет компонентный состав оптимальных для гидролиза смесей. Так, улучшение свойств ЦБП *H.insolens* привело к изменению оптимального состава смеси целлюлаз ЦБГ-ЦБП-ЭП (ЦБГ *T.emersonii*, ЦБП *H.insolens* и ЭП *T.reesei*) с 50-70%-10-40%-10-40% до 10-30%-50-70%-10-30%, при этом наибольший выход сахаров достигался при использовании смеси состава ЦБГ-ЦБП-ЭП 36%-56%-8% [111]. Таким образом, полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными.

Важно подчеркнуть, что как при гидролизе МКЦ, так и при гидролизе измельченной древесины осины, тройные смеси мутантных форм ЦБГ, ЦБП и ЭП характеризовались большей гидролитической способностью, чем смеси немутантных форм (Таблица 20).

Таблица 20. Компонентный состав тройных смесей ЦБГ-ЦБП-ЭП *P.verruculosum*, использованных для проведения гидролиза МКЦ и измельченной древесины осины, и выход глюкозы в результате гидролиза.

Субстрат	Компонентный состав, %			Концентрация глюкозы для смеси мутантных форм по сравнению с смесью немутантных форм, %		
	ЦБГ	ЦБП	ЭП	24 ч	48 ч	72 ч
МКЦ	40	40	20	138±11	133±11	131±11
	60	20	20	138±11	134±11	133±11
древесина осины	40	40	20	114±9	122±10	128±10
	20	60	20	111±9	121±10	127±10

В заключение для тройных смесей ЦБГ-ЦБП-ЭП (мутантные формы), оказавшихся наиболее активными при гидролизе МКЦ и измельченной древесины осины, была исследована зависимость эффективности гидролиза от температуры и концентрации субстрата. Компонентный состав использованных смесей представлен в Таблице 21.

Таблица 21. Компонентный состав тройных смесей ЦБГ-I-ЦБГ-II-ЭГ-II *P.verruculosum*, использованных для проведения гидролиза МКЦ и измельченной древесины осины при различных температуре и концентрации субстрата.

Субстрат	№смеси	Компонентный состав, %		
		ЦБГ-I	ЦБГ-II	ЭГ-II
МКЦ	1	40	40	20
	2	60	20	20
древесина осины	3	40	40	20
	4	20	60	20

Гидролиз МКЦ под действием смесей № 1 и 2 был осуществлен при температуре 40, 50 и 60°C (Рис. 63, а). Отметим, что выход глюкозы при использовании смесей № 1 и 2 был одинаковым в пределах погрешности эксперимента во всех приведенных ниже экспериментах.

Увеличение температуры гидролиза с 40°C до 50°C позволило увеличить выход глюкозы на 38-40% через 6-48 ч гидролиза. Увеличение температуры гидролиза до 60°C позволило увеличить выход глюкозы по сравнению с гидролизом при 40°C только в первые 6 ч. Через 6 ч гидролиза выход глюкозы оказался на 7% выше, а через 24 и 48 ч – на 26% и 34% ниже по сравнению с гидролизом при 40°C, через 48 ч гидролиз при 60°C практически прекращался. Таким образом, наилучшей из исследованных для проведения гидролиза МКЦ является температура 50°C.

Для исследования зависимости эффективности гидролиза от концентрации субстрата был проведен гидролиз МКЦ под действием смеси № 1 при температуре 50°C и различной концентрации субстрата (Рис. 63, б). Увеличение концентрации субстрата приводило к увеличению концентрации глюкозы в реакционной среде, с 1,9 г/л при начальной концентрации ($[S]_0$) МКЦ 5 г/л до 4,9 г/л при $[S]_0=50$ г/л через 72 ч гидролиза. При этом степень конверсии уменьшалась с 35% при $[S]_0=5$ г/л до 9% при $[S]_0=50$ г/л.

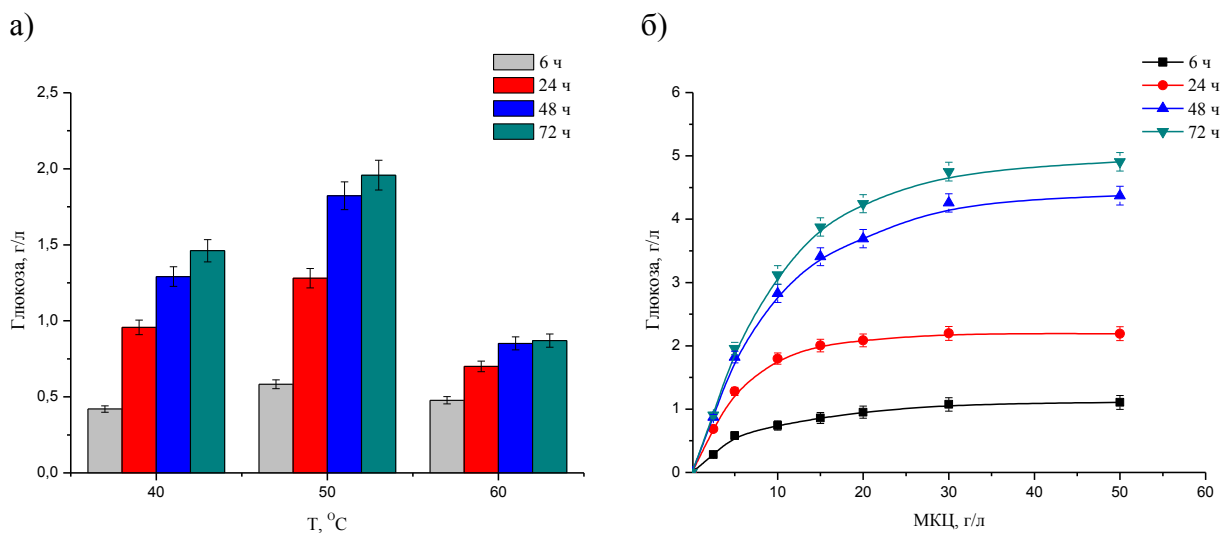


Рис. 63. Накопление глюкозы в процессе гидролиза МКЦ под действием смеси № 1 в зависимости от температуры при концентрации субстрата 5 мг/мл (а) и концентрации субстрата при температуре 50°C (б) (0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 4,5, в присутствии β-глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), дозировка ферментов 10 мг общего белка на 1 г субстрата).

Гидролиз измельченной древесины осины под действием смесей № 3 и 4 был осуществлен при температуре 40, 50 и 60°C (Рис. 64, а). Так же, как и при гидролизе МКЦ, выход глюкозы при использовании двух смесей близкого состава (смеси № 3 и 4) был одинаковым в пределах погрешности эксперимента во всех приведенных ниже экспериментах.

Увеличение температуры гидролиза с 40°C до 50°C позволило увеличить выход глюкозы на 22-25% через 6-72 ч гидролиза. Увеличение температуры гидролиза с 40°C до 60°C привело к уменьшению выхода глюкозы на протяжении всего процесса гидролиза, в отличие от аналогичного увеличения температуры при гидролизе МКЦ. Через 6 ч гидролиза выход глюкозы оказался на 30% ниже по сравнению с гидролизом при 40°C, через 24 и 48 ч – на 30% и 34% ниже по сравнению с гидролизом при 40°C, через 48 ч гидролиз при 60°C практически прекращался. Таким образом, наилучшей из исследованных для проведения гидролиза измельченной древесины осины является температура 50°C.

Для исследования зависимости эффективности гидролиза от концентрации субстрата был проведен гидролиз измельченной древесины осины под действием смеси № 4 при температуре 50°C и различной концентрации субстрата (Рис. 64, б). Как и при гидролизе МКЦ, увеличение концентрации субстрата приводило к увеличению

концентрации глюкозы в реакционной среде, с 1,0 г/л при $[S]_0=5$ г/л до 2,8 г/л при $[S]_0=50$ г/л через 72 ч гидролиза. При этом степень конверсии целлюлозы уменьшалась с 36% при $[S]_0=5$ г/л до 10% при $[S]_0=50$ г/л.

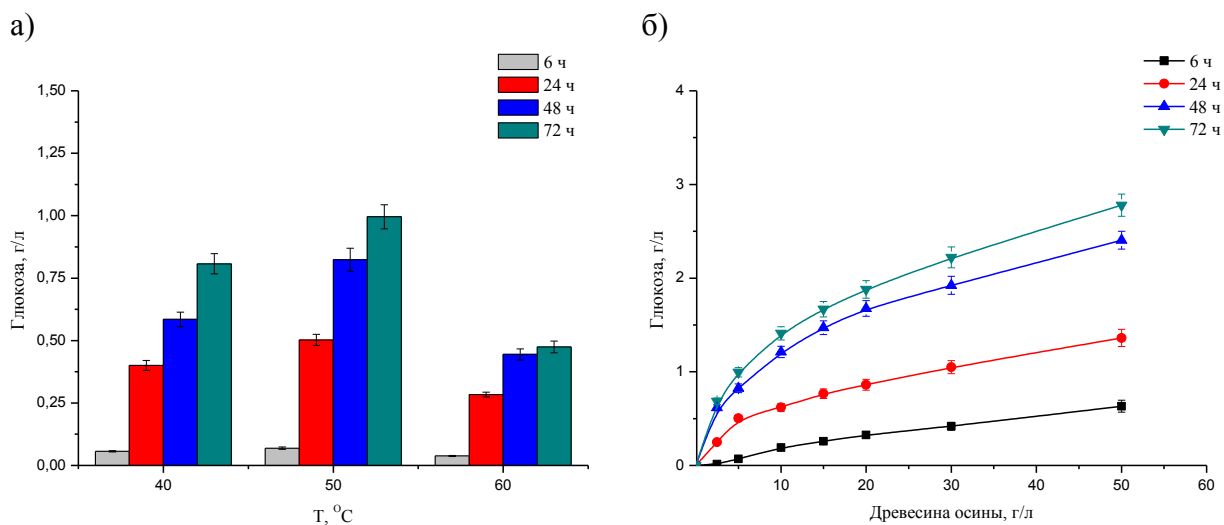


Рис. 64. Накопление глюкозы в процессе гидролиза измельченной древесины осины под действием смеси № 4 в зависимости от температуры при концентрации субстрата 5 мг/мл (а) и концентрации субстрата при температуре 50°C (б) (0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 4,5, в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), дозировка ферментов 10 мг общего белка на 1 г субстрата).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований впервые была осуществлена белковая инженерия сайтов N-гликозилирования в структуре ЭГП, ЦБГП и ЦБГП *P.verruculosum*, получены мутантные формы ЭГП, ЦБГП и ЦБГП с измененными сайтами N-гликозилирования (остаток аспарагина в составе теоретических сайтов гликозилирования был заменен на остаток аланина) и определены их каталитические и биохимические свойства. Проведен гидролиз ЦСМ под действием двойных и тройных смесей ЭГП, ЦБГП и ЦБГП (с использованием мутантных и немутантных форм), исследован синергизм в действии ЭГП, ЦБГП и ЦБГП.

В структурах ЭГП, ЦБГП и ЦБГП *P.verruculosum* было найдено соответственно 3, 4 и 4 теоретических сайта N-гликозилирования: N19, N42 и N194 в ЭГП; N219, N265, N279 и N395 в ЦБГП; N45, N194, N388 и N430 в ЦБГП. В случае ЦБГП и ЦБГП все сайты оказались расположены на поверхности белковой глобулы, в случае ЭГП два из трех сайтов оказались расположены на поверхности, один – внутри белковой глобулы.

С помощью масс-спектрометрического анализа мутантных и немутантных форм целлюлаз *P.verruculosum* были определены сайты N-гликозилирования и структуры N-связанных гликанов.

В случае ЭГП гликозилированными оказались сайты N42 и N194, сайт N194 оказался гликозилирован в меньшей степени, чем N42. В случае ЦБГП гликозилирование было детектировано для всех сайтов N219, N265, N279 и N395, при этом сайты N219 и N265 характеризовались меньшей степенью гликозилирования по сравнению с сайтами N279 и N395. В случае ЦБГП гликозилирование было детектировано для сайтов N45, N194 и N388. Степень гликозилирования этих сайтов оказалась сопоставима. Для сайта N430 гликозилирование обнаружено не было, это может быть связано с расположением сайта N430 рядом с сильно гликозилированным линкером, что затрудняет проведение масс-спектрометрического анализа. Следует отметить, что ЦБГП и ЦБГП характеризовались большей степенью N-гликозилирования, чем ЭГП.

Для селективного удаления одного из сайтов N-гликозилирования в структуру целлюлаз были внесены точечные мутации: остаток аспарагина в составе сайта N-гликозилирования был заменен на остаток аланина. В случае ЭГП и ЦБГП все мутантные формы были выделены и исследованы, в случае ЦБГП мутантная форма N430A не была экспрессирована и/или секретирована. Исследования, проведенные по внутриклеточной экспрессии, показали отсутствие формы N430A в клетках мутантных штаммов. Вероятно, сайт N-гликозилирования может принимать участие в осуществлении правильного фолдинга фермента, а также в дальнейшей стабилизации белковой глобулы.

Следует отметить, что мутантная форма ЦБГII N279A с похожим расположением сайта гликозилирования на поверхности белковой глобулы была секретирована и исследована. Различие двух этих сайтов заключается в различной локализации сайтов в составе аминокислотной цепи. Если в случае ЦБGI сайт расположен за два а.к. остатка до начала линкера, то в случае ЦБGII – на противоположном от линкера конце а.к. цепи. В случае ЦБGI сайт N430 находится в непосредственной близости от линкера и в процессе фолдинга может влиять на формирование доменной структуры ЦБGI. В случае ЦБGII сайт N279 и линкер разнесены в пространстве, тем не менее мутация N279A привела к значительному изменению таких характеристик, как pI и адсорбционная способность.

Внесение мутаций в структуру ЦБGII и ЦБGI не привело к изменению таких биохимических свойств, как pH - и температурные оптимумы активности по отношению к МКЦ и термостабильность. В случае ЭГII мутантные и немутантные формы обладали схожими pH -профилями, однако оптимумы активности отличались: pH -оптимум активности по отношению к β -глюкану для немутантных форм и мутантной формы N19A составлял 4,5, а для мутантных форм N42A и N194A составлял 5,0, что возможно объяснить участием гликанов в формировании pH микроокружения фермента. При этом мутантные и немутантные формы характеризовались одинаковыми температурными профилями активности и термостабильностью. Следует отметить, что ЦБGII и ЦБGI характеризуются большей степенью гликозилирования, чем ЭГII. В структуре ЦБGI и ЦБGII есть O-гликозилированный линкер и 4 сайта N-гликозилирования, в структуре ЭГII – 2 сайта N-гликозилирования. Поэтому удаление одного из двух N-связанных гликанов в случае ЭГII приводит к более заметному изменению pH микроокружения, чем удаление одного из нескольких гликанов в случае ЦБGI и ЦБGII.

Внесение мутаций N42A и N194A в структуру ЭГII привело к увеличению, а мутации N19A – к уменьшению каталитической активности по отношению к МКЦ и β -глюкану, а также гидролитической способности по отношению к ЦСМ.

Сайты N-гликозилирования N42 и N194 находятся на поверхности белковой глобулы соответственно у входа и выхода «ущелья» активного центра. Гликаны на поверхности белковой глобулы, присоединенные к этим сайтам, могут взаимодействовать с субстратом за счет образования водородных связей и, вероятно, влияют на скорость диссоциации фермента с поверхности полисахаридной цепи, в этом случае отсутствие гликанов увеличивает скорость диссоциации, что приводит к увеличению каталитической активности. При гидролизе β -глюкана мутантные формы N42A и N194A характеризовались большим значением k_{cat} по сравнению с немутантными формами, при этом значения K_m оказались одинаковыми для мутантных и немутантных форм.

Сайт N19, напротив, находится внутри белковой глобулы в непосредственной близости от каталитически активных остатков. Аминокислотная замена N19A, вероятно, изменяет структуру активного центра, что приводит к уменьшению каталитической активности ЭГП.

Внесение мутаций N219A и N265A в случае ЦБГП и N45A в случае ЦБГІ привело к увеличению, а мутаций N279A и N395A в случае ЦБГП и N194A и N388A в случае ЦБГІ – к уменьшению каталитической активности по отношению к МКЦ и β -глюкану, а также гидролитической способности по отношению к ЦСМ.

Сайт N45 в структуре ЦБГІ, как и сайты N219 и N265 в структуре ЦБГП, расположен у входа в «туннель» активного центра. При связывании субстрата объемный гликан у входа в активный центр может препятствовать попаданию полисахаридной цепи в активный центр и таким образом создавать стерические затруднения для связывания субстрата. Кроме того, при процессивном гидролизе полисахаридного субстрата гликан в этом положении может взаимодействовать с полисахаридной цепью за счет образования водородных связей и влиять на проявление такого свойства целлобиогидролаз, как процессивность. Удаление N-связанного гликана в этом случае, вероятно, привело к увеличению каталитической активности.

Три сайта N-гликозилирования: N219, N265 и N395 в случае ЦБГП и N45, N194 и N388 в случае ЦБГІ – расположены на одной линии, практически параллельной направлению полисахаридной цепи субстрата в активном центре ЦБГП и ЦБГІ. Подобное расположение сайтов гликозилирования на поверхности белковой глобулы может быть связано с участием N-связанных гликанов в обеспечении правильной ориентации каталитического домена целлобиогидролаз на поверхности целлюлозы. Поэтому удаление сайтов гликозилирования N395 в случае ЦБГП и N194 и N388 в случае ЦБГІ привело к уменьшению каталитической активности.

Сайт N279 в случае ЦБГП расположен рядом с гликозилированным линкером, соединяющим каталитический и целлюлозосвязывающий домены. Удаление сайта в этом случае, вероятно, привело к нарушению правильной ориентации каталитического и целлюлозосвязывающего домена и потере каталитической активности по отношению к МКЦ.

При гидролизе МКЦ и измельченной древесины осины под действием смесей ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ мутантные и немутантные формы характеризовались одинаковыми значениями $K_{син}$. Таким образом, внесение мутаций в структуру ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ не оказало влияния на синергизм в действии этих целлюлаз.

При гидролизе МКЦ под действием смесей ЭГП и ЦБГП наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГП 20% и составлял $1,4 \pm 0,1$. Аналогичная закономерность наблюдалась при гидролизе МКЦ под действием смесей ЭГП и ЦБГ. Наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГ 20% и составлял $1,8 \pm 0,1$. Большее значение синергетического эффекта для смесей ЭГП-ЦБГ по сравнению с ЭГП-ЦБГП возможно объяснить тем, что ЦБГ не обладает эндоглюканазной активностью в отличие от ЦБГП. При гидролизе МКЦ под действием смесей ЦБГ и ЦБГП наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГП 80% и составлял $2,8 \pm 0,1$. Большее значение синергетического эффекта для смесей ЦБГ-ЦБГП по сравнению с ЭГП-ЦБГ(П) возможно объяснить тем, что ЦБГП в отличие от ЭГП, обладающей высокой эндо- и низкой экзоглюканазной активностями, характеризуется значительными эндо- и экзоглюканазной активностями.

При гидролизе измельченной древесины осины под действием смесей ЭГП и ЦБГП наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГП 20% и составлял $1,3 \pm 0,1$. Аналогичная закономерность наблюдалась при гидролизе измельченной древесины осины под действием смесей ЭГП и ЦБГ. Наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГ 20% и составлял $1,7 \pm 0,1$. Большее значение синергетического эффекта для смесей ЭГП-ЦБГ по сравнению с ЭГП-ЦБГП, как и в случае МКЦ, возможно объяснить тем, что ЦБГ не обладает эндоглюканазной активностью в отличие от ЦБГП.

При гидролизе измельченной древесины осины под действием смесей ЦБГ и ЦБГП наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГП 40% и составлял $2,5 \pm 0,1$. Большее значение синергетического эффекта для смесей ЦБГ-ЦБГП по сравнению с ЭГП-ЦБГ(П), как и при гидролизе МКЦ, возможно объяснить тем, что ЦБГП в отличие от ЭГП, обладающей высокой эндо- и низкой экзоглюканазной активностями, характеризуется значительными эндо- и экзоглюканазной активностями.

Как при гидролизе МКЦ, так и при гидролизе измельченной древесины осины, наибольшей гидролитической способностью обладали тройные смеси ЦБГ, ЦБГП и ЭГП с компонентным составом 20-60% – 20-60% – 20%, что близко к соотношению этих целлюлаз в ферментном комплексе, секретлируемом *P.verruculosum*.

Выводы

- 1) Определены тип и структура N-связанных гликанов целлюлаз, экспрессированных в грибах рода *Penicillium* (*P.verruculosum* и *P.canescens*). Показано, что N-связанные гликаны в целлюлазах (ЭГП, ЦБГІ, ЦБГІІ), экспрессированных в грибах рода *Penicillium* (*P.verruculosum* и *P.canescens*), представляют собой высокоманнозные олигосахариды, а также продукты их ферментативного «тримминга», согласно общей формуле $(\text{Man})_{0-14}(\text{GlcNAc})_2$.
- 2) Методом сайт-направленного мутагенеза осуществлены замены остатков аспарагина в составе сайтов N-гликозилирования на остатки аланина, получены мутантные формы ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП *P.verruculosum* с измененными сайтами N-гликозилирования.
- 3) Удаление одного из сайтов N-гликозилирования не оказывало значительного влияния на такие свойства ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП *P.verruculosum*, как термостабильность, температурный и рН-оптимумы, однако приводило к изменению удельной активности, а также выхода сахаров при гидролизе ЦСМ.
- 4) В случае ЦБГІ и ЦБГІІ *P.verruculosum* удаление N-связанных гликанов, расположенных у входа в активный центр ферментов, позволяет увеличить их каталитическую активность, а удаление N-связанных гликанов, расположенных вдоль активного центра ферментов – приводит к уменьшению их каталитической активности. Удаление N-связанного гликана, расположенного рядом с линкером, приводит к дестабилизации молекулы фермента в случае ЦБГІ и к значительному изменению свойств в случае ЦБГІІ.
- 5) В случае ЭГП *P.verruculosum* удаление N-связанных гликанов, расположенных на входе и выходе из активного центра, приводит к увеличению активности фермента. Общий эффект изменения активности в случае ЭГП оказался меньше, чем в случае ЦБГІ и ЦБГІІ.
- 6) Использование мутантных форм ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП *P.verruculosum* позволяет на 20-40% увеличить выход глюкозы при гидролизе ЦСМ под действием различных смесей целлюлаз. Состав смесей, оказавшихся наиболее эффективными при гидролизе ЦСМ, соответствует компонентному составу секретируемого комплекса *P.verruculosum*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bungay H.R. Energy: the biomass options, Wiley and Sons, New York, **1981**, 347 p.
2. Bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts, First edition / Edited by V.S. Bisaria and A. Kondo. John Wiley & Sons, Inc, **2014**. 584 p.
3. Sticklen M. Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels // *Current Opinion in Biotechnology*. – **2006**. – V. 17. – P. 315-319.
4. John R.P., Anisha G.S., Nampoothiri K.M., Pandey A. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production // *Biotechnology Advances*. – **2009**. – V. 27. – P. 145-152.
5. BP Statistical Review of World Energy. Uckfield, UK, Pureprint Group, **2015**. 46 p.
6. Hogue C. Paris climate talks begin // *Chemical & Engineering News*, American Chemical Society. – **2015**. – V. 93, № 47. – P. 21-22.
7. Hansen J., Sato M., Ruedy R., Lo K., Lea D., Medina-Elizade M. Global temperature change // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – **2006**. – V. 103, № 39. – P. 14288-14293.
8. Bowen E., Kennedy S.C., Miranda K. Ethanol from sugar beets: a process and economic analysis. A major qualifying project submitted to the faculty of Worcester Polytechnic Institute, in partial fulfillment of the requirements for the degree of bachelor of science. Worcester. **2010**. 47 p.
9. The Fifth Assessment Report (AR5) of the United Nations Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). **2014**.
10. Азаров В.И., Буров А.В., Оболенская А.В. Химия древесины и синтетических полимеров. – СПб.: СПб ЛТА, **1999**. – 628 с.
11. Agbor V.B., Cicek N., Sparling R., Berlin A., Levin D.B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application // *Biotechnology Advances*. – **2011**. – V. 29. – P. 675-685.
12. Роговин З.А. Химия целлюлозы. – М.: Химия, **1972**. – 519 с.
13. Menon V., Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept // *Progress in Energy and Combustion Science*. – **2012**. – V. 38. – P. 522-550.
14. Conde-Mejia C., Jimenez-Guierrez A., El-Halwagi M. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials // *Process Safety and Environmental Protection*. – **2012**. – V. 90. – P. 189-202.
15. Ghatak H.R. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – **2011**. – V. 15. – P. 4042-4052.
16. Nanda S., Mohammad J., Reddy S., Kozinski J., Dalai A. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – **2014**. – V. 4. – P. 157-191.
17. Doherty W.O.S., Mousavioun P., Fellows C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers // *Industrial Crops and Products*. – **2011**. – V. 33. – P. 259-276.
18. Husson E., Buchoux S., Avondo C., Cailleu D., Djellab K., Gosselin I., Wattraint O., Sarazin C. Enzymatic hydrolysis of ionic liquid-pretreated celluloses: Contribution of CP-MAS ¹³C NMR and SEM // *Bioresource Technology*. – **2011**. – V. 102, № 15. – P. 7335-7342.
19. Клесов А.А. Биотехнология ферментативного превращения целлюлозы. В сб.: Итоги науки и техники, Сер. Биотехнология, Вып. 12. М., ВИНТИ, **1988**, с. 53-59.
20. Целлюлоза и ее производные / Под ред. И. Байклз, Л. Сегал. М., Мир, **1974**, в 2-х томах, т.1 – 500 с., т.2 – 510 с.
21. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. – М.: Мир, **1986**. – 387 с.

22. Coughlan M.P., Hazlewood G.P. Hemicellulose and hemicellulases, Portland Press, London and Chapel Hill, **1993**, v. 4, 120 p.
23. Vassilev S.V., Baxter D., Andersen L.K., Vassileva C.G., Morgan T.J. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass // *Fuel*. – **2012**. – V. 94. – P. 1-33.
24. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г., утв. Правительством РФ 24.04.2012 N 1853п-П8.
25. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 18 июля 2013 г. №1247-р. План мероприятий («дорожная карта») «Развитие биотехнологий и геномной инженерии».
26. From the Sugar Platform to biofuels and biochemical. Final report for the European Commission Directorate-General Energy N° ENER/C2/423-2012/SI2.673791, April **2015**.
27. Фенгел Д., Вегенер Г. Древесина (химия, ультраструктура, реакции): Пер. с англ. – М.: Лесная промышленность, **1988**. – 512 с.
28. Hatakeyama H., Hatakeyama T. Lignin structure, properties and applications // *Advances in Polymer Science*. – **2010**. – V. 232. – P. 1-63.
29. Bomgardner M. Biobased chemicals: Paper company makes lignin from pulp // *Chemical & Engineering News*, American Chemical Society. – **2016**. – V. 94, № 16. – P. 21-22.
30. Sustainable bioenergy: A framework for decision makers. United Nations: UN-Energy. **2007**.
31. Fuel economy guide: 2010 model year. EPA: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, U.S. Department of Energy. **2010**.
32. <http://www.gks.ru/>.
33. Parajuli R., Dalgaard T., Jørgensen U., Adamsen A.P.S., Knudsen M.T., Birkved M., Gylling M., Schjørring J.K. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – **2015**. – V. 43. – P. 244-263.
34. Mosen Asadi. Beet-sugar Handbook, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2007**, 884 p.
35. Laurens L.M.L., Dempster T.A., Jones H.D.T., Wolfrum E.J., Van Wychen S., McAllister J.S.P., Rencenberger M., Parchert K.J., Gloe L.M. Algal biomass constituent analysis: method uncertainties and investigation of the underlying measuring chemistries // *Analytical Chemistry*. – **2012**. – V. 84. – P. 1879-1887.
36. Gatenby C.M., Orcutt D.M., Kreeger D.A., Parker B.C., Jones V.A., Neves R.J. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels // *Journal of Applied Phycology*. – **2003**. – V. 15. – P. 1-11.
37. Martin M., Grossmann I.E. Optimal engineered algae composition for the integrated simultaneous production of bioethanol and biodiesel // *American Institute of Chemical Engineers Journal*. – **2013**. – V. 59, № 8. – P. 2872-2883.
38. Chen P., Min M., Chen Y., Wang L., Li Y., Chen Q., Wang C., Wan Y., Wang X., Cheng Y., Deng S., Hennessy K., Lin X., Liu Y., Wang Y., Martinez B., Ruan R. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach // *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. – **2009**. – V. 2, № 4. – P. 1-30.
39. Singh S., Simmons B., Vogel K. Visualization of biomass solubilization and cellulose regeneration during ionic liquid pretreatment of switchgrass // *Biotechnology and Bioengineering*. – **2009**. – V. 104, № 1. – P. 68-75.
40. Mes-Hartree M., Saddler J.N. The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymatic hydrolysis of cellulose // *Biotechnology Letters*. – **1983**. – V. 5. – P. 531-536.

41. Boyer L.J., Vega J.L., Klasson K., Clausen E.C., Gaddy J.L. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture // Biomass Bioenergy. – **1992**. – V. 3. – P. 41-48.
42. Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentation of glucose and xylose by *S.cerevisiae*, *Z.mobilis*, *P.stipitis*, and *C.shehate* // Enzyme and Microbial Technology. – **1996**. – V. 19. – P. 220-225.
43. Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood // Enzyme and Microbial Technology. – **1999**. – V. 24, № 3-4. – P. 151-159.
44. Синицын А.П., Ковалев Г.В., Меса-Манреса С.Р., Козловский Д.Ф., Калязин Е.П., Клесов А.А. Сравнительное изучение влияния различных видов предобработки на скорость ферментативного гидролиза природных целлюлозосодержащих материалов // Химия древесины. – **1984**. – № 5. – С. 60-71.
45. Brownell H.H., Yu E.K.C., Saddler J.N. Steam-explosion pretreatment of wood: Effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop // Biotechnology and Bioengineering. – **1986**. – V. 28. – P. 792-801.
46. Sassner P., Martensson C.G., Galbe M., Zacchi G. Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated Salix for the production of bioethanol // Bioresource Technology. – **2008**. – V. 99. – P. 137-145.
47. Rosgaard L., Pedersen S., Meyer A.S. Comparison of different pretreatment strategies for enzymatic hydrolysis of wheat and barley straw // Applied Biochemistry and Biotechnology. – **2007**. – V. 143. – P. 284-296.
48. Пат. 2461633 Россия, С 2. Способ гидролиза растительного волокнистого материала для получения и выделения сахара, включающего глюкозу / Такесима Синити, Кикүти Такеси. № 2010149335/13, заявлено 02.06.2009; опублик. 20.09.2012, Бюл. № 26. 30 с.
49. Dunnett A.J., Adjiman C.S. and Shah N. A spatially explicit whole-system model of the lignocellulosic bioethanol supply chain: an assessment of decentralised processing potential // Biotechnology for Biofuels. – **2008**. – V. 1. – P. 13-30.
50. Lin Y., Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects // Applied Microbiology and Biotechnology. – **2006**. – V. 69. – P. 627–642.
51. Smith P.B., Payne G.F. Renewable and Sustainable Polymers. ACS Symposium Series. Volume 1063. American Chemical Society: Washington, DC, **2011**. 212 p.
52. СЕН Marketing Research Report 580.0280 A, Biodegradable Polymers, January **2010**.
53. Monomers, polymers and composites from renewable resources / Ed. by M.N. Belgacem, A. Gandini. Elsevier: Amsterdam, **2008**. 552 p.
54. Handbook of Biodegradable Polymers / Ed. by C. Bastioli. Smithers Rapra Publishing, Shropshire, UK, **2005**. 552 p.
55. Sygmond C., Kracher D., Scheiblbrandner S., Zahma K., Felice A.K., Harreither W., Kittl R., Ludwig R. Characterization of the two *Neurospora crassa* cellobiose dehydrogenases and their connection to oxidative cellulose degradation // Applied and Environmental Microbiology. – **2012**. – V. 78, № 17. – P. 6161-6171.
56. Проскурина О.В., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Немашкалов В.А., Синицына О.А., Ревин В.В., Синицын А.П. Эндоглюканаза IV *Trichoderma reesei* – новый компонент биокатализаторов на основе целлюлазного комплекса гриба *Penicillium verruculosum* для гидролиза целлюлозосодержащей биомассы // Катализ в промышленности. – **2013**. – № 6. – С. 73-80.
57. Hemsworth G.R., Johnston E.M., Davies G.J., Walton P.H. Lytic polysaccharide monoxygenases in biomass conversion // Trends in Biotechnology. – **2015**. – V. 33, № 12. – P. 747-761.

58. Чекушина А.В. Целлюлолитические ферментные препараты на основе грибов *Trichoderma*, *Penicillium* и *Myceliophthora* с увеличенной гидролитической активностью. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. М., ИНБИ, **2013**, 114 с.
59. Clarke A.J. Biodegradation of cellulose. Enzymology and biotechnology, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, **1997**, 272 p.
60. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation / Ed. by P. Nigam, A. Pandley. Springer Science, **2009**. 466 p.
61. 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* // Journal of Biotechnology. – **2002**. – V. 99. – P. 63-68.
62. Wood T.M., McCrae S.I. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with cellobiohydrolase // Biochemical Journal. – **1978**. – V. 171. – P. 61-72.
63. Vrsanska M., Biely P. The cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* QM 9414: action on cello-oligosaccharides // Carbohydrate Research. – **1992**. – V. 227. – P. 19-27.
64. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. 2-е изд. – М.: Агропромиздат, **1987**. – 335 с.
65. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизмы действия. В сб.: Биоконверсия целлюлозы: микробиология и биохимия, Итоги науки и техники, Сер. Биотехнология, 11. М., ВИНТИ, **1988**, с. 8-149.
66. Claeysens M., Nerinckx W., Piens K. Carbohydrases from *Trichoderma reesei* and other microorganisms. Structure, biochemistry, genetics and applications. The Royal Society of Chemistry, **1998**, 238 p.
67. Murao S., Sakamoto R., Arai M. Cellulases of *Aspergillus aculeatus* // Methods in Enzymology. – **1988**. – V. 160. – P. 274-299.
68. Tong C.C., Cole A.L., Shepherd M.G. Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus auranticus* // Biochemical Journal. – **1980**. – V. 191. – P. 83-94.
69. Schüle M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens* // Journal of Biotechnology. – **1997**. – V. 57. – P. 71-81.
70. Mansfield S.D., Saddler J.N., Guebitz G.M. Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum* // Enzyme and Microbial Technology. – **1998**. – V. 23. – P. 133-140.
71. Bhat M.K., McCrae S.I., Wood T.M. The endo-1,4- β -D-glucanase system of *Penicillium pinophilum* cellulase: isolation, purification and characterization of five major endoglucanase components // Carbohydrate Research. – **1989**. – V. 190. – P. 279-297.
72. Illanes A., Cauerhff A., Wilson L., Castro G.R. Recent trends in biocatalysis engineering // Bioresource Technology. – **2012**. – V. 115. – P. 48-57.
73. Chen H. Lignocellulose Biorefinery Engineering. Principles and Applications. Woodhead Publishing Series in Energy: Number 74. Elsevier, Amsterdam, **2015**, 274 p.
74. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Manenkova J.A., Protas O.V. Enzymatic saccharification of industrial and agricultural lignocellulosic wastes // Applied Biochemistry and Biotechnology. – **1992**. – V. 34. – P. 625-637.
75. Davies G., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // Structure. – **1995**. – V. 3, № 9. – P. 853-859.
76. Tishkov V.I., Gusakov A.V., Cherkashina A.S., Sinitsyn A.P. Engineering the pH-optimum of activity of the GH12 family endoglucanase by site-directed mutagenesis // Biochimie. – **2013**. – V. 95. – P. 1704-1710.

77. Shen J., Agblevor F.A. Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose // *Biomass and Bioenergy*. – **2010**. – V. 34. – P. 1098-1107.
78. Öhgren K., Bura R., Lesnicki G., Saddler J.N., Zacchi G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover // *Process Biochemistry*. – **2007**. – V. 42. – P. 834-839.
79. Morales-Rodriguez R., Gernaey K.V., Meyer A.S., Sin G. A mathematical model for simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of C6 and C5 sugars // *Chinese Journal of Chemical Engineering*. – **2011**. – V. 19. – P. 185-191.
80. Ghost P., Pamment N.B., Martin W.R.B. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose: effect of β -D-glucosidase activity and ethanol inhibition of cellulases // *Enzyme and Microbial Technology*. – **1982**. – V. 4. – P. 425-430.
81. Mathew G.M., Sukumaran R.K., Singhanian R.R., Padley A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation // *Journal of Scientific and Industrial Research*. – **2008**. – V. 67. – P. 898-907.
82. Yang B., Dai Z., Ding S.-Y., Wyman C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass // *Biofuels*. – **2011**. – V. 2, № 4. – P. 421-450.
83. Vieille C., Zeikus G.J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – **2001**. – V. 65, № 1. – P. 1-43.
84. Alma'abadi A.D., Gojobori T., Mineta K. Marine metagenome as a resource for novel enzymes // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. – **2015**. – V. 13. – P. 290-295.
85. Barati B., Sadegh Amiri I. In Silico Engineering of Disulphide Bonds to Produce Stable Cellulase, *Springer Briefs in Applied Sciences and Technology*, **2015**, 48 p.
86. Yu H., Huang H. Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites // *Biotechnology Advances*. – **2014**. – V. 32. – P. 308-315.
87. Eriksen D.T., Lian J., Zhao H. Protein design for pathway engineering // *Journal of Structural Biology*. – **2014**. – V. 185. – P. 234-242.
88. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Сеницын А.П. Компонентный состав коммерческих ферментных препаратов, полученных с помощью грибов рода *Trichoderma* и предназначенных для биоконверсии растительного сырья // *Биотехнология*. – **2013**. – № 3. – С. 58-68.
89. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Сеницын А.П. Ферментные препараты *Penicillium verruculosum* для биоконверсии растительного сырья – альтернатива коммерческим препаратам, полученным с помощью грибов рода *Trichoderma* // *Биотехнология*. – **2013**. – № 3. – С. 69-80.
90. Khare S.K., Pandey A., Larroche C. Current perspectives in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass // *Biochemical Engineering Journal*. – **2015**. – V. 102. – P. 38-44.
91. <http://www.nrel.gov/>.
92. Zhang Y.-H., Himmel M.E., Mielenz J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies // *Biotechnology Advances*. – **2006**. – V. 24. – P. 452-481.
93. Juturu V., Wu J.C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – **2014**. – V. 33. – P. 188-203.
94. Пат. 7364891 США. Mutated alkaline cellulase / Yoshihiro H., Tadahihiro O., Tooru K. Applicants: KAO CORP. **2008**.
95. Пат. 8012734 США. Cellulase variants with reduced inhibition by glucose / Lavinge J.A., Hill C.M.D., Tremblay A., St-Pierre P., Tomashek J.J. **2011**.
96. Atreya M.E., Strobel K.L., Clark D.S. Alleviating product inhibition in cellulase enzyme Cel7A // *Biotechnology and Bioengineering*. – **2016**. – V. 113, № 2. – P. 330-338.

97. Пат. 8101398 США. Modified cellulases with increased thermostability, thermophilicity, and alkalophilicity / St-Pierre P., Masri N., Fournier M.C., White T.C. **2012**.
98. Schmidt-Dannert C. Directed evolution of single proteins, metabolic pathways, and viruses // *Biochemistry*. – **2001**. – V. 40, № 44. – P. 13125–13136.
99. Schmidt-Dannert C., Arnold F.H. Directed evolution of industrial enzymes // *Trends in Biotechnology*. – **1999**. – V. 17. – P. 135-136.
100. Kim Y.S., Jung H.C., Pan J.G. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants // *Applied and Environmental Microbiology*. – **2000**. – V. 66, № 2. – P. 788-793.
101. Murashima K., Kosugi A., Doi R.H. Thermostabilization of cellulosomal endoglucanase EngB from *Clostridium cellulovorans* by in vitro DNA recombination with non-cellulosomal endoglucanase EngD // *Molecular Microbiology*. – **2002**. – V. 45. – P. 617-626.
102. Wang T., Liu X., Yu Q., Zhang X., Qu Y., Gao P., Wang T. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* // *Biomolecular Engineering*. – **2005**. – V. 22. – P. 89-94.
103. Kaper T., Brouns S.J., Geerling A.C., De Vos W.M., Van der Oost J. DNA family shuffling of hyperthermostable beta-glycosidases // *Biochemical Journal*. – **2002**. – V. 368. – P. 461-470.
104. Endelman J.B., Silberg J.J., Wang Z.-G., Arnold F.H. Site-directed protein recombination as a shortest-path problem // *Protein Engineering, Design & Selection*. – **2004**. – V. 17, № 7. – P. 589-594.
105. Zhang S., Wilson D.B. Surface residue mutations which change the substrate specificity of *Thermomonospora fusca* endoglucanase E2 // *Journal of Biotechnology*. – **1997**. – V. 57. – P. 101-113.
106. Zhang S., Barr B.K., Wilson D.B. Effects of noncatalytic residue mutations on substrate specificity and ligand binding of *Thermobifida fusca* endocellulase cel6A // *European Journal of Biochemistry*. – **2000**. – V. 267, № 1. – P. 244-252.
107. Schüle M. Protein engineering of cellulases // *Biochimica et Biophysica Acta*. – **2000**. – V. 1543. – P. 239-252.
108. Bommarius A.S., Sohn M., Kang Y., Lee J.H., Realff M.J. Protein engineering of cellulases // *Current Opinion in Biotechnology*. – **2014**. – V. 29. – P. 139-145.
109. Jeoh T., Michener W., Himmel M.E., Decker S.R., Adney W.S. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion // *Biotechnology for Biofuels*. – **2008**. – V. 1. – P. 10-22.
110. Dombkowski A.A., Sultana K.Z., Craig D.B. Protein disulfide engineering // *FEBS Letters*. – **2014**. – V. 588. – P. 206-212.
111. Trudeau D.L., Lee T.M., Arnold F.H. Engineered thermostable fungal cellulases exhibit efficient synergistic cellulose hydrolysis at elevated temperatures // *Biotechnology and Bioengineering*. – **2014**. – V. 111, № 12. – P. 2390-2397.
112. Beckham G.T., Dai Z., Matthews J.F., Momany M., Payne C.M., Adney W.S., Baker S.E., Himmel M.E. Harnessing glycosylation to improve cellulase activity // *Current Opinion in Biotechnology*. – **2012**. – V. 23. – P. 338-345.
113. Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER // *Biochimica et Biophysica Acta*. – **2013**. – V. 1833. – P. 2430-2437.
114. Geysens S., Whyteside G., Archer D.B. Genomics of protein folding in the endoplasmic reticulum, secretion stress and glycosylation in the aspergilli // *Fungal Genetics and Biology*. – **2009**. – V. 46. – P. S121-S140.

115. Greene E.R., Himmel M.E., Beckham G.T., Tan Z. Glycosylation of cellulases: engineering better enzymes for biofuels // *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. – **2015**. – V. 72. – P. 63-112.
116. Hui J.P.M., Lanthier P., White T.C., McHugh S.G., Yaguchi M., Roy R., Thibault P. Characterization of cellobiohydrolase I (Cel7A) glycoforms from extracts of *Trichoderma reesei* using capillary isoelectric focusing and electrospray mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. – **2001**. – V. 752. – P. 349-368.
117. Hui J.P.M., White T.C., Thibault P. Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei* // *Glycobiology*. – **2002**. – V. 12. – P. 837-849.
118. Harrison M.J., Nouwens A.S., Jardine D.R., Zachara N.E., Gooley A.A., Nevalainen H., Packer N.H. Modified glycosylation of cellobiohydrolase I from a high cellulase-producing mutant strain of *Trichoderma reesei* // *European Journal of Biochemistry*. – **1998**. – V. 256. – P. 119-127.
119. Gusakov A.V., Antonov A.I., Ustinov B.B. N-Glycosylation in *Chrysosporium lucknowense* enzymes // *Carbohydrate Research*. – **2008**. – V. 343. – P. 48-55.
120. Deshpande N., Wilkins M.R., Packer N., Nevalainen H. Protein glycosylation pathways in filamentous fungi // *Glycobiology*. – **2008**. – V. 18, № 8. – P. 626-637.
121. Gusakov A.V., Sinitsyna O.A., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. N-Glycosylation patterns in two α -L-arabinofuranosidases from *Penicillium canescens* belonging to the glycoside hydrolase families 51 and 54 // *Carbohydrate Research*. – **2013**. – V. 382. – P. 71-76.
122. Wei W., Chen L., Zou G., Wang Q., Yan X., Zhang J., Wang C., Zhou Z. N-Glycosylation affects the proper folding, enzymatic characteristics and production of a fungal β -glucosidase // *Biotechnology and Bioengineering*. – **2013**. – V. 110, № 12. – P. 3075-3084.
123. Langsford M.L., Gilkes N.R., Singh B., Moser B., Miller Jr.R.C., Warren R.A., Kilburn D.G. Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains // *FEBS Letters*. – **1987**. – V. 225, № 1-2. – P. 163-167.
124. Hayashida S., Yoshioka H. The role of carbohydrate moiety on thermostability of cellulases from *Humicola insolens* YH-8 // *Agricultural and biological chemistry*. – **1980**. – V. 44. – P. 481-487.
125. Wang W., Nema S., Teagarden D. Protein aggregation - pathways and influencing factors // *International Journal of Pharmaceutics*. – **2010**. – V. 390, № 2. – P. 89-99.
126. Culyba E.K., Price J.L., Hanson S.R., Dhar A., Wong C.H., Gruebele M., Powers E.T., Kelly J.W. Protein native-state stabilization by placing aromatic side chains in N-glycosylated reverse turns // *Science*. – **2011**. – V. 331. – P. 571-575.
127. Taylor C.B., Talib M.F., McCabe C., Bu L., Adney W.S., Himmel M.E., Crowley M.F., Beckham G.T. Computational investigation of glycosylation effects on a family 1 carbohydrate-binding module // *Journal of Biological Chemistry*. – **2012**. – V. 287, № 5. – P. 3147-3155.
128. Voutilainen S.P., Murray P.G., Tuohy M.G., Koivula A. Expression of *Talaromyces emersonii* cellobiohydrolase Cel7A in *Saccharomyces cerevisiae* and rational mutagenesis to improve its thermostability and activity // *Protein Engineering, Design and Selection*. – **2010**. – V. 23. – P. 69-79.
129. Payne C.M., Resch M.G., Chen L., Crowley M.F., Himmel M.E., Taylor II L.E., Sandgren M., Ståhlberg J., Stals I., Tan Z., Beckham G.T. Glycosylated linkers in multimodular lignocellulosedegrading enzymes dynamically bind to cellulose // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – **2013**. – V. 110, № 6. – P. 14646-14651.

130. Beckham G.T., Ståhlberg J., Knott B.C., Himmel M.E., Crowley M.F., Sandgren M., Sørlie M., Payne C.M. Towards a molecular-level theory of carbohydrate processivity in glycoside hydrolases // *Current Opinion in Biotechnology*. – **2014**. – V. 27. – P. 96-106.
131. Sammond D.W., Payne C.M., Brunecky R., Himmel M.E., Crowley M.F., Beckham G.T. Cellulase linkers are optimized based on domain type and function: insights from sequence analysis, biophysical measurements, and molecular simulation // *PLoS One*. – **2012**. – V. 7, № 11. – e48615.
132. Adney W.S., Jeoh T., Beckham G.T., Chou Y.-C., Baker J.O., Michener W., Brunecky R., Himmel M.E. Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis // *Cellulose*. – **2009**. – V. 16. – P. 699-709.
133. Merino S.T., Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. – **2007**. – V. 108. – P. 95-120.
134. Margeot A., Hahn-Hagerdal B., Edlund M., Slade R., Monot F. New improvements for lignocellulosic ethanol // *Current Opinion in Biotechnology*. – **2009**. – V. 20. – P. 372-380.
135. Kubicek C.P., Mikus M., Schuster A., Schmoll M., Seiboth B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina* // *Biotechnology for Biofuels*. – **2009**. – V. 2, № 19. – DOI: 10.1186/1754-6834-2-19.
136. Häkkinen M., Valkonen M.J., Westerholm-Parvinen A., Aro N., Arvas M., Vitikainen M., Penttilä M., Saloheimo M., Pakula T.M. Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production // *Biotechnology for Biofuels*. – **2014**. – V. 7, № 14. – DOI: 10.1186/1754-6834-7-14.
137. Skomarovsky A.A., Gusakov A.V., Okunev O.N., Solov'eva I.V., Bubnova T.V., Kondrat'eva E.G., Synitsyn A.P. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparations of *Penicillium* and *Trichoderma* fungi // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – **2005**. – V. 41. – P. 182-184.
138. Martins L.F., Kolling D., Camassola M., Dillion A.J., Ramos L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates // *Bioresource Technology*. – **2008**. – V. 99. – P. 1417-1424.
139. Ikeda Y., Hayashi H., Okuda N., Park E.Y. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus* // *Biotechnology Progress*. – **2007**. – V. 23. – P. 333-338.
140. Gusakov A.V., Salanovich T.N., Antonov A.I., Ustinov B.B., Okunev O.N., Burlingame R., Emalfarb M., Baez M., Sinitsyn A.P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose // *Biotechnology and Bioengineering*. – **2007**. – V. 97. – P. 1028-1038.
141. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Сеницын А.П. Сравнение эффективности процессов биоконверсии растительного сырья с использованием биокатализаторов на основе ферментных препаратов *Trichoderma* и *Penicillium verruculosum* // *Катализ в промышленности*. – **2012**. – Т. 6. – С. 68-76.
142. Кастельянос О., Ермолова О.В., Сеницын А.П., Попова Н.Н., Окунев О.Н., Кернс Г., Куде Е. Схема очистки ферментов целлюлазного комплекса *Penicillium verruculosum*, исследование их биохимических свойств и специфичности // *Биохимия*. – **1995**. – Т. 60. – С. 925-943.
143. Гутиеррес Родригес Б. Каталитические, биохимические и биотехнологические свойства эндоглюканазы В4 целлюлазного комплекса *Penicillium verruculosum*. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. М., МГУ, **1997**, 116 с.

144. Зоров И.Н. Исследование целлобиогидролазы и целлобиазы целлюлазного комплекса *Penicillium verruculosum*. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. М., МГУ, **1998**, 156 с.
145. Сахаров И.Ю., Зоров И.Н., Сеницын А.П. Выделение эндоглюканазы *Penicillium verruculosum* методом иммуноафинной хроматографии // Биохимия. – **1996**. – Т. 61. – С. 1658-1663.
146. Скомаровский А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. М., МГУ, **2006**, 176 с.
147. Морозова В.В. Свойства целлюлолитических ферментов *Penicillium verruculosum* и их применение для осахаривания лигноцеллюлозного сырья. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. М., МГУ, **2009**, 159 с.
148. Короткова О.Г. Получение целлюлазных комплексов с увеличенной осахаривающей способностью на основе рекомбинантных штаммов *Penicillium verruculosum*. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. М., МГУ, **2011**, 174 с.
149. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>.
150. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Структура и механизм действия целлюлолитических ферментов // Биохимия. – **2002**. – Т. 67. – С. 1026-1050.
151. Linder M., Teeri T.T. The roles and function of cellulose-binding domains // Journal of Biotechnology. – **1997**. – V. 57. – P. 15-28.
152. Gilkes N.R., Henrissat B., Kilburn D.G., Miller R.C., Warren R.A.J. Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function and enzyme families // Microbiological Reviews. – **1991**. – V. 55. – P. 303-315.
153. Teeri T.T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases // Trends in Biotechnology. – **1997**. – V. 15. – P. 160-167.
154. Wood T.M., McCrae S.I. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose // Advances in Chemistry Series. – **1979**. – V. 181. – P. 181-209.
155. Ryu D.D.Y., Kim C., Mandels M. Competition and sorption of cellulase components and its significance in a synergistic mechanism // Biotechnology and Bioengineering. – **1984**. – V. 26. – P. 488-496.
156. Henrissat B., Driguez H., Viet C., Schülein M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose // Nature Biotechnology. – **1985**. – V. 3. – P. 722-726.
157. Fujii M., Shimizu M. Synergism of endoenzyme and exoenzyme on hydrolysis of soluble cellulose derivatives // Biotechnology and Bioengineering. – **1986**. – V. 28. – P. 878-882.
158. Сеницын А.П., Митькевич О.В., Калюжный С.В., Клесов А.А. Изучение синергизма в действии ферментов целлюлазного комплекса // Биотехнология. – **1987**. – Т. 3, № 1. – С. 39-46.
159. Сеницын А.П., Митькевич О.В. Различия в кинетических свойствах прочно и слабо адсорбирующихся на целлюлозе целлюлолитических ферментов // Биотехнология. – **1987**. – Т. 3, № 2. – С. 227-233.
160. Гусаков А.В. Биокатализаторы на основе грибных целлюлаз: фундаментальные и прикладные аспекты. Диссертация на соискание ученой степени д-ра. хим. наук, М., МГУ, **2005**, 385 с.
161. The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information // Nucleic Acids Research. – **2015**. – V. 43. – D204-D212.
162. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins

- D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0 // *Bioinformatics*. – **2007**. – V. 23. – P. 2947-2948.
163. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling // *Bioinformatics*. – **2006**. – V. 22. – P. 195-201.
 164. Guex N., Peitsch M.C., Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective // *Electrophoresis*. – **2009**. – V. 30(S1). – S162-S173.
 165. Kiefer F., Arnold K., Künzli M., Bordoli L., Schwede T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources // *Nucleic Acids Research*. – **2009**. – V. 37. – D387-D392.
 166. Rojas A.L., Nagem R.A.P., Neustroev K.N., Arand M., Adamska M., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Garratt R.C., Golubev A.M., Polikarpov I. Crystal structures of beta-galactosidase from *Penicillium sp.* and its complex with galactose // *Journal of Molecular Biology*. – **2004**. – V. 343. – P. 1281-1292.
 167. Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. *Penicillium canescens* host as the platform for development of a new recombinant strain producers of carbohydrases. In: Kamm B., editor. *Microorganisms in Biorefineries*. Berlin: Springer-Verlag, **2015**. p. 1-19.
 168. Aslanidis C., J.de Jong P. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR) // *Nucleic Acids Research*. – **1990**. – V. 18. – P. 6069-6075.
 169. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene // *Current Genetics*. – **1995**. – V. 28, № 5. – P. 474-477.
 170. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2nd ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**, 1659 p.
 171. Stoll D.A., Link S., Kulling S., Geisen R., Schmidt-Heydt M. Comparative proteome analysis of *Penicillium verrucosum* grown under light of short wavelength shows an induction of stress-related proteins associated with modified mycotoxin biosynthesis // *International Journal of Food Microbiology*. – **2014**. – V. 175. – P. 20-29.
 172. Qin G., Tian S., Chan Z., Li B. Crucial role of antioxidant proteins and hydrolytic enzymes in pathogenicity of *Penicillium expansum*: Analysis based on proteomic approach // *Molecular & Cellular Proteomics*. – **2007**. – V. 6. – P. 425-438.
 173. Nandakumar M.P., Marten M.R. Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins // *Electrophoresis*. – **2002**. – V. 23. – P. 2216-2222.
 174. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика, М., Мир, **1991**, с. 543.
 175. Somogyi M. A new reagent for the determination of sugars // *Journal of Biological Chemistry*. – **1952**. – V. 195. – P. 19-23.
 176. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of sugars // *Journal of Biological Chemistry*. – **1944**. – V. 153. – P. 375-379.
 177. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Salanovich T.N., Bukhtoyarov F.E., Markov A.V., Ustinov B.B., van Zeijl C., Punt P., Burlingame R. 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, № 1. – P. 57-69.
 178. Sinitsyna O.A., Bukhtoyarov F.E., Gusakov A.V., Okunев O.N., Bekkarevitch A.O., Vinetsky Y.P., Sinitsyn A.P. Isolation and properties of major components of *Penicillium canescens* extracellular enzyme complex // *Biochemistry (Moscow)*. – **2003**. – V. 68, № 11. – P. 1200-1209.

179. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. Учебн. пособие. М.: Изд-во МГУ, **1995**. 224с.
180. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravilnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. Cellulases of *Penicillium verruculosum* // Biotechnology Journal. – **2010**. – V. 5. – P. 871–880.
181. James P. Proteome research: mass spectrometry, Springer-Verlag, Berlin, **2001**, 274 p.
182. Cooper C.A., Gasteiger E., Packer N. GlycoMod – A software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data // Proteomics. – **2001**. – V. 1. – P. 340-349.
183. Gusakov A.V., Semenova M.V., Sinitsyn A.P. Mass spectrometry in the study of extracellular enzymes produced by filamentous fungi // Journal of Analytical Chemistry. – **2010**. – V. 65, № 14. – P. 1446-1461.
184. Van Petegem F., Vandenberghe I., Bhat M.K., Van Beeumen J. Atomic resolution structure of the major endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* // Biochemical and Biophysical Research Communications. – **2002**. – V. 296. – P. 161-166.
185. Lo Leggio L., Larsen S. The 1.62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5 // FEBS Letters. – **2002**. – V. 523. – P. 103-108.
186. Hong J., Tamaki H., Yamamoto K., Kumagai H. Cloning of a gene encoding a thermostable endo-beta-1,4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast // Biotechnology Letters. – **2003**. – V. 25. – P. 657-661.
187. Zhao G., Yao Y., Hou L., Wang C., Cao X. Draft genome sequence of *Aspergillus oryzae* 1008, an increased acid protease production strain // Genome Announcement. – **2014**. – V. 2, № 3. – e00548-14.
188. Hara Y., Hinoki Y., Shimoi H., Ito K. Cloning and sequence analysis of endoglucanase genes from an industrial fungus, *Aspergillus kawachii* // Bioscience Biotechnology and Biochemistry. – **2003**. – V. 67. – P. 2010-2013.
189. Parry N.J., Beever D.E., Owen E., Nerinckx W., Claeysens M., Van Beeumen J., Bhat M.K. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus* // Archives of Biochemistry and Biophysics. – **2002**. – V. 404. – P. 243-253.
190. Волков П.В. Молекулярно-генетические подходы к получению ферментных препаратов карбогидраз с улучшенными гидролитическими свойствами. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. М., ИНБИ, **2012**, 130 с.
191. Zou J., Kleywegt G.J., Ståhlberg J., Driguez H., Nerinckx W., Claeysens M., Koivula A., Teeri T.T., Jones T.A. Crystallographic evidence for substrate ring distortion and protein conformational changes during catalysis in cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei* // Structure. – **1999**. – V. 7, № 9. – P. 1035-1045.
192. Futagami T., Mori K., Yamashita A., Wada S., Kajiwara Y., Takashita H., Omori T., Takegawa K., Tashiro K., Kuhara S., Goto M. Genome sequence of the white koji mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, used for brewing the Japanese distilled spirit shochu // Eukaryotic Cell. – **2011**. – V. 10. – P. 1586-1587.
193. Rouvinen J., Bergfors T., Teeri T.T., Knowles J.K.C., Jones T.A. Three dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei* // Science. – **1990**. – V. 249. – P. 380-386.
194. Koivula A., Reinikainen T., Ruohonen L., Valkeajaervi A., Claeysens M., Teleman O., Kleywegt G.J., Szardenings M., Rouvinen J., Jones T.A., Teeri T.T. The active site of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II: the role of tyrosine 169 // Protein Engineering. – **1996**. – V. 9, № 8. – P. 691-699.

195. Tomme P., Clayssens M. Identification of a functionally important carboxyl group in cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* // FEBS Letters. – **1989**. – V. 243. – P. 239-243.
196. Divne C., Staahlberg J., Reinikainen T., Ruohonen L., Pettersson G., Knowles J.K.C., Teeri T.T., Jones T.A. The three dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* // Science. – **1994**. – V. 265. – P. 524-528.
197. Divne C., Staahlberg J., Teeri T.T., Jones T.A. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* // Journal of Molecular Biology. – **1998**. – V. 275. – P. 309-325.
198. Hanif A., Yasmeen A., Rajoka M.I. Induction, production, repression, and derepression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger* // Bioresource Technology. – **2004**. – V. 94. – P. 311-319.
199. Texier H., Dumon C., Neugnot-Roux V., Maestracci M., O'Donohue M.J. Redefining XynA from *Penicillium funiculosum* IMI 378536 as a GH7 cellobiohydrolase // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. – **2012**. – V. 39. – P. 1569-1576.
200. Fonteyne M., Correia A., De Plecker S., Vercruyssen J., Ilic I., Zhou Q., Vervaeke C., Remon J.P., Onofre F., Bulone V., De Beer T. Impact of microcrystalline cellulose material attributes: A case study on continuous twin screw granulation // International Journal of Pharmaceutics. – **2015**. – V. 478, I. 2. – P. 705-717.
201. 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.
202. Van Dyk J.S., Pletschke B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy // Biotechnology Advances. – **2012**. – V. 30. – P. 1458-1480.
203. Boisset C., Petrequin C., Chanzy H., Henrissat B., Schulein M. Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose // Biotechnology and Bioengineering. – **2001**. – V. 72, № 3. – P. 339-345.
204. Fagerstam L.G., Pettersson L.G. The 1,4-β-glucan cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* QM 9414 // FEBS Letters. – **1980**. – V. 119, № 1. – P. 97-100.
205. Igarashi K., Uchihashi T., Koivula A., Wada M., Kimura S., Okamoto T., Penttilä M., Ando T., Samejima M. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface // Science. – **2011**. – V. 333, № 6047. – P. 1279-1282.
206. Сеницын А.П., Наджеми Б., Митькевич О.В., Клесов А.А. Взаимное усиление гидролитического действия прочно и слабо адсорбирующихся целлюлазных препаратов // Прикладная биохимия и микробиология. – **1986**. – Т. 22. – С. 333-336.
207. Klyosov A.A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation // Biochemistry. – **1990**. – V. 29. – P. 10577-10585.
208. Сеницын А.П., Гусаков А.В. Условия возникновения синергизма между эндо- и экзодеполимеразами при ферментативной деструкции полисахаридов // Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия. – **1989**. – Т. 30. – С. 196-200.
209. Митькевич О.В., Сеницын А.П., Клесов А.А. О механизме действия полиферментных целлюлолитических препаратов на растворимую целлюлозу // Прикладная биохимия и микробиология. – **1985**. – Т. 21, Вып. 2. – С. 213-216.
210. Zhang Y.-H.P., Lynd L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems // Biotechnology and Bioengineering. – **2004**. – V. 88, № 7. – P. 797-824.
211. Zhang Y.-H.P., Lynd L.R. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase // Biotechnology and Bioengineering. – **2006**. – V. 94, № 5. – P. 888-898.

212. Шульга Т.Н. Свойства целлобиогидролаз из грибов *Chrysosporium lucknowense* и *Trichoderma reesei*. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. М., МГУ, **2008**, 99 с.
213. Kallioinen A., Puranen T., Siika-aho M. Mixtures of thermostable enzymes show high performance in biomass saccharification // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – **2014**. – V. 173, № 5. – P. 1038-1056.
214. Юлдашев Б.Т., Рахимов М.М., Рабинович М.Л. Сравнительное изучение поведения целлюлаз на поверхности целлюлозы и лигноцеллюлозы в процессе ферментативного гидролиза // *Прикладная биохимия и микробиология*. – **1993**. – Т. 29. – С. 58-68.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Масс-спектрометрический анализ ЭГП *P.verruculosum*

Таблица 1.1. ЭГП: пептиды, подтверждающие наличие необходимых аминокислотных замен.

ЭГП/протеаза	Пептид	m/z экспер.	m/z теор.
ЭГП N19A/ химотрипсин	Ala10- Phe25 (3 MC, unspecific)	1708,6	1708,7
	Gly17-Phe57 (4 MC)	4161,8	4162,0
	Thr186-Met206 (5 MC)	2391,0	2391,1
	Asn189-Leu195 (1 MC)	762,4	762,4
ЭГП N42A/ химотрипсин	Ser12-Phe25 (3 MC, unspecific)	1593,7	1593,7
	Ala10-Phe25 (3 MC, unspecific)	1751,8	1751,7
	Thr39-Phe57 (2 MC)	2037,0	2037,1
	Asn189-Leu195 (1 MC)	762,4	762,4
	Val193-Tyr209 (4 MC)	2037,0	2037,0
ЭГП N194A/ химотрипсин	Ala10-Phe25 (3 MC, unspecific)	1751,7	1751,7
	Gly17-Met54 (3 MC)	3830,8	3830,8
	Gly17-Met54 (3 MC, MSO:54)	3846,8	3846,8
	Thr186-Tyr204 (4 MC)	2088,0	2088,0

MC – нерасщепленные связи (missed cleavages), MSO – окисленный метионин, unspecific – неспецифический пептид.

Таблица 1.2. ЭГП: сайты N-гликозилирования и структура N-связанных гликанов, определенные с использованием сервиса GlycoMod.

ЭГП/протеаза	Сайт N-гликозилирования	Пептид	m/z exper.	m/z теор.	Структура гликана
Рекомб. ЭГП/ химотрипсин	Asn42	Thr39- Phe61 (3 MC)	3957,9	3957,8	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
		Gly17-Leu49 (2 MC)	5046,4	5046,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
	Asn194	Asn189-Tyr204 (3 MC)	2334,0	2334,1	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			2658,2	2658,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		Asn189-Tyr204 (3 MC, MSO:192)	2982,3	2982,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
Рекомб. ЭГП/ пепсин	Asn42	Pro41-Leu49 (2 MC)	2025,2	2024,9	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
		Gly35-Gln47 (3 MC)	2807,7	2807,1	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
	Asn194	Met192-Leu201 (1 MC)	2807,7	2807,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Asn189-Leu201 (2 MC, MSO:192)	2947,8	2947,2	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
Нативн. ЭГП/ химотрипсин	Asn42	Thr39-Met54 (1 MC, MSO:54)	3100,4	3100,4	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
		Thr39-Phe61 (3 MC)	3957,9	3957,8	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
		Gly17-Leu49 (2 MC)	5046,4	5046,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
	Asn194	Asn189-Tyr204 (3 MC)	2334,0	2334,1	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			2658,2	2658,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		Asn189-Tyr204 (3 MC, MSO:192)	2350,0	2350,1	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
Нативн. ЭГП/ пепсин	Asn42	Pro41-Leu49 (2 MC)	2025,0	2024,9	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
		Gly35-Gln47 (3 MC)	2807,4	2807,1	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
	Asn194	Met192-Leu201 (1 MC)	2807,4	2807,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Asn189-Leu201 (2 MC, MSO:192)	2947,5	2947,2	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
ЭГП N19A/ химотрипсин	Asn42	Thr39-Phe61 (3 MC)	3309,3	3309,6	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			3957,8	3957,8	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
	Asn194	Asn189-Tyr204 (3 MC)	2334,0	2334,1	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			2658,2	2658,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
			2982,2	2982,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
ЭГП N19A/ пепсин	Asn42	41Pro-49Leu (2 MC)	2025,2	2024,9	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
		Gly35-Gln47 (3 MC)	2835,5	2835,2	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
	Asn194	Met192-Leu201 (1 MC)	2807,7	2807,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Asn189-Leu201 (2 MC, MSO:192)	2947,8	2947,2	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
ЭГП N42A/ химотрипсин	Asn194	Asn189-Tyr204 (3 MC)	2334,0	2334,1	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			2658,2	2658,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		Asn189-Tyr204 (3 MC, MSO:192)	2998,2	2998,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
ЭГП N42A/ пепсин	Asn194	Met192-Leu201 (1 MC)	2807,4	2807,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Asn189-Leu201 (2 MC, MSO:192)	2947,5	2947,2	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
ЭГП N194A/ химотрипсин	Asn42	Thr39-Phe61 (3 MC)	3309,6	3309,6	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			3471,8	3471,7	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
			3958,1	3957,8	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
		Thr39-Met54 (1 MC)	2776,3	2776,2	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
ЭГП N194A/ пепсин	Asn42	Gly17-Leu49 (2 MC)	5046,7	5046,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
			Gly35-Gln47 (3 MC)	2807,4	2807,1
		Pro41-Leu49 (2 MC)	2835,2	2835,2	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂

MC – нерасщепленные связи (missed cleavages), MSO – окисленный метионин, TPO – окисленный триптофан, Cys_PAM – акриламид, присоединенный к цистеину.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Масс-спектрометрический анализ ЦБГП *P.verruculosum*

Таблица 2.1. ЦБГП: пептиды, подтверждающие наличие аминокислотных замен.

ЦБГП/протеаза	Пептид	m/z exper.	m/z теор.
ЦБГП N219A/ пепсин	Pro210-Ala223 (4 MC)	1390,7	1390,7
	Pro210-Ala223 (4 MC, MSO)	1406,7	1406,7
	Pro200-Ala219 (4 MC)	2149,1	2149,1
	Pro200-Ala219 (4 MC, MSO)	2165,1	2165,1
	Tyr199-Ala219 (5 MC)	2312,2	2312,2
	Tyr199-Ala219 (5 MC, MSO)	2328,2	2328,2
ЦБГП N265A/ пепсин	Ala265-Ala270 (3MC)	543,4	543,3
	Ala265-Gln271 (4 MC)	671,4	671,4
	Ala265-Leu272 (5 MC)	784,5	784,5
	Ser263-Gln271 (5 MC)	829,4	829,4
ЦБГП N279A/ пепсин	Thr275-Ala279 (1 MC)	581,2	581,3
	Ala274-Ala282 (4 MC)	881,4	881,5
	Phe273-Ala282 (5 MC)	1028,5	1028,5
ЦБГП N395A/ пепсин	Phe381-Ala395 (3 MC)	1536,8	1536,7
	Val382-Tyr401 (3 MC)	2071,1	2071,0
	Phe381-Tyr401 (4 MC)	2218,1	2218,0
	Val382-Tyr407 (5 MC)	2809,3	2809,2
	Val382-Tyr407 (5 MC, Cys_PAM)	2880,4	2880,3

MC – нерасщепленные связи (missed cleavages), MSO – окисленный метионин, Cys_PAM – акриламид, присоединенный к цистеину.

Таблица 2.2. ЦБГП: сайты N-гликозилирования и структура N-связанных гликанов, определенные с использованием сервиса GlycoMod.

ЦБГП/ протеаза	Сайт N-гликозилирования	Пептид	m/z exper.	m/z теор.	Структура гликана
1	2	3	4	5	6
Рекомб. ЦБГП/ пепсин	Asn219	Asn215-Ala223 (1 MC)	1842,8	1842,8	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		Asn215-Ala223 (1 MC, MSO: 216)	1858,8	1858,8	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
			2183,0	2182,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
		Pro210-Ala223 (3 MC)	2650,5	2650,1	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
			2812,2	2812,2	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
		Pro210-Ala223 (3 MC, MSO: 216)	2666,1	2666,1	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
	2828,2		2828,2	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
	Asn265	Gly261-Ala269 (3 MC)	2295,1	2295,0	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
			2149,0	2148,9	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
			2635,1	2635,0	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Gly261-Ala269 (3 MC, TPO: 262)	2959,4	2959,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
			718,1	718,4	(GlcNAc) ₁
			1245,5	1245,5	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			1570,2	1569,7	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
		Asn265-Ala269 (1 MC)	2055,9	2055,8	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			2380,0	2379,9	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
			1154,5	1154,5	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
	Asn265-Ala270 (2 MC)	1316,5	1316,6	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂	
		1478,7	1478,6	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂	
		2303,0	2303,0	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
	Asn279	Ala274-Ala282 (3 MC)	2627,1	2627,1	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
			3437,6	3437,3	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂
			1058,5	1058,5	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
		Lys278-Ala282 (1 MC)	1220,6	1220,5	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			2679,1	2679,0	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂
		Thr275-Ala282 (2 MC)	1422,2	1421,7	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			2880,2	2880,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
		Thr275-Ala284 (3 MC)	2076,0	2075,9	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
			2399,9	2400,0	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
			2724,6	2724,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Lys278-Ala284 (2 MC)	2886,6	2886,2	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
			2198,9	2198,9	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
	2523,1		2523,0	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂	
	Asn395	Ser390-Ala410 (3 MC, Cys_PAM: 405)	3884,7	3884,4	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
			4046,7	4046,5	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Val382-Tyr403 (3 MC)	3284,4	3284,4	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
			3608,6	3608,5	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
		Val382-Tyr403 (3 MC, TPO: 383)	2976,3	2976,3	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			3138,3	3138,3	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			3300,4	3300,4	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
			3462,4	3462,4	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
			3624,6	3624,5	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
			4596,8	4596,8	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂
			4759,2	4758,9	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂
		4921,1	4920,9	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂	
		Val384-Tyr401 (1 MC)	3045,3	3045,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
	3207,3		3207,3	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
	3369,3		3369,4	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	
	Phe381-Tyr401 (3 MC, TPO: 383)	3493,6	3493,5	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
		3655,6	3655,5	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	

1	2	3	4	5	6	
Нативн. ЦБГП/ пепсин	Asn219	Asn215-Ala223 (1 MC)	1680,8	1680,7	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂	
			2166,8	2166,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
			2491,0	2491,0	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
		Asn265	Asn215-Ala223 (1 MC, MSO: 216)	2183,0	2182,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
				2650,0	2650,1	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
				2812,2	2812,2	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
	Asn279		Pro210-Ala223 (3 MC)	2828,1	2828,2	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
				2295,1	2295,0	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
				2456,9	2457,0	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
		Asn265	Gly261-Ala269 (3 MC)	2635,0	2635,0	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
				1569,7	1569,7	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
				2055,9	2055,8	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
	Asn265		Asn265-Ala269 (1 MC)	2380,0	2379,9	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
				1154,5	1154,5	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
				1316,5	1316,6	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
		Asn265	Asn265-Ala270 (2 MC)	1478,7	1478,6	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
				2302,9	2303,0	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
				3437,4	3437,3	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂
	Asn279		Ala274-Ala282 (3 MC)	1058,5	1058,5	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
				1220,6	1220,5	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
				2354,9	2354,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
		Asn279	Lys278-Ala282 (1 MC)	2679,0	2679,0	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂
				1421,6	1421,7	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
				2070,0	2069,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
	Asn279		Thr275-Ala282 (2 MC)	2880,0	2880,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
				2076,0	2075,9	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
				2400,0	2400,0	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
		Asn395	Thr275-Ala284 (3 MC)	3624,5	3624,5	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
				3493,6	3493,5	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
				2640,0	2640,0	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
	Asn395		Val382-Tyr403 (3 MC, TPO: 383)	2756,9	2756,0	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
				3404,2	3404,3	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
				3566,2	3566,3	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
Asn395		Phe381-Tyr401 (3 MC, TPO: 383)	3728,3	3728,4	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂	
			3889,4	3890,4	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂	
			4052,5	4052,5	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂	
	Asn395	Ser390-Tyr401	4214,5	4214,5	(Man) ₁₄ (GlcNAc) ₂	
			4376,6	4376,6	(Man) ₁₅ (GlcNAc) ₂	
			2756,9	2756,0	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
Asn395		Ser390-Tyr403 (1 MC)	3404,2	3404,3	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂	
			3566,2	3566,3	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂	
			3728,3	3728,4	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂	
	Asn395	Ser390-Tyr403 (1 MC)	3889,4	3890,4	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂	
			4052,5	4052,5	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂	
			4214,5	4214,5	(Man) ₁₄ (GlcNAc) ₂	
Asn395		Ser390-Tyr403 (1 MC)	4376,6	4376,6	(Man) ₁₅ (GlcNAc) ₂	
			2294,0	2294,9	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
			2456,5	2457,0	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	
	Asn265	Gly261-Ala269 (3 MC)	2781,1	2781,1	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂	
			2943,4	2943,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂	
			1338,7	1338,6	(GlcNAc) ₂	
Asn265		Gly261-Ala269 (3 MC, TPO: 262)	2149,0	2148,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
			2635,1	2635,0	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂	
			2797,3	2797,1	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂	
	Asn265	Asn265-Ala269 (1 MC)	2959,4	2959,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂	
			2055,0	2055,8	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	
			2380,0	2379,9	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂	
Asn279		Thr275-Ala282 (2 MC)	2070,0	2069,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
			2880,2	2880,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂	
			2075,9	2075,9	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
	Asn279	Thr275-Ala284 (3 MC)	2399,9	2400,0	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
			2198,9	2198,9	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	
			2522,9	2523,0	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂	
Asn395		Lys278-Ala284 (2 MC)	4743,0	4742,9	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂	
			3462,4	3462,4	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
			3624,4	3624,5	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
	Asn395	Val382-Tyr403 (3 MC, TPO: 383)	4596,9	4596,8	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂	
			4759,0	4758,9	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂	
			4921,0	4920,9	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂	
Asn395		Val384-Tyr401 (1 MC)	3045,2	3045,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
			3207,2	3207,3	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
			3369,3	3369,4	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	
	Val384-Tyr403 (2 MC)	4782,0	4781,8	(Man) ₁₄ (GlcNAc) ₂		

1	2	3	4	5	6
ЦБГП N265A/ пепсин	Asn219	Asn215-Ala223 (1 MC)	1680,9	1680,7	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			2166,9	2166,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
		Ala214-Glu227, Asn215-Ala228 (3 MC, 1xMSO)	3349,4	3349,3	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
		Ala214-Glu227, Asn215-Ala228 (3 MC, 1xCys_PAM)	1946,0	1945,9	(GlcNAc) ₂
		Ala214-Glu227, Asn215-Ala228 (3 MC, 1xMSO, 1xCys_PAM)	1962,0	1961,9	(GlcNAc) ₂
	Asn279	Pro210-Ala223 (3 MC)	2163,8	2164,0	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
		Ala274-Ala282 (3 MC)	2627,2	2627,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Lys278-Ala282 (1 MC)	1058,5	1058,5	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			1220,6	1220,5	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
		Thr275-Ala282 (2 MC)	2354,0	2354,9	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
		Thr275-Ala284 (3 MC)	1908,0	1907,8	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
			1427,7	1427,7	(GlcNAc) ₂
	Asn395	Ser390-Ala410 (3 MC, Cys_PAM: 405)	2076,0	2075,9	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
			4208,9	4208,5	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
		Ser390-Tyr401	4370,9	4370,6	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
			2639,1	2640,0	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
		Val382-Tyr403 (3 MC, TPO: 383)	3300,5	3300,4	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
			3462,5	3462,4	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
			3624,6	3624,5	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
			4597,0	4596,8	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂
4759,2			4758,9	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂	
4921,0			4920,9	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂	
Val384-Tyr401 (1 MC)		3045,3	3045,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
	3207,4	3207,3	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂		
	3369,4	3369,4	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂		
ЦБГП N279A/ пепсин	Asn219	Asn215-Ala223 (1 MC)	1680,9	1680,7	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			2329,0	2328,9	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
			2977,1	2977,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
		Ala214-Glu227, Asn215-Ala228 (3 MC, 1xCys_PAM)	1945,9	1945,9	(GlcNAc) ₂
		Ala214-Glu227, Asn215-Ala228 (3 MC, 1xMSO, 1xCys_PAM)	2107,8	2107,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
	Asn265	Gly261-Ala269 (3 MC)	1961,9	1961,9	(GlcNAc) ₂
			2123,9	2123,9	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			2295,0	2294,9	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
		Gly261-Ala269 (3 MC, TPO: 262)	2781,0	2781,1	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
			2943,4	2943,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
			2148,9	2148,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
			2635,0	2635,0	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
			2959,4	2959,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
			1245,5	1245,5	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
		Asn265-Ala269 (1 MC)	1570,1	1569,7	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
			2055,9	2055,8	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
			2379,9	2379,9	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
	Asn265-Ala270 (2 MC)	1316,5	1316,6	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂	
		1478,7	1478,6	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂	
		1640,7	1640,7	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
		3884,5	3884,4	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	
	Asn395	Ser390-Ala410 (3 MC, Cys_PAM: 405)	4046,6	4046,5	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
			3284,2	3284,4	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		Val382-Tyr403 (3 MC, TPO: 383)	2976,1	2976,3	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			3138,2	3138,3	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			3300,3	3300,4	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
			4596,8	4596,8	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂
4758,9			4758,9	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂	
4921,0		4920,9	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂		
Val384-Tyr401 (1 MC)		3045,1	3045,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
		3207,2	3207,3	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
	3369,4	3369,4	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂		
Phe381-Tyr401 (3 MC, TPO: 383)	3493,5	3493,5	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂		
	3655,4	3655,5	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂		

1	2	3	4	5	6
ЦБГП N395A/ пепсин	Asn219	Asn215-Ala223 (1 MC)	1680,9	1680,7	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			2329,0	2328,9	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
		Ala214-Glu227, Asn215-Ala228 (3 MC, 1xCys_PAM)	1945,9	1945,9	(GlcNAc) ₂
		Ala214-Glu227, Asn215-Ala228 (3 MC, 1xMSO, 1xCys_PAM)	1961,9	1961,9	(GlcNAc) ₂
			2123,9	2123,9	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			2295,0	2294,9	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
	Asn265	Gly261-Ala269 (3 MC)	2619,0	2619,0	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
			2781,1	2781,1	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
			2943,4	2943,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
			2149,0	2148,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
		Gly261-Ala269 (3 MC, TPO: 262)	2635,1	2635,0	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
			2959,4	2959,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
			1245,6	1245,5	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			1569,6	1569,7	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
		Asn265-Ala269 (1 MC)	2055,9	2055,8	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
			2217,9	2217,9	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
			2380,0	2379,9	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
			1316,6	1316,6	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
	Asn265-Ala270 (2 MC)	1478,6	1478,6	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂	
		1640,8	1640,7	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
		2627,1	2627,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂	
		3437,4	3437,3	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂	
	Asn279	Ala274-Ala282 (3 MC)	1058,5	1058,5	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			1220,5	1220,5	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
		Lys278-Ala282 (1 MC)	2679,1	2679,0	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂
			1908,0	1907,8	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
		Thr275-Ala282 (2 MC)	2070,0	2069,9	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
2880,1			2880,1	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂	
Tyr275-Ala284 (3 MC)		1427,7	1427,7	(GlcNAc) ₂	
		2075,9	2075,9	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
		2238,0	2238,0	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	

MC – нерасщепленные связи (missed cleavages), MSO – окисленный метионин, TPO – окисленный триптофан, Cys_PAM – акриламид, присоединенный к цистеину.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Масс-спектрометрический анализ ЦБГ *P.verruculosum*

Таблица 3.1. ЦБГ: пептиды, подтверждающие наличие аминокислотных замен.

ЦБГ/протеаза	Пептид	m/z exper.	m/z теор.
ЦБГ N45A / трипсин	Trp40-Asn49 (unspecific)	1071,5	1071,5
	Trp40-Arg92 (2xCys_PAM)	5664,6	5664,4
ЦБГ N45A / химотрипсин	Arg39-Tyr51 (1 MC, Cys_PAM)	1564,8	1564,7
ЦБГ N45A / пепсин	Asp35-Ala45 (3 MC)	1310,6	1310,6
ЦБГ N194A / пепсин	Val190-Glu209 (2 MC)	1909,1	1908,8
ЦБГ N388A / трипсин	Thr362-Arg397	3875,9	3875,8
ЦБГ N388A / пепсин	Val376-Ala389 (5 MC, MSO)	1598,6	1598,7

МС – нерасщепленные связи (missed cleavages), MSO – окисленный метионин, Cys_PAM – акриламид, присоединенный к цистеину, unspecific – неспецифический пептид.

Таблица 3.2. ЦБГ: сайты N-гликозилирования и структура N-связанных гликанов, определенные с использованием сервиса GlycoMod.

ЦБГ/ протеаза	Сайт N-гликозилирования	Пептид	m/z exper.	m/z теор.	Структура гликана	
1	2	3	4	5	6	
Рекомб.ЦБГ/ пепсин	Asn45	Asp35-Tyr51 (3 MC, Cys_PAM, TPO)	3650,4	3650,5	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	
			3812,4	3812,5	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂	
			3974,5	3874,6	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂	
			4136,6	4136,6	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂	
			4298,6	4298,7	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂	
			4460,6	4460,7	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂	
			4622,8	4622,8	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂	
		Arg39-Tyr51 (1 MC, Cys_PAM, TPO)	2191,8	2191,9	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂	
		Arg39-Trp56 (2 MC, Cys_PAM, 2xTPO)	2402,1	2402,0	GlcNAc	
		Arg39-Trp56 (2 MC)	2502,0	2502,1	(GlcNAc) ₂	
			2664,1	2664,2	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂	
			2826,1	2826,2	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂	
			2988,2	2988,3	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂	
			3150,2	3150,3	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
			3312,2	3312,4	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
			3474,3	3474,4	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
			3636,3	3636,5	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	
			3798,4	3798,5	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂	
			3960,5	3960,6	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂	
	Val41-Tyr51 (Cys_PAM)	2482,0	2482,0	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂		
	Val41-Ala65 (3 MC)	2861,0	2861,2	GlcNAc		
	Val41-Ala65 (3 MC, 2xCys_PAM)	3692,4	3692,5	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂		
	Asn194	Ala184-Ala208 (3 MC, TPO)	2854,1	2854,2	GlcNAc	
			Asn185-Leu210 (4 MC)	4366,7	4366,7	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
				4528,8	4528,8	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
				4690,8	4690,8	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
				4852,8	4852,9	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂
				5014,8	5014,9	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂
				5176,9	5177,0	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂
			Gly188-Ala208 (1 MC)	2634,1	2634,1	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			Gly188-Ala208 (1 MC, TPO)	3136,3	3136,2	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
			Gly188-Ala208 (1 MC, 2xCys_PAM, TPO)	4088,6	4088,6	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
				4250,5	4250,6	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
				2485,1	2485,0	GlcNAc
			Gly188-Glu209 (2 MC, Cys_PAM, TPO)	2688,1	2688,1	(GlcNAc) ₂
		2850,1		2850,1	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂	
		3012,2		3012,2	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂	
		3174,2		3174,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂	
		3336,2		3336,3	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
		3498,3		3498,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
		3660,3		3660,4	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
		3822,4		3822,5	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	
		3125,2		3125,3	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂	
		3287,2		3287,3	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂	
		3449,2	3449,4	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂		
	Gly188-Leu210 (3 MC, Cys_PAM, TPO)	2471,0	2471,0	(GlcNAc) ₂		
		3837,4	3837,6	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂		
Asn388	Asp382-Ala396 (3 MC)	3612,3	3612,4	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂		
		3774,4	3774,4	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂		

1	2	3	4	5	6
Нативн. ЦБГГ/ пепсин	Asn45	Asp35-Tyr51 (3 MC, Cys_PAM, TPO)	3974,6	3874,6	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
			4136,7	4136,6	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
		Arg39-Tyr51 (1 MC, Cys_PAM, TPO)	2191,8	2191,9	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
		Arg39-Trp56 (2 MC)	2664,0	2664,2	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			2826,1	2826,2	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			3150,2	3150,3	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
			3636,6	3636,5	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
	Asn37-Trp56 (3 MC, TPO)	3466,3	3466,4	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
	Asn37-Trp56 (3 MC, Cys_PAM)	3521,4	3521,5	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
	Val41-Tyr51	1762,7	1762,7	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂	
	Asn194	Ala184-Ala208 (3 MC, TPO)	2854,0	2854,2	GlcNAc
		Asn185-Glu209 (3 MC)	4253,6	4253,6	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Asn185-Glu209 (3 MC, Cys_PAM)	4162,7	4162,6	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
		Asn185-Leu210 (4 MC)	3880,6	3880,6	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
		Gly188-Ala208 (1 MC, TPO)	3136,2	3136,2	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
		Gly188-Ala208 (1 MC, Cys_PAM)	3029,2	3029,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		Gly188-Ala208 (1 MC, 2xCys_PAM)	3100,2	3100,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		Gly188-Ala208 (1 MC, 2xCys_PAM, TPO)	4250,8	4250,6	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂
		Gly188-Glu209 (2 MC, Cys_PAM, TPO)	2688,0	2688,1	(GlcNAc) ₂
			2850,1	2850,1	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			3174,3	3174,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
			3498,3	3498,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
		Gly188-Leu210 (3 MC, Cys_PAM, TPO)	3125,3	3125,3	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			3287,3	3287,3	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
	2937,2		2937,2	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂	
	Val190-Leu210 (2 MC, 2xCys_PAM)	2937,2	2937,2	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂	
	Val190-Trp213 (3 MC, Cys_PAM)	2956,2	2956,3	(GlcNAc) ₂	
	Val190-Trp213 (2 MC, 2xCys_PAM)	3999,6	3999,6	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
	Asn388	Asp382-Ala396(3 MC)	3612,4	3612,4	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂
			3774,5	3774,4	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂
		Pro386-Ala395 (1 MC)	1616,7	1616,7	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
			3399,5	3399,3	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂
	Pro386-Glu411 (3 MC, Cys_PAM)	3436,5	3436,5	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂	
ЦБГГ N45A/ трипсин	Asn388	Thr362-Arg397	4121,6	4121,9	GlcNAc
			4973,4	4973,3	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂
			5135,4	5135,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
			5297,7	5297,3	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
			5459,7	5459,4	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
			5622,0	5621,4	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
			5784,1	5783,5	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
ЦБГГ N45A/ пепсин	Asn194	Gly188-Ala208 (1 MC, 2xCys_PAM)	3100,3	3100,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		Gly188-Glu209 (2 MC)	2601,0	2601,0	(GlcNAc) ₂
		Val190-Ala208 (Cys_PAM)	4568,6	4568,7	(Man) ₁₄ (GlcNAc) ₂
		Val190-Glu209 (1 MC, Cys_PAM)	4535,4	4535,7	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂
		Val190-Leu210 (2 MC, 2xCys_PAM)	2937,2	2937,2	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
	Val190-Trp213 (2 MC, 2xCys_PAM)	3999,8	3999,6	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	
	Asn388	Pro386-Ala395 (1 MC)	1616,7	1616,7	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂
Pro386-Glu411 (3 MC, Cys_PAM)		3436,6	3436,5	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂	
		Pro386-Glu411 (3 MC, Cys_PAM)	4732,7	4732,9	(Man) ₁₁ (GlcNAc) ₂
ЦБГГ N194A/ пепсин	Asn45	Arg39-Tyr51 (1 MC, Cys_PAM)	2175,8	2175,9	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
		Arg39-Tyr51 (1 MC, Cys_PAM, TPO)	2191,8	2191,9	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
		Val41-Tyr51	1762,9	1762,7	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
	Asn388	Val41-Trp56 (1 MC)	3455,9	3456,3	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Leu381-Ala395 (3 MC)	1669,0	1668,8	GlcNAc
		Pro386-Ala395 (1 MC)	1454,8	1454,6	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			3399,0	3399,3	(Man) ₁₃ (GlcNAc) ₂

Окончание табл. 3.2

1	2	3	4	5	6	
ЦБГТ N388A/ пепсин	Asn45	Asp35-Tyr51 (3 MC, Cys_PAM, TPO)	3326,4	3326,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂	
		Asn37-Trp56 (3 MC, TPO)	3466,3	3466,4	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
		Asn37-Trp56 (3 MC, Cys_PAM)	3521,3	3521,5	(Man) ₄ (GlcNAc) ₂	
		Arg39-Tyr51 (1 MC)	2105,1	2104,9	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂	
		Arg39-Ala59 (3 MC, Cys_PAM)	4479,9	4479,8	(Man) ₁₀ (GlcNAc) ₂	
		Val41-Ala59 (2 MC)	4390,8	4390,7	(Man) ₁₂ (GlcNAc) ₂	
	Asn194	Asn185-Glu209 (3 MC)		3767,5	3767,5	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
				3929,6	3929,5	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
				4091,6	4091,6	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
				4253,7	4253,6	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
		Asn185-Glu209 (3 MC, Cys_PAM)	4162,6	4162,6	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂	
		Asn185-Leu210 (4 MC)		3880,6	3880,6	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
				4042,6	4042,6	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
				4204,7	4204,7	(Man) ₇ (GlcNAc) ₂
				4366,7	4366,7	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
				4528,8	4528,8	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
			Gly188-Ala208 (1 MC, Cys_PAM)	3029,2	3029,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
			Gly188-Ala208 (1 MC, 2xCys_PAM)	3100,2	3100,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		Gly188-Glu209 (2 MC)	2601,0	2601,0	(GlcNAc) ₂	
		Val190-Leu210 (2 MC, 2xCys_PAM)	2937,2	2937,2	(Man) ₂ (GlcNAc) ₂	
		Val190-Trp213 (3 MC, Cys_PAM)	2956,1	2956,3	(GlcNAc) ₂	
		Val190-Trp213 (2 MC, 2xCys_PAM)	3999,6	3999,6	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂	

MC – нерасщепленные связи (missed cleavages), MSO – окисленный метионин, TPO – окисленный триптофан, Cys_PAM – акриламид, присоединенный к цистеину.