

На правах рукописи

A. Dozhenko

ДОЦЕНКО
Анна Сергеевна

**БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ
САЙТОВ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ
ЦЕЛЛЮЛАЗ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА
*PENICILLIUM VERRUCULOSUM***

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Институте биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН и на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Синицын Аркадий Пантелеймонович

Официальные оппоненты:

Нифантьев Николай Эдуардович
доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
заведующий лабораторией

Лавров Константин Валерьевич
кандидат биологических наук
ФГУП Государственный научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИ генетика),
старший научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 года в 15 часов на заседании Совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, и на сайте Химического факультета МГУ <http://www.chem.msu.ru>.

Автореферат диссертации размещён на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: vak.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.59,
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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.

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

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

- выявить сайты N-гликозилирования в целлюлазах ЦБГI, ЦБГII и ЭГII *P.verruculosum* и определить тип и структуру N-связанных гликанов в ЦБГI, ЦБГII и ЭГII *P.verruculosum*, экспрессированных в грибах рода *Penicillium* (*P.verruculosum* и *P.canescens*);
- методом сайт-направленного мутагенеза осуществить замены остатков аспарагина в составе сайтов N-гликозилирования на остатки аланина для удаления сайтов гликозилирования в рекомбинантных ЦБГI, ЦБГII и ЭГII *P.verruculosum*, экспрессированных в *P.canescens*;
- исследовать влияние N-связанных гликанов на каталитические и биохимические свойства рекомбинантных целлюлаз ЦБГI, ЦБГII и ЭГII *P.verruculosum*;

– сравнить гидролитическую способность смесей ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ *P.verruculosum* различного состава и определить состав смеси, наиболее эффективной для гидролиза целлюлозосодержащих материалов (ЦСМ).

Научная новизна работы. Впервые определены тип и структура N-связанных гликанов ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ, экспрессированных в грибах рода *Penicillium* (*P.verruculosum* и *P.canescens*).

Впервые осуществлена белковая инженерия сайтов N-гликозилирования в рекомбинантных ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ *P.verruculosum*, экспрессированных в *P.canescens*, определены каталитические и биохимические свойства мутантных форм ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ 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 рН-оптимума активности различно для целлобиогидролаз (ЦБГІ и ЦБГІІ) и ЭГІІ. В случае ЦБГІ и ЦБГІІ удаление одного из сайтов N-гликозилирования не приводило к изменению рН-оптимума активности, однако в случае ЭГІІ изменение степени N-гликозилирования приводило к сдвигу рН-оптимума активности на 0,5 ед. в нейтральную область рН.

Показано, что в случае ЦБГІ и ЦБГІІ 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 ЭГІІ 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 ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ при их действии на ЦСМ. Изменение степени N-гликозилирования ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ *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 работы. Получены мутантные формы рекомбинантных ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ *P.verruculosum* с увеличенной гидролитической способностью. Определен компонентный состав смесей ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ, 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*.

Личный вклад диссертанта. Автор лично проводил анализ литературных данных, участвовал в постановке задач и планировании экспериментов. Все результаты, их интерпретация и выводы получены автором на основе лично проведенных экспериментов или непосредственно при его участии. В подготовке публикаций и докладов на научных конференциях по теме диссертационной работы автор принимал личное участие.

Апробация работы. 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 & 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.

Публикации. Результаты работы изложены в 10 публикациях, в том числе в 4 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и 6 тезисах докладов конференций.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена при поддержке ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы" Минобрнауки РФ в рамках Соглашения о субсидии 14.616.21.0002 от 09.09.2014 (Идентификационный номер проекта RFMEFI61614X0002).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, списка цитируемой литературы (214 ссылок) и приложения. Работа изложена на 166 страницах, включает 64 рисунка, 21 таблицу и 3 приложения.

Сокращения, принятые в тексте:

а.к. – аминокислота, ВС – восстанавливающие сахара, ДДС-ЭФ – электрофорез в денатурирующих условиях, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза, КЖ – культуральная жидкость, МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза, *n*-НФ-β-Гал – *n*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид, *n*-НФ-β-Глюк – *n*-нитрофенил-β-D-глюкопиранозид, *n*-НФ-β-Лак – *n*-нитрофенил-β-D-лактозид, *n*-НФ-β-Целл – *n*-нитрофенил-β-D-целлобиозид, ПЦР – полимеразная цепная реакция, СП – степень полимеризации, ФП – ферментный препарат, ЦБГ – целлобиогидролаза, ЦСМ – целлюлозосодержащие материалы, ЭГ – эндоглюканаза; GlcNAc – N-ацетил-D-глюкозамин, Man – ангидроманнозный остаток.

В тексте использованы следующие обозначения ферментов: нативн. ЦБГ I (ЦБГ II, ЭГ II) – немутантные нативные формы ЦБГ I, ЦБГ II и ЭГ II *P. verruculosum*, экспрессированные в *P. verruculosum*; рекомб. ЦБГ I (ЦБГ II, ЭГ II) – немутантные рекомбинантные формы ЦБГ I, ЦБГ II и ЭГ II *P. verruculosum*, экспрессированные в *P. canescens*; рекомб. ЦБГ I X (ЦБГ II X,

ЭГП X) – мутантные рекомбинантные формы ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП *P.verruculosum*, экспрессированные в *P.canescens*, X – аминокислотная замена.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** сформулирована цель и задачи исследования, обозначены актуальность, научная новизна и практическая значимость исследований.

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.

Материалы и методы. В главе описаны использованные материалы и методы исследования. Для амплификации целевых генов использовали штамм *P.verruculosum* В151, для всех процедур клонирования, а также для наработки ДНК в препаративных количествах использовали штамм *Escherichia coli* MachI, для гетерологичной экспрессии использовали штамм *P.canescens* РСА-10.

Для определения теоретических сайтов N-гликозилирования был осуществлен поиск последовательностей N-X-T/S (X – любая аминокислота, кроме пролина), соответствующих сайтам гликозилирования.

Далее методом ПЦР с использованием геномной ДНК *P.verruculosum* в качестве матрицы были амплифицированы гены целевых ферментов ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП, 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 ЭГІІІ *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.

Трансформация штамма-реципиента *P.canescens* (лабораторный штамм для гетерологичной экспрессии) 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.

Аминокислотная последовательность выделенных ферментов была подтверждена масс-спектрометрическим анализом. Масс-спектрометрическим анализом были также определены сайты N-гликозилирования и структуры N-связанных гликанов.

Биохимические и каталитические свойства мутантных форм ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП были проанализированы по сравнению с немутантными формами. Различные двойные и тройные смеси ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП были использованы для гидролиза ЦСМ для выяснения степени значимости каждого из компонентов в гидролизе ЦСМ, а также исследования синергизма в действии ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП.

Результаты и их обсуждение представлены в третьей главе диссертационной работы.

1. Общая схема проведения экспериментов

ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ являются основными компонентами ферментного комплекса, секретлируемого мицелиальным грибом *P.verruculosum*. Для изучения влияния N-гликозилирования на каталитические и биохимические свойства ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ *P.verruculosum* была осуществлена белковая инженерия сайтов N-гликозилирования.

Белковая инженерия сайтов N-гликозилирования состояла из следующих этапов:

- 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.

2. Белковая инженерия сайтов N-гликозилирования ЭГІІ *P.verruculosum*

В структуре ЭГІІ *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 ЭГІІ были внесены точечные аминокислотные замены (остаток аспарагина в составе сайта гликозилирования был заменен на остаток аланина), приводящие к удалению одного из сайтов гликозилирования. Три мутантные формы ЭГІІ: N19A, N42A и N194A – были выделены и исследованы.

В результате масс-спектрометрического анализа N-гликозилирование было детектировано для сайтов N42 и N194, N-связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды (Таблица 1), в случае сайта N19 гликозилирование обнаружено не было.

Таблица 1 - Сайты N-гликозилирования и структура N-связанных гликанов, установленные с использованием сервиса GlycoMod, для рекомбинантных (немутантная и мутантные) и нативной форм ЭГІІ *P.verruculosum*

Сайт N-гликозилирования	Структура N-связанных гликанов				
	рекомб. ЭГІІ	рекомб. ЭГІІ N19A	рекомб. ЭГІІ N42A	рекомб. ЭГІІ N194A	нативн. ЭГІІ
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

Мутантные и немутантные формы ЭГП *P.verruculosum* обладали схожими рН-профилями, однако оптимумы активности несколько отличались: рН-оптимум активности для немутантных форм, как нативной, так и рекомбинантной, и мутантной формы N19A составлял 4,5, а для мутантных форм N42A и N194A составлял 5,0. Мутантные и немутантные формы характеризовались одинаковыми Т-профилями активности с Т-оптимумом 70°C и одинаковой термостабильностью, время полуинактивации при 70°C и 80°C составило (45±3) и (17±2) мин соответственно (Рис. 1).

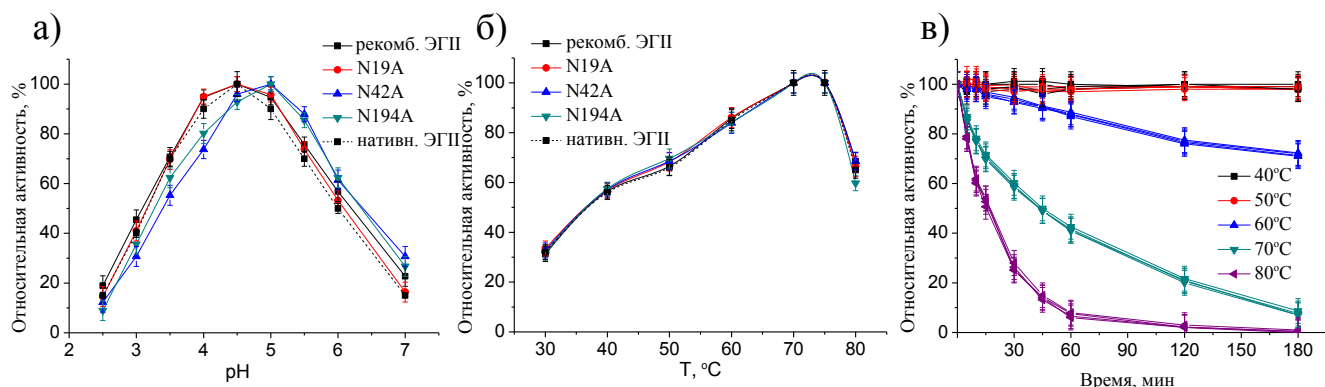


Рис. 1 - Биохимические свойства рекомбинантной немутантной (рекомб. ЭГП), рекомбинантных мутантных (N19A, N42A и N194A) и нативной немутантной (нативн. ЭГП) форм ЭГП *P.verruculosum*: (а) рН-профили относительной активности по отношению к β -глюкану (0,1 М универсальный буфер, 50°C), (б) температурные профили относительной активности по отношению к β -глюкану (0,1 М универсальный буфер, рН – соответствует рН-оптимуму активности форм), (в) термостабильность при 40-80°C (0,1 М универсальный буфер, рН – соответствует рН-оптимуму активности форм)

Для различных форм ЭГП была определена адсорбционная способность по отношению к нерастворимому субстрату МКЦ (Таблица 2). 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.

Таблица 2 - Степень адсорбции мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum* (МКЦ, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 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

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 (Таблица 3). Активность мутантных форм ЭГП N42A и N194A по отношению к КМЦ оказалась соответственно на 10% и 29% выше по сравнению с немутантной формой, активность по отношению к β -глюкану

оказалась на 12% и 35% выше по сравнению с немутантной формой. Активность по отношению к 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.

Таблица 3 - 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

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 исследования осажаривающей способности мутантных и немутантных форм ЭГП был проведен гидролиз β -глюкана и измельченной древесины осины. Мутантные и немутантные формы ЭГП полностью гидролизовали β -глюкан за 3 часа. При этом гидролитическая способность мутантных форм N42A и N194A оказалась выше, а формы N19A – ниже способности немутантных форм (Рис. 2). При гидролизе измельченной древесины осины наибольшее различие в концентрации глюкозы наблюдалось через 24 ч гидролиза. Выход глюкозы в случае форм N42A и N194A был выше соответственно на 10,5 и 26,9%, в случае формы N19A – на 10,2% ниже по сравнению с немутантными формами.

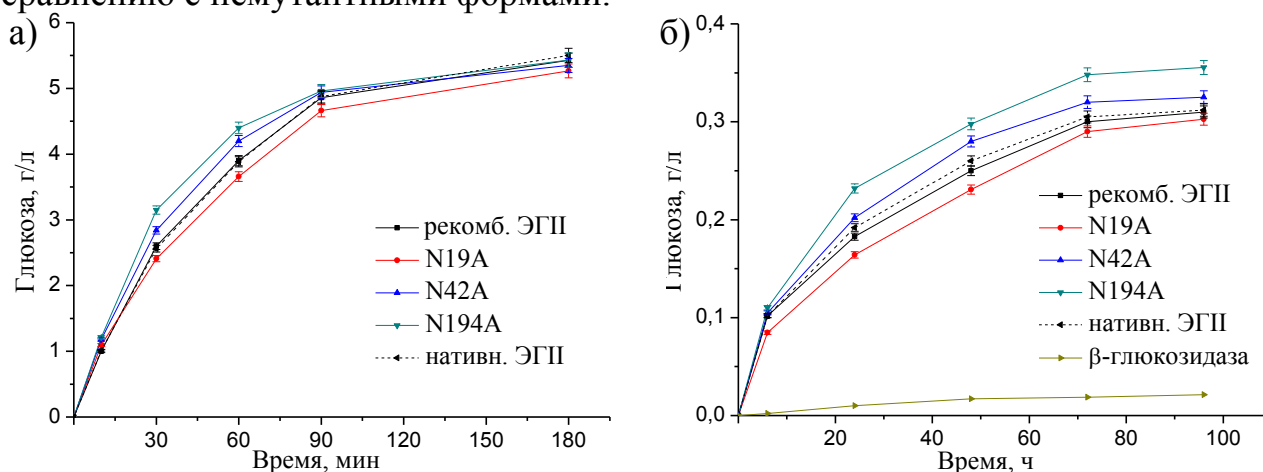


Рис. 2 - Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе

(а) β -глюкана и (б) измельченной древесины осины под действием мутантных и немутантных форм ЭГП *P.verruculosum* в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), концентрация ЭГП 0,01 мг/мл (при гидролизе β -глюкана) и 0,1 мг/мл (при гидролизе измельченной древесины осины), концентрация субстрата 5 мг/мл (50 $^{\circ}$ C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН в соответствии с рН-оптимумом)

Для мутантных и немутантных форм ЭГП были определены каталитические параметры гидролиза β -глюкана (Таблица 4).

Таблица 4 - 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 . На Рис. 3 приведена трехмерная модель ЭГП *P.verruculosum*. Сайт N19 находится внутри белковой глобулы в непосредственной близости от каталитически активных остатков глутаминовой кислоты и аргинина. Аминокислотная замена N19A, вероятно, изменяет структуру активного центра, что приводит к уменьшению каталитической активности ЭГП и изменению каталитических параметров гидролиза β -глюкана. Остатки N42 и N194 находятся по обе стороны «ущелья» активного центра. Гликаны на поверхности белковой глобулы, присоединенные к этим сайтам, могут взаимодействовать с субстратом за счет образования водородных связей и влиять на скорость диссоциации фермента с поверхности полисахаридной цепи.

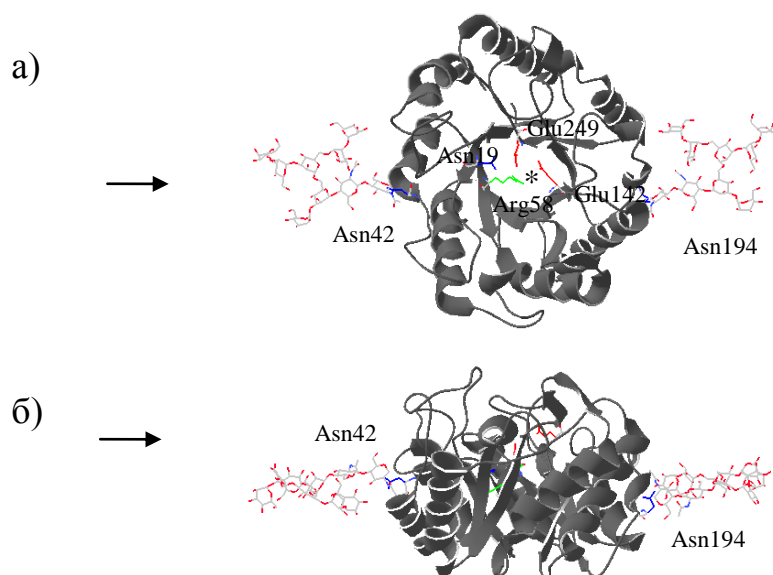


Рис. 3 - Трехмерная модель ЭГП *P.verruculosum* с N-связанными гликанами структуры $(Man)_7(GlcNAc)_2$. Серым цветом указана а.к. последовательность, красным цветом указаны атомы кислорода в составе N-связанных гликанов и каталитически активные остатки Glu142 и Glu249, зеленым – остаток Arg58, синим – 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

3. Белковая инженерия сайтов N-гликозилирования ЦБГП *P.verruculosum*

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.

В результате масс-спектрометрического анализа N-гликозилирование было детектировано для всех теоретических сайтов гликозилирования. N-Связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды общей структуры $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$ (Таблица 5).

Таблица 5 - 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	$(\text{Man})_{3-6}(\text{GlcNAc})_2$	-----	$(\text{Man})_{0-9}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{0-10}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{0-6}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{2-7}(\text{GlcNAc})_2$
N265	$(\text{Man})_{0-10}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{0-10}(\text{GlcNAc})_2$	-----	$(\text{Man})_{2-10}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{2-10}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{1-9}(\text{GlcNAc})_2$
N279	$(\text{Man})_{1-13}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{4-10}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{1-9}(\text{GlcNAc})_2$	-----	$(\text{Man})_{0-13}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{1-13}(\text{GlcNAc})_2$
N395	$(\text{Man})_{1-13}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{4-14}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{3-13}(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{Man})_{1-13}(\text{GlcNAc})_2$	-----	$(\text{Man})_{5-15}(\text{GlcNAc})_2$

Мутантные и немутантные формы ЦБГП *P.verruculosum* характеризовались одинаковыми pH- и T-профилями активности и термостабильностью (Рис. 4). Значение pH-оптимума составило 4,0, значение T-оптимума составило 65°C. Время полуинактивации при 60°C и 65°C составило (52 ± 3) и (20 ± 1) мин соответственно.

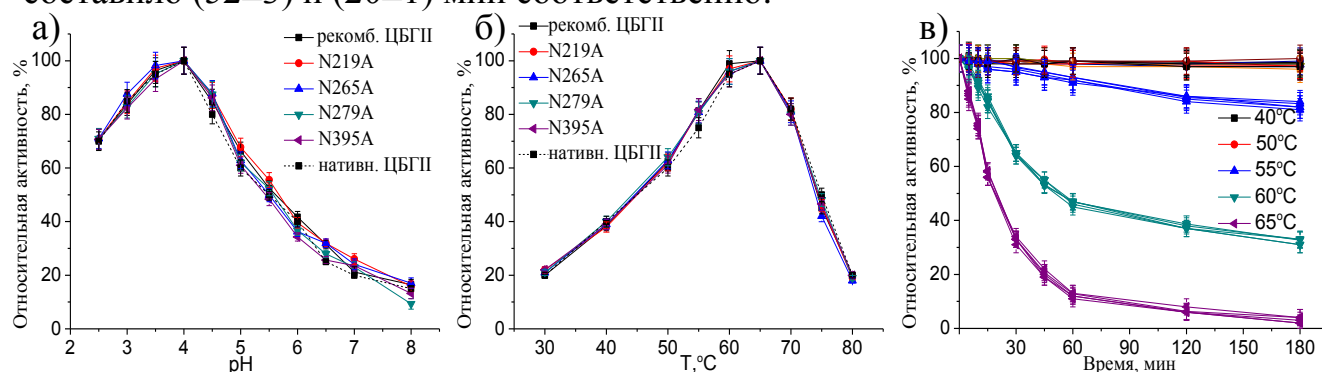


Рис. 4 - Биохимические свойства рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГП), рекомбинантных мутантных (N219A, N265A, N279A и N395A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГП) форм ЦБГП *P.verruculosum*: (а) pH-профили относительной активности по отношению к МКЦ (0,1 М универсальный буфер, 40°C), (б) температурные профили относительной активности по отношению к МКЦ (0,1 М универсальный буфер, pH 4,0), (в) термостабильность при 40-65°C (0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0)

Для различных форм ЦБГП была определена адсорбционная способность ферментов по отношению к МКЦ (Таблица 6).

Таблица 6 - Степень адсорбции мутантных и немутантных форм ЦБГП *P.verruculosum* (МКЦ, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 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 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.

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 (Таблица 7).

Таблица 7 - 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

Активность мутантных форм рекомб. ЦБГП N219A и рекомб. ЦБГП N265A по отношению к МКЦ оказалась соответственно на 26% и 16% выше по сравнению с немутантной формой, активность по отношению к 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 субстрату МКЦ оказалась соответственно на 80% и 24% ниже по

сравнению с рекомб. ЦБГП. Активность мутантной формы рекомб. ЦБГП N279A по отношению к 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. 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 МКЦ и измельченной древесины осины под действием гомогенных ЦБГП. На Рис. 5 приведены кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ под действием мутантных и немутантных форм ЦБГП в присутствии β -глюкозидазы *A.niger*.

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.

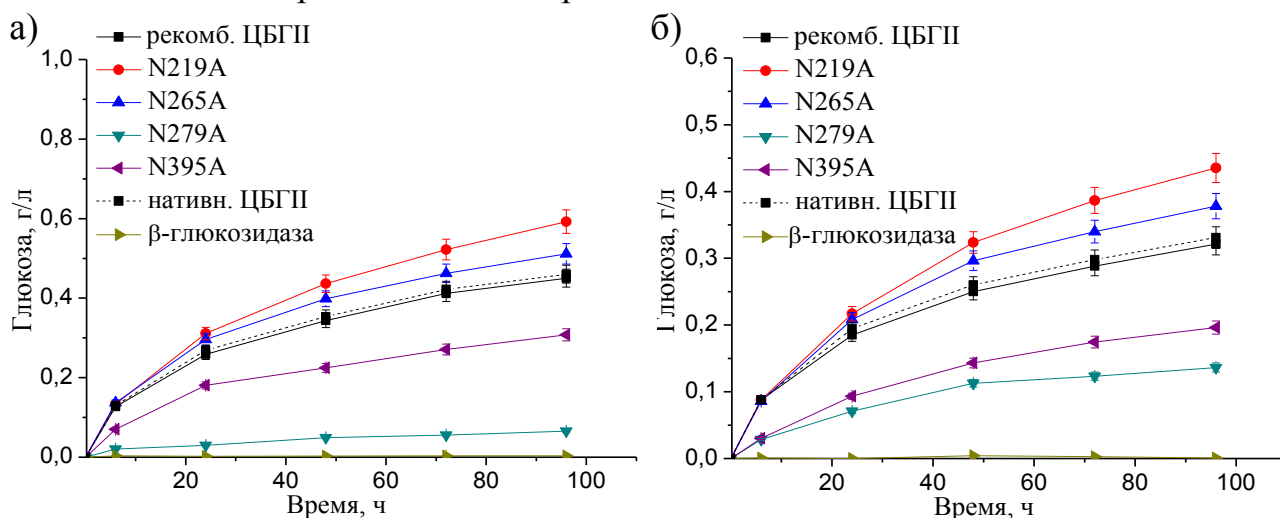


Рис. 5 - Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе (а) МКЦ и (б) измельченной древесины осины под действием мутантных и немутантных форм ЦБГП *P.verruculosum* в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), концентрация ЦБГП 0,1 мг/мл, концентрация субстрата 5 мг/мл (40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0)

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.

Трехмерная модель каталитического домена ЦБГП *P.verruculosum* приведена на Рис. 6, все четыре теоретических сайта N-гликозилирования находятся на поверхности белковой глобулы. 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.

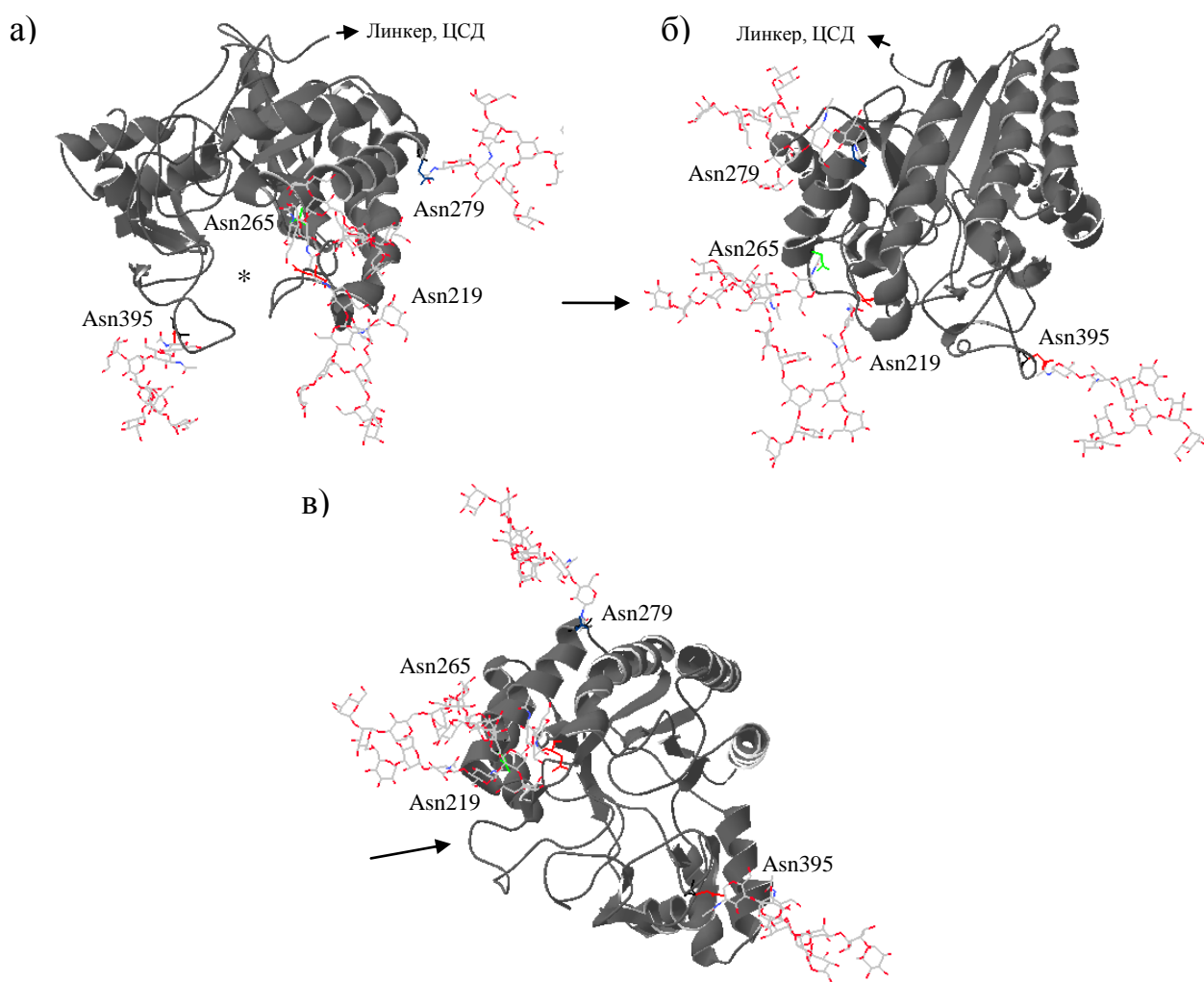


Рис. 6 - Трехмерная модель каталитического домена ЦБГП *P.verruculosum* с N-связанными гликанами структуры $(\text{Man})_7(\text{GlcNAc})_2$. Серым цветом указана а.к. последовательность, красным цветом указаны атомы кислорода в составе N-связанных гликанов, знаком * указан активный центр, стрелками показано направление полисахаридной цепи субстрата: (а) вид со стороны входа в активный центр, (б) вид сбоку, (в) вид снизу

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, их удаление привело к увеличению каталитической активности. 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 ЦБГП, как процессивность. Сайт N279 расположен рядом с гликозилированным линкером, соединяющим каталитический и целлюлозосвязывающий домены. Удаление сайта в этом случае, вероятно, привело к нарушению правильной ориентации этих доменов и потере каталитической активности по отношению к МКЦ. Каталитическая активность по отношению к аморфной целлюлозе при этом сохранилась, что объясняется возможностью каталитического домена связываться с аморфной целлюлозой и осуществлять ее гидролиз.

4. Белковая инженерия сайтов N-гликозилирования ЦБГП *P.verruculosum*

В структуре ЦБГП *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 ЦБГП были внесены точечные аминокислотные замены, приводящие к удалению одного из сайтов гликозилирования.

Из четырех мутантных форм ЦБГП: N45A, N194A, N388A и N430A – были выделены три формы: N45A, N194A и N388A.

В случае мутантной формы N430A были получены грибные штаммы, содержащие ген *cbhl*, однако при ферментации мутантная форма ЦБГП N430A не была обнаружена ни в КЖ, ни внутри грибных клеток. Для выяснения причин отсутствия секреции формы N430A были проведены следующие исследования. Грибной штамм культивировали на среде, содержащей индуктор синтеза целлюлаз (арабинозу), 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. В случае, если в грибных клетках есть экспрессия ЦБГП, т.е. происходит синтез белка, также осуществляются процессы его сворачивания 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 сворачивания и/или пост-трансляционной модификации, то фермент разрушается внутри клеток и обнаружить его невозможно. Мутантная форма ЦБГП N430A не была обнаружена внутри грибных клеток, поэтому возможно сделать вывод, что сайт N430 влияет на процессы фолдинга и/или пост-трансляционной модификации.

Масс-спектрометрическим анализом мутантных и немутантных форм ЦБГП были детектированы три сайта N-гликозилирования: N45, N194 и N388. N-Связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды (Таблица 8).

Таблица 8 - Сайты N-гликозилирования и структура N-связанных гликанов, установленные с использованием сервиса Glycomod, для рекомбинантных (немутантная и мутантные) и нативной форм ЦБГ *P.verruculosum*

Сайт N-гликозилирования	Структура N-связанных гликанов				
	рекомб. ЦБГ	рекомб. ЦБГ N45A	рекомб. ЦБГ N194A	рекомб. ЦБГ N388A	нативн. ЦБГ
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

В то же время не было установлено гликозилирования по еще одному теоретическому сайту N430. Этот а.к. остаток расположен в области а.к. последовательности, граничащей с областью сильно гликозилированного линкера, что затрудняет масс-спектрометрический анализ.

Мутантные и немутантные формы ЦБГ *P.verruculosum* характеризовались одинаковыми рН- и Т-профилями активности и термостабильностью (Рис. 7). Значение рН-оптимума составило 4,0, значение Т-оптимума составило 55°C. Время полуинактивации при 60°C и 65°C составило (45±4) и (13±1) мин соответственно.

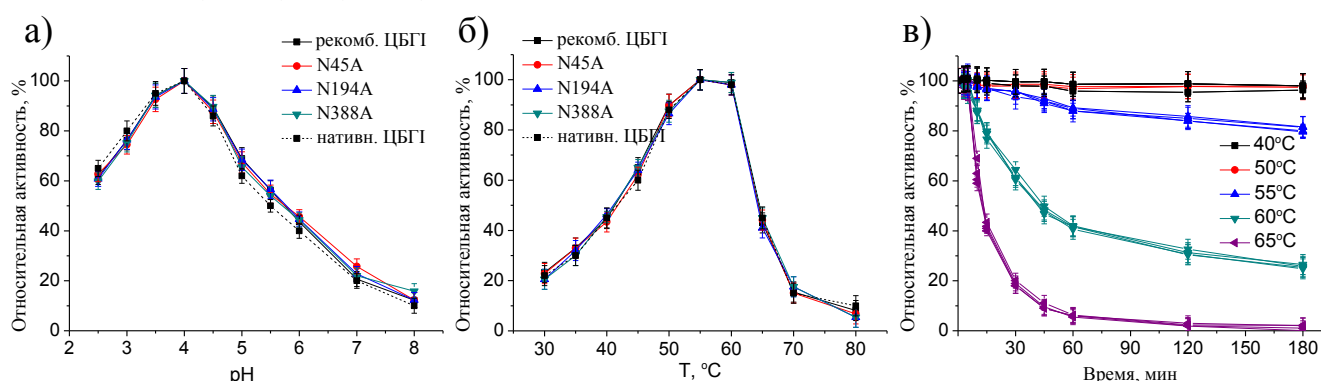


Рис. 7 - Биохимические свойства рекомбинантной немутантной (рекомб. ЦБГ), рекомбинантных мутантных (N45A, N194A и N388A) и нативной немутантной (нативн. ЦБГ) форм ЦБГ *P.verruculosum*: (а) рН-профили относительной активности по отношению к МКЦ (0,1 М универсальный буфер, 40°C), (б) температурные профили относительной активности по отношению к МКЦ (0,1 М универсальный буфер, рН 4,0), (в) термостабильность при 40-65°C (0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0)

Для мутантных и немутантных форм ЦБГ была определена степень адсорбции ферментов по отношению к МКЦ (Таблица 9). 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.

Таблица 9 - Степень адсорбции мутантных и немутантных форм ЦБГІ *P.verruculosum* (МКЦ, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0, 6°С)

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

Из осуществленных мутаций положительной оказалась мутация N45A (Таблица 10). Активность рекомб. ЦБГІ N45A по отношению к 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 отношению к β-глюкану оказалась на 150% выше по сравнению с рекомб. ЦБГІ.

Таблица 10 - 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
β-глюкан	0,047±0,002	0,117±0,005	0,044±0,002	0,041±0,002	0,050±0,002
<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

Активность по отношению к КМЦ, ксилану, *n*-НФ-β-Гал, *n*-НФ-β-Глюк не была обнаружена ни для мутантных, ни для немутантных форм. Каталитические свойства рекомб. ЦБГІ и нативн. ЦБГІ, как и биохимические свойства, оказались одинаковыми. Таким образом, экспрессия ЦБГІ *P.verruculosum* в *P.canescens* не привела к изменению свойств ЦБГІ.

Для сравнения осаживающей способности мутантных и немутантных форм ЦБГІ был осуществлен гидролиз МКЦ и измельченной древесины осины под действием гомогенных ЦБГІ. На Рис. 8 приведены кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе МКЦ под действием мутантных и немутантных форм ЦБГІ в присутствии β-глюкозидазы *A.niger*.

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 31% выше в случае рекомб. ЦБГІ N45A и на 27 и 15% ниже в случае рекомб. ЦБГІ N194A и рекомб. ЦБГІ N388A по сравнению с рекомб. ЦБГІ. Такое же соотношение концентраций глюкозы, как и через 48 ч гидролиза, наблюдалось и через 72 и 96 ч гидролиза.

При гидролизе измельченной древесины осины так же, как и при гидролизе МКЦ, рекомб. ЦБГІ N45A оказалась более эффективной, а рекомб.

ЦБГІ N194А и рекомб. ЦБГІ N388А – менее эффективными по сравнению с рекомб. ЦБГІ и нативн. ЦБГІ. Выход глюкозы через 48 ч гидролиза оказался на 60% выше в случае рекомб. ЦБГІ N45А и на 29 и 16% ниже в случае рекомб. ЦБГІ N194А и рекомб. ЦБГІ N388А по сравнению с рекомб. ЦБГІ. Такое же соотношение концентраций глюкозы, как и через 48 ч гидролиза, наблюдалось и через 72 и 96 ч гидролиза.

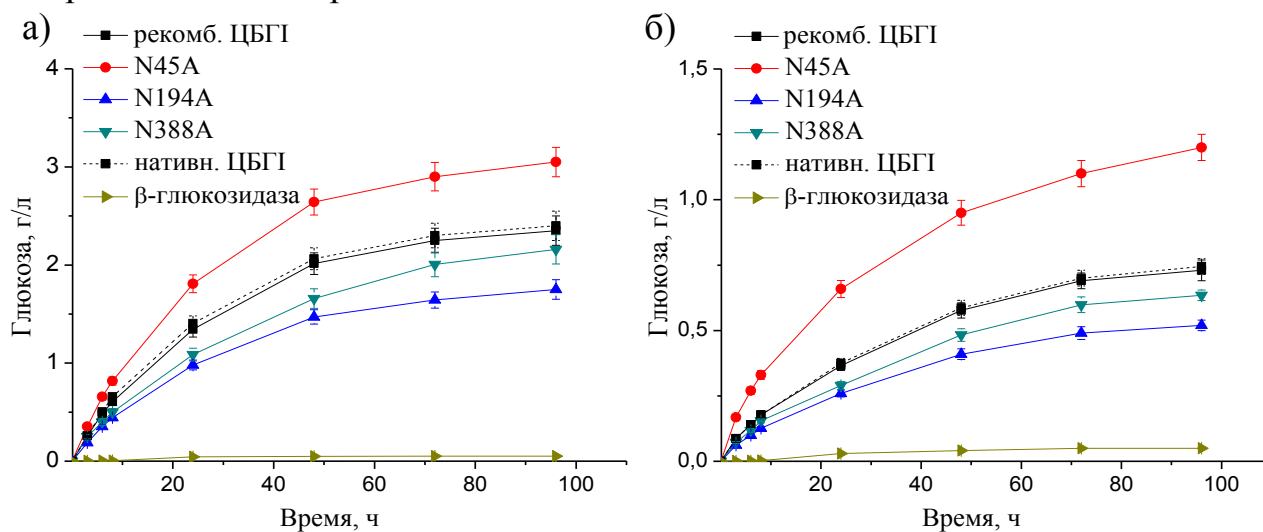


Рис. 8 - Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе (а) МКЦ и (б) измельченной древесины осины под действием мутантных и немутантных форм ЦБГІ *P.verruculosum* в присутствии β -глюкозидазы *A.niger* (0,015 мг/мл), концентрация ЦБГІ 0,2 мг/мл, концентрация субстрата 5 мг/мл (40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0)

На Рис. 9 приведена трехмерная модель каталитического домена ЦБГІ *P.verruculosum* с N-связанными гликанами структуры (Man)₇(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 увеличению скорости процессивного гидролиза.

Из Рис. 9 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.

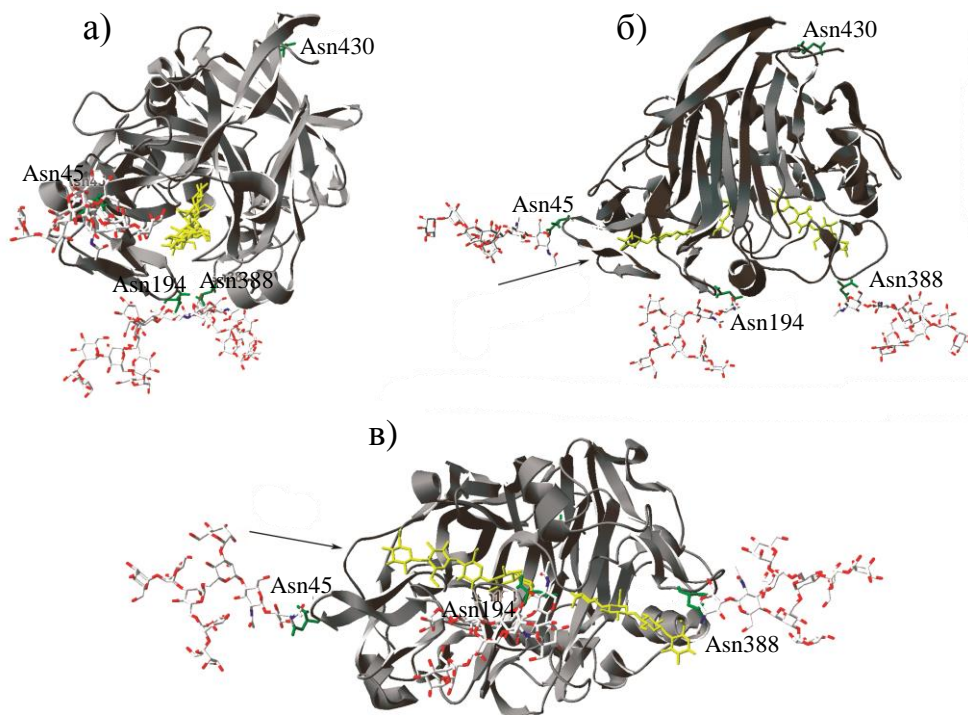


Рис. 9 - Трехмерная модель каталитического домена ЦБГІ *P.verruculosum* с N-связанными гликанами структуры (Man)₇(GlcNAc)₂. Зеленым цветом указаны сайты N-гликозилирования, красным цветом указаны атомы кислорода в составе N-связанных гликанов, желтым цветом показаны молекулы целлопентаозы и целлотриозы в активном центре ЦБГІ, стрелками показано направление полисахаридной цепи субстрата: (а) вид со стороны входа в активный центр, (б) вид сбоку, (в) вид снизу

5. Гидролиз ЦСМ под действием смесей целлюлаз *P.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. ЭПІ, рекомб. ЦБГІІ и рекомб. ЦБГІ). Из мутантных форм целлюлаз для гидролиза были выбраны формы рекомб. ЭПІ N194А, рекомб. ЦБГІІ N219А и рекомб. ЦБГІ N45А как формы, характеризовавшиеся наибольшей каталитической активностью среди всех мутантных форм.

Для проведения гидролиза ЦСМ было выбрано значение рН 4,5, как среднее значение рН-оптимумов активности исследованных целлюлаз. Температура 40°C была выбрана т.к. 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. При этом гидролитические ферменты проявляют наибольшую активность при ~50°C, а микроорганизмы – при 30-37°C. Оптимальной температурой в таком случае может быть температура 40°C.

Для проведения гидролиза была выбрана концентрация ЦСМ 5 г/л и дозировка ферментов 10 мг общего белка на 1 г субстрата. 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.

5.1. Гидролиз ЦСМ под действием двойных смесей целлюлаз *P.verruculosum*

Гидролиз МКЦ и измельченной древесины осины был осуществлен под действием двойных смесей ЭГП, ЦБГП и ЦБГ, массовая доля ферментов в смеси варьировалась от 0 до 100%. Для предотвращения ингибирования активности ЭГП, ЦБГП и ЦБГ целлобиозой гидролиз проводился в присутствии β -глюкозидаза *A.niger* (0,015 мг/мл).

Использование мутантных форм ЦБГ, ЦБГП и ЭГП позволило увеличить выход глюкозы при гидролизе МКЦ (Таблица 11). При этом использование двойных смесей мутантных форм ЦБГП-ЭГП, ЦБГ-ЭГП и ЦБГ-ЦБГП, оказавшихся наиболее эффективными при гидролизе МКЦ, приводило к сопоставимому увеличению выхода глюкозы по сравнению с немутантными формами (30-35%).

Таблица 11 - Компонентный состав двойных смесей ЦБГ, 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, %		
	ЦБГ	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
ЦБГ - ЭГП	60	-	40	137±11	138±11	135±11
	80	-	20	138±11	137±11	135±11
ЦБГ - ЦБГП	60	40	-	138±11	137±11	135±11
	40	60	-	134±11	132±11	132±11

Как и при гидролизе МКЦ, при гидролизе измельченной древесины осины использование мутантных форм ЦБГ, ЦБГП и ЭГП позволило увеличить выход глюкозы через 72 ч гидролиза на 28-40% (Таблица 12).

Таблица 12 - Компонентный состав двойных смесей ЦБГ I, ЦБГ II и ЭГ II *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, %		
	ЦБГ I	ЦБГ II	ЭГ II	24 ч	48 ч	72 ч
ЦБГ II - ЭГ II	-	60	40	124±10	125±10	128±10
	-	80	20	125±10	128±10	133±11
ЦБГ I - ЭГ II	40	-	60	133±11	136±11	138±11
	60	-	40	135±11	138±11	140±11
ЦБГ I - ЦБГ II	40	60	-	118±9	126±10	135±11
	20	80	-	116±9	125±10	128±10

Для определения степени проявления синергизма между различными целлюлазами на основании концентрации глюкозы в реакционной смеси рассчитывались коэффициенты синергического действия $K_{\text{син}}$, как отношение экспериментально полученной концентрации глюкозы к рассчитанной теоретически.

При гидролизе МКЦ и измельченной древесины осины мутантные и немутантные смеси исследованных целлюлаз характеризовались одинаковыми значениями $K_{\text{син}}$. Таким образом, внесение мутаций в структуру ЭГ II, ЦБГ II и ЦБГ I не оказало влияние на синергизм в действии этих целлюлаз.

В случае гидролиза МКЦ под действием смесей ЭГ II и ЦБГ II наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГ II 20% и составлял $1,4 \pm 0,1$. Для смесей ЭГ II и ЦБГ I наибольший синергетический эффект наблюдался так же при массовой доле ЦБГ I 20% и составлял $1,8 \pm 0,1$. Меньшее значение синергетического эффекта для смесей ЭГ II-ЦБГ II по сравнению с ЭГ II-ЦБГ I возможно объяснить тем, что ЦБГ II обладает эндоглюканазной активностью в отличие от ЦБГ I. Причиной уменьшения значения $K_{\text{син}}$ может быть конкуренция двух ферментов с эндоглюканазной активностью за центры связывания при гидролизе целлюлозы.

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

Полученные значения $K_{\text{син}}$ хорошо согласуются с литературными данными. Для целлюлаз, секретируемых штаммами рода *Trichoderma*, было

показано, что при гидролизе МКЦ (СП ~ 300) значение $K_{\text{син}}$ составляло 1,5-2,5, при гидролизе хлопка (СП > 2000) – 2,0-2,5. Для целлюлаз, секретируемых *Chrysosporium lucknowense* (*Myceliophthora thermophila*), было показано, что значения $K_{\text{син}}$ при гидролизе хлопка могут достигать 2,6-2,8.

В случае гидролиза древесины осины значения $K_{\text{син}}$ действия целлюлаз оказались незначительно меньше соответствующих значений при гидролизе МКЦ. При гидролизе измельченной древесины осины под действием смесей ЭГП и ЦБГП наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГП 20% и составлял $1,3 \pm 0,1$. Для смесей ЭГП и ЦБГП наибольший синергетический эффект наблюдался так же при массовой доле ЦБГП 20% и составлял $1,7 \pm 0,1$. Для смесей ЦБГП и ЦБГП наибольший синергетический эффект наблюдался при массовой доле ЦБГП 40% и составлял $2,5 \pm 0,1$.

5.2. Гидролиз ЦСМ под действием тройных смесей целлюлаз *P.verruculosum*

Также был осуществлен гидролиз МКЦ и измельченной древесины осины под действием тройных смесей ЭГП, ЦБГП и ЦБГП, массовая доля ферментов в смеси варьировалась от 0 до 100%. Для предотвращения ингибирования активности ЭГП, ЦБГП и ЦБГП целлобиозой гидролиз проводился в присутствии β -глюкозидазы *A.niger*.

При гидролизе МКЦ наиболее эффективными оказались смеси с компонентным составом ЦБГП-ЦБГП-ЭГП 40%-40%-20% и 60%-20%-20% (Рис. 10), что соответствует компонентному составу ФП, использующихся для биоконверсии ЦСМ. Так, ферментный комплекс, секретируемый штаммом *P.verruculosum* B151, имеет состав ЦБГП-ЦБГП-ЭГП 35%-34%-8% (на долю остальных гликозид-гидролаз приходится 23%), типичный компонентный состав целлюлолитических комплексов, продуцируемых *T.reesei*, имеет вид ЦБГП-ЦБГП-ЭГП 60%-20%-12% (на долю остальных гликозид-гидролаз приходится 8%).

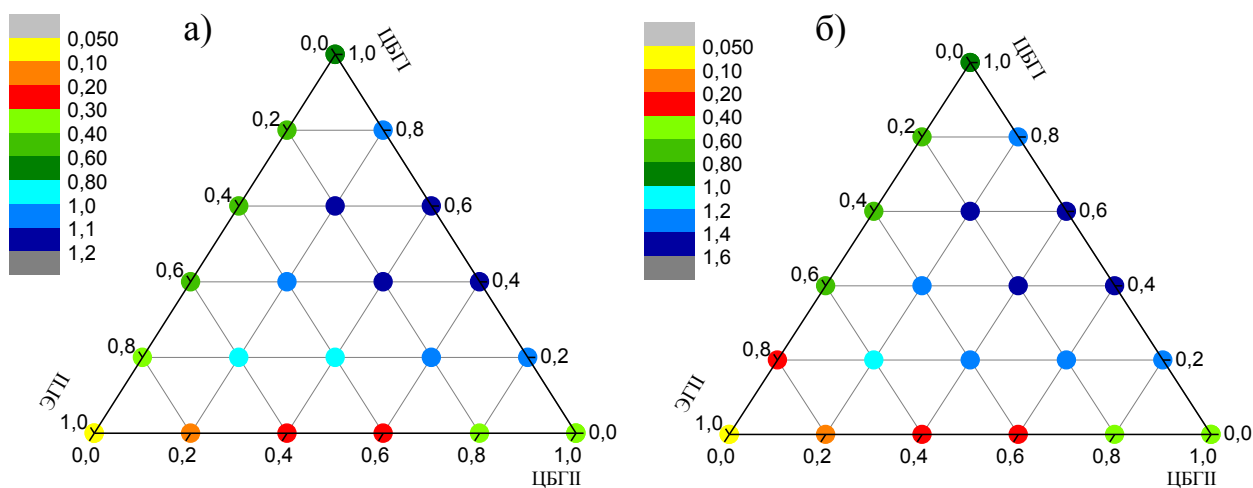


Рис. 10 - Тройные диаграммы, отражающие выход глюкозы при гидролизе МКЦ под действием тройных смесей немутантных (а) и мутантных (б) форм ЭГП, ЦБГП и ЦБГП *P.verruculosum* (концентрация субстрата 5 мг/мл, дозировка ферментов 10 мг/г субстрата, концентрация β -глюкозидазы *A.niger* 0,015 мг/мл, 72 ч гидролиза, 40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 4,5)

При гидролизе измельченной древесины осины наиболее эффективными оказались смеси с компонентным составом ЦБГІ-ЦБГІІ-ЭГІІ 40%-40%-20% и 20%-60%-20% (Рис. 11). Компонентный состав тройной смеси ЦБГІ-ЦБГІІ-ЭГІІ 40%-40%-20% приблизительно соответствует компонентному составу секретлируемого *P.verruculosum* комплекса. Для тройных смесей грибных целлюлаз показано, что увеличение каталитической активности или термостабильности ЦБГІІ значительно меняет компонентный состав оптимальных для гидролиза смесей. Так, улучшение свойств ЦБГІІ из *Humicola insolens* привело к изменению оптимального состава смеси целлюлаз ЦБГІ-ЦБГІІ-ЭГІІ (ЦБГІ из *Talaromyces emersonii*, ЦБГІІ из *H.insolens* и ЭГІІ из *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 ЦБГІ-ЦБГІІ-ЭГІІ 36%-56%-8%.

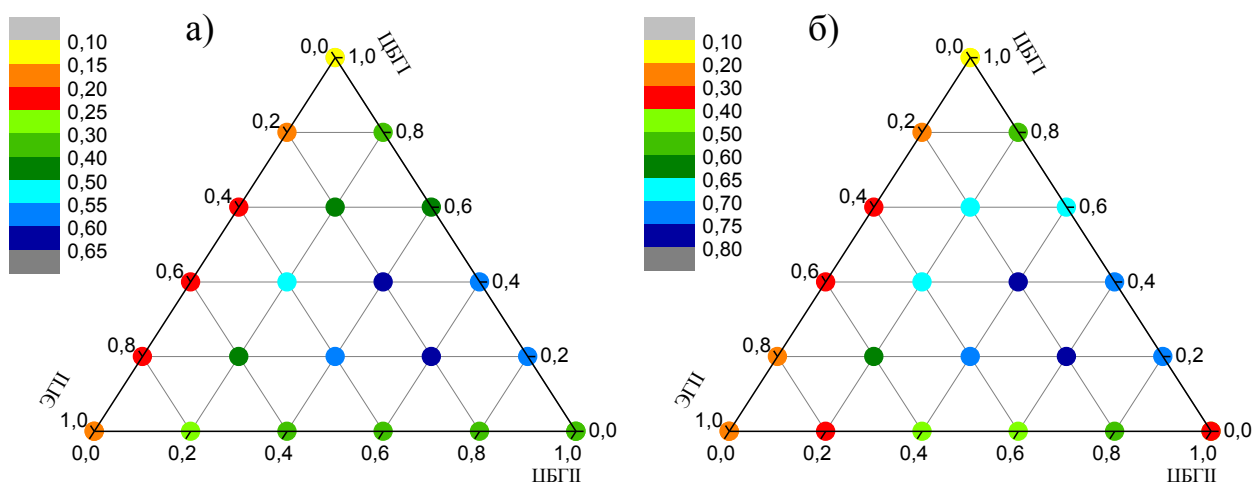


Рис. 11 - Тройные диаграммы, отражающие выход глюкозы при гидролизе измельченной древесины осины под действием тройных смесей немутантных (а) и мутантных (б) форм ЭГІІ, ЦБГІІ и ЦБГІ *P.verruculosum* (концентрация субстрата 5 мг/мл, дозировка ферментов 10 мг/г субстрата, концентрация β -глюкозидазы *A.niger* 0,015 мг/мл, 72 ч гидролиза, 40°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 4,5)

Различие компонентных составов смесей, оказавшихся наиболее эффективными для гидролиза МКЦ и измельченной древесины осины, возможно объяснить различием в адсорбционной способности исследованных целлюлаз (Таблица 13).

Таблица 13 - Адсорбционная способность мутантных и немутантных форм ЭГІІ, ЦБГІІ и ЦБГІ *P.verruculosum* по отношению к МКЦ и измельченной древесине осины (6°C, 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0)

Субстрат	ЭГІІ		ЦБГІІ		ЦБГІ	
	рекомб. ЭГІІ	рекомб. ЭГІІ N194A	рекомб. ЦБГІІ	рекомб. ЦБГІІ N219A	рекомб. ЦБГІ	рекомб. ЦБГІ 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

ЭГП, ЦБГП и ЦБГІ 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.

Следует отметить, что при гидролизе МКЦ наибольшей гидролитической способностью обладала ЦБГІ – наиболее прочно сорбирующийся на МКЦ фермент из исследованных целлюлаз. При гидролизе древесины осины, напротив, наибольшей гидролитической способностью обладала ЦБГП – 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. ЭГП, 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.

Важно подчеркнуть, что как при гидролизе МКЦ, так и при гидролизе измельченной древесины осины, тройные смеси мутантных форм ЦБГІ, ЦБГП и ЭГП характеризовались большей гидролитической способностью, чем смеси немутантных форм (Таблица 14).

Таблица 14 - Компонентный состав тройных смесей ЦБГІ-ЦБГП-ЭГП *P.verruculosum*, оказавшихся наиболее эффективными при гидролизе 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, %		
	ЦБГІ	ЦБГП	ЭГП	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

РЕЗУЛЬТАТЫ И 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*, 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 секретлируемого комплекса *P.verruculosum*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Издания, входящие в перечень ВАК РФ

- 1) *Anna S. Dotsenko, Alexander V. Gusakov, Pavel V. Volkov, Aleksandra M. Rozhkova, Arkady P. Sinitsyn.* N-Linked Glycosylation of Recombinant Cellobiohydrolase I (Cel7A) From *Penicillium verruculosum* and Its Effect on the Enzyme Activity // *Biotechnology and Bioengineering.* **2016.** – V.113, I.2. – P.283-291.
- 2) *Anna S. Dotsenko, Alexander V. Gusakov, Aleksandra M. Rozhkova, Olga A. Sinitsyna, Vitaly A. Nemashkalov and Arkady P. Sinitsyn.* Effect of N-linked glycosylation on the activity and other properties of recombinant endoglucanase IIa (Cel5A) from *Penicillium verruculosum* // *Protein Engineering, Design and Selection.* **2016.** doi: 10.1093/protein/gzw030.

- 3) Волков П.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Волчок А.А., Цурикова Н.В., Доценко А.С., Гусаков А.В., Синуцын А.П. Эффективность действия грибных целлюбогидролаз в ферментных композициях при биоконверсии сельскохозяйственных отходов // Хранение и переработка сельхозсырья. **2016.** – № 1. – С. 35-38.
- 4) Доценко А.С., Рожкова А.М., Гусаков А.В. Свойства и N-гликозилирование рекомбинантной эндоглюканазы II *Penicillium verruculosum* // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. **2015.** – Т. 56, № 6. – С.354-358. (*Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Gusakov A.V. Properties and N-Glycosylation of Recombinant Endoglucanase II from Penicillium verruculosum // Moscow University Chemistry Bulletin. 2015.* – V. 70, No. 6. – P. 283-286).

Тезисы докладов на научных конференциях

- 1) Доценко А.С., Волков П.В., Рожкова А.М., Гусаков А.В. Определение роли N-гликозилирования в проявлении каталитической активности целлюбогидролазы I *Penicillium verruculosum* методом сайт-направленного мутагенеза. Материалы VIII Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Россия, Москва, 17-20 марта **2015** г., с.364-365.
- 2) Доценко А.С. Зависимость биохимических и каталитических свойств целлюбогидролазы I от степени N-гликозилирования // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2015» / секция «Химия», подсекция Химия живых систем, нанобиоматериалы и нанобиотехнологии / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, **2015.**
- 3) *Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Gusakov A.V. Modification of N-linked glycosylation sites to improve the hydrolytic activity of endoglucanase II from Penicillium verruculosum. Abstracts of International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications". 2015. Moscow. P.104-105.*
- 4) *Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Dotsenko A.S., Bulakhov A.G., Volkov P.V., Osipov D.O., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P. Modern approaches for development of highly effective multienzyme preparations for biomass conversion. Abstracts of International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications". 2015. Moscow. P.59.*
- 5) Доценко А.С., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Гусаков А.В. Увеличение каталитической активности эндоглюканазы II из *Penicillium verruculosum* в результате изменения степени N-гликозилирования. Материалы XV Международной конференции молодых учёных «Леса Евразии – Большой Алтай», Москва-Барнаул, 13-20 сентября, **2015.** С.188-190.
- 6) *Alexander Gusakov, Anna Dotsenko, Aleksandra Rozhkova, Pavel Volkov. A novel approach for enhancing the catalytic activity of cellulases by engineering the N-glycosylation sites. Abstracts of the 17th European Congress on Biotechnology // New Biotechnology. 2016.* – V. 33S. – P. S44. doi:10.1016/j.nbt.2016.06.877.