

УДК 577.15

**УГЛЕВОД-СВЯЗЫВАЮЩИЙ МОДУЛЬ 28 СЕМЕЙСТВА
ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭНДО-1,4-β-ГЛЮКАНАЗЫ CelD
ИЗ АНАЭРОБНОГО МИКРООРГАНИЗМА *Caldicellulosiruptor bescii*
НЕОБХОДИМ ДЛЯ МАКСИМАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА
И НЕОБРАТИМО СВЯЗЫВАЕТСЯ С АМОРФНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ**

© 2013 г. Г. А. Великодворская¹, Л. А. Чекановская¹, Н. А. Лунина^{1*}, О. В. Сергиенко²,
В. Г. Лунин^{2,3}, И. А. Дворцов¹, В. В. Зверлов^{1,4}

¹Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, 123182

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии
Российской академии сельскохозяйственных наук, Москва, 127550

³Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения России, Москва, 123098

⁴Институт микробиологии, Мюнхенский технический университет, 85350, Фрайзинг, Германия

Поступила в редакцию 29.01.2013 г.

Принята к печати 25.02.2013 г.

Определена нуклеотидная последовательность фрагмента хромосомы термофильной анаэробной бактерии *Caldicellulosiruptor bescii* (syn. *Anaerocellum thermophilum*), который содержит четыре открытые рамки считывания. Вторая рамка кодирует мультимодульную эндогликоканазу CelD (749 а.о., 85019 Да). N-концевая часть этого белка содержит сигнальный пептид и каталитический модуль 5-го семейства гликозидгидролаз (GH5), далее расположены субстрат-связывающий модуль семейства 28 (CBM28) и три SLH-модуля. Рекомбинантная эндогликоканазы и два ее отдельных модуля – каталитический и модуль CBM28 – получены в *E. coli* и очищены до гомогенности. По своим каталитическим свойствам CelD является эндо-1,4-β-гликоканазой (КФ 3.2.1.4), максимальная активность которой проявляется на растворимом β-гликоне ячменя при pH 6.2 и температуре 70°C. Фермент стабилен при 50°C в течение 30 дней. При удалении модуля CBM28 активность GH5 на целлюлозных субстратах уменьшается, так же как и его термостабильность. Модуль CBM28 практически необратимо связывается с аморфной целлюлозой в диапазоне pH от 4 до 11, при температурах от 0 до 75°C и при концентрации соли от 0 до 5M NaCl. Его удается снять с целлюлозы только 100%-ным формамидом или 1%-ным раствором SDS.

Ключевые слова: *Caldicellulosiruptor bescii* (syn. *Anaerocellum thermophilum*), целлюлаза, эндо-1,4-β-гликоканазы, семейство 5 гликозидгидролаз, углевод-связывающий модуль, CBM28.

THE FAMILY 28 CARBOHYDRATE-BINDING MODULE OF THE THERMOSTABLE ENDO-1,4-β-GLUCANASE CELD *Caldicellulosiruptor bescii* MAXIMIZES THE ENZYME'S ACTIVITY AND BINDS IRREVERSIBLY TO AMORPHOUS CELLULOSE, by G. A. Velikodvorskaya¹, L. A. Chekanovskaya¹, N. A. Lunina^{1*}, O. V. Sergienko², V. V. Lunin^{2,3}, I. A. Dvortsov¹, V. V. Zverlov^{1,4} (¹Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia, *e-mail: lunina@img.ras.ru; ²All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 127550 Russia; Gamaleya Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia; ⁴Department of Microbiology, Technische Universität München, Freising, 85350 Germany). The nucleotide sequence of a chromosome fragment of the thermophilic anaerobic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii* (syn. *Anaerocellum thermophilum*) has been determined. The fragment contains four open reading frames with the second one of 749 aa encoding a multimodular endo-1,4-β-glucanase CelD (85019 Da). N-terminal region of the protein includes the signal peptide and the catalytic module of glycoside hydrolase family 5 (GH5), followed by the substrate-binding module of family 28 (CBM28). The C-terminal region bears three SLH modules. The recombinant endoglucanase and its two separate mod-

Принятые сокращения: GH (Glycoside Hydrolase) – гликозидгидролаза; SP (Signal Peptide) – лидерный пептид; Cat5 – каталитический модуль семейства 5 гликозидгидролаз; CBM28 (Carbohydrate-Binding Module) – углевод-связывающий модуль семейства 28; SLH (Surface-Layer Homology module) – модули, гомологичные белкам поверхностного слоя стенки клетки бактерий; BCC (Bacterial Crystalline Cellulose) – бактериальная кристаллическая целлюлоза; ПААГ – полиакриламидный гель; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; SDS – додецилсульфат натрия.

* Эл. почта: lunina@img.ras.ru

ules, the catalytic one and CBM28, were produced in *E. coli* cells and purified to homogeneity. Analysis of the catalytic properties showed CelD to be endo-1,4- β -glucanase whose maximum activity was exhibited on β -glucan of barley at pH 6.2 and 70°C. The enzyme was stable at 50°C for 30 days. Upon removal of the C-terminal CBM28, the activity of GH5 decreased on cellulose substrates, and its thermostability was dropped. Binding of CBM28 to amorphous cellulose was almost irreversible as it could not be removed from this substrate in a range of pH 4–11, temperatures – of 0–75°C, and NaCl concentration – of 0–5 M. Only 100% formamide or 1% SDS were able to remove the protein.

Keywords: *Caldicellulosiruptor bescii* (syn. *Anaerocellum thermophilum*), cellulase, endo-1,4- β -glucanase, glycoside hydrolase family 5(GH5), carbohydrate-binding module, CBM28.

DOI: 10.7868/S0026898413040150

Широко распространенный в природе полимер – целлюлоза – расщепляется только при совместном действии комплекса ферментов. Основные участники этого процесса – целлюлазы, гидролизующие 1,4- β -связи полисахаридов [1, 2]. Многие из них являются мультимодульными ферментами и содержат, помимо каталитического модуля, один или несколько вспомогательных, которые, в ряде случаев, представляют собой углевод-связывающие модули (СВМ) [3, 4]. Известно, что СВМ, входящие в состав целлюлаз, усиливают гидролитическую активность каталитического модуля, увеличивая концентрацию фермента на поверхности нерастворимого субстрата [5]. Термофильные микроорганизмы, способные утилизировать многие углеводы, являются источником термостабильных ферментов, гидролизующих различные формы целлюлозы. К числу гипертермофильных целлюлолитических организмов относится строгий анаэроб *Caldicellulosiruptor bescii* sp. nov. DSM 6725 (syn. *Anaerocellum thermophilum* Z1320). Эта бактерия выделена из термальных источников Камчатки [6], она является одним из наиболее термофильных микроорганизмов, способных ферментировать целлюлозу [7]. Штамм может расти при 90°C (pH 7.2), расщепляет не только кристаллическую целлюлозу и ксилан, но и нативную растительную биомассу, потенциальный источник биоэнергии.

В настоящее время секвенировано восемь геномов из разных видов рода *Caldicellulosiruptor*, в том числе, из штамма *C. bescii* sp. nov. DSM 6725 [8]. Представители рода *Caldicellulosiruptor*, относящиеся к Clostridiales, способны растворять целлюлозу при высоких температурах роста благодаря термостабильным мультимодульным мультифункциональным гидролазам, которые в них синтезируются. Тем самым, этот род микроорганизмов становится одним из перспективных кандидатов для биотехнологической переработки растительной биомассы. Анализ первичных структур ферментов, выведенных на основе последовательностей геномов, позволяет полагать, что основной обмен у разных представителей рода *Caldicellulosiruptor* высококонсервативен; тем не менее, имеются значительные различия в строении и функциях

гликозидгидролаз (GH), а также в числе транспортеров углеводов, что и определяет различия в способности штаммов расщеплять растительную биомассу [9]. Все известные до сих пор штаммы *Caldicellulosiruptor* содержат как минимум одну эндоглюканазу пятого семейства – GH5, которая может, потенциально, выступать в роли эндоцеллюлазы [10, 11]. Известно, что все штаммы значительно различаются по составу и функциям внеклеточных ферментов [12]. В настоящее время выделены целлюлазы CelA из *C. bescii* и *C. saccharalyticus*, которые содержат два каталитических модуля – GH48 и GH9, их биохимические свойства изучены [13, 14]. Исследована рекомбинантная целлюлаза/маннаназа *C. bescii*, также содержащая два каталитических модуля (GH9 и GH5) [15].

Настоящая работа посвящена изучению структуры гена *celD* и соответствующей целлюлазы CelD из *C. bescii* sp. DSM 6725. Мультимодульный рекомбинантный белок выделяли из клеток *E. coli*, очищали до электрофоретической гомогенности и исследовали его свойства, а также свойства отдельных рекомбинантных модулей – каталитического, семейства GH5, и углевод-связывающего модуля 28-го семейства. Исследовали влияние СВМ28 на каталитическую активность фермента, а также специфичность его связывания с растворимыми и нерастворимыми полисахаридами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы и векторы. Использовали штаммы *E. coli* XL-1 Blue, M15 [Rep4], рекомбинантную плазмиду pCU110, несущую вставку клона Cel10 *A. thermophilum* [16] и экспрессионный вектор pQE30 (“Qiagen”, США). Клетки *E. coli* культивировали при 37°C в среде LB с добавлением необходимых антибиотиков, индукцию проводили по рекомендациям фирмы “Qiagen”.

Процедуры работы с ДНК. Для рестрикции, лигирования и амплификации ДНК использовали ферменты фирм “МБИ Fermentas” (Литва) и “Promega” (США), следуя рекомендациям производителей. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора реактивов QIAprep Spin Mini-

prep Kit (“Qiagen”) по приложенному протоколу. Для амплификации *celD* и его отдельных модулей использовали следующие олигонуклеотидные праймеры: CELDf – gggattggatccatgagaaaattattt; CELDr – gcttgccctgaagctttcagagattatagagaat; CAT5f – cagcttggatccatgagtagacacatggac; CAT5r – accattaagcttttaaacagatctagctgatgtctcatttt; CBM28f – aaagaagatccaatgacaccttaggcg и CBM28r – cctcaaaaagcttttaggtagatctaacattatctatatac. Амплифицировали весь ген *celD* и его участки, кодирующие каталитический модуль и CBM28. Полученные амплификаты встраивали в экспрессионный вектор pQE-30 по сайтам BamHI и HindIII. Идентичность клонированных последовательностей подтверждали секвенированием.

Определение и компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили, пользуясь услугами фирмы “Medigenomiks” (Германия) и в Межинститутском Центре коллективного пользования “ГЕНОМ” (Институт молекулярной биологии РАН) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1. Продукты реакции анализировали на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 (“Applied Biosystems”, США). Последовательность зарегистрирована в базе данных GenBank (acc no. Z77855). Для сравнительного анализа нуклеотидных и определенных по ним аминокислотных последовательностей и для определения сигнального пептида использовали программы BLAST [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/], ClustalW [http://www.ebi.ac.uk/clustalw/] и SignalP [http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/].

Очистка белков. Клетки *E. coli*, содержащие рекомбинантные клоны после культивирования в LB-среде с добавлением ампициллина (200 мг/л) и индукции (по рекомендациям фирмы “Qiagen”), собирали центрифугированием, ресуспендировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 6.2) и разрушали ультразвуком. Белковые фракции очищали на Ni-NTA-агарозе по методикам, рекомендованным производителем (“GE Healthcare”, США). Концентрацию белка измеряли при помощи набора Bio-Rad Protein Assay (“Bio-Rad”, США). Молекулярные массы белков и степень очистки определяли путем электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях.

Полисахаридные субстраты. Использовали лихенан, ламинарин, 1,3-1,4-β-глюкан ячменя (“Sigma-Aldrich”, Германия), 1,3-β-глюкан – курдлан (“Wako Pure Chemical Industries”, Япония), карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ, “Merck”, Германия), хитин, ксилан овса, бактериальную кристаллическую целлюлозу (ВСС), Авицел (растворимый ксилан) (“Sigma-Aldrich”, Германия). Из Авицела готовили аморфную целлюлозу путем обработки его фосфорной кислотой [17].

Определение активности CelD. Активность CelD определяли в реакционной смеси (200 мкл), содер-

жащей 1 мкг фермента, полимерный нерастворимый (2%) или полимерный растворимый (1%) субстраты и 50 мМ натрий-фосфатный буфер с разными значениями рН. Реакционную смесь инкубировали при разных температурах. Фермент добавляли к уже прогретой при определенной температуре смеси. Концентрацию редуцирующих сахаров до и после инкубации измеряли с помощью динитросалицилового реагента [17]. В качестве стандарта использовали глюкозу. Каждое измерение ферментативной активности повторяли не менее трех раз. За единицу активности фермента (Е) принимали такое его количество, при котором высвобождается 1 мкмоль редуцирующих сахаров (в глюкозном эквиваленте) в минуту. Удельную активность измеряли при оптимальном рН 6.2 и при 70°C. Для вычисления удельной активности определяли активность на 1 мг белка, а затем пересчитывали на 1 мкмоль белка. Такой пересчет позволяет более корректно сравнивать активность в зависимости от мол. массы фермента, поскольку в 1 мг Cat5 больше молекул укороченного фермента, чем в 1 мг полноразмерного CelD. Термостабильность фермента определяли, выдерживая его в том же буфере без добавления субстрата при температурах 50, 60, 70 и 80°C и периодически измеряя активность отобранных проб на КМЦ, в качестве субстрата, в стандартных реакциях при 70°C. За 100% принимали активность фермента до начала его прогрева без субстрата.

Продукты гидролиза аморфной целлюлозы разделяли при помощи тонкослойной жидкостной хроматографии на алюминиевых пластинах, покрытых силикагелем 60 (0.2 мм) (“Merck”) с использованием в качестве растворителя смеси ацетонитрила и воды в объемном соотношении 80:20 [18].

Связывание углеводов-связывающего модуля CBM28 с нерастворимыми полисахаридами. CBM28 инкубировали вместе с нерастворимыми полисахаридами в связывающем буфере (50 мМ Трис-HCl, рН 7.0, 0.05% Твин-20) в течение 3 ч при 4°C с постоянным перемешиванием. Пробы центрифугировали, надосадочную жидкость отбирали, осадки дважды промывали связывающим буфером и измеряли количество белка в осадке и надосадочной жидкости, анализируя зоны в ПААГ после денатурирующего электрофореза. Белковые зоны регистрировали по взаимодействию с красителем Кумасси R-250.

Связывание CBM28 с растворимыми полисахаридами изучали при помощи аффинного электрофореза [19]. В нативные полиакриламидные гели (10%) перед полимеризацией добавляли растворимые полисахариды до концентрации 1 мг/мл. В качестве контроля использовали пробы без добавления субстрата. О связывании судили по из-

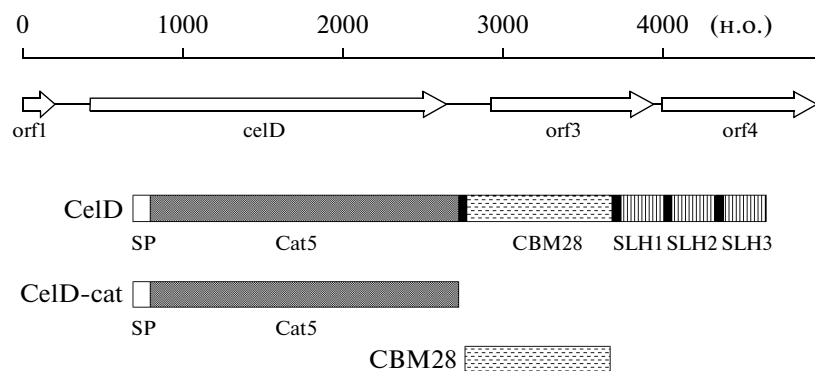


Рис. 1. Схема строения клона Cel10 из библиотеки генов *Caldicellulosiruptor bescii* (syn. *Anaerocellum thermophilum*) и строение белков — CelD, CelD-Cat5, CBM28. Orf — открытая рамка считывания, SP — сигнальный пептид, Cat5 — каталитический модуль 5-го семейства гликозидгидролаз, CBM28 — углевод-связывающий модуль 28-го семейства, SLH — модули, гомологичные белкам S-слоя стенки клетки бактерий.

менению подвижности зоны CBM28 в геле с субстратом. В качестве отрицательного контроля на оба геля наносили бычий сывороточный альбумин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ структуры фрагмента генома C. bescii sp. DSM 6725, содержащего ген целлюлазы celD, и получение делеционных производных

Ранее нами клонирован в клетках *E. coli* в составе клона Cel10 фрагмент хромосомы термофильной анаэробной бактерии *C. bescii*, который проявлял активность на субстратах, содержащих 1,4- β -связи [16], и определена последовательность вставки. Длина фрагмента составляет 4867 п.н. Идентифицированы четыре открытые рамки считывания (ОРС) (рис. 1). Неполная первая рамка считывания (<1–209 п.н.) кодирует аспартил-тРНК-синтетазу (КФ 6.1.1.12); вторая ОРС (437–2686 п.н.) соответствует гену эндо-1,4- β -D-глюканазы CelD (КФ 3.2.1.4); ОРС3 (2944–3882 п.н.) и ОРС4 (3925–4836 п.н.) кодируют белки транспорта сахаров. На рис. 1 приведена структура глюканазы CelD. Вычисленная теоретически мол. масса CelD составляет 85.0 кДа (749 а.о.). На N-конце, вслед за лидерным пептидом (SP), расположен каталитический модуль (Cat5), относящийся к семейству 5 гликозидгидролаз, затем следуют углевод-связывающий модуль семейства 28 (CBM28) и на C-конце — тройной повтор SLH-модулей, гомологичных белкам поверхностного слоя стенки клетки бактерий. Особенность структуры CelD заключается в том, что в нем отсутствует второй СВМ семейства 17, расположенный, как правило, тандемно с СВМ28 в составе целлюлаз из семейства 5. Сходство последовательностей СВМ28 и СВМ17, а также подобие их структур дают возможность предположить, что эти два семейства доменов эволюционировали в результате дубликации генов с последующим их расхождением [20, 21].

Для изучения ферментативной активности и связывающих свойств были получены полноразмерная глюканаза CelD, ее каталитический и углевод-связывающий модули. Рекомбинантные белки выделяли из клеток *E. coli* и очищали методом металлохелатной хроматографии до гомогенности, определяемой по данным денатурирующего электрофореза в ПААГ (данные не представлены). Схема строения CelD и его отдельных модулей приведена на рис. 1. CelD представляет собой фермент с мол. массой 85.0 кДа, CelD-Cat5 — каталитический модуль с мол. массой 48.9 кДа, CBM28 — углевод-связывающий модуль семейства 28 с мол. массой 28.0 кДа. Результаты определения мол. масс рекомбинантных белков с помощью электрофореза в денатурирующих условиях совпадают с теоретически вычисленными величинами (данные не представлены).

Характеристика CelD и его каталитического модуля

На рис. 2 представлены данные по изучению свойств полноразмерного CelD. Оптимум pH активности фермента — 6.2, температурный оптимум — 70°C. Для полноразмерного фермента характерна высокая термостабильность, инактивация происходит только при инкубации в отсутствие субстрата при температуре 80°C, причем время полужизни CelD при 80°C достигает часа (рис. 2б). При инкубации CelD без субстрата при 70 и 60°C в течение 5 ч активность уменьшается лишь в незначительной степени, а при 50°C — сохраняется в течение 30 дней (поэтому результат прогрева при 50°C на 5-часовом графике не приведен). После удаления СВМ28 температурный оптимум каталитического модуля не изменяется, но уменьшается его термостабильность.

В таблице приведены величины удельной активности полноразмерного CelD и CelD-Cat5 —

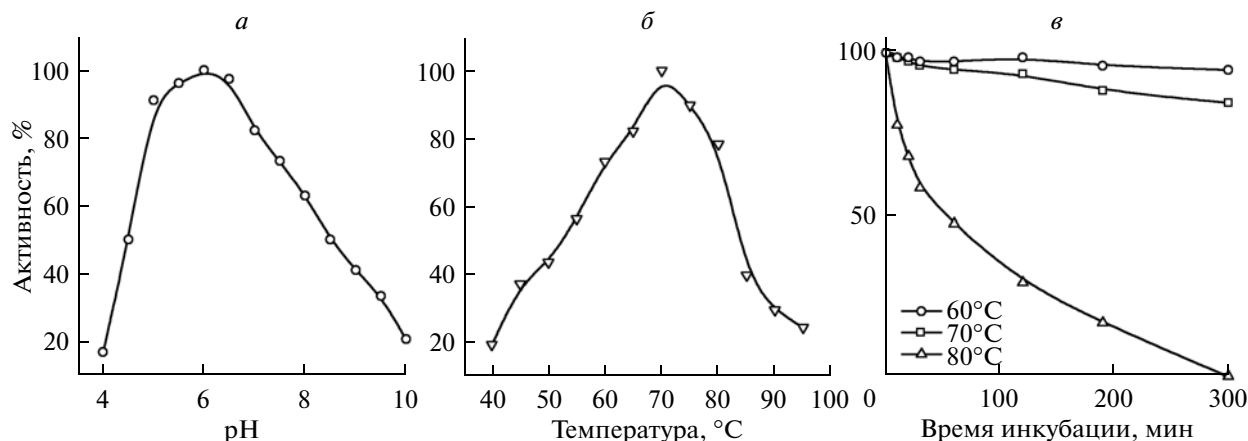


Рис. 2. Свойства рекомбинантной глюканазы CelD *Caldicellulosiruptor bescii* (syn. *Anaerocellum thermophilum*). *a* – Зависимость активности фермента от pH реакционной смеси. *б* – Зависимость активности CelD от температуры реакционной смеси. *в* – Изучение термостабильности CelD. Максимальная активность фермента принята за 100%: *a* – при pH 6.2, *б* – при 70°C, *в* – исходная активность до прогрева фермента в отсутствие субстрата.

белка, не содержащего СВМ28. Оба белка гидролизуют субстраты, имеющие в своем составе 1,4-β-связи, причем активность максимальна при гидролизе растворимого 1,3-1,4-β-глюкана ячменя. Активность каталитического модуля по отношению ко всем целлюлозным субстратам более низка, тогда как на лихенане и 1,3-1,4-β-глюкане из ячменя активность не изменяется или даже увеличивается. Эти результаты свидетельствуют о том, что углевод-связывающий модуль является важным компонентом каталитической активности и не только выполняет функцию связывания фермента с субстратом, но, возможно, вносит вклад в поддержание правильной третичной структуры каталитического модуля и в его специфичность.

Связывание СВМ28 CelD с растворимыми и нерастворимыми полисахаридами

Способность СВМ28 связываться с полисахаридами исследовали двумя способами: во-первых, определяя подвижность белка в нативном ПААГ в присутствии соответствующих растворимых субстратов (аффинный гель-ЭФ) и, во-вторых, измеряя количество оставшегося белка в надосадочной жидкости и белка, связавшегося с субстратом, после инкубации с нерастворимыми субстратами. На рис. 3 представлены результаты опытов по изучению связывания СВМ28 с растворимым ксиланом, 1,3-β-глюканом (курдланом), ламинарином, лихенаном (1,3-1,4-β-связи) и КМЦ. Более всего подвижность СВМ28 замедляется в присутствии КМЦ (растворимого субстрата, содержащего только 1,4-β-связи) и лихенана (содержащего как 1,3-, так и 1,4-β-связи) и значительно меньше – в присутствии ламинарина (в основном 1,3-β-связи) и 1,3-β-глюкана

(курдлана); ксилан вовсе не влияет на подвижность.

Кроме того, проверяли способность к связыванию с полисахаридными субстратами отдельного каталитического модуля CelD-Cat5 (результаты не приведены). При использовании аффинного метода (гель-ЭФ) показано, что подвижность каталитического модуля замедляется только в присутствии ксилана. Вероятно, это обусловлено неспецифическим связыванием, поскольку не обнаружено связывания CelD-Cat5 с другими субстратами, содержащими 1,4-β-связи – как с растворимыми, так и с нерастворимыми.

Удельная активность CelD и Cat5 CelD

Субстрат	Полноразмерный CelD Е/мкмоль	Каталитический Cat5 CelD Е/мкмоль
Аморфная целлюлоза	2.9	0.4
Ксилан	0	0
Хитин	0	0
ВСС	0	0
Авицел	0.2	0
КМЦ	24.4	11
Лихенан	12.8	15
1,3-1,4-β-глюкан ячменя	34.6	70

Примечание. Е – единица активности фермента: количество фермента, при котором высвобождается 1 мкмоль редуцирующих сахаров в глюкозном эквиваленте в минуту. Удельную активность измеряли при pH 6.2 и 70°C, объем пробы 200 мкл. Нерастворимые субстраты набухали ночь в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 6.2, растворимые субстраты растворяли в этом же буфере при нагревании до 70°C.

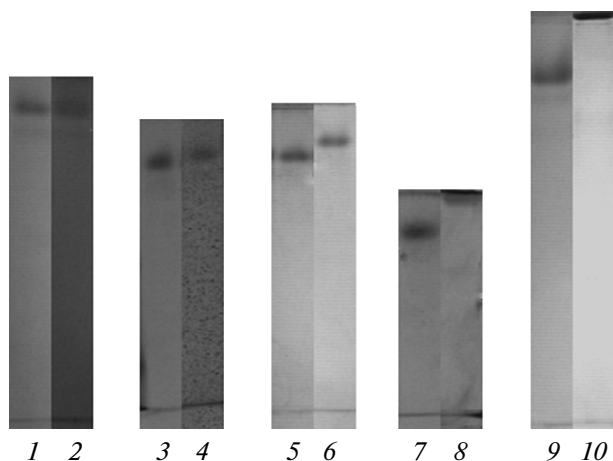


Рис. 3. Связывание CBM28 CelD с растворимыми субстратами. Аффинный электрофорез в нативном ПААГ. Нечетные дорожки – гели без полисахаридных субстратов. 2 – Растворимый ксилан, 4 – β -1,3-глюкан (курдлан), 6 – ламинарин, 8 – лихенан, 10 – КМЦ.

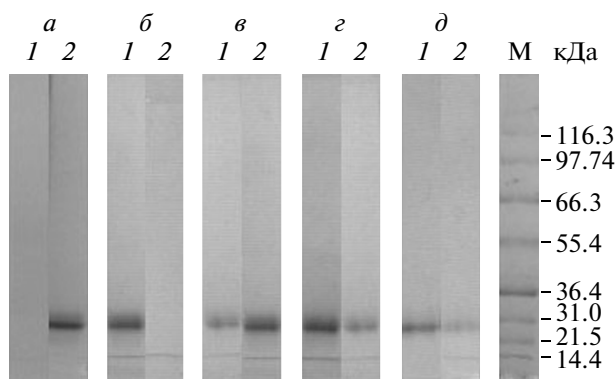


Рис. 4. Связывание CBM28 CelD с нерастворимыми субстратами. CBM28 инкубировали с нерастворимыми полисахаридами при 4°C при перемешивании 4 ч, затем центрифугировали, супернатанты отбирали для электрофореза, осадки промывали два раза буфером для связывания с твином (50 мМ Трис-НСl, pH 7.0, 0.05% Твин-20) и также наносили на гель после кипячения с буфером для денатурирующего ПААГ. *a* – Аморфная целлюлоза; *б* – хитин; *в* – Авицел; *е* – ксилан овса; *д* – ВСС (бактериальная целлюлоза). 1 – Супернатанты, 2 – промытые осадки. М – маркеры мол. массы.

На рис. 4 показано, что CBM28 эффективно связывается с аморфной целлюлозой, но вообще не связывается с хитином. Кроме того, CBM28 взаимодействует – с разной степенью интенсивности – с бактериальной целлюлозой, Авицелом (кристаллическими субстратами, содержащими 1,4- β -связи) и с ксиланом. Но, учитывая тот факт, что на ксилане адсорбируется также CelD-Cat5, можно предположить, что в этом случае происходит неспецифическое взаимодействие. Необхо-

димо отметить, что связывание CBM28 с аморфной целлюлозой наблюдается в широком диапазоне pH и практически необратимо: CBM28 CelD не удается отделить от целлюлозы в диапазоне pH от 4 до 11, температур от 0 до 75°C, и концентрации соли от 0 до 5M NaCl. Белок удается снять только 100%-ным формамидом или 1%-ным раствором SDS (данные не представлены). Таким образом, результаты качественного анализа свидетельствуют о том, что CBM28 обладает наибольшим сродством к аморфной целлюлозе, а также к растворимым субстратам, содержащим 1,4- β -связи.

Соотношения величин удельной активности фермента на различных субстратах и анализ продуктов реакции на аморфной целлюлозе с использованием тонкослойной хроматографии (данные не показаны) позволяют классифицировать CelD как типичную эндоглюканазу. При этом, ее активность на целлюлозных субстратах зависит от присутствия CBM28. Эти результаты свидетельствуют о том, что модуль CBM28 необходим для поддержания каталитической активности и специфичности гидролиза, однако механизм взаимодействия CBM с каталитическим модулем остается неясным.

CelD представляет собой высокостабильный фермент с высокой удельной активностью. Он может быть использован для увеличения активности целлюлазных комплексов микроорганизмов с пониженным содержанием эндоглюканаза. Учитывая высокое сродство к аморфной целлюлозе и необратимость связывания с этим субстратом, представляется целесообразным использовать CBM28 для иммобилизации химерных белков на различных целлюлозных матрицах. Нами сконструирована термостабильная химерная β -галактозидаза, способная необратимо связываться с целлюлозным носителем, и получен мини-реактор, эффективно гидролизующий лактозу при высоких температурах [22, 23]. В ближайшее время мы планируем провести количественные калориметрические исследования углевод-связывающих свойств CBM28 CelD *C. bescii* (syn. *A. thermophilum*) и определить константы связывания фермента с различными субстратами.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (грант 09-04-00204а) и Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tomme P., Warren R.A.J., Gilkes N.R. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 37, 1–81.
2. Zverlov V.V., Schwarz W.H. 2008. Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental systems *Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant fibre degraders. In: *Incredible Anaerobes: From*

- Physiology to Genomics to Fuels*. Eds Wiegel J., Maier R.J., Adams M.W.W. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1125**, 298–307.
3. Boraston A.B., Bolam D.N., Gilbert H.J., Davies G.J. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* **382**, 769–781.
 4. Schwarz W.H., Zverlov V.V., Bahl H. 2004. Extracellular glycosyl hydrolases from clostridia. *Adv. Appl. Microbiol.* **56**, 215–261.
 5. Karita S., Sakka K., Ohmya K. 1996. Cellulose-binding domains confer an enhanced activity against insoluble cellulose to *Ruminococcus albus* endoglucanase IV. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 553–556.
 6. Svetlichnii V.A., Svetlichnaya T.P., Chernikh N.A., Zavarzin G.A. 1990. *Anaerocellum thermophilum*, gen. nov., sp. nov. an extremely thermophilic cellulolytic eubacterium isolated from hot-springs in the valley of the geysers. *Microbiology.* **59**, 598–604.
 7. Yang S.J., Kataeva I., Wiegel J., Yin Y., Dam P., Xu Y., Westpheling J., Adams M.W. 2010. Classification of *Anaerocellum thermophilum* strain DSM 6725 as *Caldicellulosiruptor bescii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2011–2015.
 8. Kataeva I.A., Yang S.J., Dam P., et al. 2009. Genome sequence of the anaerobic, thermophilic and cellulolytic bacterium *Anaerocellum thermophilum* DSM 6725. *J. Bacteriol.* **191**, 3760–3761.
 9. Blumer-Schuette S.E., Ozdemir I., Mistry D., et al. 2011. Complete genome sequences for the anaerobic extremely thermophilic plant biomass-degrading bacteria *Caldicellulosiruptor hydrothermals*, *Caldicellulosiruptor kristianssonii*, *Caldicellulosiruptor kronotskyensis*, *Caldicellulosiruptor owensensis* and *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*. *J. Bacteriol.* **193**, 1483–1484.
 10. <http://www.cazy.org>
 11. Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucl. Acids Res.* **37**, D233–D238.
 12. Blumer-Schuette S.E., Levis D.L., Kelly R.M. 2010. Phylogenetic, microbiological and glucoside hydrolase diversities within the extremely thermophilic, plant biomass-degrading genus *Caldicellulosiruptor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 8084–8092.
 13. Teo V.S., Saul D.J., Bergqvist P.L. 1995. *celA*, another gene coding for a multidomain cellulase from the extreme thermophile *Caldocellum saccharalyticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 291–295.
 14. Zverlov V., Mahr S., Riedel K., Bronnenmeier K. 1998. Properties and gene structure of bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile *Anaerocellum thermophilum* with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains. *Microbiology.* **144**, 457–465.
 15. Su X., Mackie R.I., Cann I.K. 2012. Biochemical and mutational analysis of a multidomain Cellulase/Mannanase from *Caldicellulosiruptor bescii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2230–2240.
 16. Bolchakova E.V., Ponomarev A.A., Novikov A.A., Svetlichnyi V.A., Velikodvorskaya G.A. 1994. Cloning and expression of genes coding for carbohydrate degrading enzymes of *Anaerocellum thermophilum* in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 1076–1080.
 17. Wood T.M., Bhat K.M. 1988. Methods for measuring of cellulase activities. *Methods Enzymol.* **160**, 87–112.
 18. Zverlov V.V., Schantz N., Schwarz W.H. 2005. A major new component in the cellulosome of *Clostridium thermocellum* is a processive endo-beta-1,4-glucanase producing cellotetraose. *FEMS Microbiol. Lett.* **249**, 353–358.
 19. Zverlov V.V., Volkov I.Y., Velikodvorskaya G.A., Schwarz W.H. 2001. The binding pattern of two carbohydrate-binding modules of laminarinase Lam16A from *Thermotoga neapolitana*: differences in beta-glucan binding within family CBM4. *Microbiology.* **147**, 621–629.
 20. Jamal S., Nurizzo D., Boraston A.B., Davies G.J. 2004. X-ray Crystal Structure of a Non-crystalline cellulose-specific carbohydrate-binding module: CBM28. *J. Mol. Biol.* **339**, 253–258.
 21. Araki Y., Karita Sh., Tanaka A., Kondo M., Goto M. 2009. Characterization of family 17 and family 28 carbohydrate-binding modules from *Clostridium josui* Cel5A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1028–1032.
 22. Великодворская Г.А., Зверлов В.В., Карягина-Жулина А.С., Лаврова Н.В., Лунин В.Г., Лунина Н.А., Рязанова Е.М., Сергиенко О.В., Тихонова Т.В. 2006. Рекомбинантный белок LACspCBD, обладающий бета-галактозидазной активностью и способностью самопроизвольно связываться с целлюлозосодержащими сорбентами, рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая синтез рекомбинантного белка LACspCBD, штамм *Escherichia coli* M15 [pREP4, pLACspCBD] – продуцент рекомбинантного белка LACspCBD, способ получения иммобилизованного рекомбинантного белка LACspCBD на целлюлозе и способ ферментативного расщепления лактозы. *Патент на изобретение № 2278160, зарег. 20 июня 2006 г.*
 23. Velikodvorskaya G.A., Tikhonova T.V., Gurvits I.D., Karyagina A.S., Lavrova N.V., Sergienko O.V., Tashlitskii V.N., Lunina N.A., Lunin V.G. 2010. Chimeric lactase capable of spontaneous and strong immobilization on cellulose and development of continuous-flow system for lactose hydrolysis at high temperatures. *Appl. Envir. Microbiol.* **76**, 8071–8075.