

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ПЕТЕРБУРГСКИЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ им. Б. П. КОНСТАНТИНОВА
НАЦИОНАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

На правах рукописи

Швецова Светлана Владимировна

**Особенности действия α -L-фукозидазы и сульфатазы из нового штамма
мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1 в реакциях гидролиза и синтеза**

Специальность 03.01.04 — Биохимия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук
Кульминская Анна Алексеевна

Санкт-Петербург

2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Ферменты и ферментные системы из мицелиальных грибов.....	13
1.2 Гидролазы. Классификация гидролаз	15
1.2.1 Сульфатазы: классификация и механизмы действия	15
1.2.1.1 Сульфатированные соединения в природе – субстраты для сульфатаз	18
1.2.1.2 Разнообразие микробных сульфатаз	21
1.3 <i>O</i> -Гликозидгидролазы: общие сведения	26
1.3.1 Альфа- <i>L</i> -фукозидазы: классификация и механизм действия.....	30
1.3.1.1 Распространение α - <i>L</i> -фукозидаз	31
1.3.1.2 Выделение α -фукозидаз.....	32
1.3.1.3 Физико-химические характеристики α - <i>L</i> -фукозидаз.....	36
1.3.1.4 Субстраты α - <i>L</i> -фукозидаз.....	40
1.3.1.5 Каталитические свойства α - <i>L</i> -фукозидаз.....	45
1.3.1.5.1 Особенности реакции гидролиза и субстратная специфичность α -фукозидаз	45
1.3.1.5.2 Реакции трансгликозилирования	49
1.4 Создание биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов.....	52
1.4.1 Практическое применение иммобилизованных ферментов (<i>O</i> -гликозидаз).....	55
1.5 Заключение	55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
2.1 Реагенты и материалы.....	56
2.2 Микроорганизмы и условия их культивирования	57
2.2.1 Среды для скрининга активностей гликозидаз у штамма <i>F. proliferatum</i> LE1	57
2.3 Аналитические и физико-химические методы исследования	59
2.3.1 Определение концентрации белка.....	59
2.3.2 Определение молекулярной массы и чистоты исследуемых ферментов	59
2.4 Выделение ферментов	59
2.4.1 Выделение и очистка НАД ⁺ - зависимой альфа- <i>L</i> -фукоздегидрогеназы.....	59
2.4.2 Выделение и очистка сульфатазы из мицелиального гриба <i>F. proliferatum</i> LE1	60
2.4.3 Выделение и очистка α - <i>L</i> -фукозидазы из мицелиального гриба <i>F. proliferatum</i> LE1	61
2.5 Иммобилизация α - <i>L</i> -фукозидазы из мицелиального гриба <i>F. proliferatum</i> LE1	61
2.6 Определение активности ферментов.....	62
2.7 Масс-спектральный анализ пептидов	64

2.8	Определение физико-химических свойств ферментов.....	64
2.8.1	Определение рН оптимума ферментов	64
2.8.2	Определение рН стабильности ферментов	64
2.8.3	Определение температурного оптимума ферментов.....	65
2.8.4	Определение температурной стабильности ферментов	65
2.8.5	Определение влияния ионов металлов.....	65
2.9	Определение кинетических характеристик и констант ингибирования реакций гидролиза, катализируемых ферментами.....	66
2.10	Определение стереохимии ферментативного гидролиза α -L-фукозидазы методом ^1H ЯМР спектроскопии	68
2.11	Исследование трансгликозилирующей активности α -L-фукозидазы	68
2.12	Характеристика продуктов реакции трансгликозилирования	69
2.13	Получение и анализ фракций фукоиданов из бурых водорослей <i>Laminaria digitata</i>	70
2.14	Получение и анализ продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов	70
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ		72
3.1	Идентификация штамма LE1	72
3.2	Определение гидролитических активностей исследуемого штамма <i>F. proliferatum</i> LE1	73
3.3	Получение и характеристика сульфатазы из мицелиального гриба <i>F. proliferatum</i> LE1	79
3.3.1	Выделение сульфатазы из <i>F. proliferatum</i> LE1	79
3.3.2	Определение аминокислотной последовательности сульфатазы из <i>F. proliferatum</i> LE1	80
3.3.3	Определение субстратной специфичности и кинетических параметров FpC.....	84
3.4	Получение и характеристика альфа-L-фукозидазы из <i>F. proliferatum</i> LE1	86
3.4.1	Выделение α -L-фукозидазы из <i>F. proliferatum</i> LE1	86
3.4.2	Определение первичной последовательности α -L-фукозидазы из <i>F. proliferatum</i> LE1	88
3.4.3	Определение физико-химических свойств α -L-фукозидазы из <i>F. proliferatum</i> LE189	
3.4.4	Определение стереохимии гидролиза, катализируемого FpFucA	92
3.4.5	Определение кинетических характеристик реакции гидролиза модельного субстрата pNPFuc, катализируемой FpFucA	93
3.4.6	Определение субстратной специфичности FpFucA.....	96
3.4.7	Подбор условий ферментативного гидролиза фукоидана	101
3.4.8	Исследование трансгликозилирующей активности FpFucA.....	104
3.4.8.1	Реакции трансгликозилирования с pNP-гликозидами в качестве акцепторов.....	105
3.4.8.2	Реакции трансгликозилирования, катализируемые FpFucA, с алифатическими спиртами в качестве акцепторов.....	107

3.5 Получение и характеристика биокатализатора на основе иммобилизованной α -фукозидазы из мицелиального гриба <i>F. proliferatum</i> LE1	109
3.5.1 Реакции гидролиза, катализируемые иммобилизованной α -L-фукозидазой из <i>F. proliferatum</i> LE1	109
3.5.2 Реакции трансгликозилирования, катализируемые иммобилизованной FpFucA.....	113
ВЫВОДЫ.....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119
ПРИЛОЖЕНИЕ	145

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Большинство биохимических реакций в природе происходят под действием природных биокатализаторов — ферментов. Огромное количество ферментов разных классов хорошо изучено на современном биохимическом и структурном уровнях, а некоторые нашли применение в прикладных областях [1]. Почти неограниченным источником природных биокатализаторов являются микроорганизмы (бактерии, грибы, дрожжи), содержащие набор большинства известных энзимов. Поиск и характеристика природных продуцентов ферментов, являющихся более совершенной альтернативой используемым в настоящее время, а также получение новых, не изученных и не применяемых ранее ферментных препаратов для модификации целевых соединений, является **актуальной задачей** современной энзимологии.

В данной работе рассмотрены биохимические особенности двух гидролаз, мажорной α -L-фукозидазы и сульфатазы, обнаруженных и выделенных из мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1. Разнообразные сульфатированные соединения, а также гликоконъюгаты, содержащие α -L-фукозу, задействованы во многих жизненно важных процессах в эукариотических организмах [2–9]. Изучение механизма действия ферментов, участвующих в модификации сульфатированных гликоконъюгатов, важно как для расширения фундаментальных знаний об этих энзимах, так и для их потенциального практического использования. Биохимические исследования гетерогенного класса *сульфатаз* микробного происхождения находятся пока на начальном этапе, сильно отставая от развитых геномных технологий [4]. α -L-Фукозидазы, способные избирательно отщеплять остатки L-фукозы, являются важными инструментами для изучения структуры и биологических функций различных фукозилированных олиго- и полисахаридов [10–15]. Так, возросший интерес к фукоидам определяет потребность в эффективных биокатализаторах, способствующих деполимеризации сульфатированных полисахаридов, к которым относятся фукозидазы, фукоиданазы, сульфатазы, а также другие гликозидгидролазы [10, 11, 16–26].

Кроме того, способность α -фукозидаз с «сохраняющим» механизмом действия катализировать реакции трансгликозилирования может стать новым направлением в получении фукозилированных биомиметиков в русле разрабатываемых в настоящее время экологичных и альтернативных химическим методов и подходов по созданию фукоолигосахаридов грудного молока [27–29].

Одной из стратегий снижения высокой стоимости препаратов гликозидаз является иммобилизация ферментов, в результате чего появляется возможность их многократного

использования [30–32]. Поэтому разработка иммобилизованных биокатализаторов и их детальная биохимическая характеристика **актуальна** с точки зрения практической значимости работы.

Степень научной разработанности темы

В научной литературе достаточно широко представлено описание ферментативных комплексов, участвующих в расщеплении целлюлозы, хитина, крахмала и других полисахаридов [33–37]. Поскольку в модификациях этих соединений участвуют ферменты как эндо-, так и экзо-типа, возможность составлять из них «коктейли» делает гидролиз полисахаридов более эффективным.

Для селективного фрагментирования полианионных сульфатированных полисахаридов используют такие ферменты, как фукоиданазы – эндо-гликозидазы, распространенные среди морских организмов [21–23]. Также известно об экзо-фуканазах, отщепляющих сульфатированные *L*-фукозы и фукобиозы [10, 38, 39], что подтверждает предположения о существовании фукоидан-гидролизующих ферментов с разным типом действия. Однако охарактеризованных α -*L*-фукозидаз и сульфатаз, способных модифицировать фукоиданы, совсем немного. Чаще всего в качестве примеров успешного гидролиза приводились описания обработки полисахаридов грубой смесью ферментного препарата из бактерий или морских беспозвоночных. Также показано действие некоторых индивидуальных ферментов α -фукозидаз и сульфатаз из бактерий или морских беспозвоночных в отношении сульфатированных фукоиданов [10, 11, 25, 26, 40].

Вопрос о поиске новых продуцентов малоизученных ферментов, ценных для науки и промышленности, является актуальным и в настоящее время, а поиск — перспективным и необходимым. Известно, что штаммы рода *Fusarium* – источники ценных ферментов, а также биопродуценты для производства ароматизаторов, пигментов, биотоплива и важных вторичных метаболитов для медицинских целей [41]. В целом, мицелиальные грибы — многообещающие продуценты ферментов и других соединений, которые довольно широко используются во многих процессах [42–44].

Исследование группы ферментов сульфатаз – относительно слабо развитая область энзимологии. Сульфатазы у про- и эукариотических организмов изучали на протяжении нескольких десятилетий периодически, их функции незаслуженно считали ограниченными, а интерес к ним возрос лишь после выяснения функции и роли сульфатаз у человека [45]. Несмотря на наличие в базе данных SulfAtlas [46], созданной в 2016 году [4], большого числа предполагаемых нуклеотидных последовательностей, кодирующих сульфатазы, лишь для

ограниченного количества грибных сульфатаз выполнена подробная биохимическая характеристика. Из охарактеризованных на биохимическом уровне сульфатаз грибов можно назвать только 4-х представителей [47–50], остальные же работы содержат лишь косвенные доказательства присутствия сульфатаз в организмах. Чаще всего сульфатазы из грибов — это внутриклеточные ферменты, хотя среди них встречаются и секретируемые [49]. Ферментативная активность сульфатаз из грибных штаммов показана лишь в гидролизе коротких сульфатированных молекул (арилсульфаты, холин-*O*-сульфат, тирамин-*O*-сульфат, глюкоза/галактоза-*O*-сульфат и др.), и не найдено ни одной работы, описывающей десульфатирование высокомолекулярных сульфатированных соединений (гепарин и другие гликозамингликаны, каррагинан, агар, фукоидан и др.).

Альфа-*L*-фукозидазы встречаются в бактериях [12, 13, 51], грибах [14, 52], растениях, морских беспозвоночных [10], млекопитающих [53]. Цели исследований по изучению тех или иных α -*L*-фукозидаз различны: часть работ посвящена ассоциации α -*L*-фукозидаз человека с рядом патофизиологических процессов [54], в то время как другие работы нацелены на поиск и характеристику высокоактивных энзимов из микробных источников для модификаций фукоиданов или других фукозилированных молекул. α -*L*-Фукозидазы принадлежат к 29 и 95 семействам гликозидгидролаз [55]. Представители 29 семейства способны не только катализировать расщепление гликозидных связей, но и осуществлять перенос фукозильного остатка на другую молекулу (реакция трансгликозилирования) [12, 13, 56]. В частности, различные микробные α -*L*-фукозидазы используют для получения фукозилированных олигосахаридов грудного молока при разработке коммерческих смесей для вскармливания [15, 27–29]. Такие работы представляются перспективными, поскольку входящие в состав фукоолигосахариды являются уникальными биоактивными молекулами [28], а продукты ферментативного синтеза обладают большим потенциалом для применения в фармацевтической промышленности и медицине.

Преимущество иммобилизации ферментов заключается в возможности их повторного использования и увеличения стабильности при использовании и хранении [57]. Некоторые иммобилизованные гликозидазы наряду с гидролитической активностью способны осуществлять ферментативный синтез гликобиозидов [57–61]. Методы иммобилизации α -*L*-фукозидаз разработаны лишь для двух ферментных препаратов [40, 62]. Иммобилизованная на хитозане α -*L*-фукозидаза оказалась эффективна в реакциях гидролиза фукоидана [40]. Реакция трансгликозилирования иммобилизованными α -*L*-фукозидазами не описана в литературе.

Цель исследования

Исследование физико-химических, структурных и функциональных особенностей α -L-фукозидазы и сульфатазы, продуцируемых новым штаммом мицелиального гриба, обнаруженного на поверхности раствора фукоидана.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Характеристика спектра ферментативных активностей нового штамма мицелиального гриба, обнаруженного на поверхности раствора фукоидана.
2. Выделение и очистка сульфатазы из исследуемого организма и изучение физико-химических и каталитических свойств фермента.
3. Выделение и очистка α -L-фукозидазы, секретируемой исследуемым продуцентом, и изучение свойств фермента в гидролизе фукозосодержащих субстратов.
4. Исследование трансгликозилирующей активности α -L-фукозидазы и характеристика продуктов реакции трансгликозилирования.
5. Иммуобилизация фермента α -L-фукозидазы и исследование параметров для проведения эффективного биокатализа.

Научная новизна

В настоящей работе выделен ранее неизвестный штамм мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1, который продуцирует широкий набор различных гидролаз, в том числе α -L-фукозидазу и сульфатазу.

Получен частично-очищенный ферментный препарат внутриклеточной сульфатазы из *F. proliferatum* LE1 (FpC) и исследованы физико-химические характеристики и субстратная специфичность данного фермента. FpC стала одной из первых сульфатаз, полученных из грибов рода *Fusarium* и, более того, входит в первую десятку охарактеризованных сульфатаз из грибных источников.

Впервые получен высокоочищенный ферментный препарат α -L-фукозидазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1 (FpFucA). Исследованы физико-химические характеристики данного фермента, установлено сходство исследуемой α -L-фукозидазы с представителями 29А-семейства гликозидгидролаз базы данных CAZy. Показано, что среди известных α -L-фукозидаз исследуемая FpFucA обладает наиболее высокой удельной

активностью в реакции гидролиза хромофорного субстрата *pNPFuc*. Проведен подробный анализ кинетических характеристик и констант ингибирования реакции гидролиза, катализируемой α -*L*-фукозидазой. Исследована субстратная специфичность фермента в гидролизе синтетических и природных фукоолигосахаридов. В работе показано, что исследуемый фермент является уникальной α -*L*-фукозидазой, которая предпочтительно гидролизует α -(1→4)-*L*-фукозидную связь, присутствующую в α -*L*-фукобиозидах с различными типами связей (не сульфатированные короткие фрагменты фукоиданов). Впервые показано, что при совместном действии α -*L*-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 с набором индивидуальных ферментных препаратов экзогликозидаз из грибных источников, GrFucA способна фрагментировать фукоидан из бурых водорослей *L. digitata*.

Установлено, что исследуемый фермент α -*L*-фукозидаза обладает трансгликозилирующей активностью, перенося остаток *L*-фукозы на алифатические спирты и *pNP*-гликозиды. В результате реакции трансгликозилирования, катализируемой GrFucA, синтезированы *pNP*-фукозо-гликозиды, *pNP*-дифукозид, а также метил-, этил- и пропилфукозиды. Наличие продуктов реакций трансгликозилирования в реакционной смеси показано методами ТСХ и ВЭЖХ, а структуры полученных соединений идентифицированы с использованием методов ЯМР и масс-спектрометрии.

Впервые выполнена иммобилизация α -*L*-фукозидазы GrFucA методом ковалентной перекрёстной сшивки в желатине с использованием глутарового альдегида. Получен более стабильный по сравнению со свободным ферментом иммобилизованный биокатализатор, способный сохранять гидролитическую и трансгликозилирующую активность в течение 10 реакционных циклов. Впервые осуществлена реакция синтеза фукозилированных соединений иммобилизованным ферментным препаратом α -*L*-фукозидазы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выделенный штамм *Fusarium proliferatum* LE1 депонирован во Всероссийской Коллекции Сельскохозяйственных Микроорганизмов с коллекционным номером RCAM02409 и является продуцентом ферментов класса гликозидгидролаз (α - и β -галактозидаза, α - и β -глюкозидаза, целлюбогидролаза, β -ксилозидаза и β -ксиланаза, α -*L*-фукозидаза). Полученные в работе данные о спектре ферментативных активностей штамма, а также биохимические исследования некоторых из них, служат предпосылкой для исследования вовлеченности этих ферментов в метаболизм организма, поскольку многие представители данного вида известны как растительные патогены.

Понимание особенностей действия сульфатазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1 и соотнесение полученных знаний с имеющимися на сегодня данными поможет систематизировать и совершенствовать имеющуюся классификацию и представления о роли этих ферментов у грибных организмов не только на основе геномных «предсказаний», но и с учетом данных о биохимических характеристиках этой малоизученной группы ферментов.

Использование α -L-фукозидазы в реакциях гидролиза и синтеза фукоолигосахаридов имеет большое значение для решения как для фундаментальных, так и прикладных задач. Знание особенностей гидролитической активности FrFucA даёт возможность использовать фермент для селективного отщепления L-фукозных остатков от соответствующих фукозилированных сахаридов. В свою очередь, способность фермента катализировать синтез фукосахаридов является перспективным направлением использования α -L-фукозидазы. Разработанный способ иммобилизации FrFucA позволяет эффективно и многократно использовать гидролитическую и трансгликозилирующую активность фермента α -L-фукозидазы в модификациях фукозосодержащих соединений.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных задач, в данной работе был использован комплекс микробиологических, биохимических, физико-химических методов, позволяющих осуществить получение ферментных препаратов и их детальную характеристику. В частности, использованы следующие методы и подходы: генетические и микробиологические методы идентификации нового штамма; микробиологические методы культивирования мицелиального гриба, скрининга и индукции требуемых ферментов; вскрытие клеточных структур было осуществлено с использованием гомогенизатора под давлением; выделение ферментов осуществляли при помощи методов осаждения и хроматографических методов очистки белков; для дальнейшей характеристики ферментов использовали электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле, масс-спектрометрический анализ пептидов и их соотнесение с последовательностями в известных базах данных, методы определения ферментативной кинетики, методы химической и физической иммобилизации ферментов; получение и характеристику углеводов в работе осуществляли с использованием тонкослойной хроматографии, обращённо-фазной хроматографии, масс-спектрометрического анализа, газо-жидкостной хроматографии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^1H).

Положения, выносимые на защиту

1. Мицелиальный гриб *Fusarium proliferatum* LE1 продуцирует широкий спектр гидролаз экзо- и эндо-типа, в том числе α -L-фукозидазу и сульфатазу.
2. Сульфатаза из *F. proliferatum* LE1 является внутриклеточным ферментом, относится к подсемейству 11 S1 структурного семейства (S1_11) сульфатаз и катализирует реакцию гидролиза хромофорного субстрата *n*-нитрофенил сульфата натрия.
3. Альфа-L-фукозидаза из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1 является секретлируемым ферментом экзо-действия и катализирует расщепление α -(1→4)-, α -(1→2)-, α -(1→3)-O-гликозидных связей между остатками L-фукозы в молекулах дифукозидов. В составе ферментной смеси, включающей несколько грибных экзо-гликозидаз, фермент способен фрагментировать фукоидан сложного состава, выделенный из смеси бурых водорослей *Laminaria digitata*.
4. α -Фукозидаза FpFucA, относящаяся к 29 структурному семейству O-гликозидгидролаз подсемейству A (GH29A), катализирует реакцию трансгликозилирования с образованием *p*NP-фукогликозидов, *p*NP-дифукозида а также метил-, этил- и пропилфукозидов.
5. Имобилизованная α -L-фукозидаза из *F. proliferatum* LE1 является новым эффективным биокатализатором в реакциях гидролиза и синтеза фукозилированных соединений.

Личный вклад автора в получение результатов, изложенных в диссертации

Автором был выполнен анализ литературы по теме исследования, спланированы и проведены эксперименты, на основании полученных результатов были написаны статьи и подготовлены доклады на конференциях. На защиту вынесены положения и результаты, где роль автора в их получении была определяющей. Идентификация штамма LE1 на основе морфологических признаков была выполнена совместно с сотрудниками лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР (к.б.н. Гагкаевой Т.Б). Генетическая идентификация штамма *F. proliferatum* LE1 выполнена в лаборатории энзимологии. Масс-спектрометрический анализ пептидов выполнен сотрудниками Института биомедицинской химии (д.б.н. Нарыжный С.Н., д.б.н. Згода В.Г.), масс-спектрометрический анализ продуктов реакции трансгликозилирования выполнен сотрудниками Байкальского Объединенного Инструментального Центра «Ультрамикрoанализ» (к.х.н. Шишлянникова Т.А., к.х.н. Кузьмин А.В.) и РЦ Методы анализа состава вещества Санкт-Петербургского государственного университета (Кашина М.В.). ЯМР-эксперименты выполнены при помощи к.ф.-м.н. Шабалина К.А.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов обусловлена применением современных методов, соответствующих поставленным задачам с учетом особенностей изучаемых объектов, воспроизводимостью полученных данных, а также применением статистического метода анализа.

Полученные в ходе исследования результаты были представлены на II и IV Всероссийских конференциях «Фундаментальная гликобиология», Саратов, 2014 и Киров, 2018; XVIII и XIX Зимних молодёжных школах по биофизике и молекулярной биологии, включающих молодёжные конференции, Санкт-Петербург, 2016, 2017; The EMBO conference “The biochemistry and chemistry of biocatalysis: from understanding to design”, 2016, Оулу, Финляндия; международных конференциях «Biocatalysis-2015» и «Biocatalysis-2017», Москва, 2015, 2017; V Съезде биохимиков России, Сочи-Дагомыс, 2016; The 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 2015, Эспоо, Финляндия; Научном форуме с международным участием «Неделя науки СПбПУ», Санкт-Петербург, 2015, 2017 и 2018 г.г.; I конференции молодых учёных и специалистов ПИЯФ, Гатчина, 2014.

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в международных и российских журналах и 15 тезисов докладов в материалах научных конференций.

Работа поддержана 2 грантами: **1.** Грант РФФИ №16-38-00881 мол_а «Исследование структурных и функциональных особенностей ферментов фукоидан-гидролизующего комплекса из *Fusarium proliferatum* LE1» (2016-2017 гг.) (руководитель), **2.** Грант РНФ № 16-14-00109 «Поиск, исследования и разработка эффективных биокатализаторов на основе микробных гликозидгидролаз для модификации биологически ценных гликозидов» (2016-2018 гг.), а также **3.** являлась победителем в конкурсе работ среди молодых учёных НИЦ «КИ» ФГБУ ПИЯФ в номинации «Стипендия для молодых ученых и специалистов в области биологии им. С.Е. Бреслера»: «Исследование высокоактивного комплекса ферментов из *Fusarium proliferatum* LE1 в гидролизе и синтезе фукоолигосахаридов и сульфатированных гликоконъюгатов» (2017 г.).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц, иллюстрирована 35 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения исследования, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 358 научных источников на русском и иностранном языке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ферменты и ферментные системы из мицелиальных грибов

Известно, что все живые организмы содержат в своём арсенале разнообразные ферменты, помогающие им получать необходимые для жизнедеятельности вещества из окружающей среды, трансформируя соединения различного химического состава. Человек с древних времён использовал работу ферментов для производства хлеба, вина, сыра или других пищевых продуктов, не осознавая механизмов, обеспечивающих протекание этих процессов, а также роли микроорганизмов, как поставщиков этих ферментов. Основываясь на большом прогрессе в двух областях исследований — химии и биологии — исследователи 21-го века умело пользуются накопленными знаниями о технологиях катализа для получения широкого разнообразия полезных органических соединений [63].

Для масштабного получения ферментных препаратов внимание исследователей обращено к про- и эукариотическим микроорганизмам. Микробные продуценты являются многообещающим ресурсом благодаря их доступности, простоте и короткому циклу культивирования. Они могут синтезировать целый комплекс ферментов, различающихся селективностью в модификации природных соединений [33–35, 64–66].

Одними из основных продуцентов, секретирующих большое разнообразие промышленно-важных ферментных комплексов или индивидуальных ферментов, можно назвать мицелиальные грибы. Грибы – вторая по величине группа эукариотических организмов на Земле, оценочно включающая от 1,5 до 5,1 миллионов видов [67]. Мицелиальные грибы более предпочтительны для работы, нежели бактерии, поскольку они менее требовательны к условиям культивирования, устойчивы к стрессам, легче переносят неблагоприятные условия и сохраняют жизнеспособность при понижении влажности, концентрации веществ. Наличие широкого спектра ферментов и вторичных метаболитов, обладающих разнообразными биологическими активностями, обусловлено широким видовым и эколого-трофическим разнообразием грибов [44, 68–70]. Эндوفитные грибы (при определённых обстоятельствах населяющие ткани живых растений, не вызывая каких-либо негативных последствий для их функционирования и развития) секретируют внеклеточные ферменты, входящие в состав гидролитической системы (в основном, ксиланазы и целлюлазы) и окислительной лигнинолитической системы (лакказы, лигнины и пероксидазы) [71, 72]. Главное преимущество грибных штаммов для использования их в роли продуцентов – способность секретировать большое количество внеклеточных ферментов в среду, возможность культивирования их на простых средах, высокая скорость роста, стабильность получаемых ферментных препаратов.

В промышленных биотехнологиях грибные продуценты уже используют в виде живой биомассы клеток и мицелия для кормовых белково-витаминных концентратов и съедобных культивируемых видов, а также компоненты метаболизма грибов широко применяются в животноводстве, растениеводстве, земледелии, биоремедиации, медицине [73, 74]. Мировой рынок ферментов из грибных источников довольно развит, хотя из известных около 2500 ферментов лишь небольшое количество производится в промышленных масштабах, при этом 80% из них – гидролазы [75]. Термо- и алкилостабильные формы гидролаз вводят в состав стиральных порошков; целлюлазы, ксиланазы, лигниназы, β -глюкозидазы используют в целлюлозно-бумажной промышленности для переработки растительного сырья; фитазу – для приготовления пшеничных отрубей и в качестве добавки в корм; α - и β -амилазы, глюкоамилазы – в гидролизе крахмала и производстве глюкозо-фруктозных сиропов; серинпротеаза – в кожевенном производстве и для приготовления соевого соуса.

Наиболее широко используемыми организмами являются грибы родов *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. awamori*, *A. niger*), *Trichoderma* (*T. reesei*), *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. graminearum*), дрожжи *Candida* (*C. rugosa*, *C. antarctica*) [41, 70, 71, 76–79]. Штаммы рода *Fusarium* – многообещающие источники некоторых ферментов, а также биопродуценты ароматизаторов, пигментов и важных вторичных метаболитов для производственных и медицинских целей [41]. Именно за счёт широкого разнообразия гидролитических ферментов в метаболизме и способности синтезировать токсические соединения, многие мицелиальные грибы, в частности некоторые представители рода *Fusarium*, являются растительными патогенами. Поэтому знание о механизмах функционирования отдельных ферментов и ферментных систем грибов можно использовать для борьбы с ними.

Хотя выявлено и широко применяется впечатляющее количество и разнообразие грибных биокатализаторов, грибы содержат множество не охарактеризованных ферментов, которые могут стать новыми промышленно полезными компонентами. Для этого проводятся транскриптомные, секреторные [43] и протеомные исследования у грибов [42]. Возможность получения подробного анализа грибных секретомов основана на применении электрофоретических, хроматографических, масс-спектрометрических методов, с одной стороны, а также доступности аннотирования грибных геномов и сложных биоинформационных программных инструментов. Для получения новых ферментных препаратов, в том числе при помощи анализа секретомов, исследователям ещё предстоит выяснить биохимические характеристики, структуры и функции многих вне- и внутриклеточных белков из грибных источников [43]. Всестороннее понимание качественного и количественного состава грибных секретомов вместе с их синергическими функциями и профилями кинетической экспрессии позволит разработать оптимизированные коктейли для различных областей применения.

1.2 Гидролазы. Классификация гидролаз

На основании типа катализируемой реакции все известные ферменты делятся на шесть классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтетазы).

Класс *гидролаз* катализирует реакции гидролиза, а именно расщепление ковалентной связи с присоединением молекулы воды по месту разрыва. Наименование ферментов составляют по формуле «название расщепляемого субстрата-гидролаза» или более тривиально, присоединением к названию субстрата суффикса «-аза». Также для отдельных классов гидролаз применяются названия, характеризующие гидролиз определённой химической связи: сульфатазы, фосфатазы, эстеразы и др.

Традиционная (биохимическая) классификация ферментов основана и периодически обновляется Комиссией по ферментам (КФ) (англ. Enzyme Commission) при Международном союзе биохимии и молекулярной биологии (IUBMB) [*ENZYME*, Enzyme nomenclature database, <https://enzyme.expasy.org/>]. Классификация основана на субстратной специфичности ферментов и определяет химическую реакцию, катализируемую ферментом, но при этом не учитывает его белковую структуру. По этой причине, несмотря на значительные структурные различия, аналогичные ферменты из различных организмов или же различные ферменты одного организма могут иметь одинаковый номер КФ. Согласно международной классификации, ферменты гидролазы отнесены к классу КФ 3. В зависимости от типа расщепляемой связи ферменты этого класса подразделяют на 13 подклассов: гидролазы сложных эфиров (КФ 3.1); гидролазы *O*-гликозидов (КФ 3.2); гидролазы простых эфиров (КФ 3.3); гидролазы пептидов (КФ 3.4); гидролазы не пептидных азот-углеродных связей (КФ 3.5); гидролазы ангидридов кислот (КФ 3.6); гидролазы углерод-углеродных связей (КФ 3.7); гидролазы связей с участием галогена (КФ 3.8); гидролазы связей фосфор-азот (КФ 3.9); гидролазы связей сера-азот (КФ 3.10); гидролазы связей углерод-фосфор (КФ 3.11); гидролазы связей сера-сера (КФ 3.12); гидролазы связей углерод-сера (КФ 3.13).

Кроме того, для некоторых подклассов гидролаз созданы базы данных, которые классифицируют ферменты на основании строения, укладки белка и его филогенетического положения.

1.2.1 Сульфатазы: классификация и механизмы действия

Сульфатазы – ферменты, отщепляющие сульфатную группу по гидролитическому механизму (гидролазы сульфатированных эфиров (КФ 3.1.6.x); сульфамидазы (КФ 3.10.1.x)) или

же по окислительному механизму (диоксигеназы (КФ 1.14.11.x)) [4]. Сульфатазы обнаружены у прокариотических и эукариотических организмов.

Современная классификация, созданная Varbeugon с соавт. [4], базируется на принципах, лежащих в основе классификации углеводмодифицирующих ферментов (база данных CAZy, <http://www.cazy.org/>) и пептидаз (база данных MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk/>). Так, в основу классификации сульфатаз положено, главным образом, степень сходства аминокислотных последовательностей, фолдинга сульфатаз и совпадение каталитических остатков. В результате, известные сульфатазы поделены на четыре семейства: формилглицин-зависимые сульфатазы (семейство S1), семейство Fe(II)-альфа-кетоглутарат-зависимых диоксигеназ (семейство S2), алкилсульфогидролазы (семейство цинк-зависимых β -лактамаз) (семейство S3) и предполагаемые арилсульфатазы (семейство S4). В Таблице 1 приведены примеры представителей всех четырех семейств и их основные особенности.

Формилглицин-зависимые сульфатазы (семейство S1). Семейство формилглицин-зависимых сульфатаз (FGly-сульфатазы) включает в себя подавляющее число известных сульфатаз. Согласно базе данных SulfAtlas [46], представители данного семейства составляют почти 90% от общего числа имеющихся в базе ферментов этого типа и являются членами эволюционно консервативного семейства, произошедших от общего предка [80]. Трёхмерная структура FGly-зависимых сульфатаз имеет общую основу, они следуют одинаковому каталитическому механизму, но проявляют исключительное разнообразие субстратной специфичности и образуют десять официальных кодов ферментов (КФ). FGly-сульфатазы встречаются среди представителей всех видов живых организмов, в том числе организмов морского происхождения, за исключением наземных растений [4].

Характерной особенностью всех эукариотических и многих прокариотических FGly-зависимых сульфатаз является наличие в активном сайте C α -формилглицина (FGly), который образуется в результате пост-трансляционной модификации первого цистеина (Cys) или серина (Ser) в консервативном мотиве C/S-X-P/A-X-R-X₄-TG аминокислотной последовательности сульфатаз [81–92]. Наличие этой аминокислотной последовательности установлено для большинства всех известных сульфатаз. Сульфатазы, у которых цистеин трансформируется в формилглицин (Cys-типа) характерны как для аэробных, так и анаэробных эу- и прокариотических организмов, в то время как сульфатазы, у которых такой аминокислотой является серин, т.е. Ser-типа, встречаются только у факультативных или строго анаэробных прокариот и не характерны для строго аэробных прокариот. Считается, что модификация Cys/Ser до FGly является важным условием для проявления каталитической активности фермента, где FGly выполняет роль каталитического нуклеофила [4, 45, 81, 93–96]. Так, например, в экспериментах с эукариотическими сульфатазами, когда цистеин заменяли серином,

синтезировался каталитически неактивный белок, при этом остаток серина не претерпевал конверсии до FGly [82, 97]. FGly-Сульфатазы отщепляют сульфатные группы по гидролитическому механизму.

Сульфатазы семейства S1 имеет высокую степень структурного сходства, включая ключевые остатки в активном участке, со щелочными фосфатазами [93]. Отличительной особенностью является то, что фосфатазы используют серин, а не FGly в качестве каталитического нуклеофила, что упрощает гидролиз моноэфиров фосфата [98]. В виду близкой структурной организации активного центра двух групп ферментов, некоторые FGly-сульфатазы могут катализировать гидролиз и фосфатного эфира.

Кроме того, важной особенностью FGly-сульфатаз является наличие в активном центре иона двухвалентного металла. Чаще всего это ион Ca^{2+} , но может встречаться и Mg^{2+} . Ион металла в FGly-сульфатазах координируют четыре аминокислотных остатка (три остатка аспарагиновой кислоты и остаток аспарагина), входящие в состав двух дополнительных консервативных последовательностей сульфатаз [4].

Другие семейства. В отличие от семейства FGly-зависимых сульфатаз (S1), представители трёх оставшихся семейств (Fe^{2+} - α -кетоглутарат зависимые диоксигеназы (семейство S2); Zn^{2+} -зависимые β -лактамазы (семейство S3) и арилсульфатазы (семейство S4), представлены в меньшинстве и действуют по другим, нежели FGly-сульфатазы, механизмам при расщеплении сульфатированных соединений (Таблица 1).

Алкилсульфодиоксигеназы семейства S2 (Fe^{2+} - α -кетоглутарат-зависимые гидроксилазы [99]) обнаружены только в трёх типах бактерий: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*. Ни у одного эукариотического организма или же морских прокариотических организмов алкилсульфодиоксигеназы не обнаружены [4]. Основной особенностью ферментов данного семейства является их потребность в α -кетоглутарате (α КГ) в качестве ко-субстрата, а также наличие в активном центре иона железа Fe^{2+} . Металл удерживается в конститутивном для всех сульфатаз участке H-X-D/E-X_n-H, где значение n варьируется в диапазоне от 39 до 154 аминокислотных остатков.

Сульфатазы семейства S3 (Zn^{2+} -зависимые β -лактамазы (M β Ls)) содержат в активном центре два атома Zn^{2+} , которые в процессе гидролиза активируют молекулу воды с образованием гидроксил-иона. Помимо наличия ионов цинка в активном центре данных сульфатаз, эти ферменты характеризуются наличием пяти консервативных участков, где основная консервативная последовательность F-X-T/S-H-X-H-X-D-H-X₂-G-X₄-L ответственна за координацию и удерживание металла [4, 100, 101]. Семейство S3 характерно не только для эукариотических и прокариотических организмов, но также показаны три сульфатазы вирусов в базе данных SulfAtlas.

Малочисленное семейство S4 (порядка 0,3% от общего количества сульфатаз базы данных SulfAtlas) было сформировано ввиду низкой идентичности аминокислотных последовательностей его представителей с последовательностями сульфатаз семейства S3, несмотря на наличие у них общей последовательности T/S-H-X-H-X-D и гомологичных каталитических сайтов связывания цинка [4, 102].

1.2.1.1 Сульфатированные соединения в природе – субстраты для сульфатаз

Сульфатазы часто характеризуют по наличию ферментативной активности в отношении синтетических низкомолекулярных модельных субстратов *para*-нитрофенил сульфат (*n*НФС), *para*-нитрокатехол сульфат (*n*НКС) и аннотируют термином «сульфатаза» или «арилсульфатаза», что не даёт точной информации о метаболической роли конкретного фермента. На сегодняшний день известно, что как «не арилсульфатазы», так и «арилсульфатазы» способны отщеплять сульфатную группу от синтетических вышеупомянутых субстратов, но «арилсульфатазы» значительно эффективнее в гидролизе этих соединений [45, 103]. Однако именно истинная субстратная специфичность к конкретному субстрату даёт ключ к пониманию биологической функции исследуемых сульфатаз.

В отличие от полиспецифичного семейства S1, единственной активностью, характерной для сульфатаз S2 и S3 семейств является алкилсульфатазная активность. Алкилсульфодоксигеназы (представители S2) разлагают как линейные, так и разветвленные алкилсульфонаты (C-S) и/или алкилсульфаты (C-O-S) с дальнейшей утилизацией получившейся серы в неорганической форме для нужд организма [99, 104–107].

В природе выделяют две основные группы органических серосодержащих соединений: сульфатированные эфиры (C-O-S) и C-связанная сера (C-S), а также реже встречаемые сульфаматы (C-N-S) и сера в составе гетероциклических соединений [108]. Сульфатированные эфиры в почве встречаются в виде компонентов соединительной ткани и продуктов метаболизма млекопитающих и обитающих в почве организмов. Некоторые почвенные бактерии могут синтезировать внеклеточные полисахариды с сульфатированной эфирной группой, а мицелиальные грибы, в том числе *Aspergillus oryzae*, способны синтезировать тирозин-*O*-сульфат и другие алкилсульфаты [109]. *Fusarium sambucinum* B10.2 продуцирует тетрациклический тритерпеновый сульфат (самбацид), обладающий антибактериальной и фунгицидной активностями [110]. В лишайниках, морских водорослях, растениях и микроскопических грибах обнаружен холин-*O*-сульфат, важный компонент для роста и развития организмов. Он выступает в клетке в качестве резервуара запасных питательных источников серы, азота и углерода [111], а

также как осмопротектант, позволяющий справляться организму с осмотическим стрессом [112]. Синтез и накопление в мицелии, конидиоспорах и аскоспорах холин-*O*-сульфата обнаружены у многих высших грибов [113], тогда как у бактерий это соединение выделяется в окружающую среду [109]. У высших растений холин-*O*-сульфат — мажорный компонент сульфатного метаболизма: в листьях и корнях кукурузы (*Zea mays*), ячменя (*Hordeum vulgare*) и подсолнечника (*Helianthus annuus*) он составляет 5 – 15% от общего количества растворимой серы [114, 115]. Среди вторичных метаболитов растений встречаются сульфатированные флавоноиды и сульфатированные производные жасминовой кислоты [116, 117], гликозинолаты – защитные метаболиты в крестоцветных, а также сульфатированные тиогликозиды [118, 119].

Наиболее широко изученными сульфатированными соединениями являются сульфатированные гликозамингликаны (ГАГ) [2, 5, 120], являющиеся главной составной частью внеклеточного матрикса, принимающей участие во многих физиологических процессах. Эти соединения широко распространены как среди наземных организмов, так и среди организмов морского происхождения. Типичными представителями ГАГ, используемыми в медицине, являются гепарин, хондроитин сульфат, кератан сульфат. Гликозаминогликаны состоят из повторяющихся дисахаридных блоков, состоящих из чередующегося гексозамина и гексурановой кислоты/галактозы.

Морские беспозвоночные синтезируют уникальные полисахариды — сульфатированные галактаны и фуканы [2, 121], а основным компонентом клеточной стенки макрофитов являются сульфатированные галактаны, ульваны (главные составляющие клеточных стенок зелёных водорослей), агар, каррагинаны и порфираны (в красных водорослях), сульфатированные фукоиданы (в бурых водорослях), флоротанины (сульфатированные и/или галогенированные полифенолы красных и коричневых макроводорослей) [6, 122–124]. Как правило, эти соединения обладают достаточно большим молекулярным весом (≥ 100 кДа) и, по сравнению с ГАГ, имеют более высокую степень сульфатирования. Морские лилии *Alloeocomatella polycladia* продуцируют холестерол сульфат и несколько ароматических сульфатированных соединений [125]. Для позвоночных и млекопитающих, кроме ГАГ, также характерны сульфатированные гликоspfинголипиды [126] и сульфатированные стероиды [127–129].

Кроме сульфатированных соединений природного происхождения, в окружающей среде присутствует большое количество первичных и вторичных эфиров алкилсульфатов: поверхностно-активные вещества, гербициды, аэрозоли, используемые в косметических, медицинских, сельскохозяйственных, промышленных целях и представляющие экологический риск для почвенных и водных экосистем [130–133].

Таблица 1 – Сравнительная таблица семейств сульфатаз и их основные характеристики

Семейство сульфатаз (классификация [45])	Консервативные аминокислотные мотивы	Каталитические остатки	Металл в активном центре	Механизм действия	Основные охарактеризованные
S1	[C/S]X[P/A]XRX ₄ TG – основной мотив семейства S1	Cys/Ser → FGly — каталитический нуклеофил Arg – стабилизация FGly	Ca ²⁺ или Mg ²⁺ [4, 93]	Гидролиз сульфатированной молекулы осуществляется при наличии в активном сайте Ca-формилглицина (FGly), выполняющего роль каталитического нуклеофила, и протекает через образование промежуточного фермент-субстратного комплекса [4].	1) AtsA из <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (кристаллическая структура) [134] 2) ARSA [135] 3) ARSB [136] 4) SULF1 и SULF2 [137]
	PXNX ₆ D[D/Q][L/M][G/R]	Две Asp координируют ион металла			
	[N/D]TX ₁₀ D[N/H]G	Asp и Asn координируют ион металла; Asn - активация остатка FGly; Thr, Gly – связывание металла			
	G[R/E]YXTX ₈ GEX ₄ KHX ₅ H	Консервативные аминокислоты: Gly, Tyr, Gly и Lys			
	P[F/W]FLX ₆ [P/Y]H	Pro – структурно-важная аминокислота; His – в активном центре			
Ряд высококонсервативных аминокислот, важных для фолдинга, катализа найдены вне специфических консенсусных участков [4]					
S2	HX[D/E]X _n H	Два His и Asp вовлечены в координацию металла	Fe ²⁺	Fe (II) α-кетоглутарат зависимые диоксигеназы расщепляют сульфатированные эфиры с образованием соответствующего альдегида и неорганического сульфата. Для реакции требуется α-кетоглутарат (αКГ) в качестве ко- субстрата и наличие в активном центре иона железа (Fe ²⁺) [4, 138].	Алкилсульфатаза AtsK из <i>Pseudomonas putida</i> S-313: решена кристаллическая структура [104, 105];
	GGDT	Thr и два Arg вовлечены в координацию ко-субстрата			
	RVMHR				
	DNLWVHTN _x AY _{x2} DY	Последовательность алкилсульфодиоксигеназ			
S3	FX[T/S]HXHXDHX ₂ GX ₄ L	Консервированный His вблизи сульфат-связывающего сайта действует как общая кислота для протонирования сульфат-уходящей группы.	два атома Zn ²⁺	Zn ²⁺ -зависимые β-лактамазы (MBLs) содержат в активном центре два атома Zn ²⁺ , необходимые для активации молекулы воды с образованием гидроксил-иона. Гидроксильный ион, соединяющий ионы металлов, обычно функционирует как нуклеофил. Данный класс ферментов способен гидролизовать сульфатированные эфиры двумя путями: с сохранением или изменением стереохимической конфигурации образующегося в процессе реакции спирта [4, 139, 140].	Способны гидролизовать ДДС-- Na. SdsA1 , алкилсульфатазы из <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> DSM6611 [140, 141]
	AENATHLHNLTYLRGAKVR	Образует петлю для узнавания и связывания сульфата			
S4	[T/S]HXHXD		два Zn ²⁺	По ключевой «подписи» соответствуют глиоксалазам или металло-β-лактамазам .	AtsA из <i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> [102]

1.2.1.2 Разнообразие микробных сульфатаз

Сульфатазы у прокариотических и эукариотических организмов исследовали на протяжении долгого времени (нескольких десятилетий) волнообразно, их функции незаслуженно считали ограниченными, способными лишь расщеплять органические сульфатированные соединения почв. Со временем, исследования и получение новых данных о сульфатазах человека изменили представление о функциях и роли этих ферментов. Было показано, что сульфатазная недостаточность у человека приводит к ряду наследственных лизосомальных нарушений, после чего стало понятно, что человеческие сульфатазы являются одними из важнейших компонентов в регуляции гормонов, в процессах, связанных с возникновением раковых заболеваний, репродуктивных процессов, а также в развитии костей и хрящей [45]. На сегодняшний день огромное количество работ во всем мире, касающихся сульфатаз и их субстратов, – сульфатированных биомолекул, посвящено исследованию сульфатазной активности в тканях человека, поиску соответствующих ингибиторов стероидных сульфатаз в качестве мишени для терапии развития гормонально-зависимых видов рака [129, 142–144], изучению мутаций, ответственных за проявление множественной сульфатазной недостаточности у человека [145, 146], а также исследованию роли внеклеточных человеческих сульфатаз в модификации сульфатированных гликозаминогликанов для клеточной сигнализации при развитии онкологических заболеваний [147–149]. Несмотря на практическую значимость человеческих сульфатаз, исследования этих ферментов, выделенных из бактерий, низших эукариотических организмов, а также морских беспозвоночных, не менее важны. Биологическая роль микробных сульфатаз интересна не только для расширения фундаментальных знаний об этом классе ферментов, но и с целью их применения в промышленности, сельском хозяйстве.

Сульфатазы из бактерий. Сульфатазы являются важной и необходимой частью жизнедеятельности бактерий [103, 150]. Ряд исследований, в том числе и протеомных, показали, что при отсутствии в среде простых серосодержащих соединений, бактерии синтезируют специальные белки, которые они используют для утилизации альтернативных источников серы, например, сульфонов ($R-SO_3^-$), сульфатированных эфиров ($R-OSO_3^-$), метионина, сульфаматов ($R-NHSO_3$), органосульфидов ($R-SS-R'$) или тиоэфиров ($R-S-R'$) [2]. В условиях сульфатного голодания у бактерий образуются резервные белки трёх типов: (i) ферменты и транспортные системы, участвующие в метаболизме серосодержащих компонентов из окружающей среды, аналогичные ферментам, индуцирующимся при фосфатном голодании для утилизации фосфонатов и фосфатных эфиров (у *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* это белки, связанные с периплазмой); (ii) копии функционально-важных клеточных белков, где остатки

цистеина и метионина, в случае их незначимой роли, заменены на другие аминокислотные остатки; (iii) белки, участвующие в перераспределении серы внутри клетки. Более гибкий геном бактерий содержит в себе гораздо большее количество генов сульфатаз, относящихся к разным семействам и работающим по субстратам различной природы и структуры, используя различные механизмы. Прокариотические сульфатазы входят во все четыре семейства сульфатаз [4]. При этом семейства S2 и S4 представлены исключительно бактериями. Например, несмотря на то, что Fe(II)-альфа-кетоглутарат-зависимые гидроксилазы широко распространены среди про- и эукариотических организмов [99], сульфатазы, относящиеся к этому семейству, свойственны только бактериям трёх видов и ни одного эукариотического организма с сульфатазой семейства S2 на сегодня не обнаружено [4]. Семейство S4 немногочисленно, но тоже состоит исключительно из бактериальных ферментов.

Для патогенных бактерий *P. aeruginosa*, способных использовать широкий спектр сульфатированных соединений для роста, гены, кодирующие сульфатазы и сульфонатазы, а также комплекс генов, кодирующих белки транспортных систем, белки окислительного стресса и сульфат-регулирующие белки, являются регулируемыми при ограничении сульфатов и локализованы в различных участках генома [151, 152]. Арилсульфатазы относительно широко распространены среди представителей рода *Mycobacterium*, включая патогенов человека, *M. tuberculosis* и *M. avium*. Геном *M. tuberculosis* содержит девять предполагаемых генов сульфатаз [153]. Наряду с другими стандартами, арилсульфатазная активность используется для таксономического определения и классификации бактерий этого рода [154]. Наличие у микобактерий от 3 до 6 предполагаемых сульфатаз было показано при сравнении аминокислотных последовательностей с аминокислотными последовательностями уже охарактеризованных сульфатаз. Более того, сравнение этих последовательностей указывает на большое сходство консервативных участков микобактериальных сульфатаз с сульфатазой из *P. aeruginosa* [154]. При росте почвенной бактерии *P. aeruginosa* FLA на питательной среде, содержащей 2-(2,4-дихлорофенокси)этил сульфат (гербицид Крэга), она экспрессирует до шести алкил/арилсульфатаз, что было обнаружено методом зимографии [155].

Локализованы бактериальные сульфатазы обычно внутри клетки, либо связаны с клеточной стенкой. Так, у почвенной бактерии *Pseudomonas* C12B [156] и *Klebsiella pneumoniae* [157] сульфатазная активность обнаружена в периплазме. На клеточной же поверхности патогенных штаммов *Mycobacterium* сульфатазы играют важную роль во взаимодействиях хозяин-патоген [158].

Ряд бактериальных сульфатаз получен в виде рекомбинантных белков [158, 159], для некоторых из них исследованы кристаллические структуры. Так, алкилсульфатаза AtsK из *Pseudomonas putida* S-313 стала первым ферментом с решённой кристаллической структурой из

сульфатаз семейства Fe(II)- α -кетоглутарат-зависимых диоксигеназ. Кристаллические структуры AtsK были получены в апо-форме, а также в виде комплексов с ко-субстратом, ионом железа и алкилсульфатом [104]. Помимо этого, решены кристаллические структуры сульфатазы из патогена *Mycobacterium tuberculosis* Rv3406 [153], алкилсульфатазы из *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas* sp. DSM6611 [140, 141].

Сульфатазы из дрожжей и мицелиальных грибов. Наличие ферментов сульфатаз характерно и для низших эукариотических организмов (дрожжей, мицелиальных грибов и микроводорослей). Однако подробная характеристика этих ферментов, полученных из дрожжей и мицелиальных грибов, в научной литературе представлена крайне скудно. Лишь три работы посвящены биохимической характеристике грибных сульфатаз и одна – сульфатазе из дрожжей. К ним относятся сульфатазы из *A. oryzae* NRRL-449 [47, 160], *A. nidulans* [48], *A. awamori* R-0827 и *A. sojae* SH 10-6 [49], а также рекомбинантная арилсульфатаза из *Kluyveromyces lactis* GG799 [50]. Недавно была выполнена биохимическая характеристика рекомбинантной холин-*O*-сульфатазы F.p.Sulf-6His из мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1, экспрессированная в системе *Pichia pastoris* [161]. В основном, в литературе описаны случаи детектирования сульфатаз дрожжей и грибов при росте культур на твёрдых питательных средах, либо обнаруженные цитохимическими и генетическими методами. Так, цитохимическими методами описаны арилсульфатазы в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а позже и гены, кодирующие синтез алкил- и арилсульфатаз в дрожжах *S. cerevisiae* и *S. bayanus* [162, 163]. Патогенные дрожжи *Candida dubliniensis*, *C. albicans*, *Malassezia pachydermatis* экспрессируют, наряду с набором гидролитических ферментов, хондроитин сульфатазу, что, предположительно, является одним из основополагающих факторов их вирулентности [164–167]. Наиболее широко встречающимися продуцентами ферментов сульфатаз среди мицелиальных грибов является род *Aspergillus* [47–49, 160, 162, 168–172]. Кроме них, единичными примерами продуцентов сульфатаз являются грибы родов *Neurospora*, *Botrytis*, *Trichoderma* [162, 173–176] (Таблица 2). Чаще всего сульфатазы из грибов — это внутриклеточные ферменты, хотя встречаются и секретируемые [49]. Согласно основной классифицирующей базе данных для ферментов сульфатаз SulfAtlas, на сегодняшний день детектированные сульфатазы или, что чаще, предполагаемые гены сульфатаз из грибов принадлежат только двум семействам: S1 (FGly-зависимые сульфатазы) и S3 (Zn²⁺-зависимые β -лактамазы).

Таблица 2 – Сульфатазы из грибных источников и их основные характеристики

Организм	Физико-химические параметры	Субстрат (кинетические параметры)	Влияние ионов металлов и различных соединений на активность фермента	Описание*	Ссылка
Дрожжи					
<i>Kluyveromyces lactis</i> GG799 (гомологичная экспрессия)	T _{опт.} = 45–50 °С; T _{стаб.} = 37 °С (после 2 ч) остаточная активность 79%; pH _{опт.} 9–10; pH _{стаб.} 7,5–9,0	<i>n</i> НФС (K _M = 0,54 мМ; V _{макс} = 16,58 нкат · мл ⁻¹ A _{уд} = 152.7 ± 3.1 нкат·л)	20 мМ ЭДТА не ингибирует активность. 20 мМ Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺ слегка увеличивают активность (130, 116 и 111%, соответственно). 20 мМ Zn ²⁺ полностью ингибирует. 50 мМ Na ₂ SO ₄ , MgSO ₄ или K ₂ SO ₄ ингибирует активность сульфатазы на 20%	для фермента ДТ характерна низкая внутриклеточная активность, рекомбинантная сульфатаза – секретируемая; рекомбинантный белок получен в гомогенном виде; применяется для ароматизации сыров.	[50]
		<i>n</i> -крезол сульфат (K _M = 5,45 мМ; V _{макс} = 2,95 нкат·мл ⁻¹)	Остаточная активность при добавлении <i>n</i> -крезола: 1 мМ - 95%; 5 мМ – 91%; 10 мМ – 89%; 25 мМ – 71%; 50 мМ – 36%.		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> штамм C8	культивирование при pH 5,5.	6-Бromo-2-нафтил сульфат, <i>n</i> НКС, 8-гидроксиинолин сульфат.	Не определено	Внутриклеточный; цитохимическая детекция при росте на твердой питательной среде	[162]
<i>S. cerevisiae</i>	Не определено	Додецил сульфат натрия, октил сульфат, <i>n</i> НКС	Не определено	детекция при росте на твердой питательной среде штаммов ДТ и мутантного в гене <i>BDS1</i> (алкил-/арилсульфатаза)	[163]
<i>S. bayanus</i>		Додецил сульфат натрия			
<i>Candida albicans</i> / <i>C. tropicalis</i> / <i>C. parapsilosis</i> / <i>C. guilliermondii</i> / <i>C. krusei</i> / <i>C. dubliniensis</i> / <i>Malassezia pachydermatis</i>	культивирование при 37°C	Хондроитин сульфат	Не определено	активность хондроитин сульфатазы детектирована при росте на твердой питательной среде	[164–167]
Мицелиальные грибы					
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL-449	при pH 4,8 стабилен 1 мес. замороженный; стабильность при 37,5 °С: теряет 1% за 50 мин, 2% за 60 мин.; pH _{опт.} 4,8; pH _{стаб} 4,0–6,0	2НФС; 3НФС; <i>n</i> НФС (pH 4: V _{макс} = 1,59 мМ/мин; pH 7,5: V _{макс} = 6,46 мМ/мин); 2,4-диНФС; 2-хлоро-4-НФС; салицил сульфат.	Металлы не влияют на активность. После обработки ЭДТА: Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ - 30%; Pb ²⁺ , Al ³⁺ - 50%. Ингибирование: <i>n</i> НФС [10 мМ]; флюорид; сульфит	молекулярный вес нативного фермента 65 кДа.	[47, 160]
<i>A. nidulans</i> (фракция I)	T _{опт.} = 45 °С; стабилен до 55 °С; за 15 мин при 70 °С теряет 50% активности; pH _{опт.} 6,5–8,7 pH _{стаб.} 6,5–8,7	<i>n</i> НФС (фр. 1: K _M =0,035мМ; фр. 2: K _M =0,1 мМ); Фенил сульфат; <i>o</i> НКС; Фенолфталеин дисульфат. НЕ активны в отношении: индоксил сульфата и холин О-сульфата.	Не определено	внутриклеточный фермент; молекулярный вес 44 кДа	[48]
<i>A. nidulans</i> (фракция II)	реакция при pH 7,4			внутриклеточный фермент	
<i>A. awamori</i> R-3523; <i>A. inuii</i> R-3631, R-1210; <i>A. niger</i> ; <i>A. oryzae</i> A, KB, K, A 1-5, №35, S4-15; <i>A. phoenicis</i>	Не определено	<i>n</i> НФС	Не определено		[49]

Продолжение таблицы 2

Организм	Физико-химические параметры	Субстрат (кинетические параметры)	Влияние ионов металлов и различных соединений на активность фермента	Описание*	Ссылка
R-0638; <i>A. sojae</i> SH 10-1, SH 10-3, SH 21 <i>A. usamii</i> R-1031					
<i>A. awamori</i> R-0827	стабилен 1 час 20°C при pH 9,0; pH _{опт.} 8,5 pH _{стаб.} 7,0-10,0	<i>л</i> НФС	Ag ⁺ , Zn ²⁺ , и Hg ²⁺ Cd ²⁺ , Al ³⁺ и Fe ²⁺ ингибируют NaF PCMB KH ₂ PO ₄ Na ₂ B ₄ O ₇	секретируемый фермент	
<i>A. sojae</i> SH 10-6	pH _{опт.} 8,5 pH _{стаб.} 7,0-10,0				
<i>Fusarium proliferatum</i> LE1	T _{опт.} = 25 °C; pH _{опт.} 6,0 pH _{стаб.} 6,0	<i>л</i> НФС (K _м =2,45 мМ) Холин <i>O</i> -сульфат	После ЭДТА активна при добавлении Ca ²⁺ или Mn ²⁺ . SO ₄ ²⁻ практически не влияет. Повышение концентрации NaCl снижает активность. ДТГ и β-меркаптоэтанол не влияют. ФМСФ слегка ингибирует.	рекомбинантный фермент, внутриклеточный; тетрамер, 1 субъединица - 63 кДа	[161]
<i>A. oryzae</i> D4; <i>A. nidulans</i> D3; <i>Neurospora crassa</i> D12	Культивирование при pH 5,5.	6-Бromo-2-нафтил сульфат; <i>л</i> НКС; 8-гидроксихинолин сульфат		внутриклеточный фермент	[162]
<i>A. nidulans</i>	T _{опт.} = 25-28 °C; pH _{опт.} 7,5 pH _{стаб.} 6,8 - 8,3 >60%	Холин <i>O</i> -сульфат (K _м = 3,5мМ)	10 мМ SO ₃ ²⁻ , PO ₄ ³⁻ и CN ⁻ , цистеин - 100% ингибирование; SO ₄ ²⁻ , F ⁻ - 25% ингибирование, цистеин (до 1 мМ) – до 75% ингибирование	внутриклеточный фермент; грубый экстракт	[168]
<i>A. oryzae</i>	pH _{опт.} 6,3	<i>л</i> НФС (K _м =0,048 мМ)		молекулярный вес нативного фермента 100 кДа	[169]
<i>A. oryzae</i> (фракция I)		<i>л</i> НКС; тирозин сульфат ^a		молекулярный вес 105 кДа, внутриклеточный.	
<i>A. oryzae</i> (фракция II)		<i>л</i> НКС (тирамин повышает ак-ть); тирозин сульфат (слабая активность); 2-гидрокси-5-НФС и <i>л</i> НФС ^b	Не определено	молекулярный вес 140 кДа, внутриклеточный	[170, 171]
<i>A. oryzae</i> (фракция III)		<i>л</i> НКС (тирамин повышает ак-ть) ^a		молекулярный вес 57 кДа, внутриклеточный	
<i>A. parasiticus</i> NRRL 3145	Измерение активности при pH 7,0, 37°C	<i>л</i> НКС (4,6 ед./мг)			
<i>A. flavus</i>		<i>л</i> НКС (2,5 ед./мг)	Не определено	внутриклеточный фермент; получен в виде грубого клеточного экстракта	[172]
<i>N. crassa</i>		<i>л</i> НФС			[173, 174]
		<i>D</i> -глюкоза-6-S ³⁵ O ₄	Не определено	инкубирование мицелия с меченым субстратом; внутриклеточный фермент	[175]
	Измерение активности при pH 7,2, 37°C Измерение активности при pH 8,1, 37°C	Холин <i>O</i> -сульфат <i>л</i> НФС		внутриклеточный фермент; получен в виде грубого клеточного экстракта	[177]
<i>Trichoderma viride</i>	T _{опт.} = 28 °C; pH _{опт.} 7,5-7,9	<i>D</i> -глюкоза-6- <i>O</i> -сульфат <i>D</i> -галактоза-6- <i>O</i> -сульфат	Не определено	внутриклеточный фермент	[176]

(*). Графа “Описание” включает всю доступную информацию об исследованных сульфатазах.

1.3 *O*-Гликозидгидролазы: общие сведения

O-Гликозидгидролазы (гликозидазы или карбогидразы) – большая по численности группа ферментов класса гидролаз (п. 1.2), представители которой катализируют гидролитическое расщепление *O*-гликозидной связи и являются ключевыми ферментами метаболизма углеводов практически всех живых организмов. Большое разнообразие известных ферментативных активностей гликозидгидролаз связано с огромным числом их природных субстратов – ди-, олиго- и полисахаридов, а также их производных [178]. При этом эффективность каталитической активности многих из этих ферментов составляет порядка до 10^{17} раз по сравнению с неферментативным расщеплением [179]. *O*-Гликозидгидролазы, в большинстве своём, высоко специфичны по отношению к типу расщепляемой гликозидной связи, α - или β -конфигурации гликозидного атома и структуре гликоновой части, но достаточно лабильны относительно структуры агликона. На основании структуры расщепляемого субстрата, гликозидазы, гидролизующие олиго- и полисахариды, подразделяют две группы — ферменты *экзо*- и *эндо*-типа. Так, *экзо-гликозидазы*, или *гликозидазы*, катализируют отщепление концевых остатков соответствующего сахара от ди- или олигосахаридов. *Экзо-гликаназы* катализируют отщепление концевых остатков моно- или олигосахаридов от исходного гомополисахарида. Например, β -амилаза расщепляет вторую с конца α -1,4-гликозидную связь в молекулах крахмала, образуя, таким образом, дисахарид мальтозу (дисахарид, состоящий из двух остатков глюкозы). *Эндо-гликаназы*, в свою очередь, расщепляют внутренние гликозидные связи в цепи гомо- или гетерополисахаридов.

Активный центр ферментов, действующих на полимерные субстраты, состоит из участков или сайтов, каждый из которых связывает мономерный остаток полимера. Согласно номенклатуре Дэвиса [180], субсайты связывания с не восстанавливающего конца субстрата обозначают как $-n$, с восстанавливающего как n , а расщепление происходит между -1 и $+1$ субсайтами. Эндо-гликаназы расщепляют полисахариды с нередуцирующего конца от $-n$ до $+n$ (Рисунок 1, А). Экзо-гликозидазы, содержат только два сайта связывания (-1 и $+1$), но с небольшой специфичностью к $+1$; они специфичны к моносахаридной молекуле, но менее специфичны к агликоновой части субстрата (Рисунок 1, Б). Дисахаридазы, аналогично экзо-гликозидазам, являются -1 , $+1$ ферментами, но при этом требовательны к $+1$ сахару (Рисунок 1, Б). Экзо-гликаназы, как правило, расщепляют полисахарид с нередуцирующего конца: характерно отщепление либо моносахарида с нередуцирующего конца от полимерного субстрата -1 , $+n$ при условии $n > 1$ (Рисунок 1, В), либо дисахарида -2 , $+n$ ($n > 1$) (Рисунок 1, Г). Целлобиогидролазы, относящиеся к экзо-гликаназам, могут осуществлять гидролиз и с

редуцирующего конца молекулы субстрата: отщепление целлобиозы происходит с редуцирующего конца полимера с обозначением субсайтов +2, -n (Рисунок 1, Д).

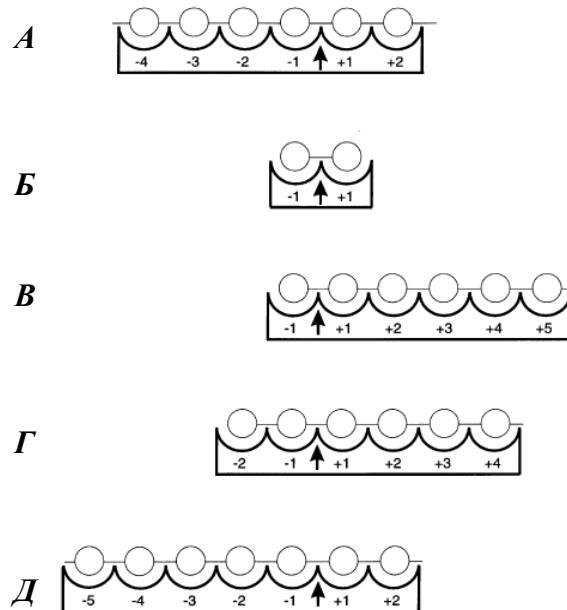


Рисунок 1 – Схематическое изображение углевод-связывающих субсайтов некоторых гликозидгидролаз [180]: (А) эндо-гликаназы, (Б) гликозидазы и, возможно, экзо-гликаназы (дисахаридазы); (В) и (Г) - экзо-гликаназы, действующие с редуцирующего конца; (Д) - экзо-гликаназы (целлобиогидролазы), действующие с нередуцирующего конца.

Согласно традиционной (биохимической) классификация ферментов (п. 1.2), все гликозидазы имеют номера КФ 3.2.1.x, что говорит о том, что фермент гидролизует O-гликозидную связь, а значение «x» может быть от 1 до 207 в зависимости от субстратной специфичности фермента (зависит от структуры гликоновой части фермента) [181]. При использовании этой системы классификации возникают сложности для многофункциональных ферментов, которые проявляют несколько типов активности и не обладают строгой специфичностью. Некоторые гликозидазы наряду с гликозил-гидролазной (К.Ф. 3.2.1), проявляют еще и трансгликозидазную активность (К.Ф. 2.4.1), что формально позволяет рассматривать их как представителей другого класса ферментов – трансфераз. Таким образом, данная классификация полезна, но часто не полностью отражает структурные и механистические особенности ферментов [178].

Существуют другие доступные типы классификаций гликозидаз. Одной из наиболее часто используемых является классификация гликозидгидролаз, основанная на сравнении их аминокислотных последовательностей. Впервые классификацию по аминокислотной последовательности и фолдингу белка предложил в 1991 году Бернард Хенриссат [182], а впоследствии возникло объединение эволюционно-родственных семейств в кланы [183] на более

высоком иерархическом уровне. Примером такой двухуровневой классификации *O*-гликозидгидролаз является база данных CAZy (Carbohydrate Active enZYmes database, <http://www.cazy.org/>) [55], учитывающая гомологию аминокислотных последовательностей, сходство пространственной структуры и механизм действия ферментов. При использовании такой классификации можно достаточно точно предсказать возможные биохимические активности неисследованных ферментов с недавно определёнными последовательностями. На сегодняшний день структурная классификация охватывает более 564 тысяч аминокислотных последовательностей *O*-гликозидгидролаз (GH, glycoside hydrolases) и их гомологов, объединённых в 156 семейств (GH family). Каждое семейство имеет сходство первичных и вторичных структур. 62 семейства сгруппированы в 18 кланов в зависимости от особенностей пространственной структуры их каталитических доменов [55].

Относительно стереохимии гидролиза, большинство известных *O*-гликозидгидролаз для осуществления реакции используют один из двух канонических механизмов гидролиза: с *сохранением* или *изменением* аномерной конфигурации молекулы субстрата [184]. Оба механизма работают через переходные состояния, связанные с оксокарбениевым-ионом и требуют для осуществления пару функциональных групп карбоновой кислоты (либо аспарагиновой кислоты, либо глутаминовой кислоты) в качестве каталитических остатков [185]. Для «обращающих» GH одна карбоксильная группа функционирует как общее основание и активирует молекулу воды для нуклеофильной атаки в анодном центре субстрата, а другая — как общая кислота и облегчает уход уходящей группы путём общего кислотного катализа (Рисунок 2, А). Обращающие гликозидазы катализируют реакцию гидролиза в одну стадию путём прямого смещения агликона, а переходное состояние имеет ионоподобные характеристики оксокарбения. Ключевые каталитические остатки обычно разделены на несколько большее расстояние, чем у сохраняющих гликозидаз. Это необходимо для размещения молекулы воды и субстрата в активном центре и является одним из фундаментальных различий между двумя основными механизмами гликозидаз. «Сохраняющие» гликозидазы действуют по общепринятому механизму двойного замещения S_N2 , предложенному Koshland [186], который предполагает последовательное осуществление двух нуклеофильных атак и включает стадии гликозилирования и дегликозилирования. Для работы «сохраняющих» гликозидаз требуются две ключевые аминокислоты: (1) каталитический нуклеофил и (2) общий кислотно-основной каталитический остаток (Рисунок 2, Б). Чаще всего оба каталитических остатка являются карбоновыми кислотами – глутаминовая или аспарагиновая кислота. Для сохраняющих GH одна карбоксильная группа функционирует в качестве катализатора на основе кислота/основание, а другая в качестве нуклеофила. Каталитический нуклеофил подходящим образом расположен для линейной атаки на аномерный центр, а вторая аминокислота находится в непосредственной

близости от гликозидного кислорода и подаёт протон этому кислороду во время стадии нуклеофильного смещения, тем самым обеспечивая общий кислотный катализ уходящей группы. На этой стадии *гликозилирования* промежуточное соединение ковалентного гликозил-фермента образуется через ионоподобное переходное состояние оксокарбения. Общий кислотный катализатор теперь депротонирован и действует как общее основание на второй стадии путем активации молекулы воды для нуклеофильной атаки в аномерном центре промежуточного соединения гликозил-фермент. Этот второй этап называется стадией *дегликозилирования* и также протекает через ионоподобное переходное состояние оксокарбения. Таким образом, для гидролиза субстрата требуются две стадии нуклеофильного смещения, широко известные как механизм двойного смещения.

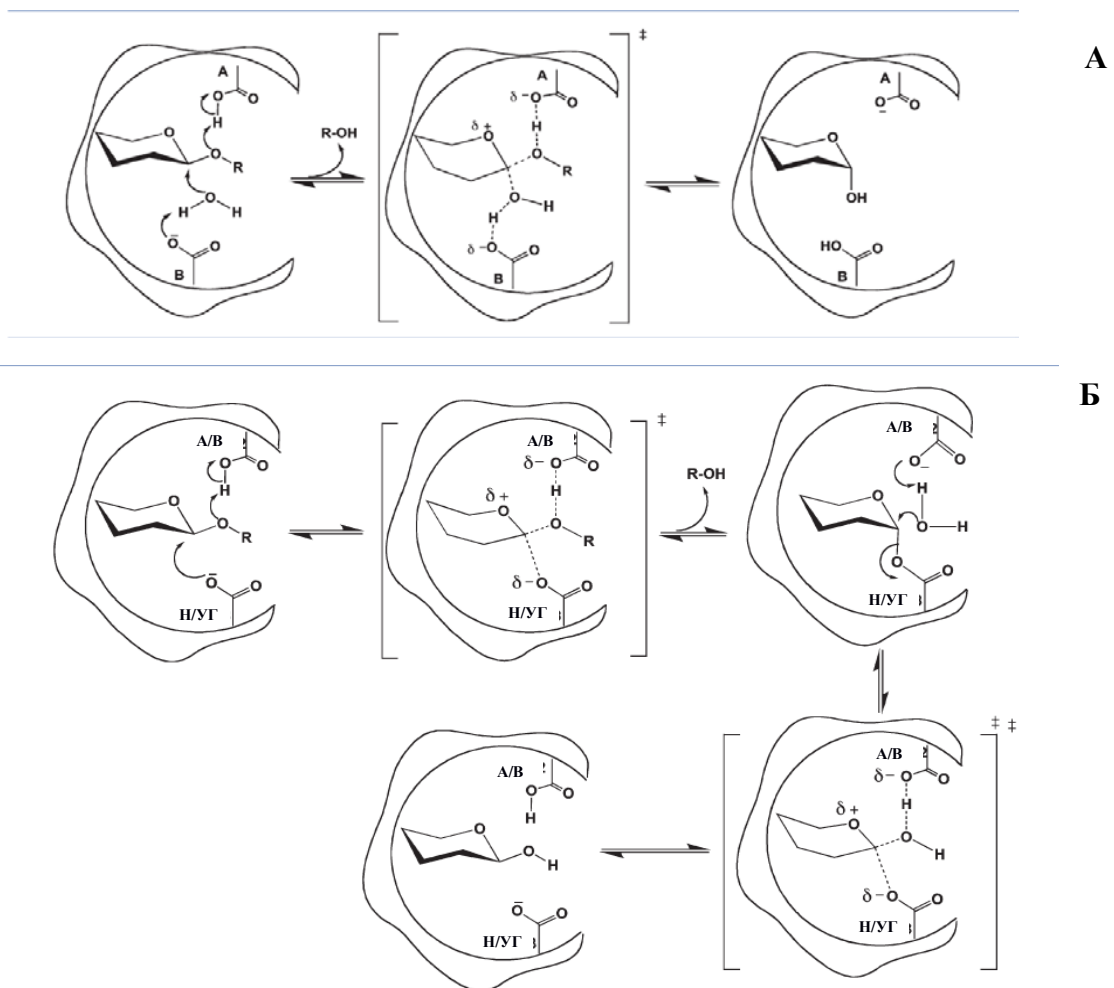


Рисунок 2 – Предполагаемый механизм действия обращющих (А) и сохраняющих (Б) гликозидаз (иллюстрация заимствована из [187]). А: А соответствует каталитическому кислотному остатку, В – каталитическому основному остатку. Б: А/В соответствует кислотно-основному каталитическому остатку, а Н/УГ соответствует остатку нуклеофил/уходящая группа.

При использовании классификации CAZy можно предсказать каталитические и молекулярные свойства фермента и механизм действия. Классификация гликозидаз на основе сходства последовательностей имеет большое значение: (1) подтверждено, что ферменты из одного и того же семейства имеют одинаковую стереоселективность, а, следовательно, используют одинаковый каталитический механизм; (2) схожая укладка и топология активного сайта являются отличительными признаками одного и того же семейства, что подтверждает общность этой классификации и дает возможность при идентификации каталитических остатков одной гликозидазы легко предсказать путем выравнивания последовательности соответствующие остатки для других членов одного и того же семейства; (3) если структурная информация доступна для одного члена семьи, то можно построить модели гомологии между членами из того же семейства и почерпнуть много полезной информации [184].

1.3.1 Альфа-*L*-фукозидазы: классификация и механизм действия

Среди ферментов *O*-гликозидгидролаз в модификации структурно-разнообразных природных фукозилированных молекул принимают участие ферменты α -*L*-фукозидазы (син. α -фукозидаза; систематическое название: α -*L*-фукозид фукогидролаза). Эти ферменты встречаются у представителей всех царств живой природы от архей и бактерий до эукариотических организмов [10, 12–15, 51, 53, 188–192]. Альфа-*L*-фукозидазы — ферменты экзо-действия, способные катализировать отщепление *L*-фукозильных концевых остатков, связанных различными типами связей.

В Номенклатуре ферментов «КФ» α -*L*-фукозидазы отнесены к нескольким группам (КФ 3.2.1.51, КФ 3.2.1.63, КФ 3.2.1.111 и КФ 3.2.1.127) в зависимости от типа гидролизуемой связи между *L*-фукозой и другими сахарами в углеводной цепи. Альфа-*L*-фукозидазы катализируют последовательное отщепление *L*-фукозильных остатков в $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$, $\alpha(1\rightarrow4)$ и $\alpha(1\rightarrow6)$ положении в олигосахаридных цепях от невосстанавливающего конца. Альфа-*L*-фукозидазы группы КФ 3.2.1.51 не разделяются по типу связи, сюда входят фукозидазы с широкой субстратной специфичностью. В свою же очередь три другие группы α -*L*-фукозидаз систематизированы в соответствии с типом расщепляемой связи. В группу КФ 3.2.1.63 входят 1,2- α -*L*-фукозидазы, высокоспецифичные относительно невосстанавливающих концевых *L*-фукозных остатков, связанных с остатками *D*-галактозы с помощью $\alpha(1\rightarrow2)$ -связи. Примерами таких ферментов являются узкоспецифичная α -фукозидаза из *Aspergillus niger* [193], α -фукозидаза из миндальной эмульсии [194], а также α -фукозидаза из морского моллюска *Chamelea gallina* L. [195]. КФ 3.2.1.111 включает 1,3- α -*L*-фукозидазы, которые осуществляют гидролиз (1 \rightarrow 3)-связей между α -*L*-фукозой и остатками *N*-ацетилглюкозамина в гликопротеинах

(характерно для некоторых фукозидаз миндальной эмульсии) [194, 196, 197]. А группа КФ 3.2.1.127 включает 1,6- α -*L*-фукозидазы, осуществляющие гидролиз (1 \rightarrow 6)-связей между α -*L*-фукозой и *N*-ацетил-*D*-глюкозаминами в гликопептидах [189].

В соответствии с классификацией ферментов, представленной в базе данных CAZy [55], α -*L*-фукозидазы принадлежат к 29 (GH29) и 95 (GH95) структурным семействам гликозидгидролаз. Эти семейства отличаются между собой механизмом катализа реакций гидролиза фукозидных связей. Ферменты α -фукозидазы, отнесенные к 95 семейству *O*-гликозидгидролаз (КФ 3.2.1.51, КФ 3.2.1.63) катализируют процесс гидролиза фукозидной связи с изменением аномерной конфигурации углеродного атома в молекуле *L*-фукозы при образовании продукта реакции (обращающие ферменты). Представители 29 семейства α -фукозидаз (КФ 3.2.1.51, КФ 3.2.1.111) (сохраняющие ферменты) используют механизм двойного замещения S_N2 , который протекает через образование ковалентно-связанного субстрат-ферментного промежуточного комплекса, что в результате приводит к сохранению стереохимической конфигурации аномерного центра. На основании субстратной специфичности и данных филогенетического анализа, семейство GH29 разделено на два подсемейства [51]. Подсемейство А содержит α -*L*-фукозидазы (ЕС 3.2.1.51) с относительно широкой субстратной специфичностью и способные гидролизовать синтетический субстрат *n*-нитрофенил α -*L*-фукопиранозид (*p*NPFuc). Альфа-*L*-фукозидазы (ЕС 3.2.1.111) из подсемейства В являются специфическими для α -(1 \rightarrow 3/4)-фукозидных связей и практически не могут гидролизовать *p*NPFuc.

1.3.1.1 Распространение α -*L*-фукозидаз

В виду важности фукозилированных молекул в метаболизме и жизнедеятельности всех организмов, работа ферментов α -*L*-фукозидаз крайне важна для протекания биохимических процессов: *L*-фукозидазы играют роль в защите растений [198, 199], а также принимают участие в процессах, происходящих при воспалениях, метастазировании, развитии генетического заболевания фукозидоз у человека [7, 200, 201]. Поскольку эти ферменты могут избирательно удалять *L*-фукозу, не нарушая общую структуру целой фукозилированной молекулы, они являются важными инструментами для определения структуры и биологических функций различных фукоолигосахаридов [51].

Согласно информации, отражённой в базе данных CAZy, семейство α -фукозидаз семейства GH29 (на 04.04.2018) включает 2734 последовательностей, где лишь 111 последовательностей являются эукариотическими и всего 33 фукозидазы из различных источников считаются

охарактеризованными; GH95 представлено 1409 последовательностями, из которых 41 являются эукариотическими и охарактеризовано 9 ферментов [55].

Среди мицелиальных грибов α -L-фукозидазы выделены и охарактеризованы из представителей родов *Fusarium* [14, 52, 202], *Aspergillus* [193], *Penicillium* [56] (Таблица 3), являющихся, в частности, растительными патогенами.

Среди бактериальных штаммов, α -фукозидазы охарактеризованы из молочнокислых бактерий *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* [15, 203, 204]. Считается, что олигосахариды из грудного молока не расщепляются и не усваиваются в кишечном тракте, поэтому они не используются организмом человека в качестве питательных веществ. Однако несколько семейств кишечных бактерий, таких как *Bacteroidaceae* и *Bifidobacteriaceae* (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *B. bifidum*, в меньшей степени *B. longum* subsp. *longum* и *B. breve*) разрушают молочные олигосахариды, используя комплекс ферментов, включающих α -фукозидазы, сиалидазы и β -галактозидазы, а затем используют моносахариды в качестве источника энергии. В этом отношении молочные олигосахариды, в том числе и фукозилированные, способствуют формированию микробиоты кишечника младенцев уникальными штаммами бактерий [9, 203].

У многих организмов морского происхождения (бактерии-эпифиты, грибы, морские беспозвоночные) также присутствуют α -L-фукозидазы. Возможно, наличие ферментов фукозидаз у этих организмов объясняется большим изобилием фукозилированных соединений в этой среде обитания, а также содержанием таких соединений у самих беспозвоночных.

1.3.1.2 Выделение α -фукозидаз

У бактерий и грибов α -L-фукозидазы, как правило, являются секретлируемыми ферментами (Таблица 3). Единственным примером внутриклеточной локализации фермента служит бактерия *Xanthomonas manihotis*, где две α -L-фукозидазы выделяли после вскрытия клеток [205].

Как правило, бактериальные или грибные фукозидазы являются индуцибельными ферментами. Поэтому при подборе условий выращивания грибного или бактериального продуцента для максимального выхода α -L-фукозидазы, в питательную среду добавляют либо фукозосодержащие соединения (фукоидан, свиной желудочный муцин [206, 207]), либо конечный продукт действия фермента – L-фукозу (Таблица 3). Впервые индукция α -фукозидазы L-фукозой выполнена при культивировании мицелиального гриба *A. oxysporum* [52], а сегодня примеры индукции фермента конечным продуктом гидролиза показаны и используются и для α -фукозидаз из других организмов. При исследовании влияния прочих углеводных источников, индуцирующее влияние на секрецию α -L-фукозидаз оказывает D-арабиноза – моносахарид из

Таблица 3 – α -L-Фукозидазы дикого типа из различных источников

№	Источник фермента	Локализация фермента	Состав среды для роста (источники углерода, соли) Условия роста: pH, T(°C) и время роста (часы)	Схема выделения	Степень очистки, раз	Выход, %	Активность фермента, ед./л или ед./мг	Ссылка
Мицелиальные грибы								
1	<i>F. graminearum</i> PH-1	секретируемый	5 г/л аммоний виннокислый, 1 г/л NH ₄ NO ₃ , 1 г/л KH ₂ PO ₄ , 0.5 г/л MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0.13 г/л CaCl ₂ · 2H ₂ O, 1 г/л NaCl, 1 г/л дрожжевой экстракт. Инкубирование при комнатной температуре в течение недели без перемешивания.	В пуле ферментов обнаружен фермент α -фукозидаза. Затем получен клонированный фермент (FgFCO1), который очищен с использованием гель-фильтрации и ионообменной хроматографии [14, 213].	н.о.	н.о.	н.о.	[214]
2	<i>F. oxysporum</i> 0685	секретируемый	Культуру <i>F. oxysporum</i> с картофельно-декстрозного агара переносили на жидкую картофельно-декстрозную среду, содержащую 1% L-фукозы и выращивали без перемешивания в течение 7 дней.	1. Сульфатное осаждение (80%) 2. Обессоливание с 6-кДа эксклюзионной колонкой (BioRad 732-2010) 3. TSK gel SP-5PW 4. TSK gel Phenyl-5PW	н.о.	н.о.	н.о.	[14]
3	<i>F. oxysporum</i> S252 (из почвы) Гликозилированная фукозидаза	секретируемый	0.5% глюкоза, 0.5% пептон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl. pH 7,0, перемешивание, 30°C. Мицелий промывали дважды в 20 mM Трис-НСl (pH 8.5), а затем переносили в индущирующую среду:	1. Концентрирование 2. DEAE-Sephadex A-50 3. Sephadex G-100 [Yamamoto, 1986]	н.о.	45	110 ед./мг	[52, 202]
	<i>F. oxysporum</i> S252 (из почвы) Дегликозилированная фукозидаза	секретируемый	0,2% L-фукоза в 20 mM Трис-НСl буфере (pH 8.5). Инкубирование 24 часа при 30°C.	1-3. аналогично очистке гликозилированной фукозидазы (выше) 4. Конканавалин А-Sepharose 4B	15	6		
4	<i>Penicillium multicolor</i>	Коммерческий препарат Lactase-P2, порошкообразный культуральный бульон		1. Bio-Gel HTP-gel 2. Концентрирование Ultrafree CL2	частично-очищенный		4.4 ед./мл (41.3 ед./г).	[56]
5	<i>Aspergillus niger</i>	Коммерческий препарат «Rhozyme», культуральная жидкость		1. Q-Sepharose 2. Концентрирование Amicon PM-30	частично-очищенный		(0.033 ед./мг).	[215]
6	<i>A. niger</i>	Коммерческий ферментный продукт из <i>A. niger</i> , Rhozyme HP-150		1. Сульфатное осаждение (100%) 2. DEAE-Sephadex A-50 3. Sephadex G-150 4. DEAE-Sephadex A-50 5. Sephadex G-150	н.о.	н.о.	403.2 10 ² ед./мг	[193]
7	<i>A. niger</i>	Коммерческий грубый ферментный препарат		1. Сульфатное осаждение (100%) 2. DEAE-Sepharose CL-6B 3. Sephacryl S300 4. BIG Sepharose 4B (аффинная)	156,1	11	36.36 ед./мг	[189]
Бактерии								
8	<i>Clostridium perfringens</i> тип 33-48	секретируемый	Бульон для стрептококков (по Тодд-Хьюиту), 35; K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O, 2.36; NaCl, 2.5; глюкоза, 1.5; цистеин-НСl · 4 H ₂ O, 0.05. Культивирование при 37°C, 72 часа.	1. Сульфатное осаждение (0-80%); 2. Сульфатное осаждение (52.3-54.5%); 3. Sephadex G-75; 4. Alumina Cr eluate 5. Bentonite; 6. Vacuum dialysis.	615	0.7	418	[216]
9	<i>Thermus</i> sp. (из почвы термальных источников Камчатки)		<u>Скрининг культур</u> : на агаризованной среде с добавлением pNPFuc. <u>Культивирование</u> : 3% суспензии разрушенных клеточных стенок <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; соли, г/л: Na ₂ HPO ₄ , 6; KH ₂ PO ₄ , 3; NaCl, 0.5; NH ₄ Cl, 1. Рост 16 часов, 45°C, перемешивание. Затем перенос 0,5л культуры в 5 л той же среды 20-литрового ферментера. 2 дня, 45°C, аэрация 2 л/мин, перемешивание 700 rpm.	1. Ультрафильтрация 2. DEAE-Sephadex 3. DEAE-5PW 4. Аффинная хроматография (L-фукозилламин-агароза) 5. Phenyl Superose	41.7	30	10	[208]

Продолжение таблицы 3

№	Источник фермента	Локализация фермента	Состав среды для роста (источники углерода, соли) Условия роста: pH, T(°C) и время роста (часы)		Схема выделения	Степень очистки, раз	Выход, %	Активность фермента, ед./л или ед./мг	Ссылка
10	<i>Bacillus sp.</i> K40T (из почвы)	секретируемый	0.5% глюкоза; 0.5% полипептон; 0.5% дрожжевой экстракт; 0.5% NaCl. pH 6.5, 30°C, ночь, перемешивание. Клетки собирали центрифугированием, промывали дважды физиологическим раствором, затем суспендировали в индуцирующей среде: 0,25% L-фукозы в 100 mM Трис-НСl буфере, pH 8,0, 24 ч, 30 °С.		1. Hydroxylapatite 2. Хроматофокусирование 3. Hydroxylapatite	38	26	61	[207]
11	<i>Streptomyces sp.</i> 142		Затравка - спорулирующий мицелий с агаризованной среды. 1% L-фукозы, 0,3% пептон, 0,05% YE, 0,1% KH ₂ PO ₄ , 0.05% MgSO ₄ · 7H ₂ O. pH 7,0. 40 часов, 27 °С, шейкер. Затем переносили 25 мл КЖ в 500 мл этой же среды и культивировали 48 часов. 27 °С на шейкере.		1. CM-Sepharose I 2. CM-Sepharose II 3. TSKgel HW55S	741	17	0,304	[217]
12	<i>Xanthomonas manihotis</i> Fuc I	внутриклеточный	1 г/л дрожжевой экстракт, 2 г/л триптон, 6 г/л Na ₂ HPO ₄ , 3 г/л KH ₂ PO ₄ , 0,5 г/л NaCl, 1 г/л NH ₄ Cl ₂ , 2 г/л глюкоза, 1 mM CaCl ₂		1. Гомогенизация клеток 2. DEAE-Sepharose CL-6B 3. Heparin-Sepharose CL-6B 4. Phenyl-Sepharose 5. S-Sepharose 6. Mono S HR 5/5 7. Heparin-TSK 8. Phenyl-Superose HR10/10	н.о.	н.о.	60000 U of >95% pure	[205]
13	<i>Xanthomonas manihotis</i> Fuc II	внутриклеточный	1 mM MgSO ₄ . 30 °С, до логарифмической стадии роста, аэрирование, перемешивание. Клетки собирали и замораживали при -70 °С.		1. Гомогенизация клеток 2. DEAE-Sepharose CL-6B 3. Phenyl—Sepharose 4. S-Sepharose 5. Mono Q HR 5/5	н.о.	н.о.	1500 U of >95% pure	
14	<i>Bacillus cereus</i> (из почвы)	секретируемый	0,5% PGM или L-фукоза, 0,2% (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,2% KH ₂ PO ₄ , 0,02% дрожжевой экстракт, 0,05% MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0,05 м%. Н ₃ РО ₄ , 0,004 м%. CuSO ₄ ,	0,01 м% KI, 0,02 м% FeCl ₃ , 0,04 м% MnSO ₄ · 4-6H ₂ O, 0,02 м% Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 0,04 м% ZnSO ₄ · 7H ₂ O. pH 5,0; 3 дня, 30 °С, шейкер.	1. Сульфатное осаждение (85%) 2. Фракционирование ацетоном (30% об/об) 3. DEAE-Toyopearl 650M 4. Octyl Sepharose CL-4B	60,6	1,8	51,1	[206]
15	<i>Streptomyces sp.</i> OH11242 (из почвы) Fase-I	секретируемый	<u>Инокулюм:</u> 2% (w/v) глюкоза, 0.5% (w/v) пептон, 0.5% (v/v) мясной экстракт,	<u>Индукция:</u> 0.26% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.24% KH ₂ PO ₄ , 0.43% K ₂ HPO ₄ ,	1. Сульфатное осаждение (80%) 2. Sepharose CL-4B 3. Hydroxapatite 4. Resource Q 5. Mono Q	150	10	12,7	[218]
16	<i>Streptomyces sp.</i> OH11242 (из почвы) Fase-II	секретируемый	0.3% (w/v) высушенные клетки дрожжей; 0.5% (w/v) NaCl; 0.3% (w/v) CaCO ₃ , pH 7,0, перемешивание, 27 °С, 2 дня.	0.10% MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0.1% (v/v) раствор металлов (0.64% CuSO ₄ · 5H ₂ O, 0.10% FeSO ₄ · 7H ₂ O, 0.79 % MnCl ₂ · 4H ₂ O, 0.15% ZnSO ₄ · 7H ₂ O); 0.5 г PGM. pH 7,0, 27 °С, 3 дня, шейкер (120 об/мин).	1 – 4 (аналогично п.15)	38	3,5	0,229	

Продолжение таблицы 3

№	Источник фермента	Локализация фермента	Состав среды для роста (источники углерода, соли) Условия роста: pH, T(°C) и время роста (часы)	Схема выделения	Степень очистки, раз	Выход, %	Активность фермента, ед./л или ед./мг	Ссылка
Растения								
17	Горох (fisum sativum var. Alaska)	внутриклеточный	Горох выращивали в вермикулите в темноте при 25 ° C в течение 2,4 и 8 дней. Этиолированный ствольный материал гороха над семядолями собирали, взвешивали и замораживают в жидком азоте.	1. Гомогенат, грубый экстракт 2. CM-Sepharose	н.о.	н.о.	н.о.	[198]
18	Миндальная эмульсия (Fuc I)	внутриклеточный		1. Грубый экстракт; 2. Sephadex G-200; 3. LNF-II-Sepharose	н.о.	12.7	0.35	[197]
19	Миндальная эмульсия (Fuc II)	внутриклеточный		1. Грубый экстракт; 2. SP-Sephadex; 3 Sephacryl S-200; 4. Blue-Sepharose pulse	1250	23	64,5 (человеческий лактоферрин)	[196]
20	Миндальная эмульсия (Fuc III)	внутриклеточный		1. Грубый экстракт; 2. Сульфатное осаждение (80%); 3. S-Sepharose; 4. Phenyl-Sepharose; 5. Mono P; 6. Superose 12; 7. Аффинная хроматография (N-(5-карбоксит-1-пентил) -1,5-дидеокси-1,5-имино-L-фуцитол (CPDFJ))	163000	6	1417 (Fuc1-3GlcNAc)	[209]
21	Миндальная эмульсия	внутриклеточный		1. Грубый экстракт; 2. Sephadex G-200 (первая); 3. Sephadex G-200 (вторая)	н.о.	н.о.	1,46	[194]
					н.о.	н.о.	0,186	
22	<i>Pecten maximus</i>	внутриклеточный	Пищеварительные железы	1. Гомогенат; 2. Сульфатное осаждение до 30%; 3. Сульфатное осаждение (30%-70%); 4. Промывка 30% (v/v) этилацетатом; 5. SP-Sepharose Fast Flow; 6. Chelating Sepharose Fast Flow; 7. 6-Amino-DMJ Sepharose Fast Flow (аффинная хроматография)	568	3,4	86	[10]
23	<i>Charonia lampas</i>	внутриклеточный	Печень	1. Гомогенат; 2. Сульфатное осаждение (75%); 4. CM-Sepharose FF; 5. TSKgel HW55-(S); 6. Affi-Gel CPDFJ аффинная хроматография; 7. F.p.l.c. хроматофокусирование; 8. Повторное рециркулирование аффинной хроматографии	170,8	8	11,1	[210]
24	<i>Octopus vulgaris</i>	внутриклеточный	Пищеварительные железы	1. Гомогенат; 2. Сульфатное осаждение (30-70%); 3. DE-52 cellulose; 4. Концентрирование и гидроксилпатит колонка; 5. Bio-Gel P6 и Agarose-ε-aminocaproyl-fucopyranosylamine	486	21.8	38.9	[211]
25	<i>Unio elongatulus</i>		Семенная жидкость	Аффинная хроматография				[219]
26	Свиная печень	внутриклеточный		1 Гомогенат; 2. Аффинная хроматография α-С-фукозилпропиламин; 3. Аффинная хроматография β-фукозиламин	3400	75	13.6	[212]

группы пентоз [206]. Некоторые же среды для роста культур для выделения α -фукозидаз в качестве источника углерода содержат только глюкозу. Показано, что при росте на среде с глюкозой некоторые организмы также секретируют α -фукозидазы [207, 208].

α -L-Фукозидазы из организмов морского происхождения (морские беспозвоночные) выделяют из пищеварительных органов, желудочно-кишечного тракта, печени (Таблица 3); у человека известные α -фукозидазы, участвующие в метаболизме и физиологических процессах, являются лизосомальными ферментами; фукозидазы из растений, выделяют из ствольного материала (горох) или миндальной эмульсии (*Arabidopsis*). Для получения чистого ферментного препарата α -фукозидазы из этих организмов используют аффинную хроматографию, а иногда и цикл аффинных хроматографий (Таблица 3) [10, 189, 197, 208–212]. Также для выделения гомогенных ферментных препаратов, как например, из гороха, используют ряд ионно-обменных хроматографий и препаративное изоэлектрическое фокусирование [198].

1.3.1.3 Физико-химические характеристики α -L-фукозидаз

Большинство α -L-фукозидаз из мицелиальных грибов наиболее активны в кислых и нейтральных значениях pH в интервале 4,5 – 6,0 (Таблица 4), но с некоторыми исключениями [193, 220]. Для большинства бактериальных фукозидаз pH оптимум гидролиза равен 5,5-6,5; для фукозидаз из бактерий *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* оптимум гидролиза находится в нейтральной области pH 6,5-7,5 [15, 204, 221]. Обнаружены также бактериальные ферменты с оптимумом в щелочной области: наиболее экстремальное значение pH-оптимума гидролиза описано для рекомбинантной α -фукозидазы из бактерии *Tanarella forsythia*, которое находится в щелочной области и равно 9,0 [222]; pH-оптимум фукозидазы iso1 из *Paenibacillus thiaminolyticus* равен 8,2 [12]. Фукозидазы из морских организмов имеют предпочтительно кислый оптимум гидролиза в интервале 3,0-4,0; растительные фукозидазы наиболее активны при pH 5,0-6,0 (Таблица 4), а оптимальные условия pH гидролиза фукозидаз из человека и других млекопитающих находятся в широком диапазоне значений pH 4,0-7,0.

Многие из охарактеризованных α -фукозидаз из различных организмов, в том числе и из грибных источников, стабильны в диапазоне значений pH 4-6. Для некоторых ферментов характерно смещение как в кислую (pH 3), так и в сторону щелочных значений до pH 9-10 [52, 202, 206, 207, 217].

Известные значения изоэлектрических точек для α -фукозидаз находятся в диапазоне pI 4,0 для бактерии *Thermus* sp. [208], pI 6,0 для морского моллюска *Pecten maximus* [10] и pI 6,9-7,0 для рекомбинантной фукозидазы из *Arabidopsis* [223] и фукозидазы из человека [192].

Данные о термостабильности и термо-оптимуме альфа-фукозидаз свидетельствуют, что большинство ферментов активны при повышении температуры реакции до 50 °С. Но для достаточно большого количества охарактеризованных фукозидаз использовали в качестве рабочей температуры 37 °С, поскольку стабильность многих ферментов, как правило, лежит в пределах до 50 °С. Наиболее экстремальное значение рабочих температур определено для архея *Sulfolobus solfataricus*: оптимальная температура гидролиза равна 95 °С; стабилен до 75 °С, а в качестве рабочей выбрана температура 65 °С. Немногим ниже значения температурных оптимумов для морских организмов *Pecten maximus* и *Octopus vulgaris* – 60 °С и 70 °С, соответственно [10, 211]. Для мицелиальных грибов, температурный оптимум составляет порядка 45-60 °С, но температура, при которой фермент стабилен, не превышает значений 50 °С и, в качестве рабочей температуры, исследования проводят при 37 °С; в качестве частного случая для *F. oxysporum* 377 оптимальная температура равна 25 °С [220].

Молекулярные массы нативных α -L-фукозидаз варьируются от 37 и 38 кДа у организмов *Brassica oleracea* и *Arabidopsis thaliana* [223] (по ДСН-ПААГ); до 508 кДа у архея *Sulfolobus solfataricus* [188]. По субъединичному строению альфа-L-фукозидазы являются как мономерами (молекулярные массы 40 – 80 кДа), так и те, которые имеют большую массу – обладают субъединичной структурой (от димеров до декамеров, 100 – 508 кДа) (Таблица 4).

Аналогично другим типам гликозидаз, α -фукозидазы ингибируются конечным продуктом реакции гидролиза – L-фукозой в концентрации до 0,25 мМ (Таблица 4). Ингибирующими активностью ферментов являются соединения: деоксифуконоджиримицин, деоксиманноджиримицин; буферные растворы на основе Триса и солей лимонной кислоты (цитрат). Из различных ионов двухвалентных металлов ингибирующим действием для большинства α -фукозидаз являются ионы Hg^{2+} и Cu^{2+} . Это может быть объяснено наличием в активном центре ферментов сульфгидрильных мостиков. Активирующее действие на некоторые α -фукозидазы оказывает повышение ионной силы раствора.

Таблица 4 – Физико-химические характеристики α -фукозидаз

Организм	ДТ или рекомбинантный	Молекулярная масса, кДа	pI	Температурный оптимум (°С)	pH-опт	pH-стаб.	Ингибиторы	Ссылка
Грибы								
<i>F. oxysporum</i> (FoFCO1)	дт	~ 70	-	42 — 55	5,0	4,0 — 6,0 (>80%)	-	[14]
	рекомбинантный (<i>P. pastoris</i>)	75 — 100 (гетерогенно гликозилирован)	-	-	-	-	-	
<i>F. graminearum</i> (FgFCO1)	рекомбинантный (<i>P. pastoris</i>)	-	-	Термостабилен до 52 и 65	5,0	4 - 9	цитрат и Трис (50 мМ) – сильные ингибиторы	
<i>F. oxysporum</i> S252 (дегликозилированная)	дт	72	-	37 (р)	4,5 — 5,5	4 — 10	Не обнаружено	[52, 202]
<i>F. oxysporum</i> S252 (гликозилированная)	дт	75	-	60; 37 (р)	4,5 — 6,0	5,5 — 10	1 мМ Hg ²⁺ ; L-фукоза (0,12 мМ)	
<i>F. oxysporum</i>	дт	80 (рф)	-	50	4,5 — 5,5	4,5 — 8,0	L-фукоза, D-арабиноза, Hg ²⁺	[224]
<i>F. oxysporum</i> 377	дт	-	-	25	6,8	-	-	[220]
<i>Aspergillus niger</i>	дт	-	-	37 (р)	3,8	-	-	[193]
<i>Penicillium multicolor</i>	дт	180 (ГФ)	-	50 стаб.	5,0	3,0 – 7,0	-	
<i>A. niger</i>	дт	-	-	50 стаб.	-	-	-	[56]
Бактерии и археи								
<i>Clostridium perfringens</i> тип 33-48	дт	185 - 225 (рф)	-	37 (р)	5,8 - 6,3		<i>n</i> -хлоромеркурибензоат, йодацетамид, ЭДТА, Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Hg ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	[216]
<i>Thermus</i> sp.	дт	61*4=240	4,2	50	6,5	5,5-7,5 при 37	L-фукоза (0,15 мМ)	[208]
<i>Tanarella forsythia</i>	рекомбинантный	51	-	22	9,0		L-фукоза (0,25 мМ); DFJ (0,1 мкМ)	[222]
<i>Bacillus</i> sp. K40T	дт	200	-		5,5-7,0	6,0-9,0	Hg ²⁺ ; L-фукоза	[207]
<i>Bacillus cereus</i>	дт	196 (рф); 81 (ДСН-ПААГ)	-	50; 37 (р)	7,0	5,0-9,0	L-фукоза (10 мМ); Hg ²⁺ (0,1 мМ)	[206]
<i>Bacillus circulans</i> M28 (F I)	дт	135x2 (ДСН-ПААГ) 285 (рф)	-	50	5,5 — 6,5	4,5 – 9,0	1 мМ Hg ²⁺	[225]
<i>Bacillus circulans</i> M28 (F II)	дт	250	-	40 — 45	6,0 — 7,0	6,0 — 8,5	1 мМ Cu ²⁺ , 1 мМ Hg ²⁺ , 0,5 мМ <i>n</i> -хлорортути бензоат — полностью; 1 мМ Ni ²⁺ и Zn ²⁺ - сильно. L-Фис не влияет.	[202]
<i>Bacillus fulminans</i>	дт	70 — 80 (рф)	-	37 (рабоч), 50 стабил 5 мин	6,3 — 6,6	-	Деоксихолат, ЭДТА, Hg ²⁺ (0,1 мМ), Mn ²⁺ (0,1 мМ), SDS	[226]
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> BT 2970	рекомбинантный	~ 50 (ДСН-ПААГ), димер	-	37; стабилен при 37 в течение 30 мин	6,0	4,0 — 9,0	-	[51]
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> BT 2192	рекомбинантный	~ 55 (ДСН-ПААГ), димер	-	50; стабилен при 37 в течение 30 мин	6,0	4,0 — 9,0	-	
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (AfcA) GH95	рекомбинантный (<i>E. coli</i>)	205	-	37 (р)	6,5 (р)		-	[15]
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (AfcB) GH29	рекомбинантный	160 (ДСН-ПААГ); 350 (рф)	-	45	5, 5 6,0	3,5 8,0	Cu ²⁺ ингибирует; Co ²⁺ активирует	[227]
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 штаммы Blon_0248; Blon_0426; Blon_2336	рекомбинантный (<i>E. coli</i>)	-	-	37	6,5	-	-	[221]
				штаммы Blon_2335 и Blon_0346	37	7,5 и 6,0	-	
<i>Lactobacillus casei</i> AlfA	рекомбинантная (<i>E. coli</i>)	165.6 (рф)	-	39 – 41	7,0-7,5	-	-	[204]
<i>Lactobacillus casei</i> AlfB		178.58 (рф)	-	41	7,0	-	MnCl ₂ ингибирует	
<i>Lactobacillus casei</i> AlfC		159.06 (рф)	-	41	7,0	-	-	

Продолжение таблицы 4

Организм	ДТ или рекомбинантный	Молекулярная масса, кДа	pI	Температурный оптимум (°C)	pH-опт	pH-стаб.	Ингибиторы	Ссылка
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	рекомбинантная (<i>E. coli</i>)	10*57 = 508 (гф)	-	95; стабилен при 75; 65 (p)		3,3 6,3		[188, 228]
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> (iso1)	рекомбинантная (<i>E. coli</i>)	51.2 (ДСН-ПААГ)	-	48	8,2	-	Трис буфер	[12]
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> (iso2)	рекомбинантная (<i>E. coli</i>)	76,8 (ДСН-ПААГ)	-	50	6,5	-	-	[13]
<i>Streptomyces</i> sp. ОН11242 (Fase-I)	дт	59 (ДСН-ПААГ); 76 (гф)	-	37 (p)	5.5-6.0	-	-	[218]
<i>Streptomyces</i> sp. ОН11242 (Fase-IIa)	дт	57	-	37 (p)	4.7	-	-	
<i>Streptomyces</i> sp. ОН11242 (Fase-IIb)	дт	56	-	37 (p)	6,5	-	-	
<i>Streptomyces</i> sp.142	дт	40 (гф)	-	50	6,0-6,5	6,0-8,5	10 мМ Hg ²⁺ ; 1 мМ <i>n</i> -ртутнохлористый бензоат; мочевины или гуанидин гидрохлорид (2 М); 10 мМ <i>L</i> -фукоза	[217]
<i>Trichoderma maritima</i>	рекомбинантная (<i>E. coli</i>)	300 (гф) гексамер 52кДа (ДСН-ПААГ)	-	37 (p); 25 (p)	5,0	-	10 мМ ЭДТА	[229, 230]
<i>Xanthomonas manihotis</i>	дт	-	-	-	6,0	-	-	[205]
Растения								
Миндаль (эмульсия)	дт	73 (гф)	-	37	5,3	-	0,1М Hg ²⁺ ; <i>L</i> -фукоза. Повышение ионной силы активирует.	[196]
Миндаль (эмульсия) I	дт		-	37	5,5		нет	[194]
Миндаль (эмульсия) II	дт		-	37	5,0-6,5		нет	[209]
Миндальное молочко	дт	106 (гф), 54 (ДСН-ПААГ)	-	37 (p)	5,3	Между 3 и 7	NaCl стимулирует	[231]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	дт	63 (ДСН-ПААГ)	-	-	-	-	-	[232]
<i>Solanum lycopersicum</i> α-Fuc'ase S1-1	Рекомбинантная (<i>E. coli</i>)		-	-	4,0 — 5,0	-	Zn ²⁺ , Fe ²⁺ и Cu ²⁺	[223]
<i>Arabidopsis</i> (AtFXG1)	Рекомбинантная (<i>Pichia pastoris</i>)	38	6,9	-	-	-	-	[198]
Листья капусты <i>Brassica oleracea</i>	дт	37 (ДСН-ПААГ), 200 (гф)	-	-	5,5	-	-	
Горох <i>Pisum sativum</i>	дт	20 (ДСН-ПААГ)	5,4-5,6	30 (p)	6,0 (p)	-	-	[198]
Морские организмы								
<i>Pecten maximus</i>	-	4x50 (ДСН-ПААГ); 200 (гф)	6	60	4	3 – 5,5	Ингибиторы: 1-DFJ (0,026 нМ); 6- <i>N</i> -ацетиламино-деоксиманноджирицидин; Cu ²⁺ ; Hg ²⁺ ; <i>L</i> -фукозамин (0,316 мМ); <i>L</i> -фукоза (0,24 мМ); Активаторы: ЭДТА; повышение ионной силы 10 – 200 мМ; Zn ²⁺	[10]
<i>Ostropus vulgaris</i>	дт	70 — 75 (гф)	-	70	3; 5,5	-		[211]
<i>Charonia lampas</i>	дт	208 (гф), тетрамер, 49,5 (ДСН-ПААГ)	6,0 6,4	37 (p)	3,0	-	1 мМ-Cu ²⁺ и 0.1 мМ <i>n</i> -ртутнохлористая-фенилсульфоновая кислота	[210]
<i>Biomphalaria glabrata</i>	дт	-	-	37 (p)	5,8	-	<i>L</i> -фукоза, DFJ, Трис	[191]
<i>Unio elongatulus</i> гликозилированная	дт	67,8 (МС)	-	-	-	-	-	[219]
дегликозилированная	дт	56 (МС)	-	50-60	5,0	-	-	
Наземные и млекопитающие								
Евразийский волк <i>Canis lupus lupus</i> (αFUC)	Рекомбинантная (экспрессия в CHO и MDCK клетки)	50*2 (ДСН-ПААГ); 156 (гф)	-	37	7,0	5,0 — 9,0	-	[233]
Хомяк <i>Mesocricetus auratus</i>	дт	56 + 60 (ДСН-ПААГ)	7,0	-	6,8	5,5 — 7,5	-	[234]
<i>Cavia porcellus</i>	дт		7,0	-			-	
Семенная плазма человека (h-Fuc)	Рекомбинантная (<i>E. coli</i>)		-	55	4.8-5.2	2.5-8.0	-	[53]
	-	~56-57 (ДСН-ПААГ); 110, 236 и 314 (гф)	5.0-7.0	-	4.0-4.5; 6.4-7.4		-	[192]

1.3.1.4 Субстраты α -L-фукозидаз

L-Фукоза (6-деокси-L-галактоза), хотя и относительно мало встречается в биосфере, имеет много важных функций. Интерес к этому моносахариду обусловлен его важной ролью во многих физиологических и патологических процессах [235]. L-фукоза обнаружена в самых разных организмах: бактерии, растения, животные, насекомые, млекопитающие, морские бурые водоросли и морские беспозвоночные [8, 236]. Природное фукозилирование представлено следующим разнообразием: терминальное фукозилирование в форме $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -связей с D-галактозой (Gal), $\alpha(1 \rightarrow 3/4/6)$ -связи с N-ацетилглюкозамином (GlcNAc), $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -связи с D-глюкозой (Glc); фукозидные цепи между фукозой с помощью $\alpha(1 \rightarrow 3/4)$ -связей. Кроме перечисленных основных вариантов связей между фукозным мотивом в природных соединениях, существуют некоторые примеры редкого фукозилирования. В зависимости от типа связей, дополнительных моносахаридных звеньев, длины фукосахаридов, в природе обеспечивается большое разнообразие фукозосодержащих соединений, наделённых различной биологической ролью в метаболизме организмов.

Одними из распространенных фукозилированных гликоконъюгатов являются N- и O-гликопротеины клеточной поверхности [237]. У человека и растений фукозилирование многих N- и O-гликанов осуществляется в положениях $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Gal, $\alpha(1 \rightarrow 3/4)$ -GalNAc. Для N-гликанов также характерно фукозилирование в положении $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -GalNAc, связанного с остатком Asn с образованием $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -хитобиозной единицы (Рисунок 3) [7, 8, 238–240]. Присоединение L-фукозы в положении $\alpha(1 \rightarrow 3)$ на самый внутренний фрагмент GlcNAc хитобиозной единицы, которая связана с Asn, часто встречается у растений, а также у некоторых насекомых, паразитов, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* [238, 241]. Стоит отметить, что у растений достаточно часто распространено $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -фукозилирование N-гликанов, которое задействовано в физиологических процессах.

Олигосахаридные цепи гликоконъюгатов, содержащих L-фукозу, встречаются среди наиболее известных фукозилированных гликанов группы крови ABO и антигенов A, B, H и Льюиса [7, 242]. Предшественники фукозилированных олигосахаридов Льюиса типа I и типа II различаются типом связи между терминальными остатками Glc и Gal в дисахариде: цепи типа I содержат мотив Gal- $\beta(1 \rightarrow 3)$ -GlcNAc- $\beta(1 \rightarrow)$ -R, а цепи типа II – Gal- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc- $\beta(1 \rightarrow)$ -R [243] (Рисунок 4). В антигенах крови A и B, а также у Le^a, Le^b и H-антигенов цепей типа I и типа II, L-фукоза прикреплена в $\alpha(1 \rightarrow 2)$ положении к терминальному остатку галактозы. Субтерминальный остаток GlcNAc у цепей типа II фукозилирован $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -связью, а у цепей типа

I – $\alpha(1\rightarrow4)$ [243]. Фрагмент Le^a олигосахаридов: Gal-(1 \rightarrow 3)[Fuc-(1 \rightarrow 4)]GlcNAc также представлен на антеннах *N*-гликанов (Рисунок 3).

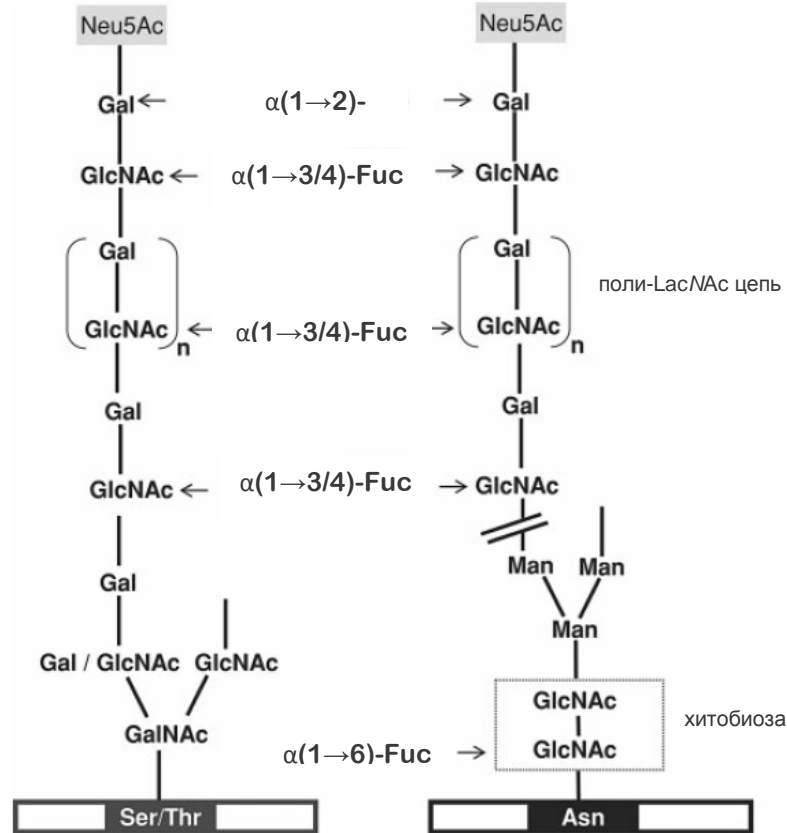


Рисунок 3 – Фукозилирование в положениях $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3/4)$ и $\alpha(1\rightarrow6)$ *O*-гликанов (слева) и *N*-гликанов (справа). Черный и темно-серый блоки внизу представляют собой белки (иллюстрация адаптирована из [238]).

Некоторые патогенные бактерии (*Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyrogenes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* и *Eikenella corrodens*) секретирует липополисахариды клеточной поверхности, несущие производные антигенов групп крови Льюиса, тем самым подражая моделям гликозилирования хозяина, которые выводят из активированного состояния иммунный ответ, и, как следствие, происходит бессимптомная колонизация хозяина [238, 244].

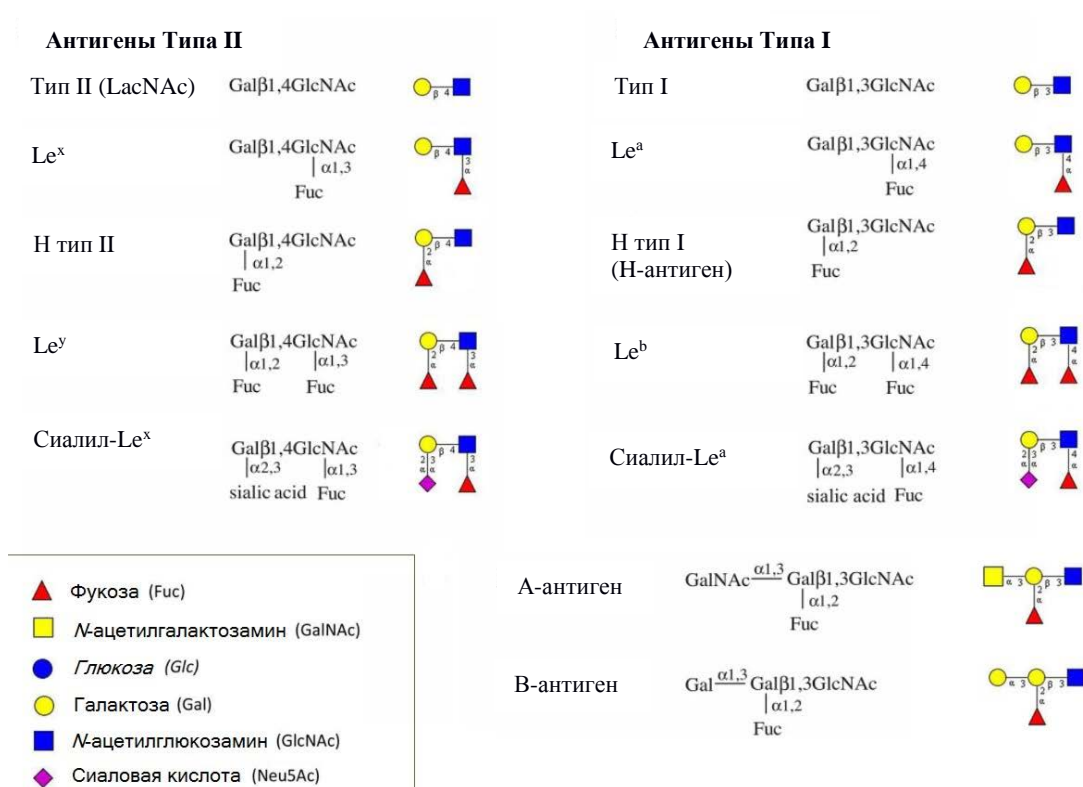


Рисунок 4 – Строение некоторых фукозосодержащих антигенов групп крови. Структуры изображены в соответствии с номенклатурой символов Консорциума по функциональной гликомике (<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/Nomenclatures.html>).

Другими распространенными фукозилированными соединениями являются олигосахариды грудного молока, которые содержат 5 моносахаридных строительных блоков: глюкозу (Glc), галактозу (Gal), N-ацетил глюкозамин (GlcNAc), фукозу (Fuc) и сиаловую кислоту (Рисунок 5). В основе таких молекул лежит дисахарид лактоза ($\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$) на редуцирующем конце, которая может быть удлинена до 15 дисахаридных единиц добавлением через $\beta(1\rightarrow3)$ - и $\beta(1\rightarrow6)$ -связи лакто-N-биозы ($\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GlcNAc}$ -, цепь типа 1) или N-ацетиллактозамина ($\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$ -, цепь типа 2). Кроме того, лактоза и/или добавленная олигосахаридная цепь могут удлиняться фукозилированием в положениях (1→2), (1→3) или (1→4) и/или сиалированием в (2→3) или (2→6) положениях. На сегодня идентифицировано более 150 различных вариантов олигосахаридов грудного молока [245]. В результате, из существующего большого разнообразия различных видов НМО, различающихся длиной цепи, типами замещений и конфигурацией связей, подавляющее большинство являются фукозилированными видами (50 – 80% олигосахаридов НМО фукозилирована) [246, 247]. Наиболее распространенными олигосахаридами в материнском молоке являются трисахарид 2'-O-фукозиллактоза и пентасахарид лакто-N-фукопентоза I [248]. Присутствуя в грудном молоке человека, они имеют

решающее значение для здоровья и развития младенцев посредством иммуномодулирующих эффектов, а также путём избирательной стимуляции определённых штаммов *Bifidobacterium* [203, 246, 249]. Поэтому предпринимаются попытки синтеза различными путями соединений грудного молока для последующего введения на рынок детских смесей [28, 245].

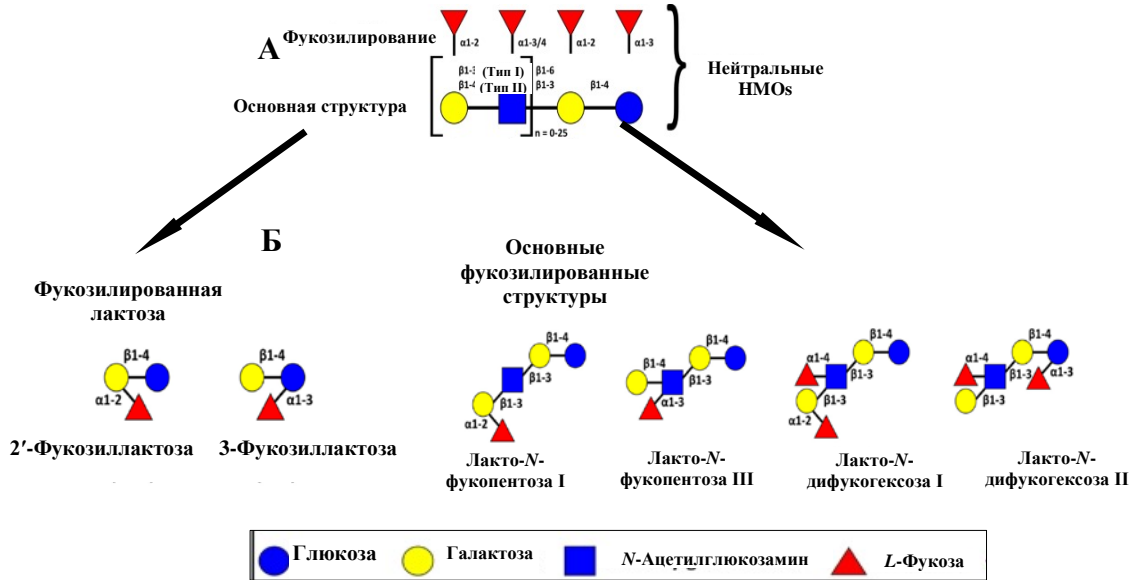


Рисунок 5 – А: Схематическое изображение общей структуры фукозилированных олигосахаридов грудного молока (НМОs). Б: Фукозилированные соединения НМОs (адаптировано из [250]).

В растительных клеточных стенках *L*-фукоза представлена в виде терминальной модификации углеводной цепи полисахаридов и гликопротеинов, включающих рамногалактуронаны, арабиногалактан-протеины, некоторые ксилоглюканы и пектин. Ксилоглюкан состоит из $\beta(1\rightarrow4)$ -*D*-Glc скелета, который несет $\alpha(1\rightarrow6)$ -ксилозные фрагменты на три последовательных остатка глюкозы (Рисунок 6). Вторая и третья ксилоза в строительном блоке X-X-X-G могут иметь $\beta(1\rightarrow2)$ -связанную *D*-Gal, а вторая из Gal обычно удлиняется Fuc $\alpha(1\rightarrow2)$ -связью. [190, 198, 199, 223, 238].

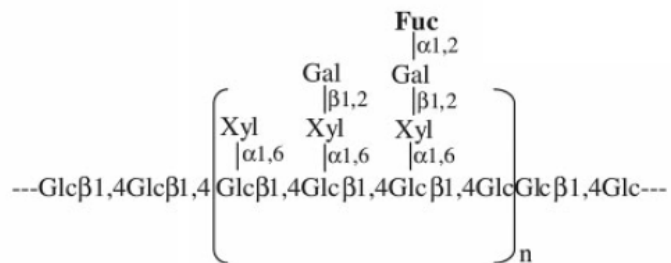


Рисунок 6 – Фукозилирование ксилогликана клеточной стенки у растений [238].

Большую гетерогенную группу фукозосодержащих биополимеров образуют фукоиданы, или фукозосодержащие сульфатированные гликаны – полианионные полисахариды, которые

являются составной частью клеточных стенок морских водорослей, а также обнаружены у организмов морского происхождения, морских беспозвоночных [18, 251]. По химической структуре фукоиданы представляют гомо- или гетерополисахариды, где основным мономером выступают остатки α -L-фукозы. При этом значительная часть α -L-фукозы сульфатирована или иногда ацетилирована по разным положениям [252–255]. Помимо остатков L-фукозы, в состав фукоиданов бурых водорослей входят различные моносахариды: галактоза, манноза, ксилоза, рамноза, уроновые кислоты. Остатки галактозы могут содержать сульфатные группы подобно L-фукозе. В галактофуканах сульфатные группы проявляется, но реже, при C3 и/или C6 остатков - D-галактопиранозы.

Содержание и структура фукоиданов бурых водорослей варьируется в зависимости от эндо- и экзогенных факторов: вида водоросли, времени сбора, места произрастания, факторов внешней среды. При этом структура фукоиданов у одного и того же вида также может иметь значительные различия [255–257]. В виду существования большого разнообразия структур фукоиданов, настолько разнородную группу молекул сложно классифицировать. Кроме фукоидана в водорослях могут встречаться другие фукозосодержащие полисахариды (галактофуканы, фукогалактаны, фукоглюкурономаннаны и ксилофукоглюкуронаны) [256]. Выделяют несколько структурных групп фукоиданов, различающихся типом O-гликозидной связи между остатками L-фукозы в полисахариде и наличием дополнительных мономерных звеньев [256]:

- Сульфатированные α -L-фуканы. (α -L-Fuc-(1→3)-L-Fuc-)_n. Характерно для бурых водорослей порядка *Laminariales* и *Ectocarpales*.
- Фукоиданы, построенные из остатков L-фукозы, связанные (1→3)- и (1→4)-O-гликозидными связями. Характерно для бурых водорослей порядка *Fucales*.
- Сульфатированные галактофуканы. Состоят из α -L-фукозы и β -D-галактозы, связанные (1→3)- и/или (1→4)-O-гликозидными связями. Характерно для бурых водорослей порядка *Laminariales*.
- Фукоиданы сложного состава. Содержат в составе кроме L-фукозы значительные количества других моносахаридов.

Кроме фукоиданов, морские организмы в своём составе могут содержать фукозилированные гликозаминогликаны. Примером служит фукозилированный хондроитин сульфат – гликозаминогликан, обнаруженный в некоторых видах морских огурцов. Основная структура хондроитин сульфата представлена чередующимися звеньями дисахарида (1→4)-связанной глюкуроновой кислоты и (1→3)-связанными остатками N-ацетилгалактозамина, что является основой как для морских организмов, так и наземных млекопитающих. Однако структурное разнообразие этого полисахарида проявляется в виде сульфатированных и не сульфатированных

фукозильных разветвляющихся звеньев, связанных с остатками глюкуроновой кислоты (1→3)-связью [121].

1.3.1.5 Каталитические свойства α -L-фукозидаз

1.3.1.5.1 Особенности реакции гидролиза и субстратная специфичность α -фукозидаз

Поскольку ферменты α -L-фукозидазы могут избирательно удалять L-фукозу, они являются важными инструментами для определения биологических функций различных фукоолигосахаридов [51].

Ферменты семейства GH95 являются высокоспецифичными для гидролиза L-фукозы, находящейся на невозстанавливаемых концах, связанную с остатками D-галактозы $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -связью и характеризуются обращаемым механизмом гидролиза [15]. Напротив, α -L-фукозидазы из семейства GH29 могут гидролизовать различные типы гликозидных связей. GH29 α -L-фукозидазы чаще всего гидролизуют $\alpha(1 \rightarrow 2)$ – связи между фукозой и галактозой или $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -, $\alpha(1 \rightarrow 4)$ - и $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -связи между остатками фукозы и N-ацетилглюкозамина [258]. Недавно Сакурама и соавторы разделили семейство GH29 на два подсемейства, основанных на их субстратной специфичности и филогенетическом анализе [51]. Подсемейство А содержит α -L-фукозидазы (ЕС 3.2.1.51) с относительно свободной субстратной специфичностью и способные гидролизовать синтетический субстрат pNPFuc. Альфа-L-фукозидазы (ЕС 3.2.1.111) из подсемейства В являются специфичными для $\alpha(1 \rightarrow 3 / 4)$ -фукозидных связей и практически не могут гидролизовать pNPFuc. После изучения субстратных особенностей двух GH29 α -L-фукозидаз из *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 (GH29-А [BT_2970] и GH29-В [BT_2192]), для которых были решены кристаллические структуры, было высказано предложение, что α -L-фукозидаза GH29-В имеет субсайт, который может вмещать остаток галактозы и что наличие разветвленного галактозного остатка необходимо для его гидролитической активности [51]. Позже активность α -L-фукозидазы и β -D-галактозидазы были обнаружены для бактериального фермента *B. thetaiotaomicron* BT_2192 (GH29-В), и после анализа его кристаллической структуры было предложено, что β -D-галактозид связывается во втором кармане активного сайта [259].

В зависимости от специфичности α -L-фукозидаз, они активно гидролизуют различные терминальные фукозильные связи, представленные в форме $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -связей с D-галактозой (Gal), $\alpha(1 \rightarrow 3/4/6)$ -связи с N-ацетилглюкозамином (GlcNAc), $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -связи с D-глюкозой (Glc), которые присутствуют в разных природных субстратах [10, 14, 51, 190, 221, 260]. Кроме того,

Таблица 5 – Субстратная специфичность α -L-фукозидаз из различных источников

Фермент	Предпочтительный для гидролиза тип связи в фукозилированных олигосахаридах	Кинетические параметры гидролиза pNPFuc			Ссылка
		K _M , mM	k _{cat} , с ⁻¹	k _{cat} /K _M , (мМ·с) ⁻¹ *	
Грибы					
FgFCO1 (из <i>Fusarium graminearum</i>)	α -(1→2)- > α -(1→3)-/ α -(1→4)-	9.8	0.14	0.014	[14, 213]
FoFCO1 (из <i>F. oxysporum</i>)	нет доступной информации	0.85	0.023	0.027	[14]
Гликозилированная α -L-фукозидаза из <i>F. oxysporum</i> S252	гидролизует 2-фукозиллактозу: α -(1→2)-D-Gal ^e	0.48	нет доступной информации		[52, 202]
Дегликозилированная α -L-фукозидаза из <i>F. oxysporum</i> S252		0.59	нет доступной информации		
α -L-фукозидаза из <i>F. oxysporum</i> 377	нет доступной информации	0.75	нет доступной информации		[220]
α -L-фукозидаза из <i>A. niger</i>	гидролизует 2-фукозиллактозу: α -(1→2)-D-Gal	не определено			[193]
α -L-фукозидаза из <i>A. niger</i>	только α -(1→6)-D-GlcNAc	не определено			[189]
Бактерии и археи					
α -L-фукозидаза из <i>Bacillus</i> sp. K40T	α -(1→2)- ; не гидролизует α -(1→3)-/ α -(1→4)-	гидролизует pNPFuc			[207]
α -L-фукозидаза из <i>Bacillus cereus</i>	α -(1→2)-D-Gal; не гидролизует α -(1→3)-/ α -(1→4)-	не определено			[206]
BT 2970 из <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	α -(1→3)- > α -(1→4)-D-GlcNAc неразветвленные; не гидролизует α -(1→6)-	1.5	1.3	0.87	[51]
BT 2192 из <i>B. thetaiotaomicron</i>		α -(1→3)-/ α -(1→4)- разветвленные			
AfcB (GH29) из <i>Bifidobacterium bifidum</i>	α -(1→3)-/ α -(1→4)-, не гидролизует α -(1→2)-	не определено			[227]
α -L-фукозидаза из <i>Bacillus circulans</i> M28 (F I)	α -(1→2)-/ α -(1→3)-/ α -(1→4)				[202]
α -L-фукозидаза из <i>Bacillus circulans</i> M28 (F II)	2'-фукозиллактоза, 3-фукозиллактоза, α -(1→6)-D-GlcNAc				
α -L-фукозидаза from <i>Clostridium perfringens</i>	α -(1→2)-D-Gal	не определено			[216]
Iso1 из <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	нет доступной информации	0.44	58.7	133	[12, 13]
Iso2 из <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	нет доступной информации	0.52			
Fase I из <i>Streptomyces</i> sp. OH11242	α -(1→2)-, не гидролизует α -(1→3)-/ α -(1→4)-	не определено			[218]
Fase IIa из <i>Streptomyces</i> sp. OH11242	нет доступной информации	гидролизует pNPFuc			
Fase IIb из <i>Streptomyces</i> sp. OH11242	α -(1→3)-/ α -(1→4)-, не гидролизует α -(1→2)-	гидролизует pNPFuc			
α -L-фукозидаза из <i>Streptomyces</i> sp. 142	α -(1→3)-/ α -(1→4)-D-GlcNAc, не работает по α -(1→2)-/ α -(1→6)-	не определено			[217]
fuc I из <i>Xanthomonas</i>	α -(1→3)-/ α -(1→4)-, не гидролизует α -(1→2)-	нет доступной информации			[205]
fuc II из <i>Xanthomonas</i>	только α -(1→2)-	гидролизует pNPFuc			

(*) Значения константы k_{кат} для многих охарактеризованных ферментов были рассчитаны на основании данных, изложенных в соответствующих работах.

Продолжение таблицы 5

Фермент	Предпочтительный для гидролиза тип связи в фукозилированных олигосахаридах	Кинетические параметры гидролиза рNPFuc			Ссылка
		K_M , mM	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , (мМ·с) ^{-1*}	
Ssa-fuc из <i>Sulfolobus solfataricus</i>	α -(1→6)-D-GlcNAc ^e	0,028 (pH 6.3)	287 (pH 6.3)	10250 (pH 6.3)	[188, 228]
		0.26 (pH 5.0)	430 (pH 5.0)	1624 (pH 5.0)	
D124G	нет доступной информации	0.09	240	2740	
D146G	нет доступной информации	0.033	224	6791	
H46G	нет доступной информации	17	419	25	
H123G	нет доступной информации	не определено		3.5	
E58G	нет доступной информации	не определено		1.9	
E292G	нет доступной информации	0.056 [§]	1.86	33	
α -L-фукозидаза из <i>Thermus</i> sp.	α -(1→2)-D-Gal / α -(1→3/1→4/1→6)-D-GlcNAc	0.2	12.2	61	[208]
<i>Lactobacillus casei</i> AlfA клонированная	только α -(1→6)-D-GlcNAc	0.27 (pH 7.5)	3.14	11.7	
<i>L. casei</i> AlfB клонированная	α -(1→3)- > α -(1→2)-D-Gal > α -(1→4)- неразветвленные	2.9 (pH 7)	17.9	6.1	[204]
<i>L. casei</i> AlfC клонированная	α -(1→6)- >> α -(1→4)- > α -(1→2)- > α -(1→3)-	5.2 (pH 7)	58.9	11.3	
rTfFuc1 из <i>Tanerella forsythia</i> (51kDa)	только α -(1→2)-D-Gal и α -(1→6)-D-GlcNAc в коротких неразветвленных олигосахаридах	0.67	17	26	[222]
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 Blon_0248	не гидролизует НМОs	0.131 [§]	0.11 [§]	0.83 [§]	[221]
Blon_0426	не гидролизует НМОs	0.115 [§]	9.452 [§]	82.0 [§]	
Blon_0346	α -(1→2)-D-Gal; не гидролизует НМОs	0.180 [§]	4.481 [§]	24.9 [§]	
Blon_2335	α -(1→2)-D-Gal > α -(1→3)-D-Glc/ α -(1→4)-D-GlcNAc > α -(1→3)-D-GlcNAc	33.03 [§]	3.898 [§]	0.119 [§]	
Blon_2336	α -(1→2)- > α -(1→3)- > α -(1→4)-	0.709 [§]	0.285 [§]	0.4 [§]	
Tm α Fuc дикий тип из <i>Thermotoga maritima</i>	нет доступной информации	0.032	5.4 s	160	[229, 230]
Tm α FucMBP	нет доступной информации	0.05	14.3	280	
Tm α Fuc D224A из <i>T.maritima</i> ⁱ	нет доступной информации	не определено		0.028	
Tm α Fuc E66A	нет доступной информации	2.1	1.3	0.6	
Tm α Fuc E266A	нет доступной информации	не определено		0.0044	
Растения					
fuc I из миндальной эмульсии	α -(1→4)- > α -(1→3)-, не гидролизует α -(1→2)-	нет доступной информации			[194]
fuc II из миндальной эмульсии	α -(1→2)- >>> α -(1→3/4)-	нет доступной информации			
α -L-фукозидаза из миндальной эмульсии	α -(1→3/4)-	не определено			[231]

(§) Активность измерена с использованием 2-хлоро-4-нитрофенил- α -L-фукопиранозида в качестве субстрата.

Продолжение таблицы 5

Фермент	Предпочтительный для гидролиза тип связи в фукозилированных олигосахаридах	Кинетические параметры гидролиза pNPFuc			Ссылка
		K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , (мМ·с) ⁻¹ *	
α L fuc I из миндальной эмульсии	α -(1→3/4)-, не гидролизует α -(1→2)-	гидролизует pNPFuc			[197]
α -L-фукозидаза I из миндальной эмульсии	α -(1→3)-D-GlcNAc; не гидролизует α -(1→2)- / α -(1→6)-	нет доступной информации			[196]
α -L-фукозидаза III из миндального молочка	α -(1→3)-D-Glc- / α -(1→3)-D-GlcNAc- / α -(1→4)-D-GlcNAc-; не гидролизует α -(1→2)-D-Gal- / α -(1→6)-D-GlcNAc-	не определено			[209]
α -L-фукозидаза из <i>Arabidopsis</i> (рекомбинантная)	α -(1→3/4)-	не определено			[231]
α -L-фукозидаза из <i>Pea epicotyls</i>	α -(1→2)-D-Gal-	не определено			[198]
Моллюски и морские беспозвоночные					
α -L-фукозидаза из <i>Charonia lampas</i>	α -(1→2)-D-Gal- / α -(1→4)-D-Glc- >>> α -(1→6)-D-GlcNAc- > α -(1→2)-D-Gal- > α -(1→3)-D-Gal-(α -(1→4)-L-Fuc)-D-GlcNAc- >>> α -(1→4)-D-Gal-(α -(1→3)-L-Fuc)-D-GlcNAc-	0.26	38.22	147	[210]
α -L-фукозидаза из <i>Biomphalaria glabrata</i>	Нет доступной информации	0.55	$V_{max} = 0,0016$ ед.	нет доступной информации	[191]
α -L-фукозидаза из <i>Octopus vulgaris</i>	гидролизует клеточные гликопептиды; не гидролизует α -(1→2)- / α -(1→3)- / α -(1→4)- в НМОs и α -(1→6)- в IgG-гликопептидах	0.358	56.3	157	[211]
α -L-фукозидаза из <i>Littorina littorea L.</i>	Очень низкая активность: α -(1→2)- / α -(1→3)- / α -(1→4)-	0.3	$V_{max} = 2.6$ мкМ/мин/мг		[262]
α -L-фукозидаза из <i>Chamelia galina</i>	α -(1→2)- / α -(1→3)- / α -(1→4)-	0.07	$V_{max} = 3.5$ мкМ/мин/мг		
α -L-фукозидаза из <i>Tapes rhomboideus</i>	α -(1→2)- / α -(1→3)- / α -(1→4)-	0.14	$V_{max} = 4.1$ мкМ/мин/мг		
α -L-фукозидаза из <i>Mytilus edulis L.</i>	α -(1→2)- / α -(1→3)- / α -(1→4)-	0.12	$V_{max} = 0.4$ мкМ/мин/мг		
α -L-фукозидаза из <i>Pecten maximus</i>	α -(1→2)-D-Gal- (неразветвленные) > α -(1→4)- > α -(1→3)- / α -(1→2)-D-Glc (разветвленные)	0.65	283	435	[10]
α -L-фукозидаза из <i>Turbo cornutus</i>	α -(1→4)- > α -(1→2)- > α -(1→3)-; IgG: α -(1→6)-	нет доступной информации			[263]
α -L-фукозидаза из <i>Charonia lampas</i>	α -(1→2)-D-Gal- > α -(1→4)-D-GlcNAc- > α -(1→3)-D-GlcNAc-; IgG: α -(1→6)-	нет доступной информации			
Млекопитающие					
α -L-фукозидаза из семенной плазмы человека	нет доступной информации	0.06 #	362 #	6031#	[192]
α -L-фукозидаза из селезёнки человека	α -(1→2)-D-Gal- > α -(1→3)- / α -(1→4)- / α -(1→6)-D-GlcNAc-	гидролизует pNPFuc			[264]
α -L-фукозидаза из мозга человека	только α -(1→2)-; Н-антиген > α -(1→2)-L-Fuc-декасахарид	гидролизует pNPFuc			
α -L-фукозидаза из печени человека	α -(1→2)-D-Gal- (неразветвленные) > α -(1→4)-D-GlcNAc-	0.3	не определено		[265]
α -L-фукозидаза человека рекомбинантная (h-Fuc)		0.284	17	60.7	[53]
α -L-фукозидаза из сыворотки крови человека	α -(1→2)-D-Gal- >>> α -(1→3)- / α -(1→4)- >>> α -(1→6)-D-GlcNAc	0.18	71.5	397.4	[266]
α -L-фукозидаза I из свиной печени	α -(1→2)-D-Gal- > α -(1→3)- / α -(1→4)-D-GlcNAc	гидролизует pNPFuc			[267]

(#) Активность измерена с использованием 4-метилумбеллиферрил- α -L-фукопиранозиды в качестве субстрата.

некоторые α -L-фукозидазы эффективно отщепляют молекулы L-фукозы не только от олигосахаридов, но и от крупной полимерной молекулы фукоидана. Например, альфа-L-фукозидаза из морского моллюска *Pecten maximus* эффективно катализирует гидролиз до свободной фукозы крупной молекулы фукоидана из *Ascophyllum nodosum*, состоящей из чередующихся звеньев Fuc- α -(1 \rightarrow 4)-Fuc и Fuc- α -(1 \rightarrow 3)-Fuc без его предварительной дополнительной деполимеризации [10, 24]. Альфа-L-фукозидаза из печени морского ушка *Haliotis gigantea* полностью гидролизует фукоидан из бурой водоросли *Ecklonia cava* [261].

1.3.1.5.2 Реакции трансгликозилирования

Основная функция O-гликозидаз – гидролитическая активность в присутствии воды (как акцептора), однако способность некоторых из этих ферментов катализировать перенос гликозильного остатка на любой другой акцептор, имеющий не менее одной гидроксильной группы [268], известна давно и исследуется на протяжении нескольких десятков лет. Знание стереохимии реакции гидролиза позволяет предсказать способность фермента к катализу побочной реакции – переносу гликозидных остатков между молекулами субстрата (трансгликозилирование). Такая способность свойственна только гликозидазам, действующим с сохранением аномерной конфигурации первого углеродного атома в молекуле L-фукозы при образовании продукта реакции [269]. Актуальность исследований ферментативного синтеза углеводов соединений со временем возрастает, хотя использование таких биокатализаторов не лишено недостатков [270].

В углеводной химии для получения важных олигосахаридов используют четыре способа: (а) очистка из природных (крайне дорогой и сложный способ) или рекомбинантных источников (после генетической модификации организмы превращаются в «живые фабрики» по производству целевых соединений); (б) химический синтез углеводов (требует технически сложных трудоемких реакций, связанных с защитой и снятием защиты с реакционноспособных групп); (в) комбинации химического и ферментативного синтеза или же (г) просто ферментативный синтез [271–277]. Ферментативный синтез углеводов продолжает соответствовать требованиям стерео- и региоселективных реакций без побочных продуктов. Многие синтезирующие гликозидазы могут быть интересны с точки зрения использования этих ферментов и продуктов их синтеза в структурной биологии как для описания структурных особенностей активных центров ферментов, а также фармацевтической промышленности, медицине. Ограничением является тот факт, что при таком способе образуются относительно малые выходы целевых продуктов.

Для синтеза фукозиллированных молекул могут быть применены ферменты фукозилтрансферазы (их непосредственной задачей *in vivo* и является синтез) и α -L-фукозидазы с сохраняющим механизмом гидролиза [270]. Ферменты класса фукозилтрансфераз (КФ 2.4.1.x) катализируют реакции переноса остатка L-фукозы от донора ГДФ-фукозы на акцепторные молекулы, включая олигосахариды, гликопротеины, гликолипиды. Следует отметить, что фукозилтрансферазы высокоспецифичны по отношению к акцептору и не способны гидролизовать продукт своей реакции. Более того, наличие фукозилнуклеотида (ГДФ-фукоза) является обязательным условием для работы этих ферментов, а он, в свою очередь, не является легко доступным и для его регенерации необходим внутриклеточный мультиферментный комплекс. Поэтому синтез фукоолигосахаридов чистыми фукозилтрансферазами возможен только в очень малых масштабах промышленными бактериями и крайне затратен. Тем не менее, при помощи фукозилтрансфераз ферментативным синтезом были получены многие фукозиллированные молекулы, включая антигены группы крови [278–281].

Использование гликозидаз как катализаторов для получения гликозидных соединений актуально и применимо в современной синтетической биохимии и инженерии и является шагом к образованию новых химических производств, выигрышных с точки зрения экологичности и устойчивости процессов. Известно, что образование гликозидной связи происходит за счёт химической реакции между аномерным атомом углерода (C1) одной молекулы моносахарида и гидроксильной группой другой молекулы моносахарида, что приводит к образованию кислородного мостика между двумя молекулами. При химическом конструировании связи в олигосахаридах может образовываться только один тип связи (1→1, 1→2, 1→3, 1→4 или 1→6) с использованием доступных атомов углерода второй молекулы (C1, C2, C3, C4 или C6), что называется региоселективностью реакции. В дополнение к региоселективности, увеличение количества образовавшихся гликозидных связей происходит за счёт существования α - и β -изомеров сахаров. В этом случае использование гликозидаз крайне удобно, поскольку они проявляют абсолютную селективность в реакциях трансгликозилирования и образуют только один изомер. Это связано с тем, что образование нежелательного изомера становится невозможным из-за стерических сложностей, вызванных тем, что другие гидроксилы сахара связаны с аминокислотными остатками в активном центре фермента [63]. Будучи доступными, а также из-за стабильности, простоте в использовании и достаточного количества доступных субстратов, гликозидазы имеют ряд преимуществ для использования их в ферментативном синтезе. Поэтому ферменты этого класса (галактозидазы, глюкозидазы, ксилозидазы и другие) интересны для крупномасштабных синтезов соответствующих олигосахаридов [282].

Способность ферментов GH29 катализировать реакции трансфукозилирования (Рисунок 7) указывают на их потенциал для использования в синтезе фукозиллированных соединений для

медицинских целей [10, 12, 283]. Если нуклеофил, атакующий промежуточное соединение гликозил-фермент, представляет собой воду, то в этом случае происходит гидролиз. Если в роли нуклеофила выступает отличное от воды соединение с одной и более гидроксильными группами, то при атаке промежуточного звена α -L-фукозил-ферментного комплекса, происходит трансгликозилирование.

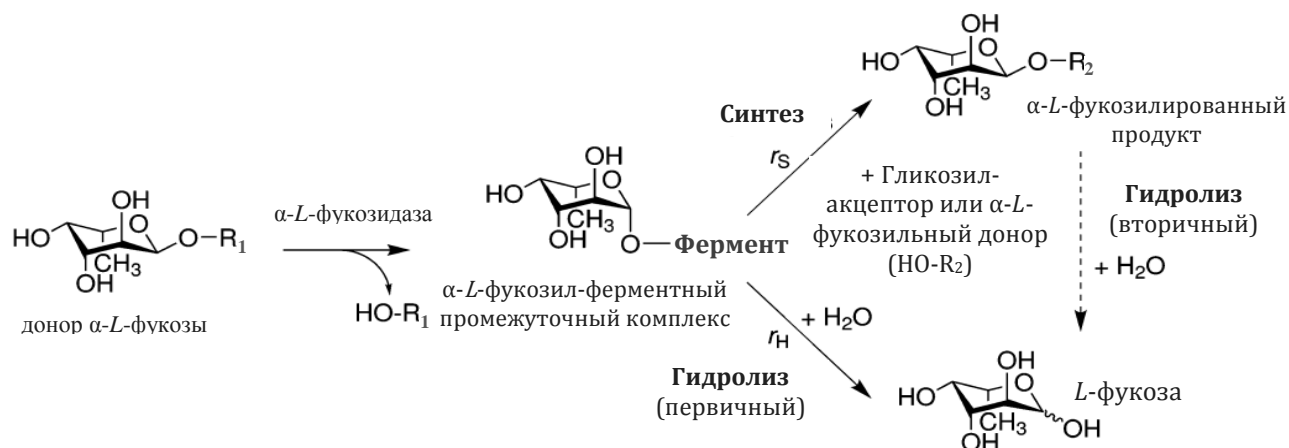


Рисунок 7 – Схема реакций, катализируемых α -L-фукозидазами семейства 29GH (адаптировано из [29]).

Синтез фукозилированных молекул α -L-фукозидазами возможен только *in vitro*, поскольку условия для протекания этих реакций подразумевают насыщенные концентрации донора и акцептора в реакционной смеси [284]. α -L-Фукозидазы способны катализировать реакции трансгликозилирования с различной эффективностью, что продемонстрировано для многих представителей 29-го семейства CAZy, выделенных как из бактерий [12, 13, 53, 283, 285], так и из эукариотических организмов [27–29, 56, 85, 212, 215]. Влияние на выход продуктов трансгликозилирования оказывают структуры используемых доноров и акцепторов: выход продукта будет максимальным, если акцептор в реакции трансгликозилирования имеет высокое сродство к соответствующему участку связывания фермента или донор в реакции трансгликозилирования имеет легко отщепляемую группу при аномерном центре субстрата. Кроме этого, природа агликоновой части акцептора, концентрации субстратов (как донора, так и акцептора), температура, значение pH и время реакции прямым образом влияют на продуктивность реакции трансгликозилирования. Для повышения выходов продуктов реакции трансгликозилирования также используют методы генетической инженерии, изменяя устройство активного сайта фермента путем сайт-направленного мутагенеза. При исследовании свойств и возможностей α -L-фукозидаз катализировать трансфукозилирование с высокими выходами были получены мутантные формы α -L-фукозидазы из *Thermotoga maritima*, работающей как трансфукозидаза [285]. Недавно создана с помощью белковой инженерии мутантная форма

«обращающей» $\alpha(1\rightarrow2)$ -фукозидазы из *Bifidobacterium bifidum* JCM 1254 с получением 1,2- α -L-фукосинтазы (мутант BbAfcA N423H), которая способна специфически присоединять дисахарид Fuc $\alpha(1\rightarrow2)$ Gal на невосстанавливающие концы олигосахаридов Льюиса, *N*- и *O*-связанных гликанов и растительных ксилоглюканов [286, 287]. Белковая инженерия развивается достаточно стремительно и, в одной из новых работ, выполнены структурные модификации по изменению α -спиральной петли вблизи активного сайта $\alpha(1\rightarrow3/4)$ -L-фукозидазы (ЕС 3.2.1.111; GH29) BbAfcB из *Bifidobacterium bifidum* с образованием более эффективной трансфукозидазы [27]. Полученный ферментный препарат способен эффективно синтезировать фукоолигосахариды грудного молока.

В работе [29] выполнен подробный анализ трансгликозилирующей способности известных α -фукозидаз из различных источников. При сравнении соотношения используемых донора/акцептора и получаемых продуктов, можно говорить о том, что в качестве основных доноров *L*-фукозы используют *p*NP α Fuc, а также метилфукозид (Fuc-OMe) и свободную α -фукозу. В роли акцепторов, как правило, используют либо свободные мономеры сахаров β Gal, β Glc, β GlcNAc, либо соединения, содержащие эти мономеры: *p*NP β Gal, *p*NP β Glc, *p*NP β GlcNAc, лактоза и *N*-ацетил-лактозамин. При этом продуктами реакции трансгликозилирования являются фукосахариды с разнообразными типами связи $\alpha(1\rightarrow2/3/4/6)$ с соответствующим акцептором, а для некоторых реакций показано образование трисахаридов [29, 283]. Образование трисахаридов происходит в случае, когда изначально образовавшиеся продукты реакции трансгликозилирования выполняют роль акцептора при дальнейшем протекании реакции. Недавнее исследование трансгликозилирующей активности семи α -фукозидаз из различных организмов микробного происхождения (*F.graminearum*, *Tannerella forsythia*, *B. bifidum*, *Clostridium perfringens*, *Xanthomonas campestris* и *T. maritima*) продемонстрировало возможность эффективного использования в качестве донора *L*-фукозы природный нонасахарид: фукозилированный ксилоглюкан из кожуры цитрусовых [28]. Это соединение входит в состав клеточной стенки растений и содержит концевые $\alpha(1\rightarrow2)$ -связанные *L*-фукозные остатки на боковых цепях. В роли акцепторной молекулы использовали молекулы лактозы. Таким образом, показана возможность использования микробных GH29A α -L-фукозидаз для производства фукозилированных олигосахаридов грудного молока нехимическими методами с использованием доступного для пищевой промышленности в качестве субстрата ксилоглюкана из кожуры цитрусовых, а в качестве акцептора – лактозы из молочной сыворотки.

1.4 Создание биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов

Стратегической задачей инженерной энзимологии является разработка научных основ применения ферментативных катализаторов для создания новых процессов в промышленности, новых методов в терапии и медицинской диагностике, анализе, органическом синтезе и в других областях практической деятельности. Поэтому целесообразен поиск решений по возможному внедрению известных охарактеризованных ферментов для дальнейшего применения. Особенно это актуально для чистых ферментных препаратов, стоимость получения которых высока и не рентабельно их однократное использование в качестве биокатализаторов [57]. Имобилизация ферментов часто обеспечивает многократное использование биокатализатора с улучшенной эксплуатационной стабильностью [288–290].

Методы имобилизации ферментов классифицируются как необратимая имобилизация (ковалентное связывание, захват и агрегация) и обратимая имобилизация (адсорбция, ионное связывание, связывание по сродству и связывание с металлами) [290]. Обратимые методы имобилизации приводят к вымыванию и потере фермента, что может препятствовать повторному использованию фермента и может быть экономически не выгодно. Однако, когда активность обратимо-имобилизованного фермента уменьшается, материал носителя можно перезагрузить свежим ферментом. Необратимая имобилизация может минимизировать потерю фермента посредством сильного связывания материала носителя и фермента, но активность фермента может уменьшаться из-за закрытия (преграждения) активного сайта и диффузных ограничений.

Кроме того, по способу взаимодействия с белковой молекулой методы имобилизации подразделяются на физические и химические. При физической имобилизации фермент не связан с носителем ковалентными связями, включён в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объёма. К физическим относят четыре типа связывания фермента: адсорбция на нерастворимых носителях; включение в поры геля; пространственное отделение фермента от остального объёма реакционной системы с помощью полупроницаемой перегородки (мембраны); включение в двухфазную среду, где фермент растворим и может находиться только в одной из фаз. В свою очередь, при химической имобилизации путём химических взаимодействий между белком и носителем создаются ковалентные связи, которые обеспечивают высокую прочность образующегося конъюгата. Химическая имобилизация зачастую приводит к существенным изменениям свойств ферментов, таких как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность.

При сопоставлении различных приёмов имобилизации, химические методы для крупномасштабных процессов кажутся малопривлекательными из-за сложности и дороговизны. В промышленных процессах обычно используются те или иные методы физической имобилизации. Тем не менее, преимуществами химической имобилизации служит более

прочное связывание белковых молекул и снижение «вымывания» белка. Различные стратегии иммобилизации и их общие характеристики приведены на Рисунке 8. Выбор соответствующего метода иммобилизации и носителя может оказать значительное влияние на кинетику и общую эффективность фермента и, следовательно, на экономическую сторону биокаталитического процесса.



Рисунок 8 – Некоторые методы иммобилизации ферментов (адаптировано из [290]).

Одним из вариантов химической иммобилизации является перекры́тно-сшитые ферментные агрегаты (cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)). Метод впервые был разработан в 1960-х годах для сшивания белков, а в 1990-х годах применён к ферментам и запатентован [291]. Такая иммобилизация обладает рядом преимуществ, поэтому широко применяется в современных исследованиях. Основным сшивающим агентом выступает глутаровый альдегид. В современной практике используют в качестве альтернативы глутаровому альдегиду другие полифункциональные молекулы с более высокой молекулярной массой, поскольку они в меньшей степени закрывают активный центр фермента по сравнению с глутаровым альдегидом [291, 292]. CLEAs пока имеют ограничение по применению в пищевой промышленности, но достаточно перспективны для применения во многих других отраслях промышленности. Перспективность использования этого способа иммобилизации объясняется высокой производительностью катализатора. До 99% массы иммобилизованного CLEAs является каталитической. Кроме того, полученные биокатализаторы обладают улучшенными параметрами стабильности, длительное время сохраняя активность. Поэтому иммобилизация

ферментов часто обеспечивает создание многоразовых биокатализаторов с улучшенной эксплуатационной стабильностью и стойкостью к растворителям [30, 31, 288–290].

1.4.1 Практическое применение иммобилизованных ферментов (*O*-гликозидаз)

Использование методов иммобилизации и применение иммобилизованных ферментов особенно актуально в рутинных промышленных процессах, где применение ферментных препаратов требуется постоянно и в больших количествах. Так, иммобилизованные ферменты класса *O*-гликозидгидролаз ($\beta(1\rightarrow3/4)$ -глюканазы, β -глюкозидазы, амилазы, ксиланазы) активно используют в нескольких повторных циклах гидролиза различных агропромышленных и пищевых отходов [290, 292–294].

Некоторые иммобилизованные ферментные препараты бактериальных сульфатаз используют в прикладных целях. Например, рекомбинантная термостабильная алкилсульфатаза иммобилизована в форме перекрёстно-сшитых белковых агрегатов и имеет большой потенциал для применения в деградации додецилсульфата натрия в промышленных сточных водах [295]. Прикладное значение имеют не только очищенные ферменты сульфатазы, но и иммобилизация бактериальных клеток, например, для разрушения поверхностно-активных веществ, как показано для *Pseudomonas* C12B, имеющих сульфатазную активность [296].

Среди известных α -фукозидаз, имеется лишь одна работа по иммобилизации фермента: α -фукозидаза из мицелиального гриба *Aspergillus awamori* иммобилизована на хитозане в качестве носителя и проявляла активность в гидролизе фукоидана [40].

Поскольку для некоторых *O*-гликозидаз характерен механизм переноса гликозидов на другие молекулы, то, безусловно, интерес к использованию иммобилизованных биокатализаторов в реакциях трансгликозилирования велик и является альтернативой или может служить вспомогательным методом для генетической инженерии. Несмотря на перспективность использования таких биокатализаторов, в научной литературе имеется ограниченное количество публикаций по этой теме. Среди гликозидаз синтез гликоолигосахаридов иммобилизованными ферментами показан для нескольких β -галактозидаз из бактериальных организмов [57–61].

1.5 Заключение

В обзоре литературы проведен анализ современных представлений о поиске и идентификации продуцентов для получения нужных ферментных препаратов, а также оценена степень изученности биохимических особенностей ферментов α -*L*-фукозидаз и сульфатаз из различных источников и пути их применения для решения биохимических задач.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Реагенты и материалы

Неорганические соли производства Sigma-Aldrich (США), Acros Organics (Бельгия) или Реахим (Россия). Неорганические кислоты, органические растворители производства Реахим или Вектон (Россия). Все реактивы отечественного производства имели квалификацию «хч» и «осч», реактивы зарубежного производства – “biotechnology grade” и “ultra pure grade”. Акриламид, бис-акриламид, глицин, трис(гидроксиметил)аминометан, глицерин, β-меркаптоэтанол, дитиотреитол (ДТТ), N,N,N',N'-тетраметилен-этилендиамин (ТЕМЕД), персульфат аммония (ПСА), толуидиновый синий, глицин, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА Na), фенилметансульфонилфторид (ФМСФ), никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) — коммерческие препараты фирмы Sigma-Aldrich (США). Красители Кумасси G250 и R250 приобретены в фирме (LKB Bromma, Франция). Глутаровый альдегид приобретен в фирме AppliChem GmbH (Германия). Пищевой желатин производства «Проммикс» (Россия).

Механически измельчённые бурые водоросли *L. digitata* приобретены в компании «Верина» (Россия), смесь водорослей *L. digitata* и *F. vesiculosus* – в компании «Исцеление» (Россия). Компоненты для питательных сред, пептон, дрожжевой экстракт (Difco, США).

Носители для ионообменной хроматографии ДЭАЭ-Sephadex A50 (Pharmacia FineChem, Швеция) и гель-фильтрации Sephacryl S200, Sephadex G200 приобретены в компании Sigma-Aldrich (США).

Колонки для ВЭЖХ: BioSuite Q 10мм АХС (7,5 × 75 мм, Waters, Япония), TSKgel Phenyl-5PW (TOSOH Bioscience, США), MonoQ FPLC (22 × 100 мм), Resolve C18 (90 Å, 5 мкм, 3,9 × 300 мм, Waters, Ирландия).

L-фукоза, *D*-ксилоза, *D*-глюкоза, *D*-галактоза, *N*-ацетил-*D*-глюкозамин, 6-*O*-α-*L*-Fuc-N,N'-диацетил-хитобиоза, картофельный крахмал, целлюлоза Avicel PH-101, ламинарин из *L. digitata*, β-глюкан, ксилан из бука приобретены в Sigma-Aldrich (США); 1-деоксифуконоджиримицин HCl – Carbosynth Ltd. (США).

Субстраты *n*-нитрофенил *N*-ацетил β-*D*-глюкопиранозид (*p*NPNAcβGlc), *n*-нитрофенил *N*-ацетил α-*D*-глюкопиранозид (*p*NPNAcαGlc) приобретены в фирме AppliChem GmbH (Германия); субстраты *n*-нитрофенил α-*L*-фукопиранозид (*p*NPFuc), *n*-нитрофенил α-*D*-галактопиранозид (*p*NPαGal), *n*-нитрофенил *N*-ацетил-α-*D*-галактопиранозид (*p*NPNAcαGal) синтезированы из соответствующих моносахаридов с использованием метода, описанного для α-гликозидов [297] в ЛЭ ОМРБ. Субстраты *n*-нитрофенил β-*L*-фукопиранозид (*p*NPβFuc) и *n*-нитрофенил β-*D*-галактопиранозид (*p*NPβGal) синтезированы согласно методике [298] в ЛЭ ОМРБ; *n*-нитрофенил

сульфат натрия (*p*NPS), *хлоро*-нитрофенил- β Gal-6SO₃Na, *n*-нитрофенил- β Gal-6SO₃-триэтиламин, *n*-нитрофенил- β XylSO₃-триэтиламин синтезированы в ЛЭ ОМРБ по методике [299]; *N*-ацетилглюкозамин-6-*O*-сульфат и *n*-нитрофенил фосфат ди(2-амино-2-этил-1,3-пропандиол) соль (*p*NPP) приобретены в компании Sigma-Aldrich (США). Фукобиозиды *L*-Fuc- α -(1 \rightarrow 2)-*L*-Fuc- α -OPr, *L*-Fuc- α -(1 \rightarrow 3)-*L*- α -OPr и *L*-Fuc- α -(1 \rightarrow 4)-*L*-Fuc- α -OPr, пропилфукозид Fuc- α -OPr [300], *D*-Gal- β -(1 \rightarrow 4)-*L*-Fuc- α -(1 \rightarrow 3)- β -*D*-GlcNAc-OMe (Le^X) [301] и *L*-Fuc- α -(1 \rightarrow 2)-*D*-Gal- β -(1 \rightarrow 4)- β -*D*-GlcNAc-OMe (антиген группы крови Н типа II, Le^d) [302] любезно предоставлены профессором, чл.-корр. Нифантьевым Н.Э. и с.н.с. Устюжаниной Н.Е. (лаборатория химии гликоконъюгатов, Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН). Фукосахарид *L*-Fuc- α -(1 \rightarrow 4)-*D*-GlcNAc-РАА любезно предоставлен профессором Бовиным Н.В. (лаборатория углеводов, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Стандартные белки: бычий сывороточный альбумин (БСА), алкогольдегидрогеназа из *Saccharomyces cerevisiae*, овальбумин, цитохром С (Sigma-Aldrich, США); β -ксилозидаза [303] и α -галактозидаза [304] из *Trichoderma reesei* из коллекции лаборатории энзимологии ОМРБ ПИЯФ НИЦ «КИ». Набор стандартных белков для ПААГ-электрофореза «Perfect Protein™ Electrophoresis Marker» 10-150 кДа фирмы «Merk Millipore» (Германия). Комбинация ферментов для гидролиза фукоидана: β -глюкозидаза из *Scytalidium candidum* ЗС [305], β -галактозидаза из *Penicillium* sp. [306], β -маннозидаза из *Trichoderma reesei* [307], β -ксилозидаза из *Aspergillus awamori* [308] из коллекции лаборатории энзимологии ОМРБ ПИЯФ НИЦ «КИ».

2.2 Микроорганизмы и условия их культивирования

В работе использовали 20 штаммов мицелиальных грибов рода *Fusarium*. Штамм *F. proliferatum* LE1 был выделен с поверхности 1% (вес/об.) раствора фукоидана, полученного из бурых водорослей *Laminaria digitata*/*Fucus vesiculosus* по методике [309]. Штаммы *F. culmorum* ПИЯФ и F2 были взяты из коллекции лаборатории энзимологии ОМРБ ПИЯФ. Штаммы *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg # 58510, 58524, 81601, 58471 и *F. verticillioides* (Sacc.) # 58526, 3621 и 3622 любезно предоставлены сотрудниками лаборатории микологии и фитопатологии Всероссийского института защиты растений (ВИЗР, Санкт-Петербург – Пушкин).

2.2.1 Среды для скрининга активностей гликозидаз у штамма *F. proliferatum* LE1

Для первичного скрининга фермента α -L-фукозидазы, штаммы мицелиальных грибов выращивали на минимальной среде Чапека без глюкозы (г/л дистиллированной воды): NaNO_3 – 2, KH_2PO_4 – 1, MgSO_4 – 0,5, KCl – 0,5, агар–агар – 15. В качестве источника углерода на поверхность разлитой по чашкам Петри (15 мл) и охлажденной до комнатной температуры агаризованной среды добавляли 200 мкл 7 мМ раствора *p*NPFuc и растирали микробиологическим шпателем по поверхности до полного высыхания. Для скрининга активности сульфатазы, к минимальной среде Чапека добавляли сахарозу (15 г/л). В качестве хромогенного субстрата на поверхность охлажденной среды наносили 200 мкл 8,9 мМ *p*-нитрофенилсульфат натрия (*p*NPS). Кусочек мицелия каждого из используемых в работе штаммов рода *Fusarium* помещали на среду Чапека и инкубировали при 28 °С в течение 5 дней.

Для исследования условий секреции ферментов альфа-L-фукозидазы и сульфатазы штаммом *F. proliferatum* LE1, культивирование культуры проводили на питательных средах различного состава, г/100 мл искусственной морской воды: среда А – измельчённые бурые водоросли *L. digitata*, 2; отруби, 1, рН 7.5; среда В: среда А + пептон, 0.5; среда С: среда В, рН 5.0; среда D: измельченные бурые водоросли *L. digitata*, 2, пептон 1, рН 7.5; среда E: измельченные бурые водоросли *L. digitata*, 2, дрожжевой экстракт, 0.5, рН 7.5; среда F: смесь измельченных бурых водорослей *L. digitata*/*F. vesiculosus*, 2, пептон, 0.5, отруби, 1, рН 5.0. Культивирование проводили в колбах Эрленмеера (объемом 400 мл), содержащих 100 мл соответствующей среды при температуре 28°С на качалке со скоростью вращения 125 об/мин в течение 10 суток. Искусственная морская вода приготовлена в соответствии с протоколом, описанным на веб-сайте Коллекции водорослей и протозойных культур (<http://www.ccap.ac.uk>).

Для выделения сульфатазы из *F. proliferatum* LE1, штамм в течение трёх суток культивировали при температуре 28°С на шейкере со скоростью вращения 125 об/мин на среде G, содержащей следующие компоненты, г/л искусственной морской воды: дрожжевой экстракт — 5; пептон — 5; глюкоза — 5; рН 7,4.

Для индукции и последующего выделения α -L-фукозидазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1, штамм выращивали на среде, содержащей, г/л дистиллированной воды: дрожжевой экстракт — 5; пептон — 5; NaCl – 5; глюкоза — 5; рН 7,4, в течение 2 дней при 28°С на шейкере. Затем клетки стерильно центрифугировали, дважды отмывали раствором 20 мМ Трис- HCl буфера, рН 7,4 и переносили в раствор 0,2%-го (вес / об.) раствора L-фукозы в том же буфере (среда H) для дальнейшего культивирования при описанных выше условиях в течение 24 часов. Финальная концентрация клеток составляла 40-50 мг (мокрого осадка) на мл среды с L-фукозой.

2.3 Аналитические и физико-химические методы исследования

2.3.1 Определение концентрации белка

Концентрацию белка в растворах определяли по методу Брэдфорд [310]. В качестве стандарта для построения калибровочных кривых использовали бычий сывороточный альбумин. Концентрацию чистого ферментного препарата α -L-фукозидазы определяли по поглощению при 280 нм.

2.3.2 Определение молекулярной массы и чистоты исследуемых ферментов

Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Чистоту и молекулярную массу исследуемых ферментов в денатурирующих условиях устанавливали с использованием электрофореза в 10%-ном ПААГ в присутствии ДСН по методу Лэммли [311]. В качестве стандартных белков использовали коммерческий набор Perfect Protein™ Electrophoresis Marker (Merck Millipore, Германия) с молекулярными массами 15 – 150 кДа.

Определение молекулярной массы белков в нативных условиях. Молекулярную массу нативных ферментов определяли с помощью гель-фильтрации на колонке Sephacryl S200 (0,5 × 700 мм), уравновешенной 20 мМ натрий ацетатным буфером, pH 5,5, содержащим 50 мМ NaCl (для α -L-фукозидазы) или 20 мМ калий фосфат-цитратным буфером, pH 6,5, содержащим 50 мМ NaCl (для сульфатазы). В качестве стандартов использовали белки с известной молекулярной массой: алкогольдегидрогеназу из *Saccharomyces cerevisiae* (150 кДа), β -ксилозидазу (95 кДа) и α -галактозидазу (54 кДа) из *Trichoderma reesei*, овалбумин куриного яйца (47 кДа), цитохром С (12,3 кДа).

Определение изоэлектрической точки. Изоэлектрическую точку для ферментного препарата α -L-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 определяли с помощью двумерного гель-электрофореза (2DE) по методике, описанной в работе [312].

2.4 Выделение ферментов

2.4.1 Выделение и очистка НАД⁺-зависимой альфа-L-фукоздегидрогеназы

Грубый ферментный препарат НАД⁺-зависимой α -L-фукоздегидрогеназы получали из свежей свиной печени и осаждали сульфатом аммония согласно процедуре, описанной в работе

[313]. Осадок отделяли центрифугированием, диализовали против 5 мМ натрий фосфатного буфера, рН 7,4 и наносили на колонку ДЭАЭ-Sephadex A50, уравновешенную тем же буфером. Элюирование проводили линейным градиентом NaCl 0 — 0,3 М в 5 мМ натрий фосфатном буфере, рН 7,4. Активные фракции наносили на колонку с гидрофобным сорбентом Phenyl Sepharose (20 × 110 мм), уравновешенную 1,5М сульфатом аммония в растворе 0,02 М Трис-НСl, рН 7,4. Элюирование вели линейным градиентом 1,5 — 0 М раствора сульфата аммония в 20 мМ Трис-НСl буфере, рН 7,4. Фракции с активностью НАД⁺-зависимой α -L-фукоздегидрогеназы наносили на колонку Sephacryl S-200 (25 × 700 мм), уравновешенную 0,02 М Трис-НСl буфером, рН 7,4, содержащим 50 мМ NaCl. Полученный ферментный препарат концентрировали с использованием мембран Microcon 30000 MWCO (Millipore Corporation, США) и хранили при 4°C.

2.4.2 Выделение и очистка сульфатазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1

Все стадии выделения фермента проводили при 4 °С. На третьи сутки роста культуры на среде G (п. 2.2.1) клеточную биомассу отделяли центрифугированием (9000 g × 60 мин). К клеткам добавляли 3 объема (от объема клеток) 20 мМ фосфат-цитратного буфера, рН 6,1 (буфер А) для получения суспензии клеток и разрушали клетки под давлением в гомогенизаторе (EmulsinFlex-SB, Avestin, Канада). Гомогенат центрифугировали (9000 g × 60 мин), полученный супернатант осаждали до 40 % степени насыщения сульфатом аммония. Сформировавшийся осадок отбрасывали, а к оставшемуся клеточному экстракту добавляли сульфат аммония до степени насыщения 80%. Осадок отделяли центрифугированием (6000 g × 30 мин), диализовали против буфера А и наносили на колонку ДЭАЭ-Sephadex A50 (20 × 300 мм), уравновешенную тем же буфером. Фракции, содержащие сульфатазную активность, элюировали линейным градиентом 0 – 1 М раствора NaCl в буфере А, объединяли и вновь диализовали против буфера А. Ферментный препарат наносили на колонку с анионообменным сорбентом MonoQ FPLC, уравновешенную буфером А. Элюирование проводили линейным градиентом 0 – 1 М NaCl в буфере А в течение 30 мин при скорости потока 1,0 мл / мин. Активные фракции собирали, растворяли в равном объеме 2,5 М (NH₄)₂SO₄ в буфере А и наносили на колонку TSKgel Phenyl-5PW (TOSOH Bioscience, США), уравновешенную 1,25 М (NH₄)₂SO₄ в буфере А. Хроматографию проводили с использованием линейного градиента 1,25 – 0 М (NH₄)₂SO₄ в буфере А в течение 30 мин при скорости потока 1,0 мл/мин. Фракции, проявляющие сульфатазную активность, наносили на колонку для гель-проникающей хроматографии Sephadex G-200 (7 × 100 мм), уравновешенную буфером А, содержащим 50 мМ NaCl. Элюирование проводили рабочим буфером со скоростью 0,2 мл/мин. Полученный ферментный препарат концентрировали с

использованием мембран Microcon 30000 MWCO (Millipore Corporation, США) и хранили при 4 °С.

2.4.3 Выделение и очистка α -L-фукозидазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1

Все стадии выделения фермента выполняли при температуре 4°C. После индукции на среде Н (описано в п. 2.2.2) клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (6000 g × 40 мин). Супернатант диализовали против 0,01 М калий-фосфатного буфера, рН 6,5 (буфер Б) и наносили на колонку ДЭАЭ-Sephadex A50 (20 × 300 мм), уравновешенную тем же буфером. Элюирование проводили линейным градиентом 0,01 – 0,5 М раствора калий фосфатного буфера, рН 6,5. Фракции, содержащие α -L-фукозидазную активность, объединяли и диализовали против буфера Б. Ферментный препарат наносили на колонку с анионообменным сорбентом BioSuite Q10 АХС (7,5 × 75 мм, Waters, Япония), уравновешенную буфером Б. Элюировали линейным градиентом 0,01 – 0,5 М калий фосфатного буфера, рН 6.5 в течение 30 мин при скорости потока 1,0 мл/мин. Фракции, проявляющие α -фукозидазную активность, объединяли и наносили на колонку для гель-фильтрации Sephacryl S-200 (25 × 700 мм), уравновешенную 20 мМ натрий-ацетатным буфером, рН 5.5, содержащим 50 мМ NaCl (буфер В). Элюирование вели в буфере В. Фракции, обладавшие α -фукозидазной активностью, растворяли в 1,5 М (NH₄)₂SO₄ и наносили на колонку TSKgel Phenyl-5PW (TOSOH Bioscience, США), уравновешенную 1,5 М (NH₄)₂SO₄ в буфере В. Колонку промывали буфером с последующим элюированием связавшегося белка линейным градиентом 1,5 – 0 М (NH₄)₂SO₄ в буфере В в течение 30 мин при скорости потока 1,0 мл/мин. Собранные фракции с α -L-фукозидазной активностью диализовали против буфера В, концентрировали ультрафильтрацией с использованием мембран Microcon 30000 MWCO (Millipore Corporation, США). Белок хранили при 4°C для дальнейшего использования.

2.5 Иммуобилизация α -L-фукозидазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1

Иммуобилизацию α -L-фукозидазы осуществляли с использованием метода [314] с некоторыми модификациями. 0,5 г пищевого желатина растворяли в 5 мл 0,05 М натрий ацетатного буфера, рН 5,2, нагревали смесь до полного растворения желатина, а затем охлаждали до 37 °С. К 2 мл приготовленного 10%-го (вес/об.) раствора желатина добавляли 200 мкл очищенного ферментного препарата α -L-фукозидазы (0,3 ед. акт.) и тщательно перемешивали. Смесь немедленно переносили в чашку Петри и выдерживали при 4 °С в течение 1 часа. После этого, на поверхность застывшего желатина наливали 4 мл 12,5% (об. / об.) раствора глутарового альдегида и выдерживали при 4 °С в течение 1 часа. Оставшийся над поверхностью пластины

желатина раствор глутарового альдегида удаляли и трижды промывали иммобилизованный в желатине фермент 0,05 М натрий ацетатным буфером, pH 5,2. Иммобилизованный фермент хранили при 4 °С в 0,05 М натрий ацетатном буфере, pH 5,2.

2.6 Определение активности ферментов

Для определения активностей гликозидгидролаз штамма *F. proliferatum* LE1, аликвоты культуральной жидкости отбирали на 5-е сутки роста на среде F и центрифугировали при 9000 g в течение 20 мин. **Активность экзо-гликозидаз** определяли с использованием хромогенных субстратов. Стандартную реакционную смесь, содержащую 100 мкл культуральной жидкости, 20 мкл раствора (2 мг/л) соответствующего *n*-нитрофенилгликозида (*p*NP α Gal, *p*NP α Glc, *p*NP α DMan, *o*NP β Glc, *p*NP β LFuc, *p*NP β -целлобиозид, *p*NP β Xyl, *p*NP β Gal, *p*NPNAc β DGlc, *p*NP β Fuc) и 20 мкл 0,5 М натрий фосфатного буфера, pH 6,5, инкубировали при 37 °С в течение 90 мин. Реакцию останавливали добавлением 10% (вес / об.) раствора Na₂CO₃. Поглощение освободившегося *n*-нитрофенола измеряли спектрофотометрически при 400 нм на спектрофотометре JascoV-560 UV/Vis (Jasco, Analytical Instruments, Япония) относительно соответствующих контролей. Концентрацию освободившегося хромофора определяли, используя коэффициент экстинкции 18300 M⁻¹ см⁻¹ для иона *p*NP. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализировало гидролиз 1 мкмоль *n*-нитрофенилгликозида за 1 минуту в условиях определения. Удельную активность была определена как число единиц активности фермента на 1 мл ферментного препарата.

Активность эндо-гликозидгидролаз штамма *F. proliferatum* LE1 определяли с использованием качестве субстратов следующие полисахариды: картофельный крахмал, целлюлозу Avicel PH-101, ламинарин из *L. digitata*, β -глюкан, ксилан из бука и фукоидан из *L. digitata*. Аликвоту культуральной жидкости предварительно диализовали против 20 mM натрий ацетатного буфера, pH 5,5. Реакционную смесь, содержащую 100 мкл культуральной жидкости и 100 мкл соответствующего раствора субстрата (10 мг/мл), инкубировали в течение 16 часов при 37 °С. Количество восстанавливающих сахаров, образующихся при гидролизе соответствующих полисахаридов, определяли методом Сомоджи-Нельсона [315]. За единицу активности эндо-гликозидгидролазы принимали количество фермента, способного высвободить 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу) в описанных условиях. Удельная активность эндо-гликозидаз была определена как как число единиц активности фермента на 1 мл ферментного препарата.

Для исследования динамики секреции в культуральную среду ферментов α -L-фукозидазы и сульфатазы исследуемым штаммом на средах А-Ф, осуществляли отбор проб (5 мл) в течение 10 дней роста культуры. Культуральную жидкость центрифугировали при 9000g в течение 20 мин. Реакционная смесь содержала 100 мкл супернатанта, 50 мкл 0,5 М калий фосфатного буфера, рН 6,5 и 20 мкл 10 мМ *pNPFuc* или *pNPS*, соответственно. Время инкубации 16 часов при 37 °С. Активность ферментов в гидролизе хромофорных субстратов была определена как описано выше.

Определение активности сульфатазы в культуральной жидкости, а также внутри клеток осуществляли при росте штамма *F. proliferatum* LE1 на среде F. Аликвоты культуральной жидкости (5 мл) с клетками отбирали ежедневно в течение 10 дней, центрифугировали при 9000 g в течение 20 мин. Клетки промывали трижды 10-15 мл раствором 20 мМ Трис-НСl, рН 7,4, механически растирали в жидком азоте до гомогенной суспензии и центрифугировали. Реакционная смесь содержала 70 мкл культуральной жидкости или клеточного экстракта, 30 мкл 1М Трис-НСl, рН 7,4 и 10 мкл *pNPS* (10 мМ). Инкубирование проводили в течение 120 мин при 37 °С. Активность сульфатазы в гидролизе хромофорного субстрата была определена как описано выше. Удельную активность фермента рассчитывали как число единиц активности фермента на 1 мг белка.

Реакционная смесь (50 мкл) для определения активности сульфатазы в процессе очистки фермента после роста на среде G содержала 4 мМ *pNPS* в буфере 0,1 М Трис-НСl, рН 7,4. Реакцию инкубировали в течение 20 мин при 40 °С. Удельную активность фермента определяли как число единиц активности фермента на 1 мг белка.

Активность α -L-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 определяли в реакционной смеси (80 мкл), содержащей 3,5 мМ *pNPFuc* в буфере В. Инкубирование проводили в течение 20 мин при 37 °С. Удельная активность фермента была определена как число единиц активности фермента на 1 мг белка. Активность α -L-фукозидазы в гидролизе различных фукоолигосахаридов без хромофорной группы (пропил-фукозид, фукобиозиды с различными типами связи, Le^x, Le^d, L-Fuc- α -(1→4)-D-GlcNAc-РАА и 6-диацетил фукохитобиоза) измеряли с использованием НАД⁺-зависимой α -L-фукоздегидрогеназы согласно методике [316]. Измерение образовавшегося НАДН определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Для построения калибровочной зависимости использовали свободную L-фукозу в пределах 0,01-0,10 мкмоль.

Для определения активности иммобилизованной α -L-фукозидазы, пластину желатина, содержащую фермент, разрезали при помощи скальпеля на фрагменты размером 2 мм³ (иммобилизованный биокатализатор, ИБ). Реакционная смесь (80 мкл) содержала 3,5 мМ *pNPFuc* в 50 мМ натрий-ацетатном буфере, рН 5,2 и ИБ. Реакцию инкубировали в течение 20 мин при 37 °С. Активность иммобилизованной фукозидазы оценивали как описано выше для гликозидаз в

гидролизе хромофорных субстратов. Для учёта относительной погрешности размера фрагментов ИБ для нескольких параллельных экспериментов вводили поправочный коэффициент.

Выход иммобилизации α -L-фукозидазы определяли по формуле (1):

$$\text{Выход иммобилизации} = \frac{A_{\text{связ}} - A_{\text{своб}}}{A_{\text{общ}}} \times 100\% \quad (1),$$

где $A_{\text{связ}}$ – активность иммобилизованного фермента; $A_{\text{своб}}$ – активность не связавшегося фермента, определённая в отобранном с поверхности растворе глутарового альдегида и буфере после промывки; $A_{\text{общ}}$ – общая активность α -фукозидазы, взятая для иммобилизации.

Активность иммобилизации была определена как отношение остаточной активности иммобилизованного фермента $A_{\text{связ}}$ к начальной активности α -фукозидазы, взятой для иммобилизации $A_{\text{общ}}$.

Активность НАД⁺-зависимой альфа-L-фукоздегидрогеназы определяли по методу [316].

2.7 Масс-спектральный анализ пептидов

Масс-спектрометрический анализ пептидов выполнен сотрудниками лаборатории системной биологии Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (д.б.н. Нарыжный С.Н. и д.б.н. Згода В.Г.).

2.8 Определение физико-химических свойств ферментов

2.8.1 Определение pH оптимума ферментов

Реакционную смесь (80 мкл), содержащую 10 мкл раствора фермента (0,01 ед. FrFucA или 0,05 ед. FrC), 50 мкл 0,2 М Na-фосфат-цитратного буфера со значениями pH (3,0 – 7,2), 0,2 М Na-фосфатного буфера, pH (6,5 – 8,0) или 0,25 М Трис-HCl буфера со значениями pH (6,0 – 9,0) и 20 мкл соответствующего субстрата (3,5 мМ *p*NPFuc для FrFucA или 4 мМ *p*NPS для FrC), инкубировали 20 минут при 37 °С. Для иммобилизованной FrFucA использовали один фрагмент ферментного препарата (0,01 ед.). Активность ферментов определяли спектрофотометрически как описано ранее. Полученные значения пересчитывали в относительные единицы, принимая за 100% максимальное значение.

2.8.2 Определение pH стабильности ферментов

Зависимость стабильности ферментов от значения кислотности среды определяли после предварительного инкубирования 10 мкл фермента (0,01 ед. FrFucA или 0,05 ед. FrC) с 20 мкл 0,2 М Na-фосфат-цитратного буфера со значениями pH (3,0 – 7,2), 0,2 М Na-фосфатного буфера, pH (6,5 – 8,0) или 0,25 М Трис-НСl буфера со значениями pH (6,0 – 9,0) в течение 16 часов при 37 °С. Затем к инкубационной смеси добавляли 30 мкл 0,5 М ацетата натрия, pH 5,5 (для FrFucA) или 0,5М Трис-НСl буфера, pH 7,1 (для FrC) и 20 мкл соответствующего субстрата (*p*NPFuc или *p*NPS) и инкубировали при 37 °С в течение 20 мин. Остаточную активность определяли как описано ранее.

2.8.3 Определение температурного оптимума ферментов

Температурную зависимость активности ферментов α -L-фукозидазы и сульфатазы определяли путем измерения активности белка в течение 20 минут в диапазоне температур 10 - 90 °С в растворе 20 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 5,5 для FrFucA или в растворах 0,1 М Трис-НСl, pH 7,1, содержащий 0,2М NaCl или 0,2М фосфат-цитратный буфер, pH 6,1 для FrC, используя в качестве субстратов *p*NPFuc или *p*NPS, соответственно.

2.8.4 Определение температурной стабильности ферментов

Температурную стабильность ферментов α -L-фукозидазы и сульфатазы определяли посредством измерения остаточной активности в стандартных условиях после инкубации пробы белка в течение 20 минут в диапазоне температур 10 – 80 °С и последующим быстрым охлаждением.

2.8.5 Определение влияния ионов металлов

Влияние ионов металлов на ферментативную активность определяли после предварительного инкубирования раствора фермента FrFucA с растворами 2 мМ Hg²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ и ЭДТА в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,5 в течение 5 мин с последующим стандартным измерением активности фермента.

2.9 Определение кинетических характеристик и констант ингибирования реакций гидролиза, катализируемых ферментами

Кинетические параметры реакций гидролиза, катализируемых ферментами (константы Михаэлиса (K_M) и каталитические константы скоростей реакций гидролиза ($k_{кат}$)) каждого из субстратов определяли методом начальных скоростей с последующей обработкой данных с помощью нелинейного регрессионного анализа уравнения Михаэлиса-Ментен.

α -L-Фукозидаза из *F. proliferatum* LE1. Реакцию гидролиза хромофорного субстрата *p*NPFuc проводили в 20 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,5), содержащего 1 мг/мл БСА, в диапазоне концентраций субстрата 0,4 – 10,5 мМ и 0,01 ед. FpFucA при температуре 37 °С. Начальные скорости гидролиза *p*NPFuc определяли спектрофотометрически, регистрируя освободившийся *n*-нитрофенол при длине волны 400 нм с использованием спектрофотометра JascoV-560 UV/Vis (Jasco, Япония), оснащенного циркулирующей водяной баней. Константа Михаэлиса и каталитическую константу $k_{кат}$ рассчитывали из графиков Лайнуивера-Берка.

Константы конкурентного ингибирования (K_I) в реакции гидролиза *p*NPFuc определяли в диапазоне концентраций ингибитора 0,2 – 0,6 мМ для *L*-фукозы и 10 – 70 нМ для 1-дезоксифукоджиримицина. Определение активности проводили спектрофотометрически, также как описано для определения K_M . Ингибирующее действие Триса на активность FpFucA оценивали в кинетических экспериментах с *p*NPFuc как описано ранее. В качестве контрольного буфера использовали 50 мМ калий фосфатный буфер, pH 7,4 или 20 мМ и 50 мМ Трис-HCl-буфера, pH 7,4. Для компенсации влияния ионной силы на фермент к растворам Триса и фосфатного буфера добавляли раствор 0,1 М NaCl.

Кинетические параметры реакции гидролиза пропилфукозида и фукобиозидов определяли, рассматривая их как конкурентные субстраты при гидролизе хромогенного субстрата *p*NPFuc. Конкурентный тип ингибирования определяли путем анализа кинетических кривых как функции от концентрации ингибитора. Константы конкурентного ингибирования (K_I) для *L*-Fuc- α -OPr и фукобиозидов (*L*-Fuc- α -(1→2)-*L*-Fuc- α -OPr, *L*-Fuc- α -(1→3)-*L*-Fuc- α -OPr и *L*-Fuc- α -(1→4)-*L*-Fuc- α -OPr) оценивали, используя следующие концентрации ингибиторов: 1-6 мМ (*L*-Fuc- α -OPr); 0,5-5 мМ (*L*-Fuc- α -(1→2)-*L*-Fuc- α -OPr); 2-10 мМ (*L*-Fuc- α -(1→3)-*L*-Fuc- α -OPr); 0,6-3 мМ (*L*-Fuc- α -(1→4)-*L*-Fuc- α -OPr). Экспериментальные данные обрабатывали с помощью нелинейного регрессионного анализа уравнения Михаэлиса-Ментен. Обработка данных и построение графиков выполнены с использованием программы Origin 8.0 (OriginLab Corp.). Соответствующие контроли были учтены для компенсации поглощающей способности растворов субстратов и/или других используемых соединений.

Значение константы ингибирования K_I рассчитывали для различных концентраций ингибитора по уравнению:

$$\frac{v_0}{v_i} - 1 = K_M \frac{\frac{K_M [I]}{K_I}}{K_M + S_0} \quad (2),$$

где v_0 – скорость реакции без ингибитора; v_i – скорость реакции с ингибитором; K_M – константа Михаэлиса-Ментен; S_0 – начальная концентрация субстрата; K_I – константа конкурентного ингибирования; $[I]$ – концентрация конкурентного ингибитора.

Для каждого ингибитора кажущиеся константы Михаэлиса $K_M^{\text{каж}}$ и число оборотов $k_{\text{кат}}$ были рассчитаны из графиков Лайнуивера-Берка и константы K_I были получены с использованием линейной регрессии зависимости $K_M^{\text{каж}}$ от концентрации ингибитора $[I]$ [317].

Относительные скорости гидролиза фукобиозидов, L -Fuc- α -OPr и фукозосодержащих субстратов (D -Gal- β -(1 \rightarrow 4)- L -Fuc- α -(1 \rightarrow 3)- β - D -GlcNAc-OMe (Le^x), L -Fuc- α -(1 \rightarrow 2)- D -Gal- β -(1 \rightarrow 4)- β - D -GlcNAc-OMe (Le^d), L -Fuc- α -(1 \rightarrow 4)- D -GlcNAc-PAA и D -GlcNAc- β -(1 \rightarrow 4)- L -Fuc- α -(1 \rightarrow 6)- D -GlcNAc) оценивали по высвобождению L -фукозы, которое определяли с использованием НАД⁺-зависимой фукоздегидрогеназы по методике, описанной в работе [316]. Реакционную смесь (10 мкл), содержащую 0,375 ед. FrFucA и соответствующий фукозосодержащий субстрат, инкубировали в течение 17 часов при 37 °С в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,5, содержащем 50 мМ NaCl. Реакционную смесь с Le^d -сахаридом инкубировали в течение 2 часов при этих условиях. Концентрации субстратов были следующими: 4,9 мМ (L -Fuc- α -(1 \rightarrow 2)- L -Fuc- α -OPr, 10,2 мМ L -Fuc- α -(1 \rightarrow 3)- L -Fuc- α -OPr, 2,4 мМ L -Fuc- α -(1 \rightarrow 4)- L -Fuc- α -OPr), 24 мМ L -Fuc- α -OPr и 9 мМ Le^x , Le^d , L -Fuc- α -(1 \rightarrow 4)- D -GlcNAc-PAA и 6- O - α - L -Fuc-N,N'-диацетилхитобиоза. Концентрацию свободной L -фукозы определяли по калибровочной кривой в диапазоне концентрации от 0,01 до 0,1 мМ.

Сульфатаза из F. proliferatum LE1. Кинетические параметры реакций гидролиза, катализируемые сульфатазой FrC, определяли в 20 мМ Трис-НСl буфере, pH 7,1 при 40 °С с использованием *p*NPS в качестве субстрата в диапазоне концентраций 0,17 – 15,5 мМ. Значение K_M определяли методом начальных скоростей с последующей обработкой экспериментальных данных с помощью нелинейного регрессионного анализа уравнения Михаэлиса-Ментен. Обработка данных и построение графиков выполнены с использованием программы Origin 8.0.

Влияние ионной силы на активность FrC измеряли в 0,1 мМ Трис-НСl буфере, pH 7,1 и 30–630 мМ NaCl при стандартных условиях. Влияние 10 мМ дитиотреитола (ДТТ), 10 мМ ЭДТА и 10 мМ фенилметилсульфофлюорида (ФМСФ) определяли после предварительного инкубирования FrC в течение 5 мин и последующего измерения активности как описано ранее.

Ингибирующий эффект неорганического сульфата определяли путем добавления Na_2SO_4 к реакционной смеси в диапазоне концентраций 5 – 90 мМ в гидролизе *p*NPFuc и стандартного измерения гидролитической активности фермента FpC. Для компенсации любого фонового поглощения субстратом или другими используемыми соединениями были учтены соответствующие контроли.

2.10 Определение стереохимии ферментативного гидролиза α -*L*-фукозидазы методом ^1H ЯМР спектроскопии

Сtereoхимию реакции гидролиза, катализируемой FpFucA, определяли с использованием спектрометра Varian NMR 700 МГц. Ампулу, содержащую 7 мМ *p*NPFuc, растворенного в 600 мкл 20 мМ натрий-ацетатного буфера, сделанного на основе D_2O , pH 5,5 (без коррекции D_2O), помещали в спектрометр и прогревали до 37 °C в течение 20 мин, в результате чего были оптимизированы однородность магнитного поля и подавление сигнала растворителя. Импульсная последовательность с блоком подавления воды WET использовалась для подавления сигнала остаточного растворителя (H_2O). После накопления начального спектра, реакция была инициирована добавлением 0,5 ед. FpFucA. Первый спектр продуктов гидролиза регистрировался после 2-минутной установки однородности поля; затем спектры регистрировали в течение 1-минутных интервалов на протяжении 40 мин. Концентрацию каждой составляющей реакционной смеси определяли путем интеграции аномерных, непересекающихся протонных сигналов: сигнал $\delta^1_{\text{H}}5,81$ ppm соответствовал протону H1 остатка *p*NPFuc, сигнал 5,25 ppm соответствовал протону H1 остатка α -фукопиранозы и сигнал 4,6 ppm соответствовал протону H1 остатка β -фукопиранозы. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Varian VNMRJ версии 3.2C.

2.11 Исследование трансгликозилирующей активности α -*L*-фукозидазы

***p*NPFuc в качестве донора и акцептора.** Реакционную смесь (55 мкл), содержащую 80 мМ *p*NPFuc, растворенного в 10% ДМФА в буфере В и 0,15 ед. альфа-*L*-фукозидазы, инкубировали при 37 °C. Накопление продуктов трансгликозилирования отслеживали с помощью ТСХ на пластинах Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в системе этилацетат/уксусная кислота/вода (7:2:2, об./об./об.) в качестве подвижной фазы. Для определения компонентов с *n*-нитрофенольной группой, пластины ТСХ анализировали в ультрафиолетовом свете. Для визуализации молекул с

сахаридной частью, пластины опрыскивали раствором 5% (об. / об.) серной кислоты в изопропанолe и прогревали до 110 °С в течение 10 мин.

Для оценки степени конверсии субстрата, из реакционной смеси отбирали аликвоты объемом 5 мкл каждые 5 мин в течение хода реакции, добавляли раствор 10%-го (вес/об.) Na₂CO₃ и концентрации высвобожденного *p*-нитрофенола определяли спектрофотометрически при длине волны 400 нм. При достижении степени конверсии *p*NPFuc 60%, реакцию останавливали кипячением реакционной смеси на водяной бане в течение 10 мин и центрифугировали. Продукты реакции трансгликозилирования анализировали методом ВЭЖХ на колонке Resolve C18 (90 Å, 5 мкм, 3,9 × 300 мм, Waters, Ирландия) с использованием линейного градиента ацетонитрил-вода 0 – 90 % (об. / об.). Элюирование проводили в течение 80 мин со скоростью потока 0,5 мл / мин. Обнаружение компонентов реакционной смеси осуществляли при длине волны 302 нм с использованием УФ-детектора (Waters 2489). Количественное определение каждого продукта проводили интегрированием соответствующих хроматографических пиков. Полученные после хроматографического разделения фракции анализировали методом ТСХ. Фракцию, соответствующую продукту трансгликозилирования, лиофильно высушивали и анализировали с использованием масс-спектрального анализа.

Реакции трансгликозилирования с *p*NP-гликозидами в качестве акцепторов. Реакционную смесь (18 мкл), содержащую 34 мМ донора (*p*NPFuc), 75 мМ акцептора (*p*NPαGal, *p*NPβGal, 2NPaGlc, *p*NPβGlc, *p*NPβXyl и *p*NPFuc) и 0,1 ед. FpFuc, инкубировали 40 мин при 37 °С. Образование продуктов реакции детектировали методом ТСХ как описано выше.

Реакции трансгликозилирования с алифатическими спиртами в качестве акцепторов были выполнены с использованием раствора 7 мМ *p*NPFuc в качестве донора *L*-фукозы и 30% (об. / об.) метанола или этанола или 20% (об. / об.) 1-пропанола в качестве акцепторов. Каждая реакционная смесь содержала 0,2 ед. FpFucA. Реакционную смесь инкубировали при 37 °С, соответствующее время для достижения 20 – 60 % степени гидролиза *p*NPFuc. Ход реакции контролировали методом ТСХ как описано выше. При достижении требуемой конверсии субстрата, образцы кипятили в течение 10, а затем лиофильно высушивали для последующего Н1 ЯМР-анализа.

2.12 Характеристика продуктов реакции трансгликозилирования

Анализ продуктов реакции трансгликозилирования методом масс-спектрометрии. Идентификация продукта реакции трансгликозилирования FpFucA с использованием в качестве донора и акцептора *p*NPFuc методом масс-спектрометрического анализа выполнялась сотрудниками Байкальского Объединенного Инструментального Центра «Ультрамикрoанализ»

(к.х.н. Шишлянникова Т.А. и к.х.н. Кузьмин А.В.) для реакции со свободной FpFucA и сотрудниками РЦ Методы анализа состава вещества Санкт-Петербургского государственного университета (Кашина М.В.) для реакции с иммобилизованной FpFucA.

Протонная ^1H ЯМР-спектроскопия продуктов реакции трансгликозилирования. ^1H ЯМР-спектры продуктов реакции трансгликозилирования со спиртами в качестве акцепторов регистрировали при 25 °С в спектрометре Varian NMR с рабочей частотой 700 МГц, растворив их в D_2O . Концентрации таутомеров (фуранозные и пиранозные формы субстрата и продуктов) определяли путем интегрирования неперекрывающихся сигналов со следующими химическими сдвигами, соответствующими аномерным протонам: $\delta^1_{\text{H}} 5,71$ ppm (*p*NPfuc), 5,10 ppm (альфа-фукопираноза), 4,45 ppm (бета-фукопираноза), 5,17 ppm (альфа-фукофураноза), 5,13 ppm (бета-фукофураноза); а также для метильной группы C_6 : δ 1,06 ppm (*p*NPfuc), 1,10 ppm (альфа-фукопираноза), и 1,14 ppm (бета-фукопираноза).

2.13 Получение и анализ фракций фукоиданов из бурых водорослей *Laminaria digitata*

Грубая фракция фукоидана F была выделена из бурых водорослей *L. digitata* по методике [309]. Фракции 0,5F, 0,75F, 1F и 1,25F получали с помощью дополнительного фракционирования фукоидана F на колонке с анионообменным носителем DEAE-Sephacel (20 × 300 мм). Элюирование проводили путем последовательного повышения концентрации раствора NaCl: 0,5M NaCl; 0,75M NaCl; 1,0M NaCl; 1,25M NaCl. Собранные фракции диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Определение элюированных фракций фукоиданов в процессе хроматографии осуществляли с использованием метода измерения общих сахаров фенол-сернокислотным методом [318]. *L*-фукозу использовали в качестве стандарта.

Определение моносахаридного состава фукоидана 0,75F было выполнено методом газожидкостной хроматографии после кислотного гидролиза образцов раствором трифторуксусной кислоты. Содержание сульфатных остатков в изучаемых полисахаридах определяли с помощью турбидиметрического метода [319] после кислотного гидролиза раствором 1M HCl при 100 °С в течение 6 часов. В качестве стандарта использовали K_2SO_4 .

2.14 Получение и анализ продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов

Для подбора условий ферментативного расщепления полученных фракций фукоиданов, лиофилизированный порошок фракции 0,75F растворяли в 50 мМ натрий-ацетатном буфере, pH

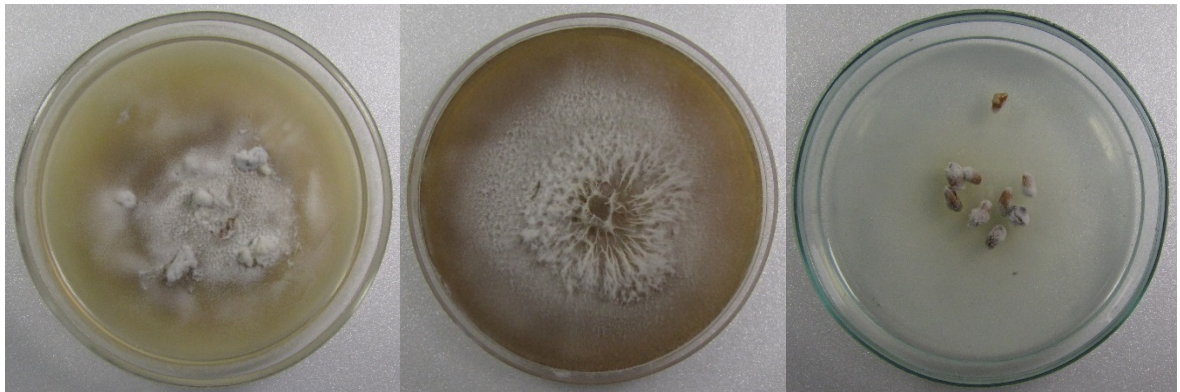
5,0 в концентрации 20 мг/мл. К 50 мкл раствора фракции фукоидана добавляли индивидуальный ферментный препарат FpFucA или ферментную смесь. В первом варианте А к фукоиданам добавляли только FpFucA (0,1 ед.); вариант Б представлял собой «коктейль» ферментов из некоторых полученных в лаборатории энзимологии ОМРБ ПИЯФ НИЦ «КИ» грибных экзогликозидаз без FpFucA: β -глюкозидаза из *S. candidum* ЗС (0,1 ед.), β -галактозидаза из *Penicillium* sp., β -маннозидаза из *T. reesei*, β -ксилозидаза из *A. awamori*; вариант В — комбинация смеси гликозидаз совместно с FpFucA (0,1 ед. акт.). Мониторинг образующихся продуктов осуществляли методом тонкослойной хроматографии в системе *n*-бутанол/уксусная кислота/вода (3:1:1, об./об./об.). Пластины опрыскивали 5%-ной серной кислотой в изопропанолу и нагревали при 110 °С в течение 10 мин.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Идентификация штамма LE1

Штамм мицелиального гриба LE1, выделенный после роста на поверхности раствора фукоидана из бурых водорослей, был изолирован для дальнейшей работы и выполнена его идентификация на основе морфологических характеристик и анализа ITS-последовательности рибосомальной ДНК.

Идентификация штамма LE1 на основе морфологических признаков была выполнена сотрудником лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР к.б.н. Гагкаевой Т.Б. Все морфологические характеристики штамма LE1: форму конидий, длину и тип конидиальных цепей или головок, степень разветвления конидиеносца для морфологической идентификации грибной культуры, - определяли в течение роста на трёх специфических средах (Рисунок 9).



А.

Б.

В.

Рисунок 9 – Морфологии культуры гриба *F. proliferatum* на питательных агаризованных средах:

А. – КСА; Б. – сусло-агар, В. – SNA с автоклавированным зерном пшеницы.

По сумме макро- и микроморфологических признаков исследуемого штамма гриба, культура штамма LE1 была отнесена к виду *Fusarium* [320]. Систематическое положение: *Nectriaceae*, *Hypocreales*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*, *Fungi*.

Генетическая идентификация. Генетическая идентификация исследуемого штамма была выполнена сотрудником лаборатории энзимологии ОМРБ ПИЯФ Бобровым К.С. ITS-участок рибосомальной ДНК (558 пар оснований) штамма LE1 секвенировали и сравнивали с известными нуклеотидными последовательностями из базы данных GenBank [321]. В результате, на основе сравнительного анализа идентичности и максимального коэффициента совпадения нуклеотидных последовательностей штамма LE1 и близкородственных штаммов рода *Fusarium*, было определено филогенетическое положение исследуемого мицелиального гриба (Рисунок 10).

Согласно данным генетического анализа, исследуемый штамм является представителем вида *Fusarium proliferatum* LE1.

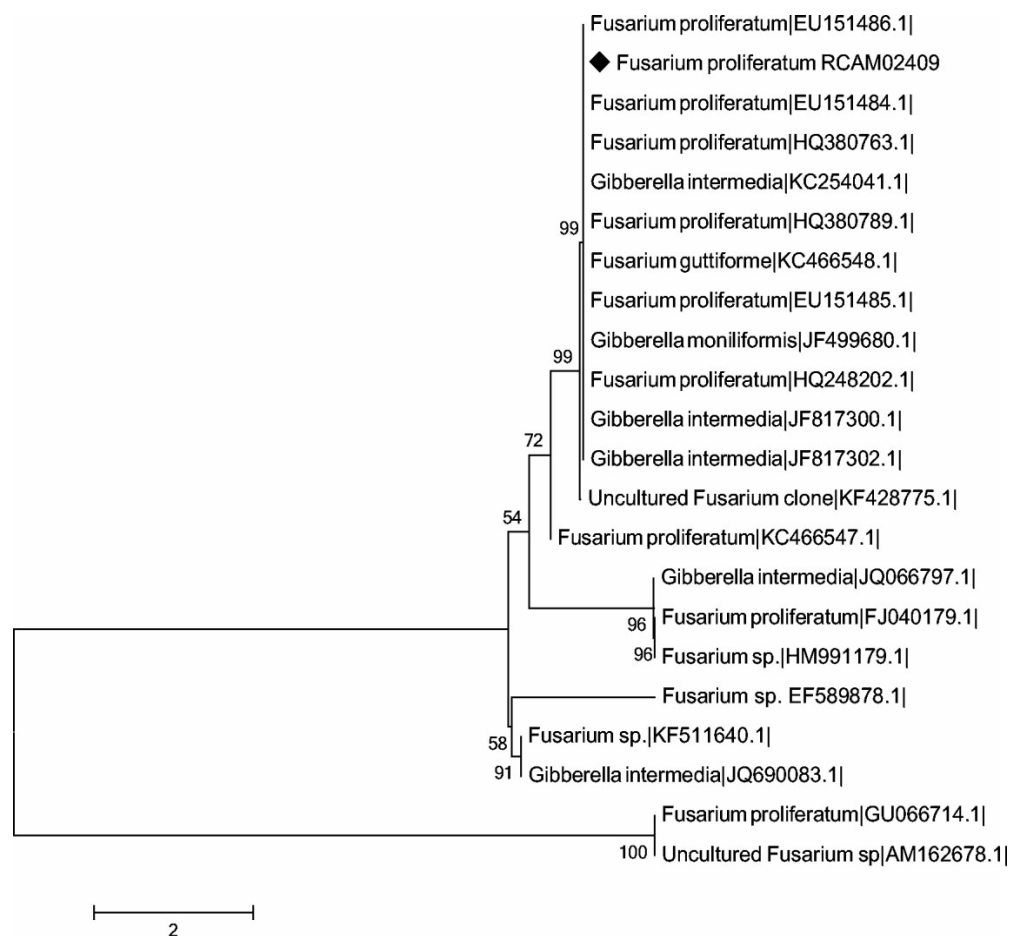


Рисунок 10 – Филогенетическое дерево, построенное методом присоединения соседей с использованием программных пакетов ClustalW и TreeView, показывающее положение исследуемого штамма *F. proliferatum* LE1 (RCAM02409) относительно родственных штаммов рода *Fusarium*. В скобках приведены номера доступа для базы GenBank.

Штамм *F. proliferatum* LE1 был депонирован под номером RCAM02409 в Российской коллекции сельскохозяйственных микроорганизмов (RCAM).

3.2 Определение гидролитических активностей исследуемого штамма *F. proliferatum* LE1

Род *Fusarium* состоит из грибов, различающихся по типу питания и способности образовывать различные вторичные метаболиты, включая высокотоксичные для млекопитающих. Некоторые представители вида *F. proliferatum* широко распространены в мире, в частности, как патогены культивируемых и диких растений [44]. Способность грибов адаптироваться к различным условиям окружающей среды обусловлена их генетической

гибкостью и метаболическим разнообразием. Адаптируя свой метаболизм к различным источникам углерода и азота, грибы производят арсенал внеклеточных ферментов, секретомов, который позволяет эффективно деградировать разнообразные биополимеры. Роль ферментов при этом сложно переоценить. Некоторые штаммы *F. proliferatum* уже являются коммерческими производителями β -гликозидаз и β -ксилозидаз, лакказ и других ферментов [41, 322–324].

Использование модельных субстратов с хромофорной группой для гидролаз – наиболее простой способ обнаружения и контроля их активности во время роста грибов. Исследуемый штамм *F. proliferatum* LE1, а также некоторые представители рода *Fusarium* из коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР, были выращены на агаризованной среде Чапека, содержащей *n*-нитрофенил α -*L*-фукопиранозид или *n*-нитрофенил-сульфат натрия. После 5-ти дневного роста при добавлении в среду соответствующего субстрата, видимое желтое гало было обнаружено только вокруг области роста *F. proliferatum* LE1 (Рисунок 11). Полученный результат указывает на наличие у исследуемого штамма *F. proliferatum* LE1 активностей α -*L*-фукозидазы и арилсульфатазы. Другие штаммы рода *Fusarium*, использованные в работе, не давали видимую желтую окраску в зоне роста культуры или с очень слабой интенсивностью, что может свидетельствовать либо об отсутствии, либо об относительно слабой ферментативной активности при росте на среде с соответствующим субстратом.

α -*L*-Фукозидазы обнаружены и выделены из мицелиальных грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, а также *Fusarium* [14, 56, 189, 193, 213]. Среди представителей рода *Fusarium* продуцентами этих ферментов являются виды *F. oxysporum* и *F. graminearum* [14, 52, 202, 213], но нами не обнаружено работ по характеристике α -*L*-фукозидаз из *F. proliferatum*.

Сульфатазы из мицелиальных грибов детектированы при росте культур родов *Aspergillus*, *Neurospora*, *Botrytis*, *Trichoderma* на твёрдых питательных средах (п. 1.2.1.2). Широкое развитие геномных технологий и существующие на сегодня базы данных предсказывают наличие нескольких генов, кодирующих ферменты сульфатазы у грибов рода *Fusarium* (база данных NCBI [325]). Несмотря на этот факт, нам не удалось обнаружить ни одной экспериментальной работы, описывающей биохимическую характеристику ферментов сульфатаз из мицелиальных грибов рода *Fusarium*.

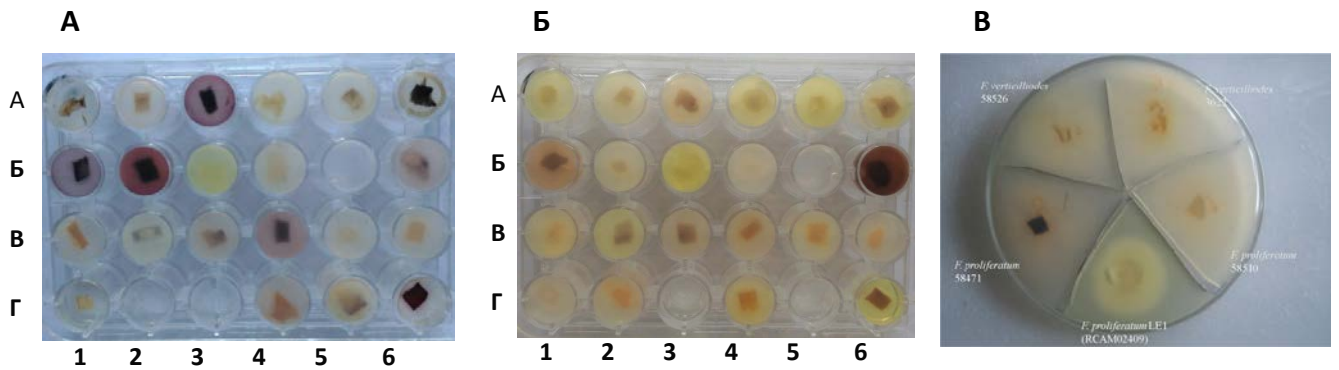


Рисунок 11 – Скрининг ферментативных активностей α -L-фукозидазы (А) и сульфатазы (Б, В) у различных представителей рода *Fusarium* при росте на твёрдой питательной среде с содержанием хромофорных субстратов *pNPFuc* и *pNPS*, соответственно. А и Б: А1 - *F. proliferatum* №1; А2 — *F. proliferatum* №2; А3 — *F. proliferatum* №3; А4 - *F. proliferatum* №4; А5 — *F. proliferatum* №6; А6 — *F. proliferatum* №8; Б1 — *F. proliferatum* 3627; Б2 — *F. proliferatum* 3628; Б3 — *F. proliferatum* LE1; Б4 — *F. solum* VTT; Б5 — пустая лунка; Б6 — *F. proliferatum* №7; В1 — *F. verticilloides* №5; В2 — *F. verticilloides* №9; В3 — *F. verticilloides* №10; В4 — *F. verticilloides* №11; В5 — *F. verticilloides* №12; В6 — *F. verticilloides* №13; Г1 — *F. verticilloides* 3621; Г2 – пустая лунка (А) / *F. verticilloides* 3622 (Б); Г3 — пустая лунка; Г4 — *F. verticilloides* 3622 (А) / *F. culmorum* F2 (Б); Г5 — *F. culmorum* F2 (А) / пустая лунка (Б); Г6 — *F. culmorum* ПИЯФ (изолят с бурых водорослей).

С целью получения достаточного количества фукоидан-модифицирующих ферментов из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1, была выполнена работа по подбору жидких питательных сред для его культивирования. В качестве простого и доступного индуктора для ферментов, участвующих в расщеплении фукоидана, среды содержали измельчённый порошок бурых водорослей *L. digitata* или смесь водорослей *L. digitata*/*F. vesiculosus* как природный источник сульфатированного фукозосодержащего полисахарида фукоидана. С целью обогащения питательных сред дополнительными источниками углерода и азота, в среды в разных количествах добавляли пептон, отруби или дрожжевой экстракт; кислотность культуральной среды подводили до слабокислого или слабощелочного значения (рН 5,0 или рН 7,5, соответственно).

В результате роста культуры *F. proliferatum* LE1 на средах разного состава, максимальная активность α -L-фукозидазы была детектирована на среде F (Рисунок 12, А), содержащей смесь бурых водорослей *L. digitata*/*F. vesiculosus*, пшеничные отруби и пептон, рН 5,0. Важно, что при использовании в качестве компонента среды порошок только из *L. digitata*, не происходило повышения активности требуемых ферментов в культуральной среде. Также для секреции

требуемых ферментов в среду, оказалось важным наличие дополнительных компонентов среды – пептона и пшеничных отрубей. На 5-й день роста культуры на среде F, удельная активность α -L-фукозидазы в 13 и 6 раз выше по сравнению со средами В и С, соответственно. Среда В, С и F в своём составе содержали идентичные компоненты в одинаковых пропорциях, но среды В и С отличались между собой только значением кислотности среды (рН 7,5 и 5,0, соответственно), а от среды F отличались видом добавленных измельчённых водорослей. Согласно полученным данным, кислотность среды также играет роль – при рН 5,0 продукция выше, чем при рН 7,5.

В случае использования в качестве единственной добавки какого-то одного из компонентов (отруби/пептон/дрожжевой экстракт) детектировали очень низкую активность или полное отсутствие активности α -L-фукозидазы. Активность сульфатазы при росте культуры *F. proliferatum* LE1 на тестируемых средах была обнаружена на средах В, С, D и F, наибольшее значение – на средах В и F.

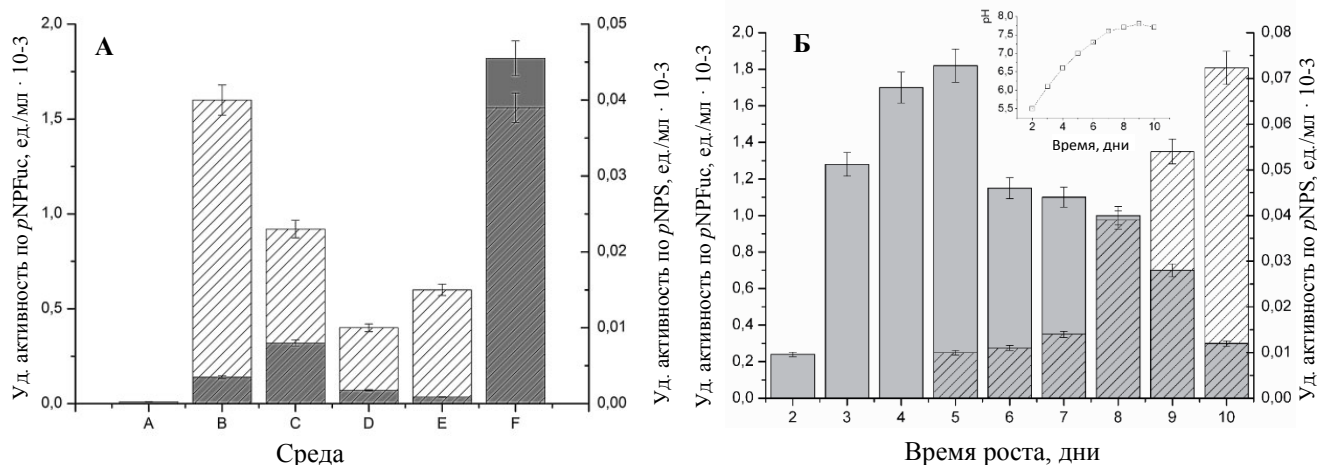


Рисунок 12 – А: Удельные активности α -L-фукозидазы и сульфатазы из *F. proliferatum* LE1, измеренные на 5-е сутки роста на питательных средах А — F. Б: Удельные активности α -L-фукозидазы и сульфатазы из *F. proliferatum* LE1 при росте на среде F в течение 10 дней. Врезанный график иллюстрирует изменение рН среды в процессе роста культуры на среде F. А, Б: Серые столбцы — активность по $pNPFuc$, заштрихованные столбцы — активность по $pNPS$.

Секрецию в культуральную среду ферментов α -L-фукозидазы и сульфатазы на среде F, выбрав её в качестве наиболее подходящей, отслеживали в течение 10 дней роста культуры (Рисунок 12, Б). Во время культивирования штамма *F. proliferatum* LE1 на среде F, активность α -L-фукозидазы начала расти на второй день культивирования и достигла максимума на 4-5-й день (Рисунок 12, Б), медленно снижаясь в течение следующих нескольких дней. Активность арилсульфатазы из *F. proliferatum* LE1 была обнаружена, когда активность α -L-фукозидазы падала, и достигла максимума на 8-10-й день. В период роста культуры значения рН в культуральной среде менялись от 5 до 8 (Рисунок 12, Б, вставка). Позднее проявление и рост

активности сульфатазы в культуральной среде дало основание предположить, что фермент может быть локализован внутриклеточно, попадая в культуральную среду с распадом клеточных структур. Чтобы определить локализацию арилсульфатазы у мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1, нами была измерена активность фермента сульфатазы в супернатанте культуральной среды и внутри клеток в течение роста культуры на протяжении нескольких дней на среде F. Результаты, представленные на Рисунке 13, ясно показывают, что сульфатаза является внутриклеточным ферментом. На третий день роста удельная активность сульфатазы внутри клеток была в 32 раза выше, а затем в культуральной жидкости; разница уменьшилась до 3,5 раз к 10-му дню.

Полученные нами данные о локализации фермента сульфатазы хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными. Практически все известные грибные сульфатазы являются внутриклеточными ферментами (Таблица 2). Исключение составляет сульфатаза из мицелиального гриба *A. awamori* R-0827 [49]. Как правило, сульфатазы локализованы в лизосомах мицелиальных грибов, наиболее распространенных органеллах в гифах, что подтверждено для штаммов *Basidiobolus ranarum*, *Ceratocystis fagacearum*, *Ceratocystis fimbriata*, *Fomes annosus*, *Agaricus campestris*, *Alternaria tenuis* [326]. В клетках грибов *A. oryzae*, *A. nidulans*, *N. crassa* наиболее активная арилсульфатаза обнаружена в развивающихся грибных органах, в особенности, окончаниях гиф, дифференцирующихся апексах, конидиеносцах с наиболее интенсивным метаболизмом [162] (Таблица 2).

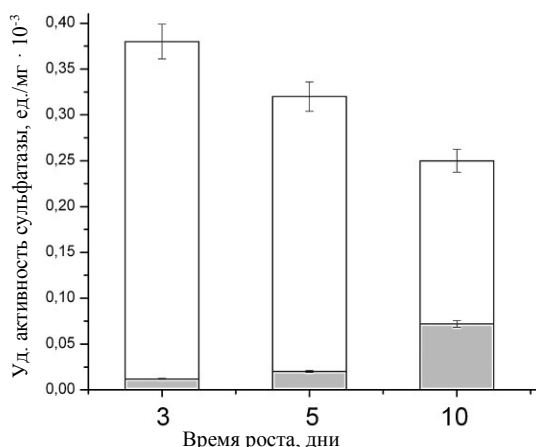


Рисунок 13 – Внутриклеточная и секретируемая активности сульфатазы из *F. proliferatum* LE1, измеренные в течение роста культуры на среде F. Белые столбцы – внутриклеточная активность, серые столбцы — активность в культуральной жидкости.

При глубинном культивировании на среде F, штамм *F. proliferatum* LE1 был протестирован на наличие активностей гликозидгидролаз в культуральной жидкости во время роста. Было показано, что *F. proliferatum* LE1 секретирует целлюлазы и гемицеллюлазы в

детектируемых количествах: β -глюкозидазу, целлобиогидролазу, целлюлазы, эндо- β -глюканазы, а также β -ксилазы и β -ксилозидазы (Рисунок 14). α -Галактозидаза и α -глюкозидаза также были обнаружены в значительных количествах, являясь преобладающими ферментами в культуральной жидкости. Низкий уровень активности β -L-фукозидазы указывает на отсутствие или небольшое содержание субстратов с подходящим типом связи, которые данный фермент может гидролизовать в определённых условиях и, следовательно, его синтез для данного штамма был низок.

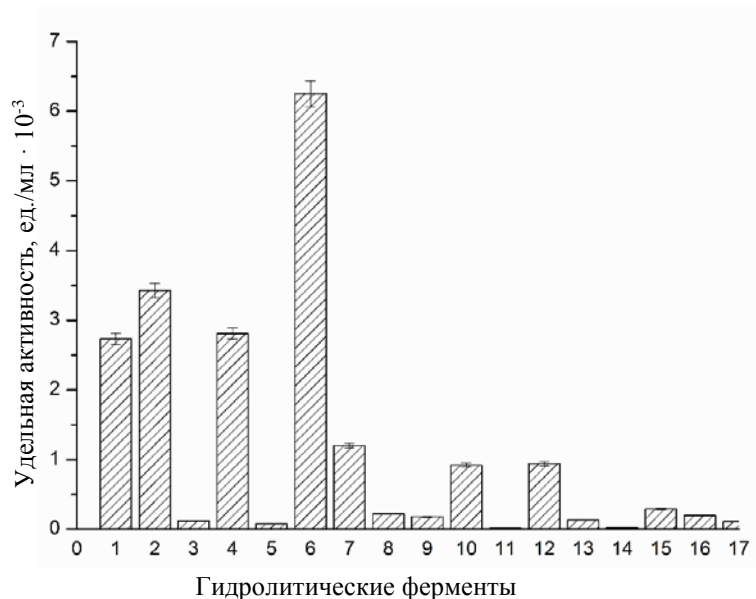


Рисунок 14 – Удельные активности *O*-гликозидгидролаз и сульфатазы из культуральной жидкости в гидролизе соответствующих *pNP*-субстратов, измеренные на 5-е сутки роста культуры *F. proliferatum* LE1 на среде F: 1. α -галактозидаза; 2. α -глюкозидаза; 3. α -D-маннозидаза; 4. β -глюкозидаза; 5. β -L-фукозидаза; 6. β -целлобиогидролаза; 7. β -ксилозидаза; 8. β -галактозидаза; 9. β -D-глюкозидаза; 10. β -D-глюкозаминидаза; 11. **арилсульфатаза**; 12. **α -L-фукозидаза**; 13. амилаза; 14. целлюлаза; 15. ламинариназа; 16. β -глюканаза; 17. β -ксилаза.

По проделанной части работы можно сделать вывод о том, что исследуемый штамм, идентифицированный как *F. proliferatum* LE1, является штаммом-продуцентом ценных ферментов класса гликозидгидролаз (α -L-фукозидазы, α - и β -глюкозидаз, β -целлобиогидролазы, целлюлаз, эндо- β -глюканазы, β -ксилазы, β -ксилозидазы, α -галактозидазы), имеющих в дальнейшем потенциальные возможности для применения на практике. Значение активностей для каждого из интересующих нас ферментов, обнаруженных у данного штамма на выбранной среде F, может существенно варьироваться при изменении условий роста. Поэтому дальнейшим этапом работы стало исследование ферментативных свойств α -L-фукозидазы и сульфатазы.

3.3 Получение и характеристика сульфатазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1

3.3.1 Выделение сульфатазы из *F. proliferatum* LE1

Внутриклеточная сульфатаза из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1 была выделена после выращивания культуры на богатой питательной среде G. Клетки разрушали с использованием гомогенизатора под давлением, затем внутриклеточный экстракт концентрировали сульфатным осаждением и подвергали ряду хроматографических стадий. В результате подобранных условий культивирования и очистки фермента сульфатазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1 нами получен частично-очищенный ферментный препарат внутриклеточной сульфатазы (FrC) со степенью очистки 170 раз (Таблица 6). Ферментный препарат имел удельную активность 0,5 ед./мг в гидролизе модельного субстрата *p*NPS и не имел побочной фосфатазной активности, которую определяли с использованием хромофорного субстрата *p*NPP. Определение гидролитической активности по *p*NPP было выполнено для того, чтобы исключить вероятную побочную фосфатазную активность полученного ферментного препарата, которая показана для некоторых охарактеризованных сульфатаз [93]. Известно, что некоторые ферменты могут «неразборчиво» гидролизовать различные относительно похожие субстраты, что, предположительно, сохранилось за время эволюции ферментов. Так, бактериальная арилсульфатаза из *Pseudomonas aeruginosa* способна гидролизовать ряд сульфатных эфиров наряду с фосфатными эфирами [151, 152].

Таблица 6 – Баланс выделения сульфатазы FrC

Стадия очистки	Объем, мл	Общее количество белка, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки	Выход, %
Внутриклеточный экстракт	700	4125	12,0	$2,9 \cdot 10^{-3}$	1	100
Осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (фракция до 40% насыщения)	760	3116	10,6	$3,4 \cdot 10^{-3}$	1,2	89,0
Осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (фракция 40% - 80% насыщения)	65	1073	5,7	$5,3 \cdot 10^{-3}$	1,8	47,1
Ионообменная хроматография на DEAE Sephadex A50	80	472	2,8	$6,0 \cdot 10^{-3}$	2,1	23,3
Анионообменная хроматография на MonoQ	11	38	1,4	$36 \cdot 10^{-3}$	12,4	11,5
Гидрофобная хроматография на TSKgel Phenyl-5PW	5,5	3,2	1,2	0,37	125,8	9,6
Гель-фильтрация на Sephadex G200	4	0,44	0,2	0,5	170,8	1,8

Несмотря на достаточно большое количество хроматографических стадий, применённых для очистки внутриклеточной сульфатазы, нам не удалось увидеть единственной белковой зоны

методом ДСН-ПААГ электрофореза (данные не показаны). Несмотря на это, фермента FrC было достаточно для его полной и всесторонней биохимической характеристики.

Молекулярная масса нативного фермента сульфатазы была оценена методом гель-проникающей хроматографии на колонке Sephacryl S200 с использованием набора белковых маркеров и составила 65 ± 1 кДа (Рисунок 15).

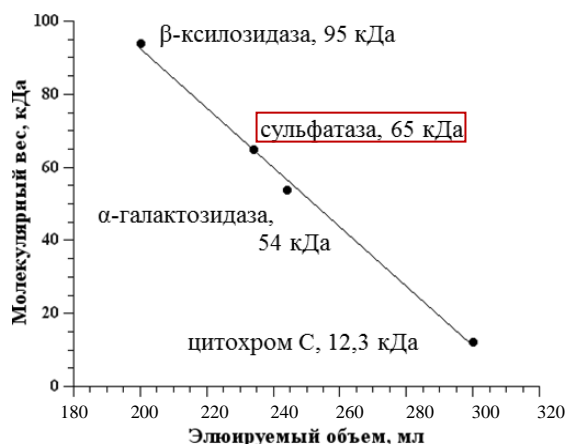


Рисунок 15 – Определение молекулярной массы нативной сульфатазы с помощью гель-фильтрации на носителе Sephacryl S200.

Поскольку не удалось получить данные о молекулярной массе фермента в денатурирующих условиях, то мы не можем сделать предварительного вывода о субъединичном строении фермента на основании только известной молекулярной массы в неденатурирующих условиях.

Для некоторых сульфатаз из дрожжей и грибов определены значения молекулярной массы ферментов дикого типа, которые находятся в диапазоне 44 – 140 кДа. Молекулярный вес нативной сульфатазы из *Aspergillus oryzae* NRRL-449 равен 65 кДа [47, 160], для сульфатазы из *A. nidulans* молекулярная масса равна 44 кДа [48], для сульфатазы из *A. oryzae* – 100 кДа [169], а из мицелиального гриба выделено три внутриклеточные сульфатазы с молекулярными массами 57, 105 и 140 кДа [170, 171]. Недавно из исследуемого организма *F. proliferatum* LE1 в результате гетерологичной рекомбинации была получена сульфатаза, которая являлась тетрамером в нативных условиях с массой 1 субъединицы 63 кДа [161].

3.3.2 Определение аминокислотной последовательности сульфатазы из *F. proliferatum* LE1

Для исследования первичной структуры частично-очищенной сульфатазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1 был выполнен анализ аминокислотных

последовательностей пептидов ферментного препарата частично-очищенной ФрС. По результатам сравнения аминокислотных последовательностей сульфатаз в базах данных SulfAtlas и NCBI и полученных пептидных последовательностей частично-очищенной сульфатазы было установлено, что сульфатаза из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1 имеет наибольшее сходство (34,4%) с сульфатазой из мицелиального гриба *F. fujikuroi* IMI (номер последовательности XP_023435437.1 базы данных NCBI Protein DataBase) (Рисунок 16), являющейся арилсульфатазой / *N*-ацетилглюкозамин-6-*O*-сульфатазой, а также с сульфатазами 11 подсемейства S1-семейства сульфатаз базы данных SulfAtlas. На основании полученных результатов, нами было сделано предположение, что исследуемая сульфатаза ФрС из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1, относится к подсемейству 11 S1 структурного семейства (S1_11) сульфатаз SulfAtlas.

```

1 mrlptwiqpv ilassllaqn tnalskygpe dqavlkpnnnd avsrkpkttl dgkknivfil
61 tddqdsylds vsympklkeh iidkgtfvn hfttaiccp srvalwtgkq phntnvtvvn
121 ppyggfpkfv sqglndnylp vwlikeagynt yytgklfnah tihnynsyp agwtgtnfl
181 dpgtydylnp iyqhnqppv qhkgvhtsdl iskyahellk eaigsenpff vaiapvaphs
241 nvnrrqp gn psaplmtipi plerhshlfe gakvprtenf npdspgsvw ihklaqlnes
301 avsylddfyr arlqalqgvd eiveqmtkql edagiidety iyyssdngyh lgqhrllppgk
361 ecgfdedirv plfirpgvsv sgsvenavtt hidlaptilr lagadlrtdf dgtpivplpt
421 qenkrhehva veywggaiiae geiggfdgkg qifaqnntyk gvrivhedynlyawsawcne
481 helydiktdp gqlnnlfpd dakasteflg ttgqvlrnl dalmlvlksc kgntciepwk
541 ilhpeggvas lkdalqakfn afykeqvkvvr fdrceygyli daegpqvgye yreglewhhh
601 t

```

Рисунок 16 – Аминокислотная последовательность арилсульфатазы / *N*-ацетилглюкозамин-6-*O*-сульфатазы из *F. fujikuroi* IMI 58289 [325]. Цветом выделены пептиды частично очищенной сульфатазы из *F. proliferatum* LE1, совпадающие с представленной последовательностью.

Принимая за среднюю массу аминокислоты 110, теоретическая молекулярная масса сульфатазы из близкородственного организма *F. fujikuroi* IMI 58289 равна порядка 66,1 кДа. Расчетные данные коррелируют с экспериментальным значением молекулярной массы нативной сульфатазы из *F. proliferatum* LE1. Таким образом, можно сделать предположение о том, что исследуемая ФрС состоит из одной субъединицы.

Согласно последней классификации сульфатаз [4], все известные сульфатазы разделяют на четыре семейства на основе гомологии аминокислотных последовательностей, фолдинга белков и совпадения каталитических остатков (п. 1.2.1). Анализируя представленные для каждого семейства консервативные аминокислотные «мотивы», среди идентифицированных пептидов ФрС не найдено основной последовательности SxPxRxxxxTG, хотя она имеется в предсказанной сульфатазе из *F. fujikuroi* IMI 58289 (аминокислоты 98-108). К настоящему времени нет ни одной определённой и соотнесённой с базами данных аминокислотной последовательности сульфатаз из мицелиальных грибов, которая была бы получена

экспериментальным путем. На основании полученных данных можно сказать, что для более точной идентификации изучаемой сульфатазы необходимо провести молекулярно-генетические работы по выделению и клонирования гена, кодирующего искомым фермент.

3.3.3 Определение физико-химических свойств сульфатазы из *F. proliferatum* LE1

Для частично-очищенной сульфатазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1 было определено влияние кислотности среды и температуры на активность и стабильность фермента. При изучении физико-химических свойств сульфатазы было установлено, что исследуемый фермент обладает наибольшей активностью в диапазоне pH 7,5-8,5. При инкубировании в течение 20 минут при pH 7,1, фермент проявлял максимальную активность при температуре 70°C. Фермент относительно стабилен спустя сутки в диапазоне pH 5,5-7,0 после инкубирования при температуре 37°C. Ферментный препарат сульфатазы сохраняет более 80% активности при инкубации в течение часа при температуре до 40° (Рисунок 17).

Для известных на сегодняшний день сульфатаз из грибов, можно сказать, что они наиболее активны в среднем при pH 6,5 – 8,5 и температуре 45°C. В основном, рабочими условиями были температура 37°C и pH 5,0 (рост) или 7,0 (рост или измерение активности).

При исследовании зависимости ферментативной активности сульфатазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1 от присутствия ионов двухвалентных металлов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} и раствора ЭДТА Na_2 , было показано, что активность частично-очищенного ферментного препарата FrC не зависит от наличия в растворе ЭДТА Na_2 и ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , но значительно (на 65%) ингибируется присутствием в среде ионов Zn^{2+} . Ингибирующий эффект ионов Zn^{2+} характерен в отношении других грибных сульфатаз (Таблица 2), для которых выполнена биохимическая характеристика. Считается, что все известные сульфатазы являются металлозависимыми ферментами, т.е. во всех четырёх семействах нет представителей, лишённых того или иного иона металла в активном центре [4]. Так, формилглицин-зависимые сульфатазы (семейство S1) нуждаются в присутствии ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} для осуществления катализа гидролитического отщепления сульфатных групп от различных молекул. Для исследуемой нами частично-очищенной сульфатазы из *F. proliferatum* LE1 не показано изменение гидролитической активности при отсутствии или добавлении в раствор ЭДТА Na_2 или ионов соответствующих металлов. В частности, для сульфатазы из мицелиального гриба *A. oryzae* NRRL-449 не обнаружено существенной зависимости между наличием определённого иона металла в реакционной смеси и уровнем сульфатазной активности: гомогенный ферментный препарат активен в отношении набора арилсульфатов при двух разных значениях pH 4,02 и pH 7,54 и не

изменяет значение ферментативной активности после диализа против буфера, содержащего ЭДТА [160].

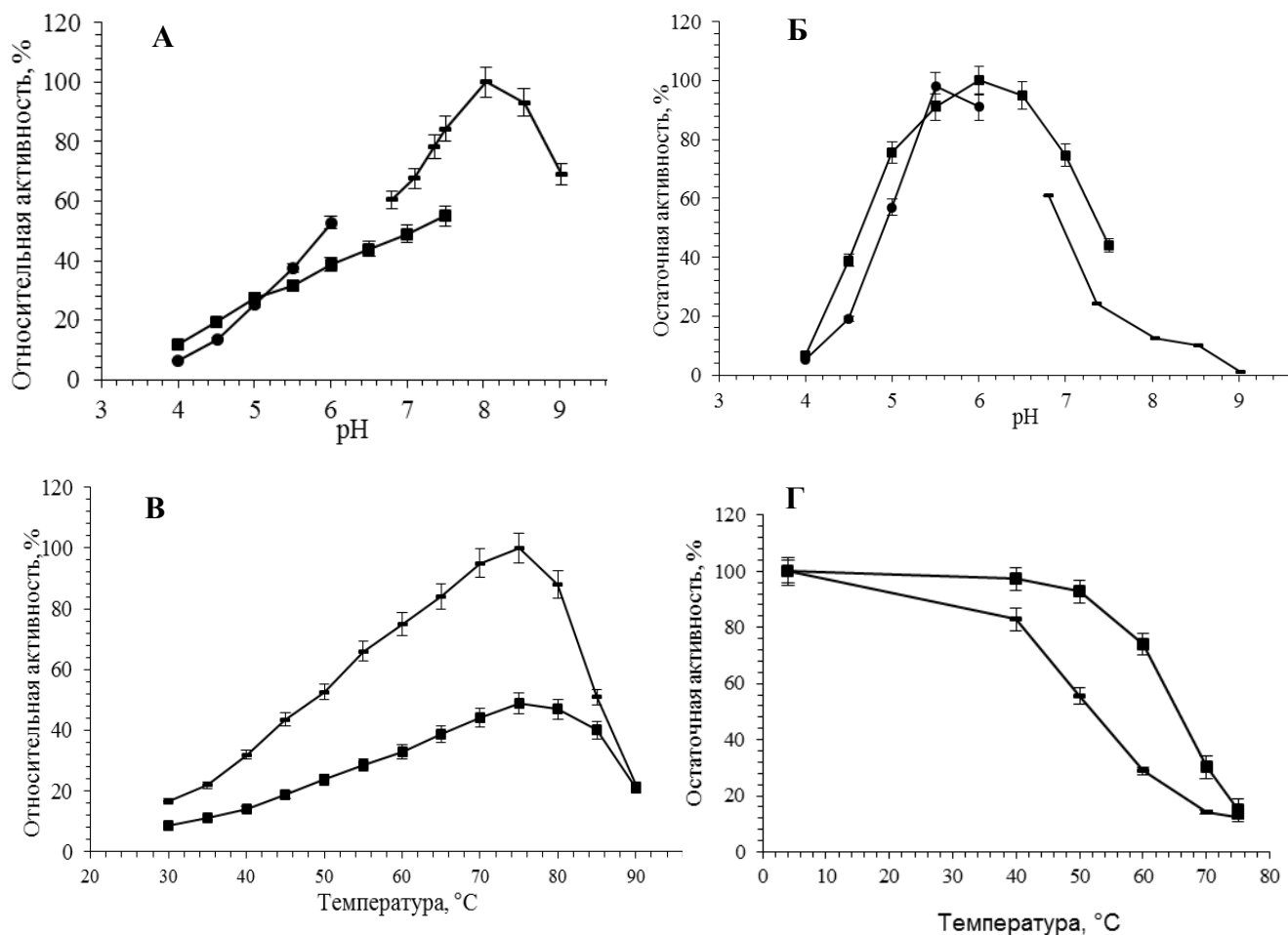


Рисунок 17 – Влияние T и pH на активность и стабильность фермента FpC в реакциях гидролиза модельного субстрата *p*NPS. **А:** Относительная активность сульфатазы FpC, измеренная при различных значениях pH; **Б:** Остаточная активность FpC после инкубирования фермента 22 часа при 37 °C в диапазоне значений pH 4,0–9,0; **В:** Влияние температуры на гидролитическую активность фермента (pH 6,1 (—■—) и pH 7,1 (—●—)); **Г:** Остаточная активность сульфатазы после инкубирования фермента при различных температурах (20–60 °C, pH 5,5) в течение 20 мин. Буферные растворы: —■— - Na-фосфат-цитратный буфер; —●— - Na-ацетатный буфер; —■— - Трис-HCl буфер.

Активность фермента сульфатазы в гидролизе модельного субстрата *p*NPS была протестирована при различной концентрации NaCl в реакционной смеси для того, чтобы оценить эффект ионной силы на активность фермента. Также было оценено влияние различных соединений на гидролитическую активность FpC. В результате, было установлено, что повышение ионной силы раствора путём добавления к реакционной смеси до 1,5 M NaCl не влияет на активность фермента. Добавление в реакцию дитиотреитола также не влияет на

активность сульфатазы, в то время как ФМСФ снижает активность на 50%. Для недавно охарактеризованной рекомбинантной холин-*O*-сульфатазы из этого же продуцента было показано слабое снижение активности фермента в присутствии ФМСФ [161].

3.3.3 Определение субстратной специфичности и кинетических параметров FpC

Кинетические параметры гидролиза *p*NPS сульфатазой из *F. proliferatum* LE1 были определены в диапазоне концентраций субстрата от 0,17 мМ до 15,5 мМ. При низких концентрациях субстрата кинетика реакции подчиняется зависимости Михаэлиса-Ментен. В результате, значение константы Михаэлиса K_m при исследовании гидролиза сульфатазой *p*NPS было равно $0,62 \pm 0,1$ мМ. Определение каталитической константы $k_{кат}$ не выполнено в виду отсутствия соответствующей чистоты ферментного препарата.

Ингибирующий эффект неорганического сульфата был проверен при добавлении в реакцию от 5 мМ до 90 мМ Na_2SO_4 , при этом активность сульфатазы в гидролизе *p*NPS сохранялась на 85% при концентрации 90 мМ.

Исследуемая сульфатаза оказалась неактивной по отношению ко всем остальным использованным в работе субстратам: *хлоро*-НФ-βGal-6SO₃Na, *n*-НФ-βGal-6SO₃-триэтиламин, *n*НФ-βXylSO₃-триэтиламин, а также *N*-ацетилглюкозамин-6-*O*-сульфата.

Преобладающее число описанных ранее грибных сульфатаз охарактеризовано термином “арилсульфатазы”, что, однако, не раскрывает истинной субстратной специфичности и функциональной роли каждой из них. Согласно данным литературы об охарактеризованных биохимическими методами сульфатазах из грибных штаммов (Таблица 2; база данных BRENDA [327]), для каждого из этих ферментов описан гидролиз лишь коротких сульфатированных молекул (арилсульфаты, холин-*O*-сульфат, тирамин-*O*-сульфат, глюкоза/галактоза-*O*-сульфат и др.), но нет ни одной работы, описывающей десульфатирование сложных полимерных (высокомолекулярных) сульфатированных молекул (гепарин и другие ГАГ, каррагинан, агар, фукоидан и др.). Сульфатазы с известной субстратной специфичностью, а именно холин-*O*-сульфатазы, охарактеризованы из мицелиальных грибов *A. nidulans* [168] и *N. crassa* [177], *F. proliferatum* LE1 [161]. Помимо этого, мицелиальные грибы могут использовать тирозин-*O*-сульфат и другие ароматические сульфатированные сложные эфиры в качестве вторичных источников серы. *N. crassa* и *Trichoderma viride* могут использовать глюкозу-6-*O*-сульфат в качестве единственного источника серы [175, 176]. Все эти субстраты для грибных сульфатаз предварительно транспортируются в клетку в виде не модифицированного соединения с последующим внутриклеточным гидролизом. Вероятно, что сульфатазы являются лишь элементом в цепи сложных гидролитических превращений сульфатированных углеводных

молекул, имеющих в природе. Так называемые гликосульфатазы - сульфатазы, отщепляющие сульфат от глюкозы или галактозы в б-ом положении, можно предположить, вступают в работу после работы экзо- и/или эндо-гликозидаз, активных в отношении дерматан/кератан/гепарин сульфата, у которых мономерными звеньями выступают именно эти соединения. Возможно, что в имеющемся небольшом объеме работ по характеристике сульфатаз из мицелиальных грибов не раскрыт весь потенциал специфичности сульфатаз из этих организмов в модификации крупных молекул. Или же специфичность сульфатаз мицелиальных грибов ограничена отщеплением сульфатов от низкомолекулярных соединений. Такой вопрос открывает перспективы для дальнейшего изучения этого класса ферментов, что может быть сильно облегчено развитыми геномными технологиями. К сожалению, накопленные на сегодняшний день немногочисленные данные о каталитических свойствах сульфатаз из грибных источников не дают возможность предположить функции, выполняемые этими ферментами в организме.

В результате выполненной работы мы показали, что внутриклеточная сульфатаза дикого типа, выделенная из *F. proliferatum* LE1, отличается по своим свойствам от холин-сульфатазы, описанной ранее [161] и, вероятно, необходима этому организму для получения неорганического сульфата при гидролизе от малых органических сульфатированных молекул, например, арилсульфатов (Таблица 7).

Таблица 7 – Сравнительные характеристики сульфатаз из *F.proliferatum* LE1

	Холин-О-сульфатаза [161]	Исследуемая сульфатаза FpC
Очистка	рекомбинантный фермент, экспрессированный в <i>Pichia pastoris</i>	частично-очищенный белок дикого типа
Молекулярная масса	внутриклеточный; тетрамер, 1 субъединица - 63 кДа	молекулярный вес 65 кДа
Физико-химические характеристики	$pH_{\text{опт.}} = 6,0$; $pH_{\text{стаб.}}$: остаточная активность >50% при pH 6,0-8,0; $T_{\text{опт.}} = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{стаб.}}$: стабилен 2 часа при 25 °C	$pH_{\text{опт.}} = 7,5-8,0$; $pH_{\text{стаб.}}$: остаточная активность >50% при pH 5,0-7,0; $T_{\text{опт.}} = 75 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{стаб.}}$: стабилен 1 час при 40 °C
Влияние металлов	Ca^{2+} и Mn^{2+} повышают активность	не нуждается в наличии металла
Субстратная специфичность	$p\text{NPS}$: $K_M=2,45 \text{ mM}$; $k_{\text{кат}}=0,28 \text{ c}^{-1}$ холин сульфат: кинетические параметры не определены	$p\text{NPS}$: $K_M=0,62 \text{ mM}$ <i>N</i> -ацетил- <i>D</i> -галактозамин-6-О-сульфат: не активен

Из-за небольшого количества детально охарактеризованных на биохимическом уровне сульфатаз из грибных продуцентов, в том числе полученных в чистом виде, а также отсутствия кристаллических структур этих белков, возникает ряд вопросов, противоречащих современным представлениям о механизмах гидролиза и классификации сульфатаз. Чтобы решить вопрос о наличии различий в биохимических и структурных свойствах грибных сульфатаз по сравнению с другими известными сульфатазами, требуется ряд исследований, подтверждающих, опровергающих или дополняющих имеющиеся на сегодня знания и вносящие ясность в функционирование сульфатаз из грибных продуцентов. Таким образом, исследование сульфатаз из мицелиальных грибов интересно не только с точки зрения определения их физиологической роли, но и с точки зрения расширения фундаментальных знаний о них.

3.4 Получение и характеристика альфа-*L*-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1

3.4.1 Выделение α -*L*-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1

Низкие выходы фермента альфа-*L*-фукозидаза из *F. proliferatum* LE1 при росте на среде F с бурыми водорослями ограничивали возможность очистки целевого белка до гомогенного состояния. Мы предприняли попытки подобрать условия индукции фермента, при которых FrFucA будет мажорным белком в культуральной жидкости (Рисунок 18, 19, А). Индукция α -*L*-фукозидазы была осуществлена добавлением в среду *L*-фукозы, конечного продукта действия фермента, аналогично индукции α -*L*-фукозидазы из мицелиального гриба *F. oxysporum* [52]. Результат этой работы позволил всего после четырёх хроматографических стадий получить чистый ферментный препарат в достаточных для дальнейших экспериментов количествах (Таблица 8).

Таблица 8 – Схема выделения альфа-*L*-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1

Стадия очистки	Объем, мл	Общее кол-во белка, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед./мг белка	Степень очистки, раз	Выход, %
Культуральная жидкость	1000	50,3	110,3	2,2	1	100
Ионообменная хроматография на DEAE Sephadex A50	250	10,6	110,0	9,4	4,3	90,7
Анионообменная хроматография BioSuite Q 10 μ m АХС	7	7,8	98,0	12,5	5,7	88,8
Гель-фильтрация на Sephacryl S200	22	2,4	88,6	36,6	16,6	80
Гидрофобная хроматография на TSKgel Phenyl-5PW	2,5	1,8	70,1	39,0	18,0	64

Выход фермента составил 1,8 мг чистого белка с 1 литра культуральной жидкости. Удельная активность в гидролизе *pNPFuc* равна 39 ед./мг. По результатам ДСН-ПААГ электрофореза, FrFucA после финальной стадии очистки является белком с молекулярной массой 67 ± 1 кДа (Рисунок 19, А). Электрофоретическая зона очищенной α -L-фукозидазы имеет слегка размытые границы, что может свидетельствовать о гликозилировании белковой молекулы. Молекулярная масса нативного фермента, определённая при помощи гель-фильтрации, составила 67 кДа (Рисунок 20). При сравнении результатов, полученных при определении молекулярной массы α -L-фукозидазы в денатурирующих и не денатурирующих условиях, можно сделать вывод, что фермент является мономером.

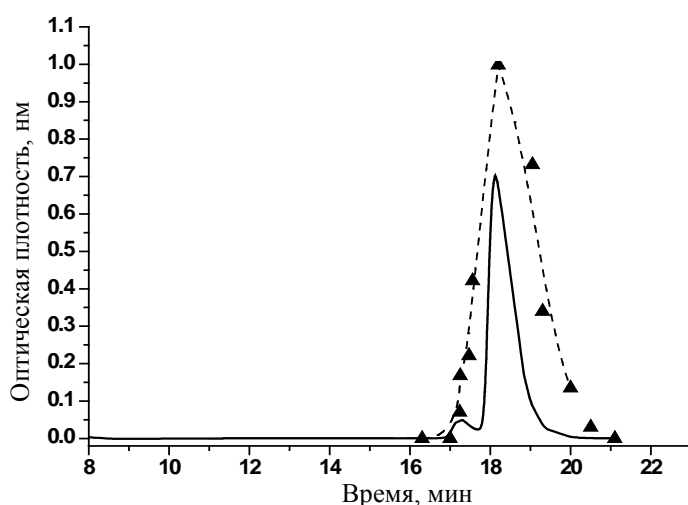


Рисунок 18 – Профиль элюции FrFucA в процессе очистки на хроматографической колонке Phenyl TSK-gel 5PW. — - оптическая плотность на 280 нм; —▲— - активная фракция в гидролизе *pNPFuc*.

Значение изоэлектрической точки α -L-фукозидазы pI составило $5,21 \pm 0,05$ (Рисунок 19, Б). Относительно известных значений изоэлектрической точки для α -фукозидаз, значение pI для FrFucA коррелирует с данными для α -фукозидазы из *Pisum sativum* [198] и рекомбинантной фукозидазы человека [192]; все остальные значения изоточек для фукозидаз выше и находятся в диапазонах pI 6-6,5 [10, 210] и 6,9-7 [223, 234]. Следует отметить, что ни для одной из исследованных α -L-фукозидаз из мицелиальных грибов не было определено значение изоточки (Таблица 4).

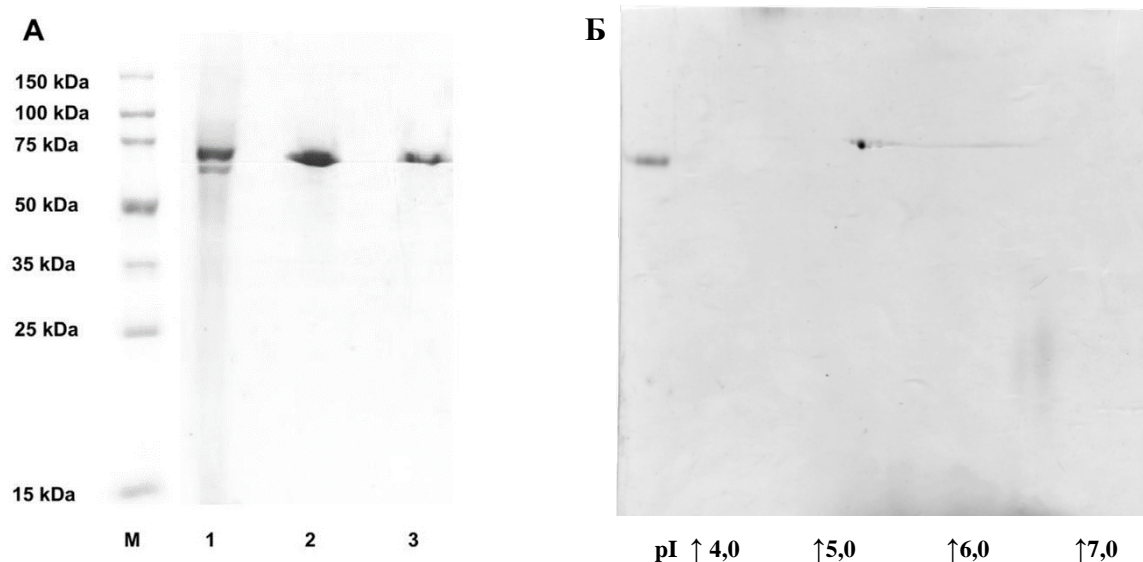


Рисунок 19 – ДСН-ПААГ электрофорез FpFucA (А) и двухмерный 2D-электрофорез (ДСН-ПААГ) (Б). А: Линия М: набор маркеров молекулярного веса; линия 1: белковые зоны, соответствующие белкам в культуральной жидкости; линия 2: FpFucA, после анионообменной хроматографии на колонке BioSuiteQ10; линия 3: FpFucA, элюированная после гидрофобной хроматографии на колонке Phenyl TSK-gel 5 PW.

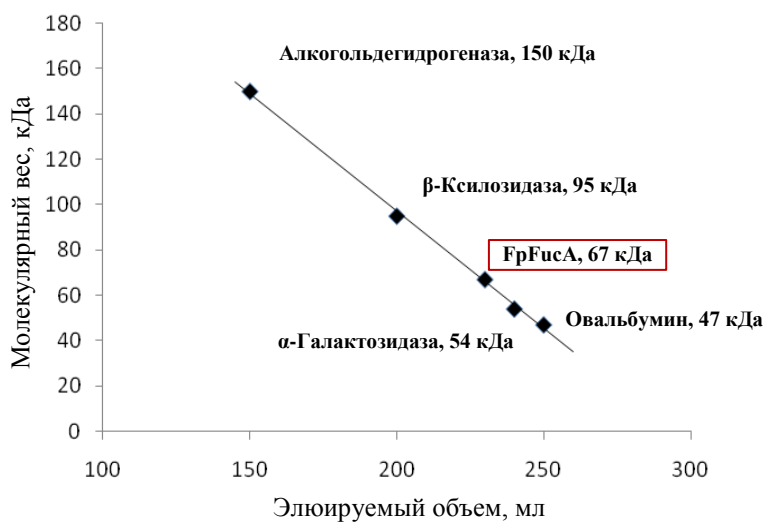


Рисунок 20 – Определение молекулярной массы очищенной FpFucA методом гель-фильтрации на колонке Sephacryl S200.

3.4.2 Определение первичной последовательности α -L-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1

Определение аминокислотной последовательности α -L-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 было выполнено после расщепления очищенного ферментного препарата FpFucA трипсином и

последующей идентификации полученных пептидов с помощью масс-спектрального анализа. Анализ полученных пептидных последовательностей с использованием программного обеспечения баз данных MASCOT и NCBI показал идентичность исследуемой α -L-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 с последовательностями α -L-фукозидазы из *F. fujikuroi* IMI 58289 на 70% (Рисунок 21), а также с идентичностью 15% совпадали с α -L-фукозидазой из *F. oxysporum*. Оба протеина принадлежат к 29-му семейству гликозидгидролаз (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). Таким образом, высокое сходство исследуемой FpFucA с фукозидазами 29го семейства даёт нам основание предположить, что фермент является представителем этого семейства гликозидгидролаз.

1	MLIRLLSHLG	PVLSLGTASV	GAVSLKHSKR	ATSPASIGIG	NPVLT SKWIE
51	GSDYEQVVEF	FITNSDDKNS	LTWDDDLEVS	VESSSLETTT	PGLTIRL LGPK
101	QSAVVQVGVK	NKAGVKAGTK	CDAKAVVTWG	SKEDPKKSTK	DFSGECGIGD
151	YQASSGSLSH	HWNPDWFNDI	KYGIFIHWGL	YSVPAFGNKP	GPKQDYAEWY
201	GFRMTQPDFP	SETYQYHREK	YGENFNYYDDF	VSNFTA AKFD	ANEWMNLVAD
251	AGAQYVVPVT	KHHDGWALFD	FPDSVSKRST	VHYGPKRDFL	KELLDAAKVN
301	HPKIRRGTYF	SMPEWFNPAY	VKYGWDQHYK	GNYYGRPPTN	PYTHKSIEYT
351	GYVEVDDFLD	DIQNPQIEAL	FYKYETEILW	CDIGGPNKAP	DVLAPWLNWA
401	RDKGRQVTFN	DRCGAAGDYS	TPEYAGISFK	ASKFESNRGL	DPFSFGYNFM
451	TTDDEYLTGE	EIVNTLIDNV	VNNGNLLLNM	GPKPDGTIPK	QQQLNLLDAG
501	AWIKSHGEGI	FGTRYWPTAQ	TSGPLRFATA	PDAFYIHHVG	KPSSPLVIKE
551	PVPWVEGDKV	TAIGGSADGT	VLDVAQKDGS	FVVQLPKVI	QGDKYIWTIK
601	IEYKTGN				

Рисунок 21 – Масс-спектрометрический анализ FpFucA. Последовательность белка, соответствующая α -L-фукозидазе из *F. fujikuroi* IMI 58289. Пептиды, соответствующие FpFucA, выделены жирным шрифтом.

3.4.3 Определение физико-химических свойств α -L-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1

При изучении физико-химических свойств α -L-фукозидазы было установлено, что фермент обладает наибольшей активностью при pH 5,5 (Рисунок 22, А). При оптимальном значении pH в течение 20 минут фермент проявляет максимальную активность при температуре 45-50 °C (Рисунок 22, В). Значения оптимума pH и температуры, оптимальные для FpFucA, являются характерными и для многих известных на сегодняшний день α -фукозидаз из мицелиальных грибов, а также других эукариотических организмов и бактерий. Как правило, pH оптимум гидролиза α -фукозидаз находятся в слабокислой или нейтральной областях (Таблица 4).

Влияние pH среды на скорость ферментативной реакции связывают с состоянием и степенью ионизации ионогенных групп в молекуле фермента и субстрата. Этот фактор определяет конформацию белка, состояние активного центра и субстрата, формирование фермент-субстратного комплекса, собственно процесс катализа. Профиль pH-зависимости

альфа-фукозидазы имеет вид колоколообразной кривой, полученной для многих представителей гликозидгидролаз [303, 328, 329]. Вид кривой предполагает, что катализ зависит от ионизации двух аминокислотных остатков. Обязательным условием первой стадии гидролиза – стадии гликозилирования - является протонирование группы, осуществляющей кислотно-основной катализ, и депротонирование нуклеофильной группы. Область кривой с низкими значениями pH определяет протонирование нуклеофила, а область с высокими значениями – депротонирование кислотного катализатора [330]. Для 29го семейства гликозидгидролаз в качестве каталитических аминокислотных остатков определены Asp (нуклеофил) и Glu (донор протонов), которые играют, соответственно, роль нуклеофильной группировки и кислотного катализатора [55].

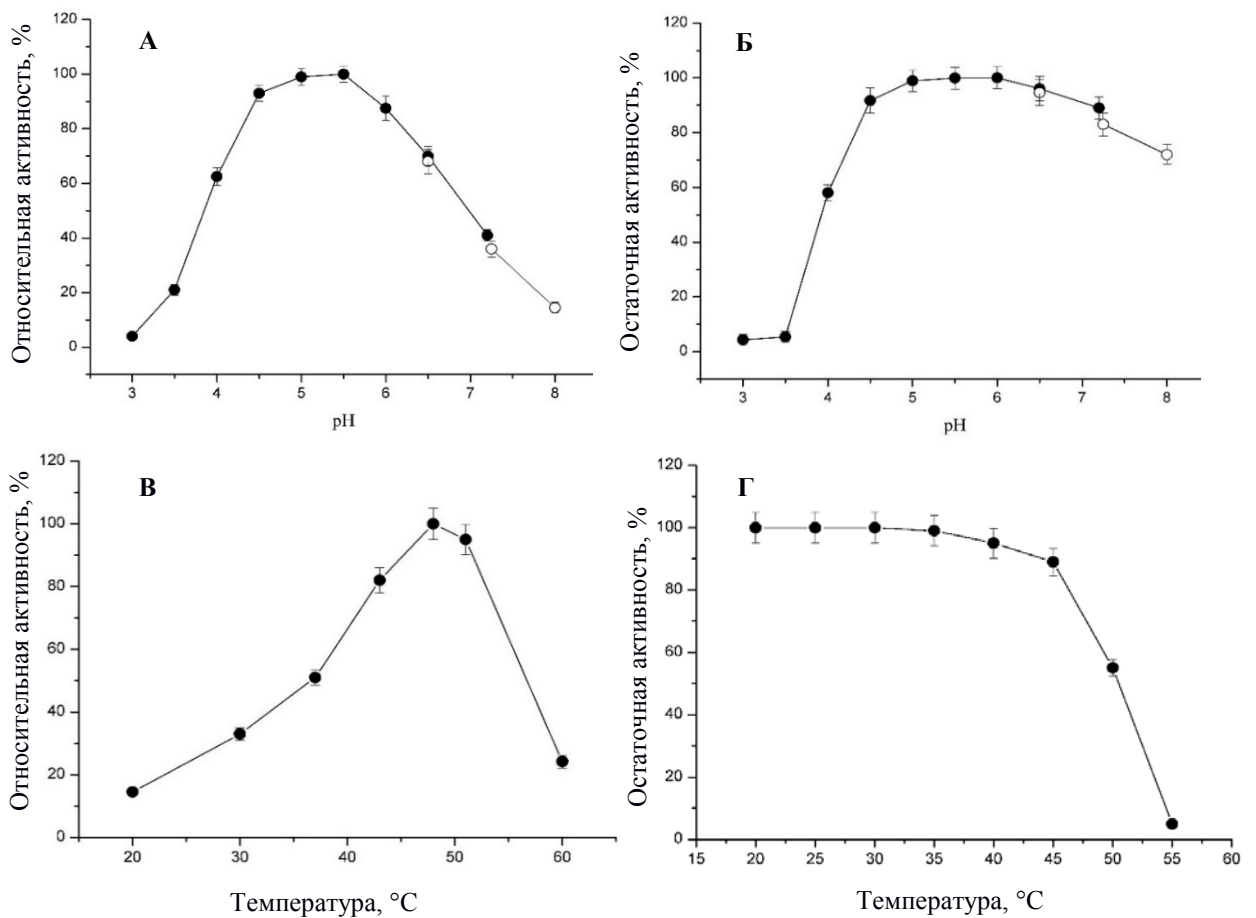


Рисунок 22 – Влияние pH и температуры на активность и стабильность FrFucA в гидролизе *p*NPFuc. **А:** Относительная активность α -фукозидазы, измеренная при различных значениях pH; **Б:** Остаточная активность FrFucA после инкубирования фермента 16 часов при 37 °C в диапазоне значений pH 3,0–8,0; **В:** Влияние температуры на гидролитическую активность фермента (pH 5,5); **Г:** Остаточная активность α -L-фукозидазы после инкубирования фермента при различных температурах (20-60 °C, pH 5,5) в течение 20 мин.

Установлено, что фермент стабилен в относительно широком диапазоне рН, сохраняя более 80% активности в диапазоне рН 4,5 до 7,0 после инкубирования в течение 16 часов при температуре 37 °С. При исследовании рН-стабильности FpFucA активность фермента резко снижалась при хранении при рН 4,0, но в диапазоне рН 6,5 – 8,0 остаточная активность уменьшалась медленно (Рисунок 22, Б). После инкубирования фермента при температуре 45 °С и выше, активность FpFucA значительно снижалась. Предварительная инкубация при 50 °С в течении 20 мин приводила к потере активности α -L-фукозидазы вдвое (остаточная активность 45%) (Рисунок 22, Г).

Было исследовано влияние ионов двухвалентных металлов на активность FpFucA. Анализ чувствительности FpFucA к ионам металлов показал, что фермент сохранял 38 и 25% активности после инкубации с Cu^{2+} и Hg^{2+} , соответственно (Таблица 9). Ингибирующее действие ионов Hg^{2+} может указывать на присутствие сульфгидрильных групп в активном центре фермента. Данные относительно эффекта ионов Hg^{2+} на гидролитическую активность α -L-фукозидаз сопоставимы с результатами, полученными для α -L-фукозидаз из мицелиальных грибов вида *F. oxysporum* [202], α -L-фукозидаз из бактерий *Clostridium perfringens* [216], рода *Bacillus* [206, 207, 226] и *Streptomyces* [217]; пищеварительных желез морского моллюска *Pecten maximus* [10]. Для частично очищенной α -L-фукозидазы из *Haliotis* sp. после инкубирования с ионами Hg^{2+} активность сохранялась на 20%, но Cu^{2+} не влиял [331]. Также было показано, что хлористая соль Hg^{2+} инактивирует α -фукозидазу из гепатопанкреаса *Littorina littorea* L. [332].

Другие ионы металлов не влияли на активность фермента FpFucA, что характерно также и для известных α -L-фукозидаз из различных источников. Согласно экспериментальным данным, добавление в раствор фермента натриевой соли ЭДТА не влияло на уровень активности α -фукозидазы, что может свидетельствовать о том, что ионы металлов не входят в активный центр FpFucA. Сравнительно для большого количества известных α -фукозидаз не показана зависимость гидролитической активности фермента от присутствия в активном центре иона металла, требуемого для катализа.

Таблица 9 – Влияние ионов двухвалентных металлов на активность FpFucA

Ион металла	Остаточная активность, %
Без добавления металла	100
Hg^{2+}	25
Cu^{2+}	38
Mn^{2+}	98
Zn^{2+}	93
Fe^{2+}	100
Mg^{2+}	96
Ca^{2+}	100
ЭДТА	104

3.4.4 Определение стереохимии гидролиза, катализируемого FrFucA

Исследование стереохимии реакции гидролиза, катализируемой α -L-фукозидазой, осуществляли с помощью ^1H ЯМР спектроскопии, используя в качестве субстрата *p*NPFuc. Для анализа использовали достаточное количество FrFucA, позволяющее завершить полный гидролиз *p*NPFuc в течение 10 минут. На Рисунке 23 показаны частичные ЯМР ^1H спектры аномерных протонов субстрата *p*NPFuc и накопление α - и β -аномеров *L*-фукозы в начальный момент времени, после 3 и 40 минут реакции. При анализе продуктов ферментативного гидролиза *p*NPFuc было показано, что изначально образуется α -аномер *L*-фукозы (сигнал 5,1 ppm), что можно наблюдать на спектре после 3 минут инкубирования (Рисунок 23). В течение последующего времени, на более поздних стадиях, появляется сигнал 4,6 ppm, соответствующий протону H1 остатка β -фукозы. Аномер β -фукозы возникает в реакционной смеси в результате мутаротации (сигнал 4,45 ppm). Спустя 40 минут, на ^1H ЯМР спектре видно равновесие α - и β -аномеров фукозы. Полученные в рамках эксперимента данные о том, что α -*L*-фукоза образуется во время начальной стадии гидролиза, служат очевидным доказательством того, что исследуемая α -*L*-фукозидаза катализирует гидролиз с сохранением конфигурации при аномерном центре гликоновой части субстрата и, следовательно, в течение каталитического цикла, она, вероятно, существует в виде промежуточного комплекса гликозил-фермент.

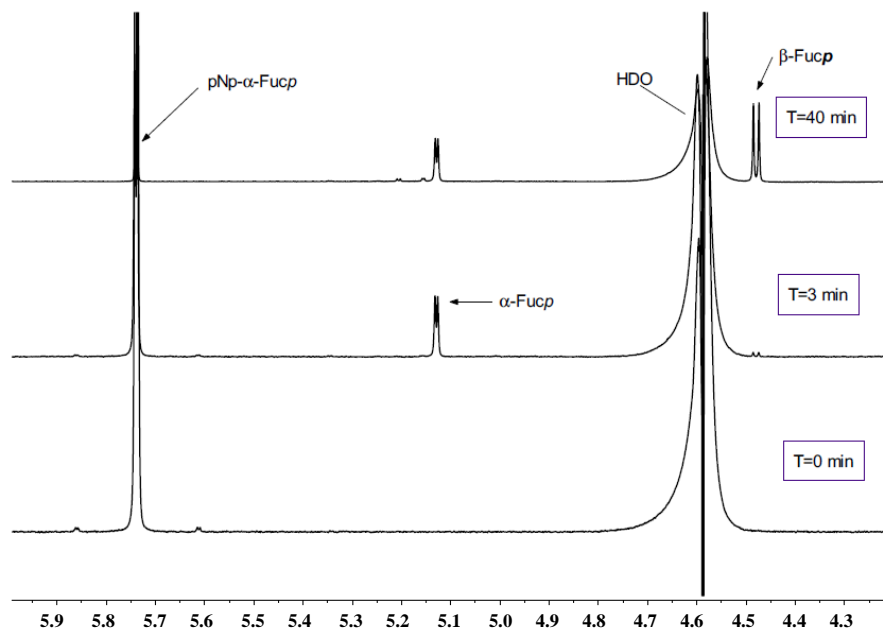
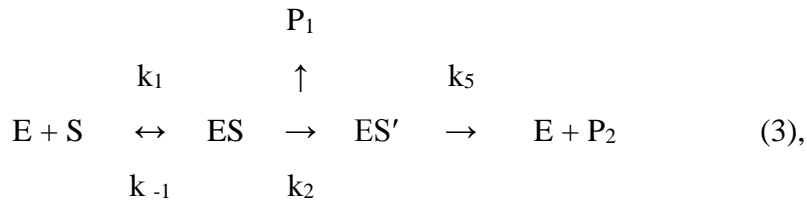


Рисунок 23 – Частичные ^1H ЯМР спектры реакции гидролиза *p*NPFuc α -*L*-фукозидазой, иллюстрирующие образование аномерных протонов субстрата и образование α - и β -аномеров *L*-фукозы в начальный момент времени, после 3 и 40 минут реакции.

В соответствии с классификацией ферментов CAZy [55, 183], α -L-фукозидазы принадлежат к 29 и 95 семействам гликозид гидролаз, различаясь между собой механизмом катализа реакций гидролиза фукозидных связей. Представители 95-го семейства гликозидгидролаз катализируют гидролиз связей с α -L-фукозой с обращением аномерной конфигурации первого углеродного атома продукта. В свою очередь, представители 29 семейства являются сохраняющими ферментами, т.е. в результате гидролиза α -L-фукоза, остается в той же аномерной конфигурации, что и в исходной молекуле, подвергающейся гидролизу. Исследуемая FpFucA демонстрирует подобную стереохимию гидролиза. Полученные результаты подтверждают классификацию α -фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 как представителя 29 семейства гликозид гидролаз CAZy.

3.4.5 Определение кинетических характеристик реакции гидролиза модельного субстрата *pNPFuc*, катализируемой FpFucA

Кинетика реакции гидролиза *pNPFuc*, катализируемая исследуемой α -фукозидазой, в диапазоне концентраций субстрата 0,4 – 10,5 мМ подчиняется зависимости Михаэлиса-Ментена. Это подтверждается линейной зависимостью в координатах Лайнуивера-Берка (Рисунок 24). Кинетическая схема реакции в данном случае может быть представлена следующим уравнением:



где E – фермент; S – субстрат; ES – фермент-субстратный комплекс; ES' – фукозил-ферментный комплекс; P₁ – продукт реакции, формирующийся из агликоновой части субстрата (*pNP* для *pNPFuc*); P₂ – L-фукоза; k₋₁, k₂ и k₅ – константы скорости соответствующих стадий (k₅ = k₅ · [H₂O]).

Для α -L-фукозидазы были определены значения $K_M = 1,10 \pm 0,02$ мМ, $k_{кат} = 39,8 \pm 1,8$ с⁻¹, $k_{эфф} = 36,18$ мМ⁻¹ · с⁻¹ в диапазоне концентраций субстрата 0,4 – 10,5 мМ при исследовании гидролиза *pNPFuc*. Мы показали, что гидролитическая активность FpFucA по отношению к *pNPFuc* была самой высокой среди известных α -фукозидаз из грибов (Таблица 4). Однако некоторые бактериальные и несколько α -фукозидаз человека гидролизуют модельный субстрат *pNPFuc* более эффективно, чем FpFucA. Активность α -L-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 сопоставима с гидролитическими активностями рекомбинантной α -L-фукозидазы человека [53] и нескольких бактериальных α -L-фукозидаз [204, 208, 221], (Таблица 4).

В работе показано ингибирующее действие *L*-фукозы, а также 1-деоксифуконоджиримицин-HCl на активность α -*L*-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 и определены константы ингибирования реакции гидролиза, катализируемой FpFucA (Таблица 10).

L-Фукоза, конечный продукт действия α -*L*-фукозидаз, является конкурентным ингибитором активности FpFucA с константой ингибирования $K_I = 0,20 \pm 0,05$ мМ (Рисунок 24, А; Таблица 10). Для многих ферментов показано, что при накоплении конечного продукта ферментативной реакции, он может действовать как ингибитор фермента. При этом между субстратом и продуктом реакции происходит конкуренция за активный центр данного фермента, из-за чего снижается скорость реакции гидролиза или вовсе приостанавливается дальнейшее образование самого конечного продукта.

1-Деоксифуконоджиримицин (DFJ) оказывает сильный ингибирующий эффект на активность фермента. Константа ингибирования для α -фукозидазы исследуемым соединением в реакции гидролиза *p*NPfuc равна $K_I = 7,1 \pm 0,05$ нМ (Рисунок 24, Б; Таблица 10). Деоксифуконоджиримицин (1,5-дидеокси-1,5-имино-*L*-фуцитол) - мощный и специфичный конкурентный ингибитор активности α -фукозидаз из различных организмов (Таблица 4) [333, 334]. Данное соединение по структуре представляет собой аналог *L*-фукозы, где атом кислорода в цикле заменен азотом и отсутствует гидроксильный заместитель у C1. За время исследований функций и активности ферментов α -фукозидаз, это соединение многократно модифицировали (*N*-метилирование; добавление алкильного или арильного заместителя, смежного с атомом азота в кольце; изменение стереоизомерной конфигурации C-5 или заместителей у C-1) с целью повышения или ослабления ингибирующего эффекта и изучения вариантов взаимодействия с активным центром фермента [335, 336]. Для α -фукозидазы из печени человека показано, что все производные DFJ являются более эффективными конкурентными ингибиторами фермента в сравнении с такими соединениями как *L*-фуконолактон и *L*-фуконо- δ -лактам [335]. Короткие молекулы-ингибиторы α -фукозидаз нужны как для изучения работы фермента с фундаментальной точки зрения, так и имеют прикладные значения для лечения ряда патологических состояний, при которых задействованы ферменты α -фукозидазы. Например, одним из вариантов необходимости разработки ингибирующих соединений и знаний о влиянии этих соединений на кинетические характеристики α -фукозидаз служит применение их для создания искусственного дефицита лизосомальной фукозидазы животных обратимым образом, имитируя генетический дефицит фермента в организме, что позволяет анализировать взаимодействия фермента с гликанами значимых гликопротеинов [335].

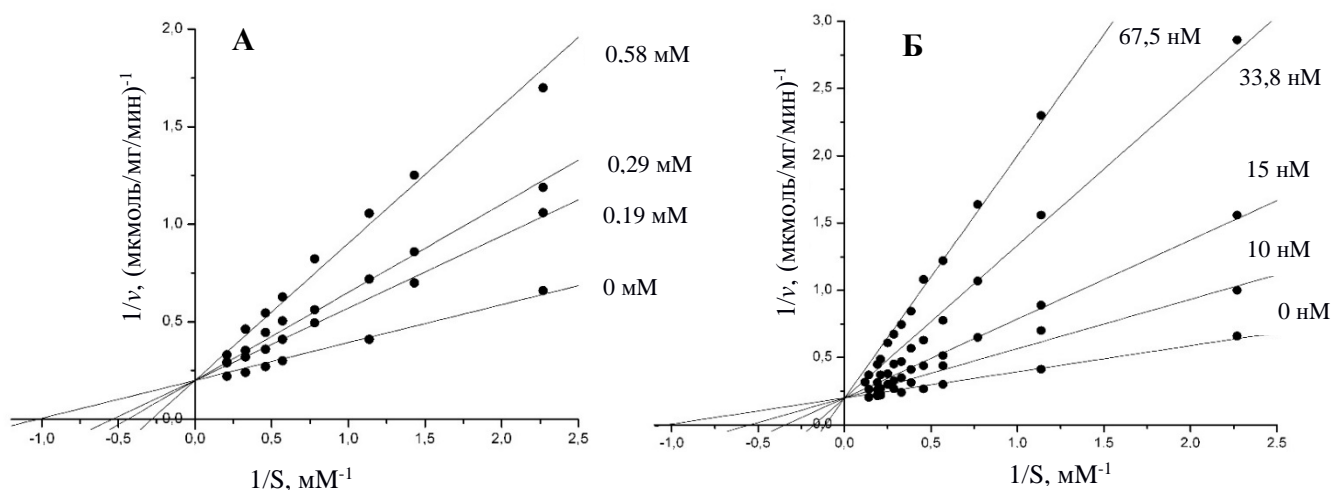


Рисунок 24 – Зависимость скорости реакции гидролиза p NPFuc, катализируемой FpFucA, в присутствии различных концентраций ингибитора L -фукозы (А) или 1-деоксифуконоджиримицин-HCl (Б).

В лабораторных исследованиях достаточно часто используют буферные растворы на основе трис(гидроксиметил)аминометана (Трис). В настоящее время принято считать, что это соединение может влиять на активность некоторых гликозидаз, связываясь с активным центром фермента [337]. Нами проверено влияние Трис-HCl буфера на активность FpFucA. Согласно полученным данным, Трис является конкурентным ингибитором FpFucA в гидролизе p NPFuc с константой ингибирования $K_I = 12,2 \pm 0,1$ mM (Рисунок 25; Таблица 10). Ингибирующее действие Трис также показано в отношении α -фукозидаз из *F. graminearum* (FgFCO1) (50 mM Трис ингибирует) [14], *Paenibacillus thiaminolyticus* (iso1) (50 mM Трис ингибирует) [12] и *Biomphalaria glabrata* [191]. Факт влияния Трис на активность α -фукозидаз на сегодняшний день в литературе остаётся без обсуждения. Тем не менее, для других известных гликозидаз имеются структурные данные, описывающие механизм взаимодействия Триса с активным центром фермента. Считается, что структура молекулы Триса имитирует гидроксильные группы сахарных колец. Трис связывается с -1 сайтом активного центра вблизи нуклеофила и каталитической кислоты и действует как конкурентный ингибитор для гликозидгидролаз. Примерами ферментов, для которых подтверждён этот эффект, служат целлобиогидролаза GH7 [338], амилаза из GH13 [339], глюкоамилаза GH15 [340], 1,3-1,4- β -D-глюканаза [341]. Несмотря на оптимальный диапазон значений pH для исследуемой FpFucA в диапазоне 4,5 – 6,0, для большинства организмов буферные свойства при pH 7–9 соответствуют физиологическим значениям pH. Эти свойства и низкая стоимость делают Трис одним из часто используемых буферов для биохимии.

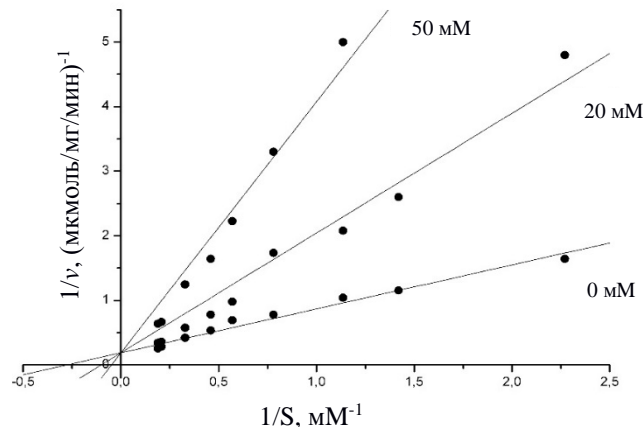


Рисунок 25 – Ингибирующий эффект Трис-НСl на активность FpFucA. Зависимость скорости реакции гидролиза *p*NPfuc, катализируемой FpFucA, в присутствии 50 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,4 (0 мМ Триса), 20 мМ или 50 мМ Трис-НСl буфера, рН 7,4

Таблица 10 – Константы ингибирования реакции гидролиза *p*NPfuc, катализируемой α -L-фукозидазой из *F.proliferatum* LE1

Ингибитор	Структурная формула	K_I
L-Фукоза		$0,20 \pm 0,05$ мМ
1-Деоксифуконоджиримицин-НСl		$7,1 \pm 0,05$ нМ
Трис(гидроксиметил)аминометан		$12,2 \pm 0,1$ мМ

3.4.6 Определение субстратной специфичности FpFucA

Способность FpFucA катализировать отщепление различных моносахаридов от гликоконъюгатов была проверена с использованием семи различных *p*NP-гликозидов как возможных субстратов для фермента: *p*NPfuc, *p*NP α Gal, *p*NP β Gal, *p*NP β Fuc, *p*NPNA β Glc, *p*NPNA α Glc, *p*NPNA α Gal. Было показано, что FpFucA способна гидролизовать только *p*NPfuc из использованных *p*NP-гликозидов, что говорит о том, что фермент не может разместить никакой из гликозидных остатков кроме L-фукозы в -1 субсайте активного центра.

Определены относительные скорости катализируемого FpFucA гидролиза некоторых фукозиллированных олигосахаридов с различными типами связи: L-Fuc- α -OPr и набора фукобиозидов с тремя различными типами связи (Таблица 11).

Таблица 11 – Кинетические параметры реакций гидролиза фукозосодержащих субстратов, катализируемые FpFucA (pH 5,5; 37°C)

Субстрат	K_M , mM*	Скорость гидролиза, с ⁻¹ **	$k_{эфф}$, mM ⁻¹ с ⁻¹
<i>p</i> NPFuc	1,10 ± 0.02	39,8 ± 1,8	36,18
<i>L</i> -Fuc- α -OPr	1,67 ± 0.08	0,40 ± 0,01	0,24
<i>L</i> -Fuc- α -(1→2)- <i>L</i> -Fuc- α -OPr	1,23 ± 0.06	(4,0 ± 0,1) · 10 ⁻³	3,3 · 10 ⁻³
<i>L</i> -Fuc- α -(1→3)- <i>L</i> -Fuc- α -OPr	3,0 ± 0.1	(2,20 ± 0,07) · 10 ⁻³	0,7 · 10 ⁻³
<i>L</i> -Fuc- α -(1→4)- <i>L</i> -Fuc- α -OPr	0,53 ± 0.03	(3,6 ± 0,1) · 10 ⁻³	6,8 · 10 ⁻³

(*) Константа Михаэлиса K_M для фукобиозидов и пропилфукозида принята равной константе ингибирования K_I и была оценена в гидролизе *p*NPFuc как функция от концентрации соответствующего ингибитора.

(**) Скорости реакции гидролиза определяли из экспериментов с фиксированным $[S_0]$.

Оценка значений кинетического параметра K_M была выполнена как K_I для пропилфукозида и фукобиозидов, поскольку мы рассматривали их как конкурентные субстраты при гидролизе хромогенного субстрата *p*NPFuc. Конкурентный тип ингибирования был подтверждён анализом измеренных кривых кинетики, как функция от концентрации ингибитора (Приложение А). В каждом случае кажущаяся максимальная скорость (V_{\max}) не зависела от концентрации ингибитора, что является показателем конкурентной модели ингибирования. Для такого типа ингибирования определение констант ингибирования является очень удобным способом оценки сродства различных субстратов [342]. В частности, это правило наиболее верно, когда конкурирующие нехромофорные субстраты могут быть преобразованы в продукты со значительно меньшей скоростью, чем хромофорные, как в случае с *p*NPFuc (Таблица 11). Аналогично выполненным нами измерениям, такой же подход использован для определения кинетических констант при гидролизе дигалактозидов, катализируемых α -*D*-галактозидазой из *Thermotoga maritima* [343]. Следует отметить, что синтезированные фукобиозиды имеют пропильную группу, защищающую восстанавливающий конец дисахарида. Поэтому перед анализом активности FpFucA в гидролизе этих субстратов было определено влияние скорости расщепления фукозы от пропильной группы на общую скорость гидролиза фукобиозидов с различными типами связи. Было показано, что скорость гидролиза пропилфукозида на два порядка выше, чем скорость гидролиза дифукозидной связи в фукобиозиде. Таким образом, это был самый быстрый этап и можно было пренебречь при сравнительном анализе фукобиозидов с различными типами связей. Было обнаружено, что FpFucA гидролизует расщепление α -(1→4)-связи в 2 и примерно в 10 раз более эффективно (параметр $k_{эфф}$), чем расщепление α -(1→2)- и α -(1→3)-связей, соответственно (Таблица 11). Несмотря на то, что скорости гидролиза для всех

исследуемых фукобиозидов были практически равны, основное влияние на каталитическую эффективность оказывало значение константы K_m , которая характеризовала аффинность субстрата к активному центру фермента. Наибольшее сродство наблюдалось для L -Fuc- α -(1 \rightarrow 3)- L -Fuc- α -OPr, а самое низкое для L -Fuc- α -(1 \rightarrow 4)- L -Fuc- α -OPr. Использование дифукозидов с «чистой» фукозидной связью не часто используется для характеристики субстратной специфичности α - L -фукозидаз. Такие субстраты были описаны для исследования гидролитической способности α -фукозидазы из *A. niger* [193], но в работе не были приведены численные значения активности. Единственной охарактеризованной α - L -фукозидазой, для которой наиболее предпочтительной для гидролиза является α -(1 \rightarrow 4)-связь, является α - L -фукозидаза I из миндальной эмульсии [194] (Таблица 5). Способность гидролизовать любые другие фукозилированные сахара не описана для этой α -фукозидазы.

Семейство α - L -фукозидаз GH29 имеет различные субстратные предпочтения. Основываясь на разнообразных биохимических, филогенетических и структурных данных, исследователи склонны делить это семейство на два основных подсемейства. Работа по подтверждению существования двух подсемейств GH29 выполнена на основе α -фукозидаз из *Bacteroides thetaiotaomicron* [51]: бактериальная фукозидаза подсемейства А способна гидролизовать широкий спектр фукозилированных соединений, в том числе и модельный субстрат p NPFuc, тогда как представители подсемейства В катализируют, в основном, реакцию гидролиза α -(1 \rightarrow 3/4)-связей и практически не проявляет активность по отношению к p NPFuc. Такие «предпочтения» при гидролизе фукозилированных соединений были объяснены наличием консервативной аминокислоты триптофана (Trp) в активном сайте представителей подсемейства В, которая образует дополнительный сахар-связывающий субсайт, специфичный для α -(1 \rightarrow 3/4)-связанных фукозильных остатков.

Часто субстратную специфичность α - L -фукозидаз тестируют в реакции гидролиза фукозилированных разветвлённых олигосахаридов, у которых остатки L -фукозы присоединены к остаткам Gal или GlcNAc. Способность отщеплять L -фукозу от разветвленного олигосахарида является одним из основных критериев классификации бактериальных α - L -фукозидаз на подсемейства А или В, в соответствии со структурными доказательствами, полученными Sakurama и соавторами [51]. Основываясь на филогенетических данных, авторы включили в эту классификацию α - L -фукозидазы растений и животных, но имеющиеся в литературе данные не всегда не подтверждают это правило (Таблица 5).

Для исследования субстратной специфичности α - L -фукозидазы из *F. proliferatum* LE1, помимо хромофорного субстрата p NPFuc и дифукозидов с различными типами связи, были использованы фрагменты натуральных олигосахаридов различной структуры (Таблица 12). Показано, что FpFucA катализирует с различной скоростью гидролиз используемых в работе

фукозилированных олигосахаридов. Фермент FpFucA расщепляет α -(1→4)- и α -(1→6)-связи между *L*-фукозой и остатком GlcNAc в дисахарид-замещенном полиакриламидном полимере (*L*-Fuc- α -(1→4)-*D*-GlcNAc-ПАА) и в 6-*O*- α -*L*-Fuc-*N,N'*-диацетилхитобиозе, соответственно. Известно, что фукозилирование GlcNAc в положениях α -(1→3/4)- характерно для *N*- и *O*-гликанов у человека и растений, а в положении α -(1→6)-хитобиоза характерно лишь для *N*-гликанов. Структура *N*-гликанов Gal-(1→4)[Fuc-(1→6)]GlcNAc является основной для *N*-гликанов, напрямую связываясь одной единицей GlcNAc с Asn. Характер гликозилирования гликопротеина играет важную роль для его функционирования, оказывая влияние на его способность правильно укладываться, на устойчивость к протеолитическому и/или другому виду расщепления, на каталитическую активность и на способность гликопротеина должным образом взаимодействовать с другими молекулами. Поэтому активность гидролитических ферментов мицелиального гриба в отношении растительных гликопротеинов может играть существенную роль при развитии патогенных штаммов. Разнообразные структуры *N*-гликанов уже предложено анализировать с использованием набора экзо-гликозидаз [344].

Нами было установлено, что FpFucA гидролизует α -(1→2)-связи между *L*-фукозой и остатком Gal в сахариде Н-антиген типа II (Таблица 12). Стоит отметить, что α -*L*-фукозидаза была неактивна в отношении разветвленного фрагмента Le^x, где *L*-фукоза присоединена к остатку GlcNAc в третьем положении сахаридного кольца.

Поскольку для определения субстратной специфичности α -фукозидазы FpFucA было использовано ограниченное количество субстратов, а также из-за отсутствия трёхмерных структур фермента с лигандами и без них, затруднительно сделать однозначные выводы о региоселективности FpFucA при гидролизе данных фукозилированных олигосахаридов. Однако очевидно, что остатки сахаров, окружающие расщепляемую ферментом гликозидную связь, сильно влияют на активность FpFucA. Из полученных данных можно предположить, что активный центр фермента потенциально легче вмещает линейные олигосахаридные структуры, чем разветвлённые.

Таблица 12 – Субстратная специфичность фермента FpFucA

Субстрат	Скорости гидролиза, с ⁻¹ *
<i>D</i> -Gal- β -(1→4)-(L-Fuc- α -(1→3))- β - <i>D</i> -GlcNAc-OMe (Le ^x)	Нет активности
<i>L</i> -Fuc- α -(1→2)- <i>D</i> -Gal- β -(1→4)- β - <i>D</i> -GlcNAc-OMe (Le ^d)	$(55 \pm 2) \cdot 10^{-3}$
<i>L</i> -Fuc- α -(1→4)-GlcNAc-ПАА	$(10 \pm 1) \cdot 10^{-3}$
6- <i>O</i> - α - <i>L</i> -Fuc- <i>N,N'</i> -диацетилхитобиоза <i>D</i> -GlcNAc- β -(1→4)-(L-Fuc- α -(1→6))- β - <i>D</i> -GlcNAc-OMe	$(17,4 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$

(*) Значение скорости гидролиза для каждого субстрата определено в эксперименте при фиксированном значении [S₀] при стандартных условиях.

Экспериментальные данные по субстратной специфичности биохимически охарактеризованных α -L-фукозидаз очень разнообразны (Таблица 5). Например, α -L-фукозидазы из моллюсков и человека, за некоторыми исключениями, проявляют гибкость в отношении гидролизуемых субстратов. α -Фукозидазы из грибов, также, как и бактериальные α -фукозидазы [51], были сгруппированы в два подсемейства в соответствии со сходством их аминокислотных последовательностей [213]. При помощи полученных кристаллических структур α -L-фукозидазы из *F. graminearum* были выявлены открытые и закрытые конформации активного участка, в которых была определена аминокислота Glu, выполняющая роль общей кислоты/основания, и аминокислотный остаток Asp, играющий роль нуклеофила. Известно, что эти аминокислоты характерны и для некоторых бактериальных GH29-фукозидаз.

На основании данных выравнивания последовательности FpFucA и последовательностей предполагаемых GH29 α -L-фукозидаз из других микроорганизмов, было построено филогенетическое дерево для классификации исследуемого фермента относительно подсемейства А или В семейства GH29 α -L-фукозидаз с помощью алгоритма Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Рисунок 26). Согласно данным филогенетического анализа и полученным экспериментальным результатам по субстратной специфичности исследуемого фермента, α -L-фукозидазу из *F. proliferatum* можно классифицировать, как члена подсемейства А 29-го семейства гликозидгидролаз базы данных CAZy [55], представители которого характеризуются широкой субстратной специфичностью.

При изучении двух α -фукозидаз из мицелиальных грибов рода *Fusarium* [14], авторы, на основании выравнивания последовательностей, показали, что GH29 семейство α -фукозидаз включает α -L-фукозидазы из различных грибных источников. В это семейство входят ортологи α -фукозидаз из рода *Fusarium* (FoFCO1 из *F. oxysporum*, FgFCO1 из *F. graminearum*, фукозидаза из *F. verticillioides*) [14]. Стоит отметить, что при разделении грибных фукозидаз 29го семейства на два подсемейства на основании известных геномных последовательностей, подсемейство А включает в себя наибольшее количество грибных α -фукозидаз (принадлежит FoFCO1), тогда как подсемейство В – немногочисленно (включает FgFCO1). Было показано, что подсемейство А распространено среди аскомицетов, базидиомицетов и также присутствует у зигомицетов *Mucor circinelloides* (*Mucoromycotina*). Среди известных геномов базидиомицетов не обнаружено α -фукозидаз подсемейства В. Интересен тот факт, что в геноме мицелиального гриба *Trichoderma reesei*, источника многих промышленно важных ферментов, вовсе не найдено ферментов подсемейства GH29, хотя показана, по крайней мере, одна предсказанная α -фукозидаза из GH95. Некоторые грибы, например, *Magnaporthe grisea*, имеют несколько генов α -фукозидаз: два члена подсемейства А и одно из подсемейства В. Для многих грибов вовсе не показано наличие в геноме последовательностей α -фукозидаз.

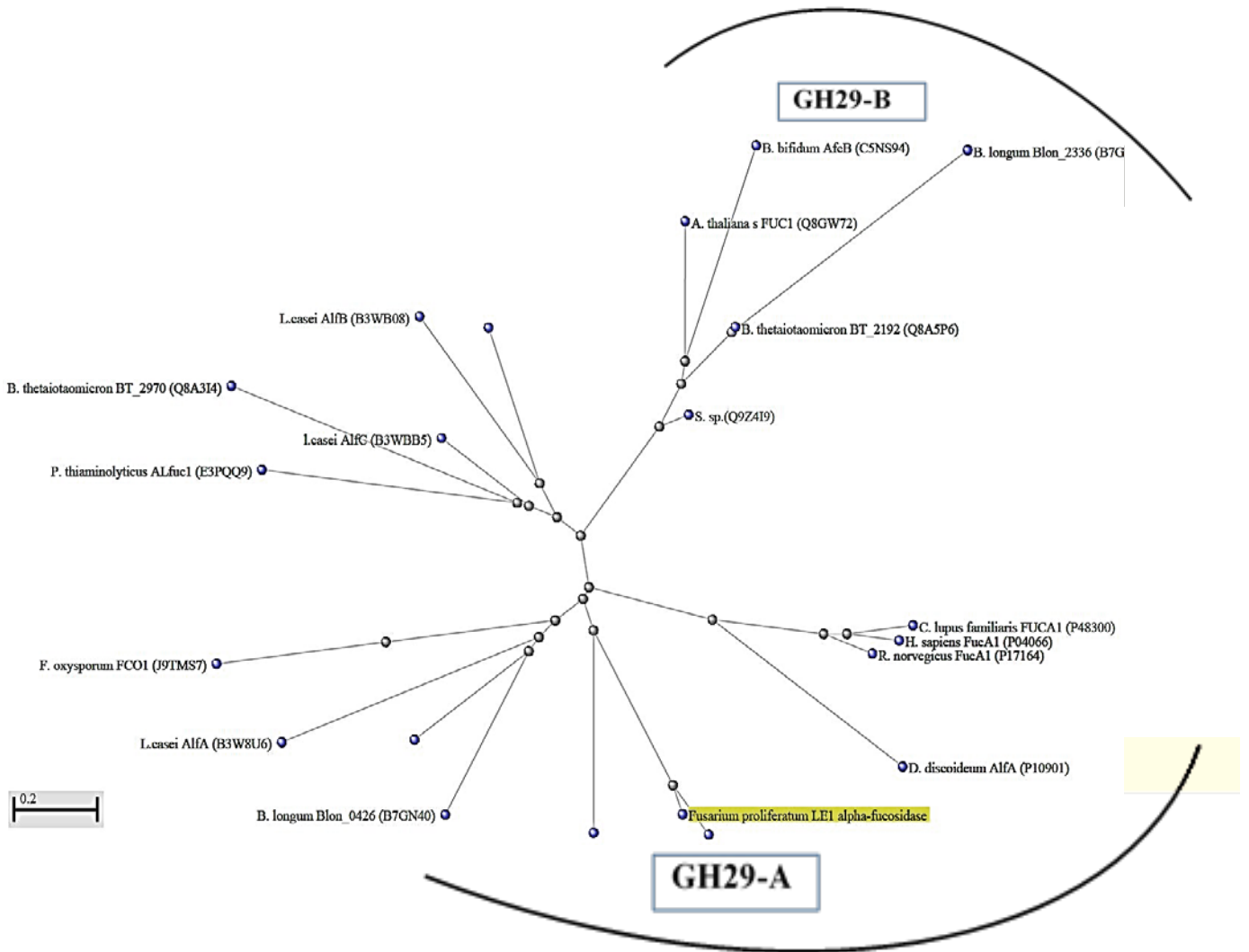


Рисунок 26 – Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательности GrFucA и предполагаемых GH29 α -L-фукозидаз из других микроорганизмов.

3.4.7 Подбор условий ферментативного гидролиза фукоидана

Задача найти, охарактеризовать и разработать эффективные биокатализаторы, способные селективно деполимеризовать сульфатированный полисахарид фукоидан, актуальна на современном этапе исследований этого класса соединений. Для подбора условий ферментативного гидролиза, нами была выделена грубая фракция фукоидана из бурых водорослей *L. digitata*, которую затем фракционировали с использованием анионообменной хроматографии. В результате, после элюирования раствором NaCl с концентрацией 0,75M, 1M и 1,25M, были получены фракции 0,75F, 1F и 1,25F, соответственно.

Фракция 0,75F была использована для дальнейшей работы по подбору условий для ферментативного гидролиза. Для этого предварительно был определён моносахаридный состав образца методом газо-жидкостной хроматографии (Таблица 13).

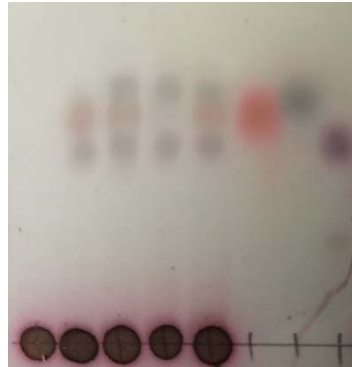
Таблица 13 – Моносахаридный состав фракции фукоидана из *L. digitata*, элюированной 0,75M NaCl

Состав фракции фукоидана, %				
<i>L</i> -Fuc	<i>D</i> -Xyl (α - и β -)	<i>D</i> -Gal (α - и β -)	<i>D</i> -Glc (α - и β -)	Сульфаты
12,5	39,8	16,4	9,1	19,8

Исходя из данных о структуре фукоиданов, в их дефрагментации могут принимать участие разные ферменты, специфичные к определённым участкам молекулы. Аналогично целлюлолитическому комплексу ферментов, данный комплекс может включать комбинацию гликозидгидролаз экзо- и эндо-действия: фукоиданазы (эндо-действия), фукозидазы (экзо-действия); сульфатазы, а также глюкозидазы, маннаназы, ксилозидазы, галактозидазы и галактаназы. Поскольку фукоиданы, кроме *L*-Fuc, могут содержать в своём составе *D*-Xyl, *D*-Gal, *D*-Glc, *D*-Man, то для целевой фрагментации, а также, в перспективе, для установления возможных структурных особенностей этих соединений, нами была предпринята попытка подобрать состав смеси ферментов класса гликозидаз, имеющихся в лабораторной коллекции, для гидролиза фукоидана. Индивидуальные ферментные препараты в реакционной смеси были использованы в следующих комбинациях: вариант А содержал только FpFucA; вариант Б — «коктейль» ферментов, включающий β -глюкозидазу из *S. candidum* ЗС, β -галактозидазу из *Penicillium* sp., β -маннозидазу из *T. reesei*, β -ксилозидазу из *A. awamori* и FpFucA; вариант В — комбинация Б без FpFucA; вариант Г — комбинация Б с добавлением сульфатазы FpC.

Предварительные результаты свидетельствуют о том, что при использовании в реакции гидролиза фукоидана смеси ферментов гликозидаз без добавления α -фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 (вариант В) происходит образование моносахаридов *D*-Xyl и *D*-Gal (Рисунок 27). При добавлении к раствору фукоидана только FpFucA (вариант А), в реакционной смеси образуется *L*-фукоза и *D*-галактоза. При этом, при использовании FpFucA совместно с гликозидазами (вариант Б) происходит образование трёх моносахаридов *D*-Xyl, *L*-Fuc и *D*-Gal со значительно более высоким количеством моносахарида *L*-Fuc по сравнению с вариантом А и моносахаридов *D*-Xyl и *D*-Gal относительно варианта В. Данный факт подтверждает участие FpFucA в гидролизе молекулы фукоидана сложного состава. При этом, согласно полученным данным, можно высказать предположение о том, что при использовании FpFucA без дополнительных гликозидгидролизующих ферментов происходит освобождение лишь доступных боковых остатков *L*-фукозы, в то время как при использовании комбинации гликозидгидролаз происходит синергетическое действие каждого из используемых ферментов.

Известно, что фукоиданы являются сульфатированными молекулами. Для исследования роли сульфатазы FpC в отщеплении сульфатных групп от молекулы фукоидана, была использована комбинация ферментов Г, содержащая, помимо комплекса гликозидгидролаз, и сульфатазу. Нам не удалось детектировать методом ТСХ существенного различия между продуктами ферментативного гидролиза при использовании комбинаций ферментов Б и Г.



К А Б В Г Fuc Xyl Gal

Рисунок 27 – ТСХ-анализ ферментативного гидролиза фракции фукоидана 0,75F из бурых водорослей *L. digitata* комбинациями гидролаз. Обозначения: К – контроль фракции фукоидана; А-Г – комбинация ферментов в реакционной смеси; Fuc – фукоза; Xyl – ксилоза; Gal – галактоза.

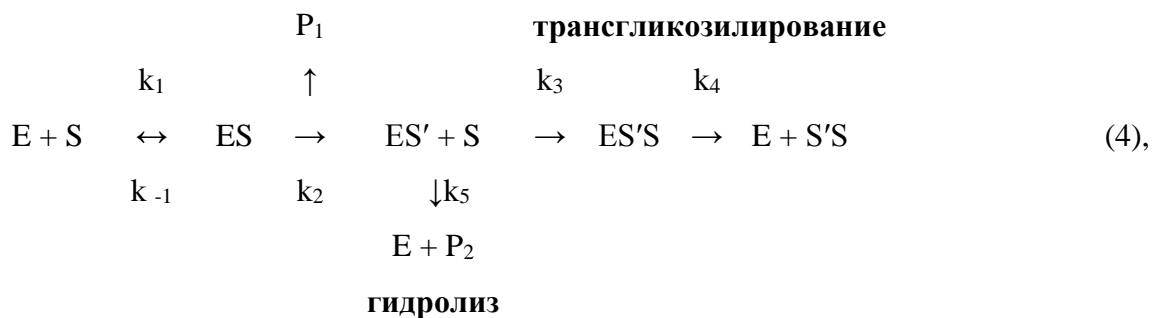
Известно, что некоторые α -фукозидазы активны в гидролизе сложных олиго- и полимерных молекул. Так, для нескольких α -фукозидаз из грибов рода *Fusarium* показана активность в отношении олигомерных фрагментов растительных ксилоглюканов, где остаток *L*-Fuc связан $\alpha(1\rightarrow2)$ -связью с остатком Gal [14, 28]. Другие известные α -фукозидазы активны в гидролизе полимерных соединений высших животных – муцинов. Биodeградация природных полисахаридов, как правило, осуществляется, комплексом ферментов. Из-за концевое расположения остатков Fuc в поли- и олигосахаридах, для максимального гидролиза исходных соединений действие α -фукозидаз должно быть выполнено раньше действия других гликозидаз, которые будут отщеплять сахара боковой цепи [344]. Другими полимерными субстратами для α -фукозидаз являются фукоиданы. Интерес к подбору условий для селективного расщепления полимерных молекул фукоиданов весьма высок в научном сообществе. Имеются данные о гидролизе фукоиданов, полученные методом ТСХ-анализа реакционной смеси с использованием α -фукозидаз [10, 11, 191, 261]. При этом, в некоторых работах говорится о том, что индивидуальные ферменты α -фукозидазы неактивны в отношении молекулы фукоидана, несмотря на их широкую субстратную специфичность в отношении других фукозилированных молекул [24, 345]. Часто модификации фукоидана осуществляли грубой смесью ферментного препарата, содержащего фукозидазную и/или сульфатазную активность. Роль ферментов

сульфатаз в деградации фукоиданов в литературе описана мало. Известно, что сульфатазы из морских моллюсков *Littorina sitkana* и *Turbo chrysostomus* не действовали на полимерные субстраты, такие как декстран сульфат и фукоидан из *Fucus evanescens*, а также на сульфатированные производные фукозы [346]. Среди известных грибных сульфатаз не охарактеризовано ферментов сульфатаз, активных в отношении полимерных сульфатированных субстратов (Таблица 2).

3.4.8 Исследование трансгликозилирующей активности FpFucA

Характерным свойством сохраняющих гликозидгидролаз является трансгликозилирующая активность, которая выражается в способности ферментов катализировать реакцию переноса гликозильного остатка исходного субстрата (донора) не только на молекулу воды, но и на иную молекулу акцептора, имеющую по меньшей мере одну гидроксильную группу [185, 268]. Исходя из того, что исследуемая α -фукозидаза катализирует гидролиз с сохранением конфигурации аномерного центра, было проведено исследование трансгликозилирующей активности данного фермента. Способность катализировать реакции трансфукозилирования очищенной FpFucA была показана с использованием в качестве донора *p*NPFuc и различных акцепторов: *p*NPFuc, *p*NP-гликозидов и алифатических спиртов.

В области высоких концентраций субстрата (10,5 мМ и более) фермент катализирует реакцию трансгликозилирования. Минимальная кинетическая схема с учетом реакции трансгликозилирования может быть представлена следующим образом:



где E – фермент; S – субстрат; ES – фермент-субстратный комплекс; ES' – фукозил-ферментный комплекс; P₁ – продукт реакции, формирующийся из агликоновой части субстрата (*p*NP для *p*NPFuc); P₂ – L-фукоза; S'S – продукт реакции трансгликозилирования; k₁, k₋₁, k₂, k₃, k₄ и k₅ – константы скорости соответствующих стадий (k₅ = k₅ · [H₂O]).

3.4.8.1 Реакции трансгликозилирования с *pNP*-гликозидами в качестве акцепторов

Исследуемая *FpFucA* способна образовывать *pNP*-дифукозид при использовании *pNPFuc* в качестве донора и акцептора. Для исследования способности синтеза *pNP*-дифукозида (*pNPFucFuc*) ферментом *FpFucA* использовали высокие концентрации донора/акцептора *pNPFuc* в реакции. Из-за низкой растворимости *pNPFuc*, в реакционную смесь добавляли 10% (об. / об.) ДМФА, что практически не снижало гидролитическую активность α -*L*-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1. Продукты трансгликозилирования определяли и разделяли методом ВЭЖХ с использованием обращено-фазовой хроматографии (Рисунок 28). Выход продукта трансгликозилирования составил 1,5% от суммы всех продуктов, полученных при протекании данной реакции.

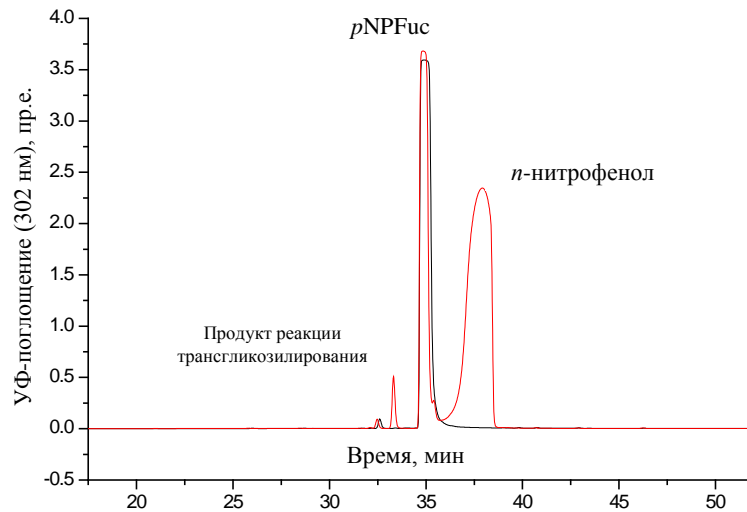


Рисунок 28 – Профиль ВЭЖХ элюции продуктов реакции гидролиза и трансгликозилирования, катализируемой *FpFucA* (красная линия) и контроль субстрата *pNPFuc* (черная линия).

Фракция, соответствующая предполагаемому пику продукта реакции трансгликозилирования (предположительно *pNP*-дифукозид) была лиофильно высушена и подвергнута анализу методом масс-спектрометрии в системе LC/MSD-TOF с электростатическим распылением (ESI) в режиме регистрации положительных ионов. В результате времяпролетной масс-спектрометрии предполагаемого *pNP*-дифукозида был получен спектр, на котором наблюдались пики с общей интенсивностью m/z 449,151 и m/z 880,311 (Рисунок 29).

Эти значения m/z коррелируют с теоретическими значениям m/z $[M+NH_4]^+$ для $pNPFucFuc$ ($m/z_{\text{расчетное}}$ 449,17659) и монодиассоциированного димерного катиона $[2M+NH_4]^+$ ($m/z_{\text{расчетное}}$ 880,331) $C_{18}H_{25}O_{11}N$, соответственно. Полученные данные подтверждают предположение о том, что продуктом реакции трансгликозилирования, катализируемой FpFucA, где донором и акцептором выступал $pNPFuc$, является $pNPFucFuc$ (pNP -дифукозид, $C_{18}H_{25}O_{11}N$).

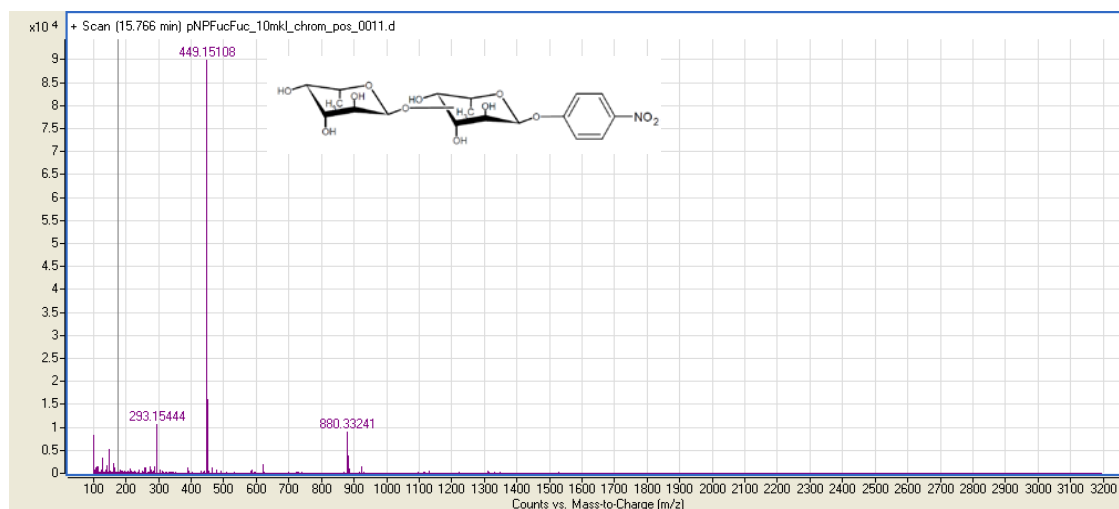


Рисунок 29 – Масс-спектр соединения, полученного в результате реакции трансгликозилирования, с временем удержания $T_R=15,7$ мин.

Некоторые α -фукозидазы проявляют строгую региоселективность, образуя только один тип связи между L -фукозным остатком и молекулой акцептора [29]. Говоря о селективности катализируемой гликозидазами реакции трансгликозилирования стоит отметить, что лишь некоторые ферменты способны осуществлять самоконденсацию донора реакции: иногда для некоторых α - L -фукозидаз и других гликозидаз донор моносахарида может также функционировать как акцептор. Среди α - L -фукозидаз такой способностью обладает небольшое количество ферментов [285, 347].

Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) было показано, что FpFucA способна переносить остаток L -фукозы на гидроксильную группу гликоновой части pNP -гликозидов: $pNP\alpha Gal$, $pNP\beta Gal$, $2NP\alpha Glc$, $pNP\beta Glc$, $pNP\beta Xyl$ и $pNPFuc$ (Рисунок 30), когда донором в реакции выступал $pNPFuc$. Стоит отметить, что в реакциях с использованием $pNP\alpha Gal$, $oNP\alpha Glc$ и $pNP\beta Xyl$ в качестве акцептора, методом ТСХ было детектировано образование двух продуктов реакции трансгликозилирования.

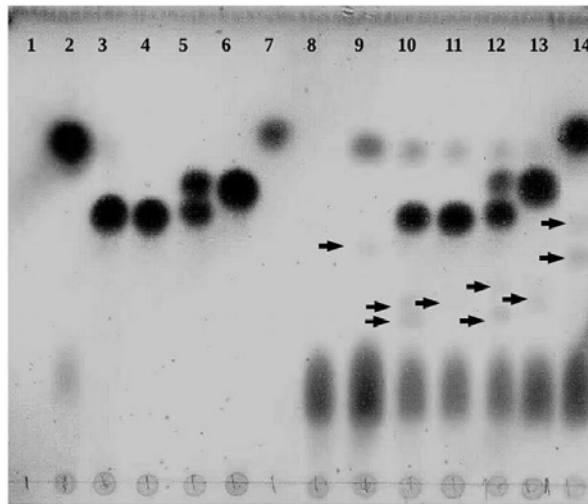


Рисунок 30– ТСХ-анализ реакций трансфукозилирования, катализируемых FrFucA, с использованием *pNP*-гликозидов в качестве акцепторов и *pNPFuc* в качестве донора *L*-фукозы. 1-8 – контроли, 9-14 – реакционные смеси (р.с.): 1. *n*-нитрофенол; 2. *pNPFuc*; 3. *pNPαGal*; 4. *pNPβGal*; 5. *pNPαGlc*; 6. *pNPβGal*; 7. *pNPβXyl*; 8. α -*L*-фукоза; 9. р.с., содержащая *pNPFuc* в качестве донора и акцептора; 10. р.с. с *pNPαGal*; 11. р.с. с *pNPβGal*; 12. р.с. с *oNPαGlc*; 13. р.с. с *pNPαGal*; 14. р.с. *pNPβGlc* в роли акцепторов. Продукты реакции трансгликозилирования указаны стрелками.

3.4.8.2 Реакции трансгликозилирования, катализируемые FrFucA, с алифатическими спиртами в качестве акцепторов

Для исследования реакции трансгликозилирования со спиртами в качестве акцепторов были использованы метанол, этанол и 1-пропанол. Для оценки эффективности реакции трансфукозилирования используемых акцепторов, реакцию проводили до трех разных значений степени гидролиза субстрата *pNPFuc* для каждого из используемых в исследовании спиртов: 28, 48 и 58% для MeOH, 23, 30 и 35% для EtOH и 17, 30, 37% для PrOH. Образование продуктов реакции трансгликозилирования предварительно детектировали методом ТСХ. Количественное определение и структуру продуктов реакций трансгликозилирования анализировали методом ^1H ЯМР-спектроскопии. Химические сдвиги, характерные для каждого продукта, согласуются с данными для метил-*L*-фукопиранозиды [348], этил-*L*-фукопиранозиды и пропил-*L*-фукопиранозиды [349], соответственно в реакциях, где акцептором выступали метанол, этанол и 1-пропанол. Была выполнена оценка эффективности трансгликозилирования (e) путем сравнения полученных значений отношения скорости реакции трансгликозилирования ($v_{\text{транс}}$) к сумме скоростей трансгликозилирования и гидролиза *pNPFuc* ($v_{\text{гидр}}$), отслеживая изменение концентрации акцептора или донора с течением времени. Параметр эффективности

трансгликозилирования выражает вероятность или предпочтение трансгликозилирования по сравнению с гидролизом и может быть рассчитан с использованием уравнения (5):

$$e = \frac{v_{\text{транс}}}{v_{\text{гидр}} + v_{\text{транс}}} \quad (5).$$

Экспериментальные данные, полученные из ЯМР-анализа, в трех временных точках, соответствующих различным степеням гидролиза субстрата для используемых в исследовании спиртов, были использованы для расчётов. Соотношение микроскопических констант для трансгликозилирования и гидролиза $k_{\text{транс}}/k_{\text{гидр}}$ (6) оценивали как отношение скоростей трансгликозилирования и гидролиза $v_{\text{транс}}/v_{\text{гидр}}$, которое может быть связано с образованием промежуточного соединения гликозил-фермента $[E \cdot \beta\text{Fuc}]$ в обоих реакционных путях (гидролиз и трансгликозилирование) и в соответствии с законом действующих масс. Значения скорости гидролиза и трансгликозилирования можно рассчитать с использованием формул (7):

$$\frac{k_{\text{транс}}}{k_{\text{гидр}}} = \frac{v_{\text{транс}}}{v_{\text{гидр}}} \frac{[\text{H}_2\text{O}]}{[\text{Акцептор}]} \quad (6),$$

где

$$v_{\text{гидр}} = k_{\text{гидр}} \cdot [E \cdot \beta\text{Fuc}] \cdot [\text{H}_2\text{O}] \quad (7).$$

$$v_{\text{транс}} = k_{\text{транс}} \cdot [E \cdot \beta\text{Fuc}] \cdot [\text{H}_2\text{O}]$$

В Таблице 14 приведены значения эффективности (e) и отношения микроскопических констант реакций трансгликозилирования и гидролиза, катализируемых FpFucA, для различных акцепторов. Наибольшее отношение констант скоростей было для 1-пропанола относительно полученных значений для этанола и метанола. Данный факт может указывать на значительное гидрофобное взаимодействие акцептора с активным центром. Это взаимодействие может объяснить увеличенное сродство субстрата при гидролизе $L\text{-Fuc-}\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{4)-}L\text{-Fuc-}\alpha\text{-OPr}$, поскольку 1-пропанол может быть мимикой метильной группы L -фукозы в +1 сайте фермента.

Таблица 14 – Определение эффективности трансгликозилирования FpFucA с использованием алифатических спиртов в качестве акцепторов

Акцептор	Эффективность, e	Отношение $k_{\text{транс}}/k_{\text{гидр}}$
Метанол	$0,12 \pm 0,01$	0,72
Этанол	$0,07 \pm 0,01$	0,65
1-Пропанол	$0,17 \pm 0,01$	3,59

Показано, что многие α -L-фукозидазы семейства 29GH, обнаруженные в бактериях [12, 13, 53, 285, 350, 351] и эукариотических организмах [10, 56, 212], обладают способностью катализировать реакции трансгликозилирования с различной эффективностью. FrFucA можно рассматривать как одну из нескольких α -L-фукозидаз, которые способны переносить фукозильный остаток на pNPFuc, образуя pNP-дифукозиды с детектируемым выходом. α -Фукозидазы iso1 и iso2 из *P. thiaminolyticus*, α -фукозидаза дикого типа Tmafuc и набор мутантных α -фукозидаз из *T. maritima* [285] эффективно катализируют трансфукозилирование pNPFuc. Семь фукозидаз, полученных из почвенного метабенома, способны катализировать реакцию самоконденсации с pNPFuc [347]. Для грибных α -фукозидаз способность трансгликозилирования показана для частично-очищенных α -L-фукозидаз из *Penicillium multicolor* и *Aspergillus niger*, которые образуют фукозилированные дисахариды путём переноса L-фукозы на остатки D-Glc и D-GlcNAc [56, 215].

3.5 Получение и характеристика биокатализатора на основе иммобилизованной α -фукозидазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1

В последние десятилетия попытки осуществлять реакции гидролиза и синтеза целевых соединений с использованием ферментов стремительно развиваются. Одной из стратегий снижения затрат на получение ферментных препаратов гликозидаз без дополнительного повышения стоимости является повторное использование ферментов. Решением такой задачи может служить иммобилизация ферментов [30–32, 288, 290]. Иммобилизация гликозидаз может приводить к улучшениям некоторых параметров работы фермента, включая увеличение стабильности при хранении, стабильность физико-химических параметров и возможность повторного использования [289, 293, 294, 352–354]. Принимая во внимание эти соображения, нами была разработана методика иммобилизации α -L-фукозидазы из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1.

3.5.1 Реакции гидролиза, катализируемые иммобилизованной α -L-фукозидазой из *F. proliferatum* LE1

Из разнообразных существующих на сегодня видов иммобилизации был выбран недорогой и эффективный способ ковалентной перекрёстной сшивки с использованием глутарового альдегида в желатине. Глутаральдегид является одним из наиболее распространенных реагентов, используемых для стабилизации ферментов при получении иммобилизованных

биокатализаторов [355]. Стабилизирующий эффект глутаральдегида основан на формировании внутри- и межмолекулярного сшивок между молекулами фермента или сшивании между ферментом и носителем.

Выход иммобилизованного фермента α -фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 равен 98%, а активность иммобилизованного фермента относительно исходного фермента составила 67,5%. Снижение каталитической активности фермента в процессе иммобилизации происходит, вероятно, из-за сложности диффузионного доступа субстрата к активному центру фермента, а также ограничения его конформационной подвижности после многоточечного связывания с носителем.

Для иммобилизованного биокатализатора α -фукозидазы FpFucA была показана возможность его использования в течение десяти повторяющихся циклов реакции гидролиза pNPFuc. После десятого цикла реакции гидролиза, фермент сохранял 96,4% активности от начальной (Рисунок 31). Влияние условий хранения иммобилизованного биокатализатора при 4 °C в 50 mM Na-ацетатном буфере, pH 5,2 проверяли каждую неделю на протяжении 2 месяцев. В результате, по истечении 2 месяцев хранения при вышеописанных условиях, гидролитическая активность фермента незначительно снижалась, сохраняя 85% активности по сравнению с исходной. Безусловно, при использовании современного метода иммобилизации фермента на монолитных дисках, иммобилизованный биокатализатор более стабилен при хранении и эффективен для использования на протяжении до 150 раз повторного использования при потере 5-7% активности [289, 352]. Тем не менее, использование сшитой глутаральдегидом в желатине α -фукозидазы не уступает другим применяемым методам иммобилизации в стабильности фермента и по количеству раз повторного использования полученного биокатализатора [40, 356, 357]. При этом, используемый в работе метод имеет ряд преимуществ по сравнению с коммерческими носителями: желатин широко распространен в природе, биоразлагаемый и имеет очень низкую стоимость.

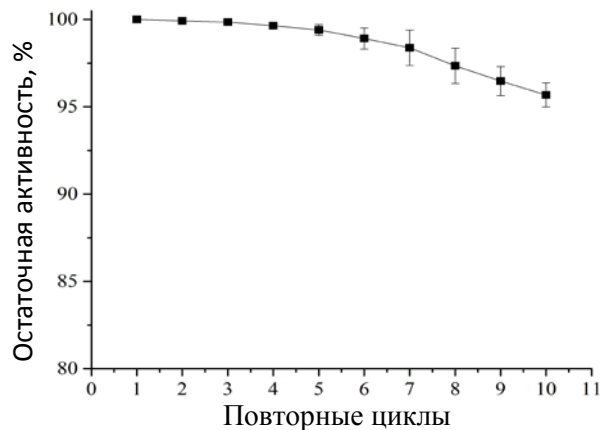


Рисунок 31 – Потенциал повторного использования иммобилизованной FpFucA в реакции гидролиза pNPFuc.

Таким образом, нами получен иммобилизованный биокатализатор FpFucA с использованием эффективного способа иммобилизации, что подтверждено высоким выходом иммобилизации и длительной стабильностью. Результаты, полученные при исследовании влияния иммобилизации FpFucA на кратность использования фермента показали перспективность использования полученного биокатализатора в непрерывном режиме в нескольких реакционных циклах гидролиза субстрата.

Для иммобилизованного биокатализатора FpFucA были определены физико-химические параметры гидролиза *pNPFuc* в тех же условиях, что и для свободного ферментного препарата. Установлено, что иммобилизованная α -*L*-фукозидаза из *F.proliferatum* LE1 обладает наибольшей гидролитической активностью при pH 5,0, что соответствует оптимальному значению pH в гидролизе *pNPFuc* для свободного фермента (Рисунок 32, А). Иммобилизованный фермент стабилен в более широком диапазоне значений pH, чем свободный ферментный препарат. Иммобилизованный ферментный препарат сохранял от 70% более активности в диапазоне pH 3,0 – 7,5 после предварительного инкубирования в соответствующем буфере при 37 °C в течение 16 часов (Рисунок 32, Б). Таким образом, при сравнении pH-стабильности свободного и иммобилизованного фермента, можно говорить о том, что иммобилизованный фермент значительно стабильнее в области кислых значений pH, а также сохраняет стабильность в нейтральных и слабощелочных значениях pH аналогично свободному ферменту. При исследовании влияния температуры на активность иммобилизованного ферментного препарата было показано, что для иммобилизованной FpFucA характерен более широкий профиль зависимости гидролитической активности от температуры реакции по сравнению со свободным ферментом (Рисунок 32, В). Оптимальная температура реакции для иммобилизованного фермента является 40-50 °C, при этом при 30 и 60 °C гидролитическая активность фермента порядка 90% от максимальной при pH 5,0. Иммобилизованная α -фукозидаза более термостабильна, чем свободный фермент, что было проверено после 20 минут инкубирования фермента в диапазоне температур 10 – 80 °C (Рисунок 32, Г). Свободный фермент терял около половины активности уже при 50 °C, в то время как иммобилизованный ферментный препарат при этой температуре теряет 10 % активности.

Известно, что повышение температуры при протекании ферментативной реакции изменяет гидролитическую активность, что можно объяснить, с одной стороны, воздействием на белковую часть фермента, приводя его к денатурации и снижению каталитической функции, а с другой стороны температура интенсифицирует скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса и все последующие этапы преобразования субстрата. При иммобилизации фермента путем связывания молекул фермента с носителем, возрастает термостабильность иммобилизованного ферментного препарата. Например, после иммобилизации β -глюкозидазы из

мицелиальных грибов *A. niger* [353, 358], *A. japonicus* [354], *A. awamori* [314] стали значительно более термостабильны, чем их соответствующие свободные формы. Для ранее иммобилизованной α -L-фукозидазы из *A. awamori* показано [40], что иммобилизация не влияла на оптимальные значения pH действия фермента: оптимальное значение pH иммобилизованного фермента совпадает со значением для свободного фермента. Оптимальная температура гидролиза для иммобилизованной α -L-фукозидазы составила 50 °C, что на 10 °C выше по сравнению со свободным ферментом.

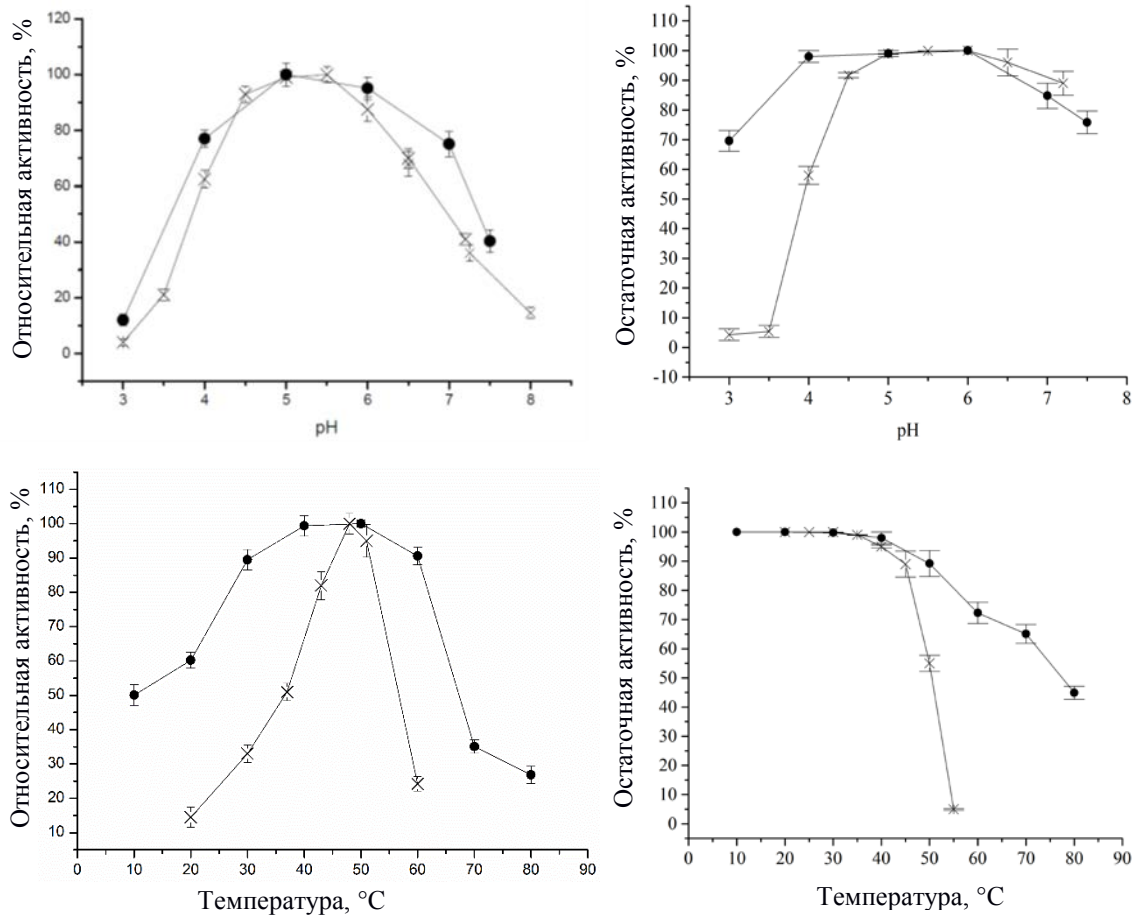


Рисунок 32 – Влияние pH и температуры на активность и стабильность свободной (п.3.4.3) и иммобилизованной FrFucA в гидролизе *pNPFuc*. Зависимости для свободного фермента приведены для наглядности. **А:** Относительная активность свободной и иммобилизованной α -фукозидазы при различных значения pH; **Б:** Остаточная активность свободной и иммобилизованной FrFucA после инкубирования фермента 16 часов при 37 °C в диапазоне значений pH 3,0–8,0; **В:** Влияние температуры на гидролитическую активность свободного и иммобилизованного фермента (pH 5,5); **Г:** Остаточная активность свободной и иммобилизованной α -L-фукозидазы после инкубирования фермента при различных температурах (20–80 °C, pH 5,5) в течение 20 мин. Обозначения: —●— - Иммобилизованный фермент; —×— - свободный ферментный препарат FrFucA (п. 3.4.3).

3.5.2 Реакции трансгликозилирования, катализируемые иммобилизованной FpFucA

Трансгликозилирующая активность иммобилизованного ферментного препарата FpFucA была протестирована в реакциях с *p*NPFuc в качестве донора и акцептора. Изначально, для исследования трансгликозилирующей активности было определено влияние ДМФА на активность иммобилизованной α -L-фукозидазы. Активность иммобилизованного фермента снижалась на 12% в присутствии 10% (об. / об.) ДМФА. В свою очередь, добавление к свободному ферменту 10% ДМФА приводило к снижению гидролитической активности на 20% (Рисунок 33). При повышении концентрации ДМФА в реакции гидролиза *p*NPFuc, иммобилизованный ферментный препарат сохранял 80% активности, в то время как свободный фермент сохранял 60% активности. Устойчивость иммобилизованных ферментов к изменению физико-химических факторов реакции показана во многих работах: иммобилизованная β -галактозидаза из *B. circulans* более термостабильна и стабильна при замораживании, а также в присутствии со-растворителей типа ДМФА [61].

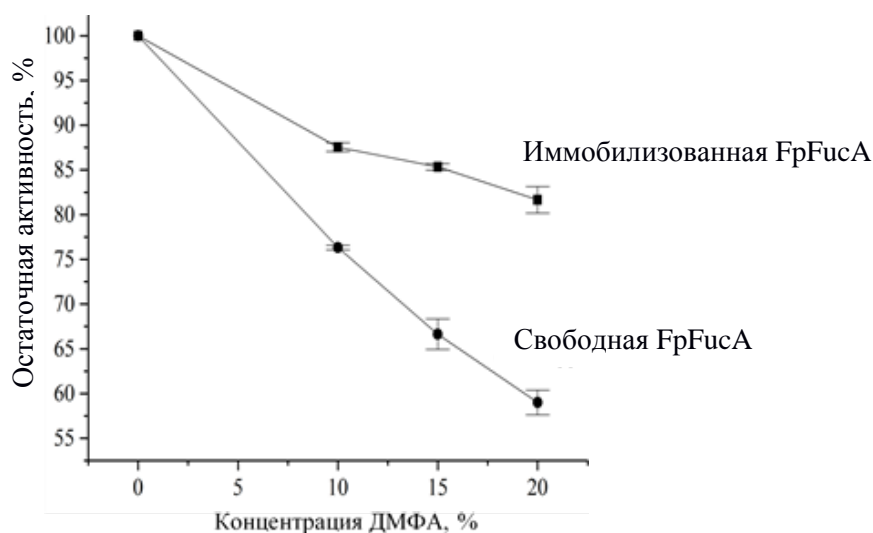


Рисунок 33 – Влияние ДМФА на активность свободной и иммобилизованной FpFucA.

При анализе методами ВЭЖХ и ТСХ продуктов реакции трансгликозилирования, катализируемой иммобилизованной α -фукозидазой, было обнаружено образование *n*-нитрофенил дифукозида. В диапазоне концентраций 0 - 180 мМ *p*NPFuc, выступающего в качестве донора и акцептора, происходит увеличение выхода продукта реакции трансгликозилирования (Рисунок 34). Стоит отметить, что из-за низкой растворимости исходного субстрата, при использовании 10% ДМФА в реакционной смеси, нам не удалось осуществить дальнейшего повышения концентрации *p*NPFuc в реакции. При использовании в реакции 87,5 мМ *p*NPFuc, максимальный выход продукта реакции трансгликозилирования составил 1,5 % при pH 5,2 и температуре 37 °C. При проведении четырех повторных циклов

реакции трансгликозилирования, катализируемых иммобилизованным ферментным препаратом α -фукозидазы, выход продукта p NPFucFuc снижался лишь на 10% к четвертому циклу, что подтверждено методами ТСХ (Рисунок 35, А) и ВЭЖХ с последующим расчетом выхода продукта реакции путем интегрирования пиков (Рисунок 35, Б).

Характеристика продукта реакции трансгликозилирования была выполнена методом масс-спектрометрии. На полученном масс-спектре очищенного продукта реакции трансгликозилирования имеется только один пик, соответствующий иону $[M + Na]^+$ и ассоциированные изотопные пики. Формирование диассоциированных аддуктов $[M + 2Na]^{2+}$, монодиассоциированных димеров $[2M + Na]^+$ подавлялось в условиях эксперимента. Расчетное значение m/z $[M + Na]^+$ для p NPFucFuc ($m/z_{\text{расчетное}} 454,1320$) коррелирует с наблюдаемым экспериментальным значением m/z $[M + Na]^+$ ($m/z_{\text{экспериментальное}} 454,1320$). Полученные данные подтверждают предположение о том, что продуктом реакции трансгликозилирования, катализируемой иммобилизованным биокатализатором FpFucA, где донором и акцептором выступал p NPFuc, является p NPFucFuc (p NP-дифукозид, $C_{18}H_{25}O_{11}N$).

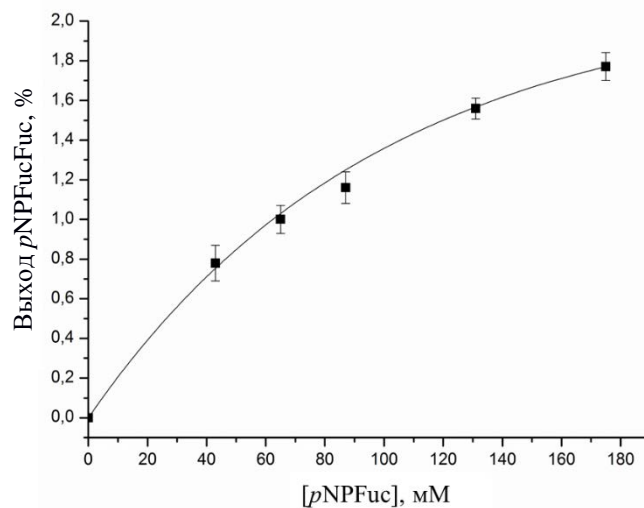


Рисунок 34 – Зависимость выхода продукта реакции трансгликозилирования (p NPFucFuc), катализируемой иммобилизованной α -фукозидазой, от концентрации субстрата (p NPFuc).

Использование иммобилизованных гликозидаз в синтезе олигосахаридов продемонстрировано для некоторых ферментов. Синтез гликосахаридов иммобилизованными ферментами является относительно слабо развитой областью исследований: имеется небольшой объем опубликованных исследовательских статей, посвященных этому вопросу, большинство из которых опубликованы в последние пять лет. Так, рекомбинантная β -галактозидаза из *B. circulans*, иммобилизованная ковалентно на CNBr-Sepharose, была использована в синтезе Gal- $\beta(1\rightarrow3)$ -GalNAc дисахаридов, часто встречающихся в боковых цепях муцин-гликопептидов [61].

При этом повышение в молярном соотношении донора приводило к повышению выхода синтезируемых продуктов. Другая рекомбинантная β -галактозидаза из *Lactobacillus bulgaricus* L3 с присоединенным целлюлозо-связывающим доменом была иммобилизована путем адсорбции на микрокристаллической целлюлозе с эффективностью 61% [58]. Данный ферментный препарат был использован в синтезе галактоолигосахаридов путем многократного повторения реакции с одним и тем же препаратом иммобилизованного фермента с незначительной (15 %) потерей активности к двадцатому циклу реакций. Также иммобилизация β -галактозидазы промышленного класса из *Aspergillus oryzae*, подходящей для получения галактоолигосахаридов, была выполнена с использованием различных биокатализаторов для иммобилизации [57]. В результате реакции трансгликозилирования, катализируемой иммобилизованной экзохитозаназой из *Aspergillus fumigatus* ПТ-004, при использовании смеси глюкозамина и *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, происходит образование хитобиозы, что показано методом ТСХ [60].

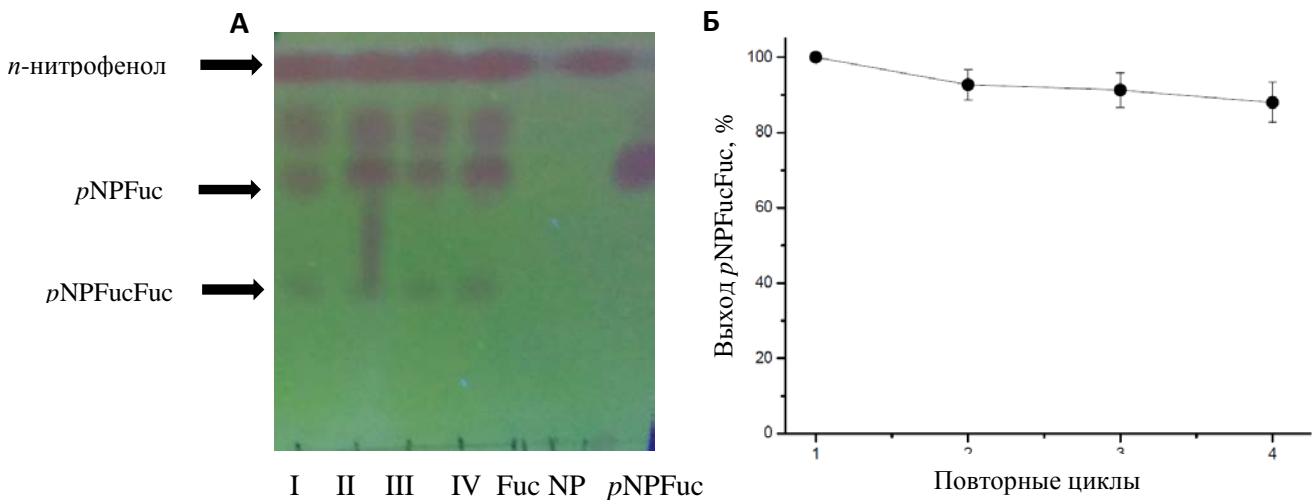


Рисунок 35 – А: ТСХ-анализ четырех повторных реакций трансгликозилирования, катализируемых иммобилизованной α -фукозидазой из *F. proliferatum* LE1, детектируемый в УФ-свете. I-IV – номер цикла реакции трансгликозилирования, катализируемый ИБ; Fuc, NP, pNPFuc – контроль фукозы, *n*-нитрофенола и *n*-нитрофенил фукозида, соответственно. Б: Потенциал повторного использования иммобилизованной α -фукозидазы в реакциях трансгликозилирования.

Таким образом, в нашей работе получен гетерогенный биокатализатор α -*L*-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1, отличающиеся высокой активностью, термостабильностью и способностью к многократному использованию в реакциях гидролиза и синтеза фукозилированных соединений.

ВЫВОДЫ

1. Штамм *Fusarium proliferatum* LE1, выделенный при росте на поверхности раствора фукоидана, является продуцентом значимых ферментов класса гидролаз.
2. Сульфатаза, выделенная из *F. proliferatum* LE1, является внутриклеточным ферментом, имеет молекулярную массу 65 ± 1 кДа и, согласно результатам сравнения аминокислотных последовательностей, относится к подсемейству 11 S1 структурного семейства (S1_11) сульфатаз.
3. α -L-Фукозидаза, выделенная из мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1, предпочтительно катализирует гидролиз α -(1 \rightarrow 4)-L-фукозидной связи, присутствующей в α -L-фукобиозидах с различными типами связей. В составе смеси ферментов, включающей β -глюкозидазу из *S. candidum* 3C, β -галактозидазу из *Penicillium* sp., β -маннозидазу из *T. reesei*, β -ксилозидазу из *A. awamori*, FpFucA способна фрагментировать фукоидан сложного состава из бурых водорослей *L. digitata*.
4. α -L-Фукозидаза является представителем 29 структурного семейства подсемейства A (GH29A) гликозидгидролаз. FpFucA катализирует реакцию трансгликозилирования с образованием *p*NP-фукогликозидов, *p*NP-дифукозида, а также метил-, этил- и пропилфукозидов в качестве продуктов.
5. Имобилизованный ферментный препарат FpFucA устойчив к изменению физико-химических параметров реакции и способен сохранять гидролитическую и трансгликозилирующую активность не менее 10 повторных реакционных циклов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КСА (PSA) - картофельно-сахарозный агар (potato-sucrose agar)

SNA — синтетическая среда Ниренберг (Synthetic Nutrient Agar)

FpFucA — альфа-*L*-фукозидаза из *Fusarium proliferatum* LE1

FpC — сульфатаза из *Fusarium proliferatum* LE1

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ДСН (SDS) — додецилсульфат натрия

ДТТ (DTT) — дитиотреитол

ДМФА (DMFA) — диметилформаид

ДЭАЭ-целлюлоза (DEAE-cellulose) — диэтиламиноэтил-целлюлоза

ПААГ (PAGE) — полиакриламидный гель

ТХУ — трихлоруксусная кислота

УФ (UV) — ультрафиолетовое излучение, $\lambda = 280-320$ нм

ЯМР (NMR) — ядерный магнитный резонанс

ТСХ (TLC) — тонкослойная хроматография

ЭДТА (EDTA) — этилендиаминтетрауксусная кислота

об./об. – отношение объема к объему

вес/об. – отношение веса к объему

ед. — единицы

н.о. — не определено

K_M (K_m) — константа Михаэлиса

$k_{кат}$ (k_{cat}) — каталитическая константа скорости

$k_{эфф}$ (k_{eff}) — константа эффективности

K_i (K_i) — константа ингибирования

pI — изоэлектрическая точка

МС — масс-спектрометрия

МС/МС — двумерная масс-спектрометрия

МАЛДИ (MALDI) — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

TOF – времяпролётный масс-анализатор (англ. Time-of-flight mass spectrometry)

ESI – электростатическое распыление в режиме регистрации положительных ионов

m/z – отношение массы к заряду; единица измерения, принятая в масс-спектрометрии

CAZy – база данных Углевод-активных ферментов (англ. Carbohydrate-Active EnZYmes database)

NCBI — Национальный центр биотехнологической информации США (англ. National Center for Biotechnological Information)

ФМСФ – фенилметилсульфонилфлюорид

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид окисленная форма

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленная форма

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин

ПСА — персульфат аммония

ppm – часть на миллион

пр.е. (AU, arb. unit, a.u.) – произвольная единица (англ. arbitrary unit)

L-Fuc – *L*-фукоза

D-Gal – *D*-галактоза

D-Glc – *D*-глюкоза

D-Xyl – *D*-ксилоза

D-Man – *D*-манноза

D-GlcNAc – *N*-ацетил-*D*-глюкозамин

*n*HKC – *n*-нитрокатехол сульфат

*n*HFc – *n*-нитрофенил сульфат

*p*NP α Gal – *n*-нитрофенил альфа-*D*-глюкопиранозид

*p*NP β Gal – *n*-нитрофенил бета-*D*-галактопиранозид

2NP α Glc, *o*NP α Glc — *o*-нитрофенил альфа-*D*-глюкопиранозид

*p*NP β Glc — *n*-нитрофенил бета-*D*-глюкопиранозид

*p*NP β Xyl – *n*-нитрофенил бета-*D*-ксилопиранозид

*p*NP β Fuc — *n*-нитрофенил альфа-*L*-фукопиранозид

*p*NP β FucFuc — *n*-нитрофенил альфа-*L*-дифукозид

Ser — серин

Thr — треонин

Asn — аспарагин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heux S. White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining / Heux S., Meynial-Salles I., O'Donohue M.J., Dumon C. // *Biotechnol. Adv.* – 2015. – Т. 33 – № 8 – С.1653–1670.
2. Pomin V.H. Marine Non-Glycosaminoglycan Sulfated Glycans as Potential Pharmaceuticals / Pomin V.H. // *Pharmaceuticals* – 2015. – Т. 8 – № 4 – С.848–864.
3. Sila A. Studies on European eel skin sulfated glycosaminoglycans: Recovery, structural characterization and anticoagulant activity / Sila A., Bougatef H., Capitani F., Krichen F., Mantovani V., Amor I.B., Galeotti F., Maccari F., Nedjar N., Volpi N., Bougatef A. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Т. 115 – С.891–899.
4. Barbeyron T. Matching the Diversity of Sulfated Biomolecules: Creation of a Classification Database for Sulfatases Reflecting Their Substrate Specificity / Barbeyron T., Brillet-Guéguen L., Carré W., Carrière C., Caron C., Czjzek M., Hoebeke M., Michel G. // *PloS One* – 2016. – Т. 11 – № 10 – С.e0164846.
5. Mikami T. Sulfated glycosaminoglycans: their distinct roles in stem cell biology / Mikami T., Kitagawa H. // *Glycoconj. J.* – 2017. – Т. 34 – № 6 – С.725–735.
6. Ngo D.-H. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae / Ngo D.-H., Kim S.-K. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2013. – Т. 62 – С.70–75.
7. Becker D.J. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals / Becker D.J., Lowe J.B. // *Glycobiology* – 2003. – Т. 13 – № 7 – С.41R-53R.
8. Vanhooren P.T. *L*-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis / Vanhooren P.T., Vandamme E.J. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 1999. – Т. 74 – С.479–497.
9. Bunesova V. Fucosyllactose and *L*-fucose utilization of infant *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium kashiwanohense* / Bunesova V., Lacroix C., Schwab C. // *BMC Microbiol.* – 2016. – Т. 16 – № 1 – С.248.
10. Berteau O. Characterization of a new alpha-*L*-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of alpha-*L*-fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*) / Berteau O., McCort I., Goasdoué N., Tissot B., Daniel R. // *Glycobiology* – 2002. – Т. 12 – № 4 – С.273–282.
11. Dong S. Purification, expression and characterization of a novel α -*L*-fucosidase from a marine bacteria *Wenyngzhuangia fucanilytica* / Dong S., Chang Y., Shen J., Xue C., Chen F. // *Protein Expr. Purif.* – 2017. – Т. 129 – С.9–17.
12. Benesová E. α -*L*-fucosidase from *Paenibacillus thiaminolyticus*: its hydrolytic and transglycosylation abilities / Benesová E., Lipovová P., Dvorská H., Králová B. // *Glycobiology* – 2013. – Т. 23 – № 9 – С.1052–1065.
13. Benešová E. Alpha-*L*-fucosidase isoenzyme iso2 from *Paenibacillus thiaminolyticus* / Benešová E., Lipovová P., Krejzová J., Kovařová T., Buchtová P., Spiwok V., Králová B. // *BMC biotechnol.* – 2015. – Т. 15 – С.36.

14. Paper J.M. α -Fucosidases with different substrate specificities from two species of *Fusarium* / Paper J.M., Scott-Craig J.S., Cavalier D., Faik A., Wiemels R.E., Borrusch M.S., Bongers M., Walton J.D. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Т. 97 – № 12 – С.5371–5380.
15. Katayama T. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95) / Katayama T., Sakuma A., Kimura T., Makimura Y., Hiratake J., Sakata K., Yamanoi T., Kumagai H., Yamamoto K. // *J. Bacteriol.* – 2004. – Т. 186 – № 15 – С.4885–4893.
16. Chollet L. Fucoidans in Nanomedicine / Chollet L., Saboural P., Chauvierre C., Villemin J.-N., Letourneur D., Chaubet F. // *Mar. Drugs* – 2016. – Т. 14 – № 8.
17. Morya V.K. Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their perspectives / Morya V.K., Kim J., Kim E.-K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – Т. 93 – № 1 – С.71–82.
18. Kwak J.-Y. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development / Kwak J.-Y. // *Mar. Drugs* – 2014. – Т. 12 – № 2 – С.851–870.
19. Senni K. Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering / Senni K., Pereira J., Gueniche F., Delbarre-Ladrat C., Sinquin C., Ratiskol J., Godeau G., Fischer A.-M., Helley D., Collic-Jouault S. // *Mar. Drugs* – 2011. – Т. 9 – № 9 – С.1664–1681.
20. Yang C. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida* / Yang C., Chung D., Shin I.-S., Lee H., Kim J., Lee Y., You S. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2008. – Т. 43 – № 5 – С.433–437.
21. Кусайкин М.И. Ферменты, катализирующие трансформацию полисахаридов бурых водорослей : дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.04 / М. И. Кусайкин – Владивосток, 2017.– 185с.
22. Kusaykin M.I. Fucoidanases / Kusaykin M.I., Silchenko A.S., Zakharenko A.M., Zvyagintseva T.N. // *Glycobiology* – 2016. – Т. 26 – № 1 – С.3–12.
23. Qianqian W. Purification and the Secondary Structure of Fucoidanase from *Fusarium* sp. LD8 / Qianqian W., Shuang M., Hourong X., Min Z., Jingmin C. // *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* – 2011. – Т. 2011 – С.196190.
24. Kusaykin M. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds / Kusaykin M., Bakunina I., Sova V., Ermakova S., Kuznetsova T., Besednova N., Zaporozhets T., Zvyagintseva T. // *Biotechnol. J.* – 2008. – Т. 3 – № 7 – С.904–915.
25. Chang Y. Isolation and characterization of a sea cucumber fucoidan-utilizing marine bacterium. / Chang Y., Xue C., Tang Q., Li D., Wu X., Wang J. // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2010. – Т. 50 – № 3 – С.301–307.
26. Silchenko A.S. Fucoidan Sulfatases from Marine Bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127T / Silchenko A.S., Rasin A.B., Zueva A.O., Kusaykin M.I., Zvyagintseva T.N., Kalinovsky A.I., Kurilenko V.V., Ermakova S.P. // *Biomolecules* – 2018. – Т. 8 – № 4 – С.pii: E98.
27. Zeuner B. Loop engineering of an α -1,3/4-L-fucosidase for improved synthesis of human milk oligosaccharides / Zeuner B., Vuillemin M., Holck J., Muschiol J., Meyer A.S. // *Enzyme Microb. Technol.* – 2018. – Т. 115 – С.37–44.

28. Zeuner B. Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29 α -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides / Zeuner B., Muschiol J., Holck J., Lezyk M., Gedde M.R., Jers C., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. // N. Biotechnol. – 2018. – Т. 41 – С.34–45.
29. Zeuner B. Methods for improving enzymatic trans-glycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics / Zeuner B., Jers C., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. // J. Agric. Food Chem. – 2014. – Т. 62 – № 40 – С.9615–9631.
30. Sirisha V.L. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes / Sirisha V.L., Jain A., Jain A. // Adv. Food Nutr. Res. – 2016. – Т. 79 – С.179–211.
31. Fang Y. Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors / Fang Y., Huang X.-J., Chen P.-C., Xu Z.-K. // BMB Rep. – 2011. – Т. 44 – № 2 – С.87–95.
32. Liang J.F. Biomedical application of immobilized enzymes / Liang J.F., Li Y.T., Yang V.C. // J. Pharm. Sci. – 2000. – Т. 89 – № 8 – С.979–990.
33. Huang D. Synergistic hydrolysis of xylan using novel xylanases, β -xylosidases, and an α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 / Huang D., Liu J., Qi Y., Yang K., Xu Y., Feng L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Т. 101 – № 15 – С.6023–6037.
34. Musatti A. Use of solid digestate for lignocellulolytic enzymes production through submerged fungal fermentation / Musatti A., Ficara E., Mapelli C., Sambusiti C., Rollini M. // J. Environ. Manage. – 2017. – Т. 199 – С.1–6.
35. Chávez R. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium* / Chávez R., Bull P., Eyzaguirre J. // J. Biotechnol. – 2006. – Т. 123 – № 4 – С.413–433.
36. Malgas S. Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates / Malgas S., Thoresen M., Dyk J.S. van, Pletschke B.I. // Enzyme Microb. Technol. – 2017. – Т. 103 – С.1–11.
37. Møller M.S. Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation / Møller M.S., Svensson B. // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2016. – Т. 40 – С.33–42.
38. Furukawa S. Purification and some properties of exo-fucoidanases from *Vibrio* sp. N-5 / Furukawa S., Fujikawa T., Koga D., Ide A. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1992. – Т. 56 – № 11 – С.1829–1834.
39. Sasaki K. Partial purification and characterization of an enzyme releasing 2-sulfo- α -L-fucopyranose from 2-sulfo- α -L-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2) pyridylaminated fucose from a sea urchin, *Strongylocentrotus nudus* / Sasaki K., Sakai T., Kojima K., Nakayama S., Nakanishi Y., Kato I. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1996. – Т. 60 – № 4 – С.666–668.
40. Мещерякова О.Л. Получение и характеристика биокатализаторов на основе иммобилизованных гликозидаз / Мещерякова О.Л., Новикова Ю.С., Анохина Е.П., Корнеева О.С. // Вестник ВГУИТ – 2014. – Т. 4 – № 62 – С.206–212.
41. Pessôa M.G. *Fusarium* species-a promising tool box for industrial biotechnology / Pessôa M.G., Paulino B.N., Mano M.C.R., Neri-Numa I.A., Molina G., Pastore G.M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Т. 101 – № 9 – С.3493–3511.

42. Doyle S. Fungal proteomics: from identification to function / Doyle S. // FEMS Microbiol. Lett. – 2011. – Т. 321 – № 1 – С.1–9.
43. Bouws H. Fungal secretomes - nature's toolbox for white biotechnology / Bouws H., Wattenberg A., Zorn H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Т. 80 – № 3 – С.381–388.
44. Hoogendoorn K. Evolution and Diversity of Biosynthetic Gene Clusters in *Fusarium* / Hoogendoorn K., Barra L., Waalwijk C., Dickschat J.S., Lee T.A.J. van der, Medema M.H. // Front. Microbiol. – 2018. – Т. 9 – С.1158.
45. Hanson S.R. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility / Hanson S.R., Best M.D., Wong C.-H. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2004. – Т. 43 – № 43 – С.5736–5763.
46. The Database of Sulfatases | SulfAtlas [Электронный ресурс]. URL: <http://abims.sb-roscoff.fr/sulfatlas/?execution=e1s1>.
47. Sampson E.J. On the physical properties and mechanism of action of arylsulfate sulfohydrolase II from *Aspergillus oryzae* / Sampson E.J., Vergara E.V., Fedor J.M., Funk M.O., Benkovic S.J. // Arch. Biochem. Biophys. – 1975. – Т. 169 – № 2 – С.372–383.
48. Apte B.N. Purification and properties of arylsulphatase of *Aspergillus nidulans* / Apte B.N., Siddiqi O. // Biochim. Biophys. Acta – 1971. – Т. 242 – № 1 – С.129–140.
49. Sakurai Y., Isobe K., Shiota H. Partial purification and some properties of an alkaline arylsulfatase produced by *Aspergillus* fungi / Sakurai Y., Isobe K., Shiota H. // Agric. Biol. Chem. – 1980. – № 44 – С.Р.1-7.
50. Stressler T. Homologous expression and biochemical characterization of the arylsulfatase from *Kluyveromyces lactis* and its relevance in milk processing / Stressler T., Leisibach D., Lutz-Wahl S., Kuhn A., Fischer L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – Т. 100 – № 12 – С.5401–5414.
51. Sakurama H. Differences in the substrate specificities and active-site structures of two α -L-fucosidases (glycoside hydrolase family 29) from *Bacteroides thetaiotaomicron* / Sakurama H., Tsutsumi E., Ashida H., Katayama T., Yamamoto K., Kumagai H. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2012. – Т. 76 – № 5 – С.1022–1024.
52. Yamamoto K., Tsuji Y., Kumagai H., Toshikura T. Induction and purification of α -L-fucosidase from *Fusarium oxysporum* / Yamamoto K., Tsuji Y., Kumagai H., Toshikura T. // Agric. Biol. Chem. – 1986. – Т. 50 – С.1689- 1695.
53. Liu S.-W. Identification of essential residues of human α -L-fucosidase and tests of its mechanism / Liu S.-W., Chen C.-S., Chang S.-S., Mong K.-K.T., Lin C.-H., Chang C.-W., Tang C.Y., Li Y.-K. // Biochemistry – 2009. – Т. 48 – № 1 – С.110–120.
54. Bonin S. Reduced expression of α -L-Fucosidase-1 (FUCA-1) predicts recurrence and shorter cancer specific survival in luminal B LN+ breast cancer patients. / Bonin S., Parascandolo A, Aversa C., Barbazza R, Tsuchida N, Castellone MD, Stanta G., Vecchio G. // Oncotarget. – 2018. – Т. 9 – № 20 – С.15228–15238.
55. CAZy [Электронный ресурс]. URL: <http://www.cazy.org/>.

56. Ajisaka K. An alpha-L-fucosidase from *Penicillium multicolor* as a candidate enzyme for the synthesis of alpha (1->3)-linked fucosyl oligosaccharides by transglycosylation / Ajisaka K., Fujimoto H., Miyasato M. // Carbohydr. Res. – 1998. – T. 309 – № 1 – C.125–129.
57. Adamíková J. A Method of Early Phase Selection of Carrier for *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase Immobilization for Galactooligosaccharides Production / Adamíková J., Antořová M., Polakovič M. // Biotechnol J – 2018. – C.1–11.
58. Lu L. Synthesis of galactooligosaccharides by CBD fusion β -galactosidase immobilized on cellulose / Lu L., Xu S., Zhao R., Zhang D., Li Z., Li Y., Xiao M. // Bioresour. Technol. – 2012. – T. 116 – C.327–333.
59. Levin G. Two-step enzymatic strategy for the synthesis of a smart phenolic polymer and further immobilization of a β -galactosidase able to catalyze transglycosylation reaction / Levin G., Gómez S., Glodowsky A., Cascone O., Hernáiz M.J. // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – T. 117 – C.264–270.
60. Sinha S. Enzymatic production of glucosamine and chitooligosaccharides using newly isolated exo- β -D-glucosaminidase having transglycosylation activity / Sinha S., Chand S., Tripathi P. // J. Biotechnol. – 2016. – T. 6 – № 1 – C.13.
61. Naundorf A. Characterization of the Immobilized β -Galactosidase C from *Bacillus circulans* and the Production of β (1→3)-linked Disaccharides / Naundorf A., Caussette M., Ajisaka K. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1998. – T. 62 – № 7 – C.1313–1317.
62. Cohenford M.A. Effect of immobilization on stability and kinetic properties of alpha-L-fucosidase from *Turbo cornutus* / Cohenford M.A., Urbanowski J.C., Dain J.A. // Biotechnol. Bioeng. – 1983. – T. 25 – № 6 – C.1501–1508.
63. Shoda S.-I. Development of chemical and chemo-enzymatic glycosylations / Shoda S.-I. // Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci. – 2017. – T. 93 – № 3 – C.125–145.
64. García-Calvo L. Secreted protein extract analyses present the plant pathogen *Alternaria alternata* as a suitable industrial enzyme toolbox / García-Calvo L., Ullán R.V., Fernández-Aguado M., García-Lino A.M., Balaña-Fouce R., Barreiro C. // J. Proteomics – 2018. – T. 177 – C.48–64.
65. Zaferanloo B. Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS / Zaferanloo B., Bhattacharjee S., Ghorbani M.M., Mahon P.J., Palombo E.A. // BMC Microbiol. – 2014. – T. 14 – C.55.
66. Buerth C. Growth-dependent secretome of *Candida utilis* / Buerth C., Heilmann C.J., Klis F.M., Koster C.G. de, Ernst J.F., Tielker D. // Microbiology – 2011. – T. 157 – № Pt 9 – C.2493–2503.
67. Raja H.A. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community / Raja H.A., Miller A.N., Pearce C.J., Oberlies N.H. // J. Nat. Prod. – 2017. – T. 80 – № 3 – C.756–770.
68. Marecik R. Screening and Identification of *Trichoderma* Strains Isolated from Natural Habitats with Potential to Cellulose and Xylan Degrading Enzymes Production / Marecik R., Błaszczuk L., Biegańska-Marecik R., Piotrowska-Cyplik A. // Pol. J. Microbiol. – 2018. – T. 67 – № 2 – C.181–190.
69. Lee T.A.J. van der Computational strategies for genome-based natural product discovery and engineering in fungi / Lee T.A.J. van der, Medema M.H. // Fungal Genet. Biol. – 2016. – T. 89 – C.29–36.

70. Bills G.F. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi / Bills G.F., Gloer J.B. // *Microbiol. Spectr.* – 2016. – Т. 4 – № 6.
71. Corrêa R.C.G. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers / Corrêa R.C.G., Rhoden S.A., Mota T.R., Azevedo J.L., Pamphile J.A., Souza C.G.M. de, Polizeli M. de L.T. de M., Bracht A., Peralta R.M. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – Т. 41 – № 10 – С.1467–1478.
72. Yan L. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions / Yan L., Zhao H., Zhao X., Xu X., Di Y., Jiang C., Shi J., Shao D., Huang Q., Yang H., Jin M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – Т. 102 – № 15 – С.6279–6298.
73. Fraç M. Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health / Fraç M., Hannula S.E., Bełka M., Jędrzycka M. // *Front. Microbiol.* – 2018. – Т. 9 – С.707.
74. Sun S. Soil Bacterial and Fungal Communities Show Distinct Recovery Patterns during Forest Ecosystem Restoration / Sun S., Li S., Avera B.N., Strahm B.D., Badgley B.D. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2017. – Т. 83 – № 14.
75. Егорова Т.А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина – М.: Академия, 2003.– 208с.
76. Cairns T.C. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research / Cairns T.C., Nai C., Meyer V. // *Fungal Biol. Biotechnol.* – 2018. – Т. 5 – С.13.
77. Cologna N. de M. di Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest / Cologna N. de M. di, Gómez-Mendoza D.P., Zanoelo F.F., Giannesi G.C., Guimarães N.C. de A., Moreira L.R. de S., Filho E.X.F., Ricart C.A.O. // *Enzyme Microb. Technol.* – 2018. – Т. 109 – С.1–10.
78. Schuster A. Biology and biotechnology of *Trichoderma* / Schuster A., Schmoll M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Т. 87 – № 3 – С.787–799.
79. Mukherjee P.K. *Trichoderma* research in the genome era / Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Herrera-Estrella A., Schmoll M., Kenerley C.M. // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2013. – Т. 51 – С.105–129.
80. Parenti G. The sulfatase gene family / Parenti G., Meroni G., Ballabio A. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 1997. – Т. 7 – № 3 – С.386–391.
81. Bojarová P. Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination / Bojarová P., Williams S.J. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2008. – Т. 12 – № 5 – С.573–581.
82. Dierks T. Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum / Dierks T., Schmidt B., Figura K. von // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1997. – Т. 94 – № 22 – С.11963–11968.
83. Dierks T. Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases / Dierks T., Lecca M.R., Schlotterhose P., Schmidt B., Figura K. von // *EMBO J.* – 1999. – Т. 18 – № 8 – С.2084–2091.
84. Marquardt C. Posttranslational modification of serine to formylglycine in bacterial sulfatases. Recognition of the modification motif by the iron-sulfur protein AtsB / Marquardt C., Fang Q., Will E., Peng J., Figura K. von, Dierks T. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Т. 278 – № 4 – С.2212–2218.
85. Berteau O. A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes / Berteau O., Guillot A., Benjdia A., Rabot S. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Т. 281 – № 32 – С.22464–22470.

86. Benjdia A. Anaerobic sulfatase-maturing enzymes: radical SAM enzymes able to catalyze in vitro sulfatase post-translational modification / Benjdia A., Leprince J., Guillot A., Vaudry H., Rabot S., Berteau O. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – T. 129 – № 12 – C.3462–3463.
87. Carlson B.L. Function and structure of a prokaryotic formylglycine-generating enzyme / Carlson B.L., Ballister E.R., Skordalakes E., King D.S., Breidenbach M.A., Gilmore S.A., Berger J.M., Bertozzi C.R. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – T. 283 – № 29 – C.20117–20125.
88. Appel M.J. Formylglycine, a post-translationally generated residue with unique catalytic capabilities and biotechnology applications / Appel M.J., Bertozzi C.R. // *ACS Chem. Biol.* – 2015. – T. 10 – № 1 – C.72–84.
89. Holder P.G. Reconstitution of Formylglycine-generating Enzyme with Copper(II) for Aldehyde Tag Conversion / Holder P.G., Jones L.C., Drake P.M., Barfield R.M., Bañas S., Hart G.W. de, Baker J., Rabuka D. // *J. Biol. Chem.* – 2015. – T. 290 – № 25 – C.15730–15745.
90. Peng J. Eukaryotic formylglycine-generating enzyme catalyses a monooxygenase type of reaction / Peng J., Alam S., Radhakrishnan K., Mariappan M., Rudolph M.G., May C., Dierks T., Figura K. von, Schmidt B. // *FEBS J.* – 2015. – T. 282 – № 17 – C.3262–3274.
91. Knop M. In Vitro Reconstitution of Formylglycine-Generating Enzymes Requires Copper(I) / Knop M., Engi P., Lemnar R., Seebeck F.P. // *Chembiochem.* – 2015. – T. 16 – № 15 – C.2147–2150.
92. Knop M. Copper is a Cofactor of the Formylglycine-Generating Enzyme / Knop M., Dang T.Q., Jeschke G., Seebeck F.P. // *Chembiochem.* – 2017. – T. 18 – № 2 – C.161–165.
93. Williams S.J. Experimental and theoretical insights into the mechanisms of sulfate and sulfamate ester hydrolysis and the end products of type I sulfatase inactivation by aryl sulfamates / Williams S.J., Denehy E., Krenske E.H. // *J. Org. Chem.* – 2014. – T. 79 – № 5 – C.1995–2005.
94. Bojarová P. Aryl sulfamates are broad spectrum inactivators of sulfatases: effects on sulfatases from various sources / Bojarová P., Williams S.J. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – T. 19 – № 2 – C.477–480.
95. Dierks T. Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme / Dierks T., Schmidt B., Borissenko L.V., Peng J., Preusser A., Mariappan M., Figura K. von // *Cell* – 2003. – T. 113 – № 4 – C.435–444.
96. Basak S. Post-Translational Protein Modifications of Rare and Unconventional Types: Implications in Functions and Diseases / Basak S., Lu C., Basak A. // *Curr. Med. Chem.* – 2016. – T. 23 – № 7 – C.714–745.
97. Recksiek M. Sulfatases, trapping of the sulfated enzyme intermediate by substituting the active site formylglycine / Recksiek M., Selmer T., Dierks T., Schmidt B., Figura K. von // *J. Biol. Chem.* – 1998. – T. 273 – № 11 – C.6096–6103.
98. Jonas S. A new member of the alkaline phosphatase superfamily with a formylglycine nucleophile: structural and kinetic characterisation of a phosphonate monoester hydrolase/phosphodiesterase from *Rhizobium leguminosarum* / Jonas S., Loo B. van, Hyvönen M., Hollfelder F. // *J. Mol. Biol.* – 2008. – T. 384 – № 1 – C.120–136.
99. Hausinger R.P. FeII-alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes / Hausinger R.P. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2004. – T. 39 – № 1 – C.21–68.

100. Melino S. A zinc-binding motif conserved in glyoxalase II, beta-lactamase and arylsulfatases / Melino S., Capo C., Dragani B., Aceto A., Petruzzelli R. // Trends Biochem. Sci. – 1998. – T. 23 – № 10 – C.381–382.
101. Daiyasu H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta-lactamase fold / Daiyasu H., Osaka K., Ishino Y., Toh H. // FEBS Lett. – 2001. – T. 503 – № 1 – C.1–6.
102. Barbeyron T. Arylsulphatase from *Alteromonas carrageenovora* / Barbeyron T., Potin P., Richard C., Collin O., Kloareg B. // Microbiology – 1995. – T. 141 (Pt 11) – C.2897–2904.
103. Stressler T. Detection, production, and application of microbial arylsulfatases / Stressler T., Seidl I., Kuhn A., Fischer L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – T. 100 – № 21 – C.9053–9067.
104. Müller I. Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: insights into the catalytic mechanism of the Fe(II) alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily / Müller I., Kahnert A., Pape T., Sheldrick G.M., Meyer-Klaucke W., Dierks T., Kertesz M., Usón I. // Biochemistry – 2004. – T. 43 – № 11 – C.3075–3088.
105. Kahnert A. Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313 / Kahnert A., Kertesz M.A. // J. Biol. Chem. – 2000. – T. 275 – № 41 – C.31661–31667.
106. Hogan D.A. Cloning and characterization of a sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase from *Saccharomyces cerevisiae* / Hogan D.A., Auchtung T.A., Hausinger R.P. // J. Bacteriol. – 1999. – T. 181 – № 18 – C.5876–5879.
107. Eichhorn E. Characterization of alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase from *Escherichia coli* / Eichhorn E., Ploeg J.R. van der, Kertesz M.A., Leisinger T. // J. Biol. Chem. – 1997. – T. 272 – № 37 – C.23031–23036.
108. Scherer H.W. Sulfur in soils / Scherer H.W. // J. Plant Nutr. Soil Sc. – 2009. – № 172 – C.326–335.
109. Fitzgerald J.W. Sulfate ester formation and hydrolysis: a potentially important yet often ignored aspect of the sulfur cycle of aerobic soils / Fitzgerald J.W. // Bacteriol. Rev. – 1976. – T. 40 – № 3 – C.698–721.
110. Dong J.-W. Production of a new tetracyclic triterpene sulfate metabolite sambacide by solid-state cultivated *Fusarium sambucinum* B10.2 using potato as substrate / Dong J.-W., Cai L., Li X.-J., Duan R.-T., Shu Y., Chen F.-Y., Wang J.-P., Zhou H., Ding Z.-T. // Bioresour. Technol. – 2016. – T. 218 – C.1266–1270.
111. Cregut M. The diversity and functions of choline sulphatases in microorganisms / Cregut M., Durand M.-J., Thouand G. // Microb. Ecol. – 2014. – T. 67 – № 2 – C.350–357.
112. Osterås M. Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine / Osterås M., Boncompagni E., Vincent N., Poggi M.C., Le Rudulier D. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1998. – T. 95 – № 19 – C.11394–11399.
113. Harada T. Choline sulphate in fungi / Harada T., Spencer B. // J. Gen. Microbiol. – 1960. – T. 22 – C.520–527.
114. Nissen P. Choline Sulfate in Higher Plants / Nissen P., Benson A.A. // Science – 1961. – T. 134 – № 3492 – C.1759.
115. Nissen P. Active Transport of Choline Sulfate by Barley Roots / Nissen P., Benson A.A. // Plant Physiol. – 1964. – T. 39 – № 4 – C.586–589.

116. Gadetskaya A.V. Sulfated phenolic compounds from *Limonium caspium*: Isolation, structural elucidation, and biological evaluation / Gadetskaya A.V., Tarawneh A.H., Zhusupova G.E., Gemejiyeva N.G., Cantrell C.L., Cutler S.J., Ross S.A. // *Fitoterapia* – 2015. – T. 104 – C.80–85.
117. Wasternack C. Jasmonate signaling in plant stress responses and development - active and inactive compounds / Wasternack C., Strnad M. // *N. Biotechnol.* – 2016. – T. 33 – № 5 Pt B – C.604–613.
118. Rausch T. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations / Rausch T., Wachter A. // *Trends Plant Sci.* – 2005. – T. 10 – № 10 – C.503–509.
119. Hirschmann F. The multi-protein family of sulfotransferases in plants: composition, occurrence, substrate specificity, and functions / Hirschmann F., Krause F., Papenbrock J. // *Front. Plant Sci.* – 2014. – T. 5 – C.556.
120. Pavão M.S.G. Glycosaminoglycans analogs from marine invertebrates: structure, biological effects, and potential as new therapeutics / Pavão M.S.G. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2014. – T. 4 – C.123.
121. Vasconcelos A.A. The Sea as a Rich Source of Structurally Unique Glycosaminoglycans and Mimetics / Vasconcelos A.A., Pomin V.H. // *Microorganisms* – 2017. – T. 5 – № 3.
122. Wang L. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years / Wang L., Wang X., Wu H., Liu R. // *Mar. Drugs* – 2014. – T. 12 – № 9 – C.4984–5020.
123. Usoltseva Menshova R.V. The comparison of structure and anticancer activity in vitro of polysaccharides from brown algae *Alaria marginata* and *A. angusta* / Usoltseva Menshova R.V., Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P. // *Carbohydr. Polym.* – 2016. – T. 153 – C.258–265.
124. Cunha L. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications / Cunha L., Grenha A. // *Mar. Drugs* – 2016. – T. 14 – № 3.
125. Hermawan I. Four Aromatic Sulfates with an Inhibitory Effect against HCV NS3 Helicase from the Crinoid *Alloeocomatella polycladia* / Hermawan I., Furuta A., Higashi M., Fujita Y., Akimitsu N., Yamashita A., Moriishi K., Tsuneda S., Tani H., Nakakoshi M., Tsubuki M., Sekiguchi Y., Noda N., Tanaka J. // *Mar. Drugs* – 2017. – T. 15 – № 4.
126. Jones Z.B. Sphingolipids in spinal cord injury / Jones Z.B., Ren Y. // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* – 2016. – T. 8 – № 2 – C.52–69.
127. Harteneck C. Pregnenolone sulfate: from steroid metabolite to TRP channel ligand / Harteneck C. // *Molecules* – 2013. – T. 18 – № 10 – C.12012–12028.
128. Dawson P.A. Sulphate in pregnancy / Dawson P.A., Elliott A., Bowling F.G. // *Nutrients* – 2015. – T. 7 – № 3 – C.1594–1606.
129. Shah R. Sulfatase inhibitors for recidivist breast cancer treatment: A chemical review / Shah R., Singh J., Singh D., Jaggi A.S., Singh N. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – T. 114 – C.170–190.
130. Jackson M. Comprehensive review of several surfactants in marine environments: Fate and ecotoxicity / Jackson M., Eadsforth C., Schowanek D., Delfosse T., Riddle A., Budgen N. // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2016. – T. 35 – № 5 – C.1077–1086.

131. Borowik A. Response of microorganisms and enzymes to soil contamination with a mixture of terbuthylazine, mesotrione, and S-metolachlor / Borowik A., Wyszowska J., Kucharski J., Baćmaga M., Tomkiel M. // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2017. – T. 24 – № 2 – C.1910–1925.
132. Barra Caracciolo A. Characteristics and environmental fate of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate (SLES) used as the main component in foaming agents for mechanized tunnelling / Barra Caracciolo A., Cardoni M., Pescatore T., Patrolecco L. // *Environ. Pollut.* – 2017. – T. 226 – C.94–103.
133. Saha S. Structure-toxicity relationship of chloroacetanilide herbicides: relative impact on soil microorganisms / Saha S., Dutta D., Karmakar R., Ray D.P. // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2012. – T. 34 – № 2 – C.307–314.
134. Boltes I. 1.3 A structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family / Boltes I., Czapinska H., Kahnert A., Bülow R. von, Dierks T., Schmidt B., Figura K. von, Kertesz M.A., Usón I. // *Structure* – 2001. – T. 9 – № 6 – C.483–491.
135. Lukatela G. Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis / Lukatela G., Krauss N., Theis K., Selmer T., Gieselmann V., Figura K. von, Saenger W. // *Biochemistry* – 1998. – T. 37 – № 11 – C.3654–3664.
136. Bond C.S. Structure of a human lysosomal sulfatase / Bond C.S., Clements P.R., Ashby S.J., Collyer C.A., Harrop S.J., Hopwood J.J., Guss J.M. // *Structure* – 1997. – T. 5 – № 2 – C.277–289.
137. Morimoto-Tomita M. Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans / Morimoto-Tomita M., Uchimura K., Werb Z., Hemmerich S., Rosen S.D. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – T. 277 – № 51 – C.49175–49185.
138. Gadler P. Biocatalytic approaches for the quantitative production of single stereoisomers from racemates / Gadler P., Glueck S.M., Kroutil W., Nestl B.M., Larissegger-Schnell B., Ueberbacher B.T., Wallner S.R., Faber K. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – T. 34 – № Pt 2 – C.296–300.
139. Toesch M. Microbial alkyl- and aryl-sulfatases: mechanism, occurrence, screening and stereoselectivities / Toesch M., Schober M., Faber K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – T. 98 – № 4 – C.1485–1496.
140. Hagelueken G. The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases / Hagelueken G., Adams T.M., Wiehlmann L., Widow U., Kolmar H., Tümmler B., Heinz D.W., Schubert W.-D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – T. 103 – № 20 – C.7631–7636.
141. Knaus T. Structure and mechanism of an inverting alkylsulfatase from *Pseudomonas* sp. DSM6611 specific for secondary alkyl sulfates / Knaus T., Schober M., Kepplinger B., Faccinelli M., Pitzer J., Faber K., Macheroux P., Wagner U. // *FEBS J.* – 2012. – T. 279 – № 23 – C.4374–4384.
142. Daško M. Synthesis and biological evaluation of *N*-acylated tyramine sulfamates containing C-F bonds as steroid sulfatase inhibitors / Daško M., Rachon J., Masłyk M., Kubiński K., Demkowicz S. // *Chem. Biol. Drug. Des.* – 2017. – T. 90 – № 1 – C.156–161.

143. Ouellet C. Discovery of a sulfamate-based steroid sulfatase inhibitor with intrinsic selective estrogen receptor modulator properties / Ouellet C., Maltais R., Ouellet É., Barbeau X., Lagüe P., Poirier D. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – T. 119 – C.169–182.
144. Thomas M.P. Estrogen O-sulfamates and their analogues: Clinical steroid sulfatase inhibitors with broad potential / Thomas M.P., Potter B.V.L. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2015. – T. 153 – C.160–169.
145. Sabourdy F. Natural disease history and characterisation of SUMF1 molecular defects in ten unrelated patients with multiple sulfatase deficiency / Sabourdy F., Mourey L., Le Trionnaire E., Bednarek N., Caillaud C., Chaix Y., Delrue M.-A., Dusser A., Froissart R., Garnotel R., Guffon N., Megarbane A., Ogier de Baulny H., Pédespan J.-M., Pichard S., Valayannopoulos V., Verloes A., Levade T. // *Orphanet. J. Rare Dis.* – 2015. – T. 10 – C.31.
146. Nur B.G. Neonatal multiple sulfatase deficiency with a novel mutation and review of the literature / Nur B.G., Mihçı E., Pepe S., Biberoglu G., Ezgu F.S., Ballabio A., Öztekin O., Dursun O. // *Turk. J. Pediatr.* – 2014. – T. 56 – № 4 – C.418–422.
147. Jakobkiewicz-Banecka J. Glycosaminoglycans and mucopolysaccharidosis type III / Jakobkiewicz-Banecka J., Gabig-Ciminska M., Kloska A., Malinowska M., Piotrowska E., Banecka-Majkutewicz Z., Banecki B., Wegrzyn A., Wegrzyn G. // *Front. Biosci.* – 2016. – T. 21 – C.1393–1409.
148. Flowers S.A. Expression of the extracellular sulfatase SULF2 is associated with squamous cell carcinoma of the head and neck / Flowers S.A., Zhou X., Wu J., Wang Y., Makambi K., Kallakury B.V., Singer M.S., Rosen S.D., Davidson B., Goldman R. // *Oncotarget* – 2016. – T. 7 – № 28 – C.43177–43187.
149. Takashima Y. Heparan sulfate 6-O-endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, regulate glomerular integrity by modulating growth factor signaling / Takashima Y., Keino-Masu K., Yashiro H., Hara S., Suzuki T., Kuppevelt T.H. van, Masu M., Nagata M. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2016. – T. 310 – № 5 – C.F395-408.
150. Yoon H.Y. Detection of bacterial sulfatase activity through liquid- and solid-phase colony-based assays / Yoon H.Y., Kim H.J., Jang S., Hong J.-I. // *AMB Express* – 2017. – T. 7 – № 1 – C.150.
151. Hummerjohann J. The sulfur-regulated arylsulfatase gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa*, a new member of the *cys* regulon / Hummerjohann J., Laudenbach S., Rétey J., Leisinger T., Kertesz M.A. // *J. Bacteriol.* – 2000. – T. 182 – № 7 – C.2055–2058.
152. Tralau T. Transcriptomic analysis of the sulfate starvation response of *Pseudomonas aeruginosa* / Tralau T., Vuilleumier S., Thibault C., Campbell B.J., Hart C.A., Kertesz M.A. // *J. Bacteriol.* – 2007. – T. 189 – № 19 – C.6743–6750.
153. Sogi K.M. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3406 is a type II alkyl sulfatase capable of sulfate scavenging / Sogi K.M., Gartner Z.J., Breidenbach M.A., Appel M.J., Schelle M.W., Bertozzi C.R. // *PLoS ONE* – 2013. – T. 8 – № 6 – C.e65080.
154. Mougous J.D. Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria / Mougous J.D., Green R.E., Williams S.J., Brenner S.E., Bertozzi C.R. // *Chem. Biol.* – 2002. – T. 9 – № 7 – C.767–776.

155. Lillis V. Initiation of Activation of a Preemergent Herbicide by a Novel Alkylsulfatase of *Pseudomonas putida* FLA / Lillis V., Dodgson K.S., White G.F., Payne W.J. // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – T. 46 – № 5 – C.988–994.
156. Fitzgerald J.W. Localization of arylsulfatase in *Pseudomonas* C12B / Fitzgerald J.W., George J.R. // Appl. Environ. Microbiol. – 1977. – T. 34 – № 1 – C.107–108.
157. Miech C. Arylsulfatase from *Klebsiella pneumoniae* carries a formylglycine generated from a serine / Miech C., Dierks T., Selmer T., Figura K. von, Schmidt B. // J. Biol. Chem. – 1998. – T. 273 – № 9 – C.4835–4837.
158. Hossain M.M. Expression and functional analysis of a predicted AtsG arylsulphatase identified from *Mycobacterium tuberculosis* genomic data / Hossain M.M., Kawarabayasi Y., Kimura M., Kakuta Y. // J. Biochem. – 2009. – T. 146 – № 6 – C.767–769.
159. Gao C. Characterization of a Recombinant Thermostable Arylsulfatase from Deep-Sea Bacterium *Flammeovirga pacifica* / Gao C., Jin M., Yi Z., Zeng R. // J. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – T. 25 – № 11 – C.1894–1901.
160. Benkovic S.J. Purification and properties of an arylsulfatase from *Aspergillus oryzae* / Benkovic S.J., Vergara E.V., Hevey R.C. // J. Biol. Chem. – 1971. – T. 246 – № 16 – C.4926–4933.
161. Korban S.A. Heterologous expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the unmodified sulfatase from *Fusarium proliferatum* LE1 / Korban S.A., Bobrov K.S., Maynskova M.A., Naryzhny S.N., Vlasova O.L., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A. // Protein Eng. Des. Sel. – 2017. – T. 30 – № 7 – C.477–488.
162. Reiss J. Cytochemical detection of hydrolases in fungus cells. 3. Aryl sulfatase / Reiss J. // J. Histochem. Cytochem. – 1974. – T. 22 – № 3 – C.183–188.
163. Hall C. Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of *Saccharomyces cerevisiae* / Hall C., Brachat S., Dietrich F.S. // Eukaryotic Cell – 2005. – T. 4 – № 6 – C.1102–1115.
164. Shimizu M.T. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species / Shimizu M.T., Almeida N.Q., Fantinato V., Unterkircher C.S. // Mycoses – 1996. – T. 39 – № 5–6 – C.161–167.
165. Shimizu M.T. Hyaluronidase and chondroitin sulphatase production by different species of *Candida* / Shimizu M.T., Jorge A.O., Unterkircher C.S., Fantinato V., Paula C.R. // J. Med. Vet. Mycol. – 1995. – T. 33 – № 1 – C.27–31.
166. Coutinho S.D. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis* / Coutinho S.D., Paula C.R. // Med. Mycol. – 2000. – T. 38 – № 1 – C.73–76.
167. Linares C.E.B. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains / Linares C.E.B., Loreto E.S. de, Silveira C.P., Pozzatti P., Scheid L.A., Santurio J.M., Alves S.H. // Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo – 2007. – T. 49 – № 4 – C.203–206.
168. Scott J.M. Regulation of choline sulphatase synthesis and activity in *Aspergillus nidulans* / Scott J.M., Spencer B. // Biochem. J. – 1968. – T. 106 – № 2 – C.471–477.
169. Rasburn M. Purification and properties of an isoenzyme of arylsulphatase from *Aspergillus oryzae* / Rasburn M., Wynn C.H. // Biochim. Biophys. Acta – 1973. – T. 293 – № 1 – C.191–196.

170. Burns G.R. Studies on the Arylsulphatase and phenol sulphotransferase activities of *Aspergillus oryzae* / Burns G.R., Wynn C.H. // Biochem. J. – 1975. – Т. 149 – № 3 – С.697–705.
171. Burns G.R. Kinetic studies of the phenol sulphate-phenol sulphotransferase of *Aspergillus oryzae* / Burns G.R., Galanopoulou E., Wynn C.H. // Biochem. J. – 1977. – Т. 167 – № 1 – С.223–227.
172. Sharma A. Intracellular hydrolases of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* / Sharma A., Padwal-Desai S.R., Ninjoor V. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1989. – Т. 159 – № 2 – С.464–471.
173. Scott W.A. Location of Aryl Sulfatase in Conidia and Young Mycelia of *Neurospora crassa* / Scott W.A., Metzenberg R.L. // J. Bacteriol. – 1970. – Т. 104 – № 3 – С.1254–1265.
174. Burton E.G. Aryl sulfatase in ascospores of *Neurospora crassa* / Burton E.G., Metzenberg R.L. // J. Bacteriol. – 1973. – Т. 113 – № 1 – С.519–520.
175. Reinert W.R. Regulation of sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: transport and accumulation of glucose 6-sulfate / Reinert W.R., Marzluf G.A. // Biochem. Genet. – 1974. – Т. 12 – № 2 – С.97–108.
176. Lloyd A.G. The glycosulphatase of *Trichoderma viride* / Lloyd A.G., Large P.J., Davies M., Olavesen A.H., Dodgson K.S. // Biochem. J. – 1968. – Т. 108 – № 3 – С.393–399.
177. McGuire W.G. Developmental regulation of choline sulfatase and aryl sulfatase in *Neurospora crassa* / McGuire W.G., Marzluf G.A. // Arch. Biochem. Biophys. – 1974. – Т. 161 – № 2 – С.360–368.
178. Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз / Наумов Д.Г. // Биохимия – 2011. – Т. 76 – № 6 – С.764–780.
179. Wolfenden R. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts / Wolfenden R., Snider M.J. // Acc. Chem. Res. – 2001. – Т. 34 – № 12 – С.938–945.
180. Davies G.J. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases / Davies G.J., Wilson K.S., Henrissat B. // Biochem. J. – 1997. – Т. 321 (Pt 2) – С.557–559.
181. Contents EC 3.1 to EC 3.3 [Электронный ресурс]. URL: <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html>.
182. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities / Henrissat B. // Biochem. J. – 1991. – Т. 280 (Pt 2) – С.309–316.
183. Henrissat B. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases / Henrissat B., Bairoch A. // Biochem. J. – 1996. – Т. 316 (Pt 2) – С.695–696.
184. Zhang, R.; Yip, V.L.Y.; Withers, S.G. Mechanisms of enzymatic glycosyl transfer / Zhang, R.; Yip, V.L.Y.; Withers, S.G. // Comp. Nat. Prod. II Chem. Biol. – 2010. – № 8 – С.385–422.
185. McCarter J.D. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis / McCarter J.D., Withers S.G. // Curr. Opin. Struct. Biol. – 1994. – Т. 4 – № 6 – С.885–892.
186. Koshland D.E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions / Koshland D.E. // Biol. Revs. Camb. Phil. Soc. – 1953. – Т. 28 – С.416–436.
187. Mhlongo N.N. A critical survey of average distances between catalytic carboxyl groups in glycoside hydrolases / Mhlongo N.N., Skelton A.A., Kruger G., Soliman M.E.S., Williams I.H. // Proteins – 2014. – Т. 82 – № 9 – С.1747–1755.
188. Cobucci-Ponzano B. The alpha-L-fucosidase from *Sulfolobus solfataricus* / Cobucci-Ponzano B., Conte F., Rossi M., Moracci M. // Extremophiles – 2008. – Т. 12 – № 1 – С.61–68.

189. Yazawa S. alpha-*L*-fucosidase from *Aspergillus niger*: demonstration of a novel alpha-*L*-(1----6)-fucosidase acting on glycopeptides / Yazawa S., Madiyalakan R., Chawda R.P., Matta K.L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1986. – T. 136 – № 2 – C.563–569.
190. Léonard R. Identification of an *Arabidopsis* gene encoding a GH95 alpha1,2-fucosidase active on xyloglucan oligo- and polysaccharides / Léonard R., Pabst M., Bondili J.S., Chambat G., Veit C., Strasser R., Altmann F. // *Phytochemistry* – 2008. – T. 69 – № 10 – C.1983–1988.
191. Perrella N.N. Characterization of α -*L*-fucosidase and other digestive hydrolases from *Biomphalaria glabrata* / Perrella N.N., Cantinha R.S., Nakano E., Lopes A.R. // *Acta Trop.* – 2015. – T. 141 – № Pt A – C.118–127.
192. Khunsook S. Purification and characterization of human seminal plasma alpha-*L*-fucosidase / Khunsook S., Alhadeff J.A., Bean B.S. // *Mol. Hum. Reprod.* – 2002. – T. 8 – № 3 – C.221–227.
193. Bahl O.P. Glycosidases of *Aspergillus niger*. II. Purification and general properties of 1,2-alpha-*L*-fucosidase / Bahl O.P. // *J. Biol. Chem.* – 1970. – T. 245 – № 2 – C.299–304.
194. Ogata-Arakawa M. alpha-*L*-fucosidases from almond emulsin: characterization of the two enzymes with different specificities / Ogata-Arakawa M., Muramatsu T., Kobata A. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1977. – T. 181 – № 1 – C.353–358.
195. Reglero A. Glycosidases of molluscs. Purification and properties of alpha-*L*-fucosidase from *Chamelea gallina* L / Reglero A., Cabezas J.A. // *Eur. J. Biochem.* – 1976. – T. 66 – № 2 – C.379–387.
196. Imber M.J. Purification of an almond emulsin fucosidase on Cibacron blue-sepharose and demonstration of its activity toward fucose-containing glycoproteins / Imber M.J., Glasgow L.R., Pizzo S.V. // *J. Biol. Chem.* – 1982. – T. 257 – № 14 – C.8205–8210.
197. Yoshima H. Purification of almond emulsin alpha-*L*-fucosidase I by affinity chromatography / Yoshima H., Takasaki S., Ito-Mega S., Kobata A. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1979. – T. 194 – № 2 – C.394–398.
198. Augur C. Purification, characterization, and cell wall localization of an alpha-fucosidase that inactivates a xyloglucan oligosaccharin / Augur C., Benhamou N., Darvill A., Albersheim P. // *Plant J.* – 1993. – T. 3 – № 3 – C.415–426.
199. Augur C. Molecular cloning and pattern of expression of an alpha-*L*-fucosidase gene from pea seedlings / Augur C., Stiefel V., Darvill A., Albersheim P., Puigdomenech P. // *J. Biol. Chem.* – 1995. – T. 270 – № 42 – C.24839–24843.
200. Giardina M.G. Serum alpha-*L*-fucosidase activity and early detection of hepatocellular carcinoma: a prospective study of patients with cirrhosis / Giardina M.G., Matarazzo M., Morante R., Lucariello A., Varriale A., Guardasole V., De Marco G. // *Cancer* – 1998. – T. 83 – № 12 – C.2468–2474.
201. Barker C. Canine alpha-*L*-fucosidase in relation to the enzymic defect and storage products in canine fucosidosis / Barker C., Dell A., Rogers M., Alhadeff J.A., Winchester B. // *Biochem. J.* – 1988. – T. 254 – № 3 – C.861–868.
202. Tsuji Y. Formation of deglycosylated alpha-*L*-fucosidase by endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase in *Fusarium oxysporum* / Tsuji Y., Yamamoto K., Tochikura T. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – T. 56 – № 4 – C.928–933.

203. Garrido D. A novel gene cluster allows preferential utilization of fucosylated milk oligosaccharides in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* SC596 / Garrido D., Ruiz-Moyano S., Kirmiz N., Davis J.C., Totten S.M., Lemay D.G., Ugalde J.A., German J.B., Lebrilla C.B., Mills D.A. // *Sci. Rep.* – 2016. – T. 6 – C.35045.
204. Rodríguez-Díaz J. Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel alpha-*L*-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain / Rodríguez-Díaz J., Monedero V., Yebra M.J. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – T. 77 – № 2 – C.703–705.
205. Wong-Madden S.T. Purification and characterization of novel glycosidases from the bacterial genus *Xanthomonas* / Wong-Madden S.T., Landry D. // *Glycobiology* – 1995. – T. 5 – № 1 – C.19–28.
206. Miura T. Purification and characterization of extracellular 1,2-alpha-*L*-fucosidase from *Bacillus cereus* / Miura T., Okamoto K., Yanase H. // *J. Biosci. Bioeng.* – 2005. – T. 99 – № 6 – C.629–635.
207. Kurimura Y. Efficient production and purification of extracellular 1,2-alpha-*L*-fucosidase of *Bacillus* sp. K40T / Kurimura Y., Tsuji Y., Yamamoto K., Kumagai H., Tochikura T. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1995. – T. 59 – № 4 – C.589–594.
208. Eneyskaya E.V. An alpha-*L*-fucosidase from *Thermus* sp. with unusually broad specificity / Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Kalkkinen N., Nifantiev N.E., Arbatskii N.P., Saenko A.I., Chepurnaya O.V., Arutyunyan A.V., Shabalin K.A., Neustroev K.N. // *Glycoconj. J.* – 2001. – T. 18 – № 10 – C.827–834.
209. Scudder P. The isolation by ligand affinity chromatography of a novel form of alpha-*L*-fucosidase from almond / Scudder P., Neville D.C., Butters T.D., Fleet G.W., Dwek R.A., Rademacher T.W., Jacob G.S. // *J. Biol. Chem.* – 1990. – T. 265 – № 27 – C.16472–16477.
210. Butters T.D. Purification to homogeneity of *Charonia lampas* alpha-fucosidase by using sequential ligand-affinity chromatography / Butters T.D., Scudder P., Rotsaert J., Petursson S., Fleet G.W., Willenbrock F.W., Jacob G.S. // *Biochem. J.* – 1991. – T. 279 (Pt 1) – C.189–195.
211. D'Aniello A. The purification and characterization of alpha-*L*-fucosidase from the hepatopancreas of *Octopus vulgaris* / D'Aniello A., Hakimi J., Cacace G.M., Ceccarini C. // *J. Biochem.* – 1982. – T. 91 – № 3 – C.1073–1080.
212. Svensson S.C. Purification of alpha-*L*-fucosidase by C-glycosylic affinity chromatography, and the enzymic synthesis of alpha-*L*-fucosyl disaccharides / Svensson S.C., Thiem J. // *Carbohydr. Res.* – 1990. – T. 200 – C.391–402.
213. Cao H. Structure and substrate specificity of a eukaryotic fucosidase from *Fusarium graminearum* / Cao H., Walton J.D., Brumm P., Phillips G.N. // *J. Biol. Chem.* – 2014. – T. 289 – № 37 – C.25624–25638.
214. Paper J.M. Comparative proteomics of extracellular proteins *in vitro* and *in planta* from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum* / Paper J.M., Scott-Craig J.S., Adhikari N.D., Cuomo C.A., Walton J.D. // *Proteomics* – 2007. – T. 7 – № 17 – C.3171–3183.
215. Ajisaka K. Regioselective synthesis of alpha-*L*-fucosyl-containing disaccharides by use of alpha-*L*-fucosidases of various origins / Ajisaka K., Shirakabe M. // *Carbohydr. Res.* – 1992. – T. 224 – C.291–299.

216. Aminoff D. Enzymes that destroy blood group specificity. I. Purification and properties of alpha-L-fucosidase from *Clostridium perfringens* / Aminoff D., Furukawa K. // J. Biol. Chem. – 1970. – T. 245 – № 7 – C.1659–1669.
217. Sano M. Purification and characterization of alpha-L-fucosidase from *Streptomyces* species / Sano M., Hayakawa K., kato I. // J. Biol. Chem. – 1992. – T. 267 – № 3 – C.1522–1527.
218. Goso Y. Purification and characterization of alpha-L-fucosidases from *Streptomyces* sp. OH11242 / Goso Y., Ishihara K., Sugawara S., Hotta K. // Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. – 2001. – T. 130 – № 3 – C.375–383.
219. Focarelli R. A nonglycosylated, 68-kDa alpha-L-fucosidase is bound to the mollusc bivalve *Unio elongatulus* sperm plasma membrane and differs from a glycosylated 56-kDa form present in the seminal fluid / Focarelli R., Cacace M.G., Seraglia R., Rosati F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – T. 234 – № 1 – C.54–58.
220. Blaser A. Stereoselective inhibition of alpha-L-fucosidases by *N*-benzyl aminocyclopentitols / Blaser A., Reymond J.L. // Org. Lett. – 2000. – T. 2 – № 12 – C.1733–1736.
221. Sela D.A. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 α -fucosidases are active on fucosylated human milk oligosaccharides / Sela D.A., Garrido D., Lerno L., Wu S., Tan K., Eom H.-J., Joachimiak A., Lebrilla C.B., Mills D.A. // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – T. 78 – № 3 – C.795–803.
222. Megson Z.A. Characterization of an α -L-fucosidase from the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* / Megson Z.A., Koerdt A., Schuster H., Ludwig R., Janesch B., Frey A., Naylor K., Wilson I.B.H., Stafford G.P., Messner P., Schäffer C. // Virulence – 2015. – T. 6 – № 3 – C.282–292.
223. La Torre F. de AtFXG1, an *Arabidopsis* gene encoding alpha-L-fucosidase active against fucosylated xyloglucan oligosaccharides / La Torre F. de, Sampedro J., Zarra I., Revilla G. // Plant Physiol. – 2002. – T. 128 – № 1 – C.247–255.
224. Yano T. Purification and Characterization of a Novel α -L-Fucosidase from *Fusarium oxysporum* Grown on Sludge / Yano T., Yamamoto K., Kumagai H., Tochikura T., Yokoyama T., Send T., Yamaguchi H. // Agric. Biol. Chem. – 1985. – T. 49 – № 11 – C.3179–3187.
225. Tsuji Y. Purification and characterization of alpha-L-fucosidase from *Bacillus circulans* grown on porcine gastric mucin / Tsuji Y., Yamamoto K., Tochikura T., Seno T., Ohkubo Y., Yamaguchi H. // J. Biochem. – 1990. – T. 107 – № 2 – C.324–330.
226. Kochibe N. Purification and properties of alpha-L-fucosidase from *Bacillus fulminans* / Kochibe N. // J. Biochem. – 1973. – T. 74 – № 6 – C.1141–1149.
227. Ashida H. Two distinct alpha-L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates / Ashida H., Miyake A., Kiyohara M., Wada J., Yoshida E., Kumagai H., Katayama T., Yamamoto K. // Glycobiology – 2009. – T. 19 – № 9 – C.1010–1017.
228. Cobucci-Ponzano B. Identification of the catalytic nucleophile of the family 29 alpha-L-fucosidase from *Sulfolobus solfataricus* via chemical rescue of an inactive mutant / Cobucci-Ponzano B., Trincone A., Giordano A., Rossi M., Moracci M. // Biochem. J. – 2003. – T. 42 – № 32 – C.9525–9531.

229. Tarling C.A. Identification of the catalytic nucleophile of the family 29 alpha-*L*-fucosidase from *Thermotoga maritima* through trapping of a covalent glycosyl-enzyme intermediate and mutagenesis / Tarling C.A., He S., Sulzenbacher G., Bignon C., Bourne Y., Henrissat B., Withers S.G. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – T. 278 – № 48 – C.47394–47399.
230. Sulzenbacher G. Crystal structure of *Thermotoga maritima* alpha-*L*-fucosidase. Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis / Sulzenbacher G., Bignon C., Nishimura T., Tarling C.A., Withers S.G., Henrissat B., Bourne Y. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – T. 279 – № 13 – C.13119–13128.
231. Zeleny R. Molecular cloning and characterization of a plant alpha1,3/4-fucosidase based on sequence tags from almond fucosidase I / Zeleny R., Leonard R., Dorfner G., Dalik T., Kolarich D., Altmann F. // *Phytochemistry* – 2006. – T. 67 – № 7 – C.641–648.
232. Ziaur Rahman M. Molecular characterization of tomato α 1,3/4-fucosidase, a member of glycosyl hydrolase family 29 involved in the degradation of plant complex type *N*-glycans / Ziaur Rahman M., Maeda M., Itano S., Hossain M.A., Ishimizu T., Kimura Y. // *J. Biochem.* – 2017. – T. 161 – № 5 – C.421–432.
233. Bielicki J. Recombinant canine alpha-*L*-fucosidase: expression, purification, and characterization / Bielicki J., Muller V., Fuller M., Hopwood J.J., Anson D.S. // *Mol. Genet. Metab.* – 2000. – T. 69 – № 1 – C.24–32.
234. Shoarinejad F. Rodent tissue alpha-*L*-fucosidases: analysis of brain and spleen isoforms and characterization of the purified hamster liver enzyme / Shoarinejad F., Alhadeff J.A. // *Comp. Biochem. Physiol., B* – 1993. – T. 105 – № 3–4 – C.523–528.
235. Tan K.-P. Fucosylation of LAMP-1 and LAMP-2 by FUT1 correlates with lysosomal positioning and autophagic flux of breast cancer cells / Tan K.-P., Ho M.-Y., Cho H.-C., Yu J., Hung J.-T., Yu A.L.-T. // *Cell Death Dis.* – 2016. – T. 7 – № 8 – C.e2347.
236. Smith B.G. Fibre in fruit (chapter 2), in: M. Skinner, D. Hunter (Eds.), *Bioactives in Fruit* / B. G. Smith – New York: John Wiley & Sons Ltd, 2013.– 19–33c.
237. Ferreira J.A. Protein glycosylation in gastric and colorectal cancers: Toward cancer detection and targeted therapeutics / Ferreira J.A., Magalhães A., Gomes J., Peixoto A., Gaiteiro C., Fernandes E., Santos L.L., Reis C.A. // *Cancer Lett.* – 2017. – T. 387 – C.32–45.
238. Ma B. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes / Ma B., Simala-Grant J.L., Taylor D.E. // *Glycobiology* – 2006. – T. 16 – № 12 – C.158R-184R.
239. Nagashima Y. Function of *N*-glycosylation in plants / Nagashima Y., Schaewen A. von, Koiwa H. // *Plant Sci.* – 2018. – T. 274 – C.70–79.
240. Veit C. *N*-Glycosylation and plant cell growth / Veit C., Vavra U., Strasser R. // *Methods Mol. Biol.* – 2015. – T. 1242 – C.183–194.
241. Hykollari A. Analysis of Invertebrate and Protist *N*-Glycans / Hykollari A., Paschinger K., Eckmair B., Wilson I.B.H. // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – T. 1503 – C.167–184.
242. Greenwell P. Blood group antigens: molecules seeking a function? / Greenwell P. // *Glycoconj. J.* – 1997. – T. 14 – № 2 – C.159–173.

243. Ewald D.R. Blood type biochemistry and human disease / Ewald D.R., Sumner S.C.J. // Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. – 2016. – Т. 8 – № 6 – С.517–535.
244. Hirota K. Cross-reactivity between human sialyl Lewis(x) oligosaccharide and common causative oral bacteria of infective endocarditis / Hirota K., Kanitani H., Nemoto K., Ono T., Miyake Y. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 1995. – Т. 12 – № 2 – С.159–164.
245. Bode L. Overcoming the limited availability of human milk oligosaccharides: challenges and opportunities for research and application / Bode L., Contractor N., Barile D., Pohl N., Prudden A.R., Boons G.-J., Jin Y.-S., Jennewein S. // Nutr. Rev. – 2016. – Т. 74 – № 10 – С.635–644.
246. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama / Bode L. // Glycobiology – 2012. – Т. 22 – № 9 – С.1147–1162.
247. Thurl S. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods / Thurl S., Munzert M., Henker J., Boehm G., Müller-Werner B., Jelinek J., Stahl B. // Br. J. Nutr. – 2010. – Т. 104 – № 9 – С.1261–1271.
248. University of Zurich [Электронный ресурс]. URL: <http://www.physiol.uzh.ch/en/Glycosylation/Humanmilkoligosaccharides.html>.
249. Bode L. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides / Bode L., Jantscher-Krenn E. // Adv. Nutr. – 2012. – Т. 3 – № 3 – С.383S–91S.
250. Sprenger G.A. Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations / Sprenger G.A., Baumgärtner F., Albermann C. // J. Biotechnol. – 2017. – Т. 258 – С.79–91.
251. Senthilkumar K. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer / Senthilkumar K., Manivasagan P., Venkatesan J., Kim S.-K. // Int. J. Biol. Macromol. – 2013. – Т. 60 – С.366–374.
252. Chang Y. Primary structure and chain conformation of fucoidan extracted from sea cucumber *Holothuria tubulosa* / Chang Y., Hu Y., Yu L., McClements D.J., Xu X., Liu G., Xue C. // Carbohydr. Polym. – 2016. – Т. 136 – С.1091–1097.
253. Zhang Z. Structure-activity relationship of the pro- and anticoagulant effects of *Fucus vesiculosus* fucoidan / Zhang Z., Till S., Jiang C., Knappe S., Reutterer S., Scheifflinger F., Szabo C.M., Dockal M. // Thromb. Haemost. – 2014. – Т. 111 – № 3 – С.429–437.
254. Thanh T.T.T. Structure of fucoidan from brown seaweed *Turbinaria ornata* as studied by electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS) and small angle X-ray scattering (SAXS) techniques / Thanh T.T.T., Tran V.T.T., Yuguchi Y., Bui L.M., Nguyen T.T. // Mar. Drugs – 2013. – Т. 11 – № 7 – С.2431–2443.
255. Ale M.T. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds / Ale M.T., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. // Mar. Drugs – 2011. – Т. 9 – № 10 – С.2106–2130.
256. Сильченко А.С. Фукоиданазы и альгинат-лиазы морской бактерии *Formosa algae* КММ 3553Т и морского моллюска *Lambis* sp. : дис. ... канд. хим. наук : 02.00.10 / Сильченко А.С. – 2014.
257. Yuguchi Y. Primary structure, conformation in aqueous solution, and intestinal immunomodulating activity of fucoidan from two brown seaweed species *Sargassum crassifolium* and *Padina australis* /

- Yuguchi Y., Tran V.T.T., Bui L.M., Takebe S., Suzuki S., Nakajima N., Kitamura S., Thanh T.T.T. // *Carbohydr. Polym.* – 2016. – T. 147 – C.69–78.
258. Shaikh F.A. Identifying the catalytic acid/base in GH29 α -L-fucosidase subfamilies / Shaikh F.A., Lammerts van Bueren A., Davies G.J., Withers S.G. // *Biochemistry* – 2013. – T. 52 – № 34 – C.5857–5864.
259. Guillotin L. Unraveling the substrate recognition mechanism and specificity of the unusual glycosyl hydrolase family 29 BT2192 from *Bacteroides thetaiotaomicron* / Guillotin L., Lafite P., Daniellou R. // *Biochem. J.* – 2014. – T. 53 – № 9 – C.1447–1455.
260. Intra J. Comparative and phylogenetic analysis of alpha-L-fucosidase genes / Intra J., Perotti M.-E., Pavesi G., Horner D. // *Gene* – 2007. – T. 392 – № 1–2 – C.34–46.
261. Tanaka K. Hydrolysis of fucoidan by abalone liver alpha-L-fucosidase / Tanaka K., Sorai S. // *FEBS Lett.* – 1970. – T. 9 – № 1 – C.45–48.
262. Cabezas J.A. Hydrolysis of natural and synthetic substrates by alpha-L-fucosidase, beta-D-glucuronidase and beta-N-acetylhexosaminidase purified from molluscs / Cabezas J.A., Reglero A., De Pedro A., Diez T., Calvo P. // *Int. J. Biochem.* – 1981. – T. 13 – № 3 – C.389–393.
263. Nishigaki M. The broad aglycon specificity of alpha-L-fucosidase from marine gastropods / Nishigaki M., Muramatsu T., Kobata A., Maeyama K. // *J. Biochem.* – 1974. – T. 75 – № 3 – C.509–517.
264. Dawson G. Substrate specificity of human alpha-L-fucosidase / Dawson G., Tsay G. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1977. – T. 184 – № 1 – C.12–23.
265. Piesecki S. The effect of carbohydrate removal on the properties of human liver alpha-L-fucosidase / Piesecki S., Alhadeff J.A. // *Biochim. Biophys. Acta* – 1992. – T. 1119 – № 2 – C.194–200.
266. DiCioccio R.A. Substrate specificity and other properties of alpha-L-fucosidase from human serum / DiCioccio R.A., Barlow J.J., Matta K.L. // *J. Biol. Chem.* – 1982. – T. 257 – № 2 – C.714–718.
267. Wiederschain G.Y. Two forms of α -L-fucosidase from pig kidney and their action on natural oligosaccharides / Wiederschain G.Y., Rosenfeld E.L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1971. – T. 44 – № 4 – C.1008–1014.
268. Sinnott M.L. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer / Sinnott M.L. // *Chem. Rev.* – 1990. – T. 90 – C.1171–1202.
269. Sharon N. A transglycosylation reaction catalyzed by lysozyme / Sharon N., Seifter S. // *J. Biol. Chem.* – 1964. – T. 239 – C.PC2398-2399.
270. Chen R. Enzyme and microbial technology for synthesis of bioactive oligosaccharides: an update / Chen R. // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2018. – T. 102 – № 7 – C.3017–3026.
271. Drouillard S. Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered *E. coli* expressing a multifunctional sialyltransferase from the *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 / Drouillard S., Mine T., Kajiwara H., Yamamoto T., Samain E. // *Carbohydr. Res.* – 2010. – T. 345 – № 10 – C.1394–1399.
272. Seeberger P.H. Automated carbohydrate synthesis to drive chemical glycomics / Seeberger P.H. // *Chem. Commun.* – 2003. – № 10 – C.1115–1121.

273. Orgueira H.A. Modular synthesis of heparin oligosaccharides / Orgueira H.A., Bartolozzi A., Schell P., Litjens R.E.J.N., Palmacci E.R., Seeberger P.H. // *Chemistry* – 2003. – T. 9 – № 1 – C.140–169.
274. Kinnaert C. Chemical Synthesis of Oligosaccharides Related to the Cell Walls of Plants and Algae / Kinnaert C., Daugaard M., Nami F., Clausen M.H. // *Chem. Rev.* – 2017. – T. 117 – № 17 – C.11337–11405.
275. Salamone S. Programmed chemo-enzymatic synthesis of the oligosaccharide component of a carbohydrate-based antibacterial vaccine candidate / Salamone S., Guerreiro C., Cambon E., André I., Remaud-Siméon M., Mulard L.A. // *Chem. Commun.* – 2015. – T. 51 – № 13 – C.2581–2584.
276. Broek L.A.M. van den Enzymatic synthesis of oligo- and polysaccharide fatty acid esters / Broek L.A.M. van den, Boeriu C.G. // *Carbohydr. Polym.* – 2013. – T. 93 – № 1 – C.65–72.
277. Fischöder T. Enzymatic cascade synthesis provides novel linear human milk oligosaccharides as reference standards for xCGE-LIF based high-throughput analysis / Fischöder T., Cajic S., Reichl U., Rapp E., Elling L. // *Biotechnol. J.* – 2018. – C.e1800305.
278. Murray B.W. Mechanism of human alpha-1,3-fucosyltransferase V: glycosidic cleavage occurs prior to nucleophilic attack / Murray B.W., Wittmann V., Burkart M.D., Hung S.C., Wong C.H. // *Biochemistry* – 1997. – T. 36 – № 4 – C.823–831.
279. Vries T. de Fucosyltransferases: structure/function studies / Vries T. de, Knegtel R.M., Holmes E.H., Macher B.A. // *Glycobiology* – 2001. – T. 11 – № 10 – C.119R-128R.
280. Petschacher B. Biotechnological production of fucosylated human milk oligosaccharides: Prokaryotic fucosyltransferases and their use in biocatalytic cascades or whole cell conversion systems / Petschacher B., Nidetzky B. // *J. Biotechnol.* – 2016. – T. 235 – C.61–83.
281. Dumon C. Assessment of the two *Helicobacter pylori* alpha-1,3-fucosyltransferase ortholog genes for the large-scale synthesis of LewisX human milk oligosaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli* / Dumon C., Samain E., Priem B. // *Biotechnol. Prog.* – 2004. – T. 20 – № 2 – C.412–419.
282. Eneyskaya E.V. Enzymatic synthesis of beta-xylanase substrates: transglycosylation reactions of the beta-xylosidase from *Aspergillus* sp / Eneyskaya E.V., Brumer H., Backinowsky L.V., Ivanen D.R., Kulminskaya A.A., Shabalin K.A., Neustroev K.N. // *Carbohydr. Res.* – 2003. – T. 338 – № 4 – C.313–325.
283. Guzmán-Rodríguez F. Synthesis of a Fucosylated Trisaccharide Via Transglycosylation by α -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima* / Guzmán-Rodríguez F., Alatorre-Santamaría S., Gómez-Ruiz L., Rodríguez-Serrano G., García-Garibay M., Cruz-Guerrero A. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2018.
284. Fajjes M. In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases / Fajjes M., Planas A. // *Carbohydr. Res.* – 2007. – T. 342 – № 12–13 – C.1581–1594.
285. Osanjo G. Directed evolution of the alpha-L-fucosidase from *Thermotoga maritima* into an alpha-L-transfucosidase / Osanjo G., Dion M., Drone J., Solleux C., Tran V., Rabiller C., Tellier C. // *Biochemistry* – 2007. – T. 46 – № 4 – C.1022–1033.
286. Sugiyama Y. Application study of 1,2- α -L-fucosynthase: introduction of Fuc α 1-2Gal disaccharide structures on N-glycan, ganglioside, and xyloglucan oligosaccharide / Sugiyama Y., Katoh T., Honda

- Y., Gotoh A., Ashida H., Kurihara S., Yamamoto K., Katayama T. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2017. – T. 81 – № 2 – C.283–291.
287. Sugiyama Y. Introduction of H-antigens into oligosaccharides and sugar chains of glycoproteins using highly efficient 1,2- α -L-fucosynthase / Sugiyama Y., Gotoh A., Katoh T., Honda Y., Yoshida E., Kurihara S., Ashida H., Kumagai H., Yamamoto K., Kitaoka M., Katayama T. // *Glycobiology* – 2016. – T. 26 – № 11 – C.1235–1247.
288. Bernal C. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts / Bernal C., Rodríguez K., Martínez R. // *Biotechnol. Adv.* – 2018. – T. 36 – № 5 – C.1470–1480.
289. Volokitina M.V. Xylan degradation improved by a combination of monolithic columns bearing immobilized recombinant β -xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100 and Grindamyl H121 β -xylanase / Volokitina M.V., Bobrov K.S., Piens K., Eneyskaya E.V., Tennikova T.B., Vlakh E.G., Kulminskaya A.A. // *Biotechnol. J.* – 2015. – T. 10 – № 1 – C.210–221.
290. Karav S. Recent advances in immobilization strategies for glycosidases / Karav S., Cohen J.L., Barile D., Moura Bell J.M.L.N. de // *Biotechnol. Prog.* – 2017. – T. 33 – № 1 – C.104–112.
291. Sheldon R.A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts / Sheldon R.A. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2007. – T. 35 – № Pt 6 – C.1583–1587.
292. Voběrková S. Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates / Voběrková S., Solčány V., Vršanská M., Adam V. // *Chemosphere* – 2018. – T. 202 – C.694–707.
293. Vazquez-Ortega P.G. Stabilization of dimeric β -glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions / Vazquez-Ortega P.G., Alcaraz-Fructuoso M.T., Rojas-Contreras J.A., López-Miranda J., Fernandez-Lafuente R. // *Enzyme Microb. Technol.* – 2018. – T. 110 – C.38–45.
294. Karam E.A. Production, immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase / Karam E.A., Abdel Wahab W.A., Saleh S.A.A., Hassan M.E., Kansoh A.L., Esawy M.A. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2017. – T. 102 – C.694–703.
295. Li S. / Li S., Su Y., Liu Y., Sun L., Yu M., Wu Y. // *Proc. Biochem.* – 2016. – T. 51 – C.2084.
296. White G.F. Immobilization of the surfactant-degrading bacterium *Pseudomonas* C12B in polyacrylamide gel beads: I. Effect of immobilization on the primary and ultimate biodegradation of SDS, and redistribution of bacteria within beads during use / White G.F., Thomas O.R. // *Enzyme Microb. Technol.* – 1990. – T. 12 – № 9 – C.697–705.
297. Helferich B. Eine neue methode zur synthese von glykoziden der phenol / Helferich B., Schmitz-Hellebrecht E. // *Ber. Dtsch. Chem.* – 1933. – T. 66 – C.378–383.
298. Dess D. Phase-transfer catalyzed synthesis of acetylated aryl *b*-D-glucopyranosides and aryl *b*-D-galactopyranosides, Synthesis 11 / Dess D., Kleine H.P. // *Synthesis* – 1981. – C.883–885.
299. Huggins C. / Huggins C., Smith D.R. // *J. Biol. Chem.* – T. 170 – C.391–398.
300. Gerbst A.G. Synthesis, NMR and conformational studies of fucoidan fragments. VI. Fragments, content of alpha-(1-->2)-bound fucobioside unit / Gerbst A.G., Grachev A.A., Ustiuzhanina N.E.,

- Khatuntseva E.A., Tsvetkov D.E., Usov A.I., Shashkov A.S., Preobrazhenskaia M.E., Ushakova N.A., Nifant'ev N.E. // *Bioorg. Khim.* – 2004. – T. 30 – № 2 – C.156–167.
301. Pérez S. Crystal and molecular structure of a histo-blood group antigen involved in cell adhesion: the Lewis x trisaccharide / Pérez S., Mouhous-Riou N., Nifant'ev N.E., Tsvetkov Y.E., Bachet B., Imberty A. // *Glycobiology* – 1996. – T. 6 – № 5 – C.537–542.
302. Nifant'ev N.E. Synthesis of methyl *O*-alpha-*L*-fucopyranosyl-(1----2)-*O*-beta-*D*- galactopyranosyl-(1----3)-2-acetamido-2-deoxy-beta-*D*-glucopyranoside, using 2,3,4-tri-*O*-benzoyl-alpha-*L*-fucopyranosyl bromide as the alpha-*L*-fucosylating agent / Nifant'ev N.E., Shashkov A.S., Kochetkov N.K. // *Carbohydr. Res.* – 1992. – T. 226 – № 2 – C.331–336.
303. Golubev A.M. Purification, crystallization and preliminary X-ray study of beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* / Golubev A.M., Brandão Neto J.R., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.V., Kerzhner M.A., Neustroev K.N., Polikarpov I. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2000. – T. 56 – № Pt 8 – C.1058–1060.
304. Shabalin K.A. Enzymatic properties of a-galactosidase from *Trichoderma reesei* in the hydrolysis of galacto-oligosaccharides / Shabalin K.A., Kulminskaya A.A., Savel'ev A.N., Shishlyannikov S.M., Neustroev K.N. // *Enzyme Microb. Technol.* – 2002. – T. 30 – C.231–239.
305. Pavlov I.Y. *Scytalidium candidum* 3C is a new name for the *Geotrichum candidum* Link 3C strain / Pavlov I.Y., Bobrov K.S., Sumacheva A.D., Masharsky A.E., Polev D.E., Zhurishkina E.V., Kulminskaya A.A. // *J. Basic Microbiol.* – 2018.
306. Neustroev K.N. Purification, crystallization and preliminary diffraction study of beta-galactosidase from *Penicillium* sp / Neustroev K.N., Sousa E.A. de, Golubev A.M., Brandão Neto, Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Polikarpov I. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2000. – T. 56 – № Pt 11 – C.1508–1509.
307. Eneyskaya E.V. Transglycosylating and hydrolytic activities of the beta-mannosidase from *Trichoderma reesei* / Eneyskaya E.V., Sundqvist G., Golubev A.M., Ibatullin F.M., Ivanen D.R., Shabalin K.A., Brumer H., Kulminskaya A.A. // *Biochimie* – 2009. – T. 91 – № 5 – C.632–638.
308. Eneyskaya E.V. Biochemical and kinetic analysis of the GH3 family beta-xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100 / Eneyskaya E.V., Ivanen D.R., Bobrov K.S., Isaeva-Ivanova L.S., Shabalin K.A., Savel'ev A.N., Golubev A.M., Kulminskaya A.A. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2007. – T. 457 – № 2 – C.225–234.
309. Bilan M.I. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima* / Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Kelly M., Sanderson C.J., Nifantiev N.E., Usov A.I. // *Carbohydr. Res.* – 2010. – T. 345 – № 14 – C.2038–2047.
310. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – T. 72 – C.248–254.
311. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / Laemmli U.K. // *Nature* – 1970. – T. 227 – № 5259 – C.680–685.

312. Naryzhny S.N. 2DE-based approach for estimation of number of protein species in a cell / Naryzhny S.N., Lisitsa A.V., Zgodina V.G., Ponomarenko E.A., Archakov A.I. // *Electrophoresis* – 2014. – T. 35 – № 6 – C.895–900.
313. Schachter H. Isolation of diphosphopyridine nucleotide-dependent *L*-fucose dehydrogenase from pork liver / Schachter H., Sarney J., McGuire E.J., Roseman S. // *J. Biol. Chem.* – 1969. – T. 244 – № 17 – C.4785–4792.
314. Nishida V.S. Immobilization of *Aspergillus awamori* β -glucosidase on commercial gelatin: An inexpensive and efficient process / Nishida V.S., Oliveira R.F. de, Brugnari T., Correa R.C.G., Peralta R.A., Castoldi R., Souza C.G.M. de, Bracht A., Peralta R.M. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – T. 111 – C.1206–1213.
315. Smogyi M. Notes on sugar determination / Smogyi M. // *J. Biol. Chem.* – 1952. – T. 195 – № 1 – C.19–23.
316. Tsay G.C. A sensitive spectrophotometric method for detection of *L*-fucose / Tsay G.C., Dawson G. // *Anal. Biochem.* – 1977. – T. 78 – № 2 – C.423–427.
317. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants / Dixon M. // *Biochem. J.* – 1953. – T. 55 – № 1 – C.170–171.
318. Dubois M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Roberts P., Smith F. // *Analyt.Chem.* – 1956. – T. 28 – C.350–356.
319. Dodgson K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters / Dodgson K.S. // *Biochem. J.* – 1961. – T. 78 – C.312–319.
320. Gerlach W. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas / W. Gerlach, H. I. Nirenberg – Berlin- Dahlem, 1982. Вып. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstw.– 406с.
321. GenBank Overview [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
322. Leslie J.F. The *Fusarium* Laboratory Manual / J. F. Leslie, B. A. Summerell – Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006.– 388с.
323. Fawzi E.M. Production and purification of β -glucosidase and protease by *Fusarium proliferatum* NRRL 26516 grown on *Ficus nirida* wastes / Fawzi E.M. // *Ann. Microbiol.* – 2003. – T. 53 – C.463–476.
324. Saha B.C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum* / Saha B.C. // *Proc. Biochem.* – 2002. – T. 37.
325. Home - Protein - NCBI [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>.
326. Wilson C.L. / Wilson C.L., Stiers D.L., Smith G.G. // *Phytopathol.* – 1970. – T. 60 – C.216.
327. Enzyme Database - BRENDA [Электронный ресурс]. URL: <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>.
328. Bravman T. Identification of the catalytic residues in family 52 glycoside hydrolase, a β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6 / Bravman T., Belakhov V., Solomon D., Shoham G., Henrissat B., Baasov T., Shoham Y. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – T. 278 – № 29 – C.26742–26749.
329. Voadlo D.J. A case for reverse protonation: identification of Glu160 as an acid/base catalyst in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* β -xylosidase and detailed kinetic analysis of a site-directed

- mutant / Vocadlo D.J., Wicki J., Rupitz K., Withers S.G. // *Biochemistry* – 2002. – T. 41 – № 31 – C.9736–9746.
330. Becker D. Engineering of a glycosidase Family 7 cellobiohydrolase to more alkaline pH optimum: the pH behaviour of *Trichoderma reesei* Cel7A and its E223S/ A224H/L225V/T226A/D262G mutant / Becker D., Braet C., Brumer H., Claeysens M., Divne C., Fagerström B.R., Harris M., Jones T.A., Kleywegt G.J., Koivula A., Mahdi S., Piens K., Sinnott M.L., Ståhlberg J., Teeri T.T., Underwood M., Wohlfahrt G. // *Biochem. J.* – 2001. – T. 356 – № Pt 1 – C.19–30.
331. Thanassi N.M. Enzymic degradation of fucoidan by enzymes from the hepatopancreas of abalone, *Haliotis* species / Thanassi N.M., Nakada H.I. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1967. – T. 118 – № 1 – C.172–177.
332. dePedro M.A. Purification and some properties of α -L-fucosidase from *Littorina littorea* L. / dePedro M.A., Reglero A., Cabezas J.A. // *Comp. Biochem. Physiol., B* – 1978. – T. 60 – C.379–382.
333. Fleet G.W. Short efficient synthesis of the α -L-fucosidase inhibitor, deoxyfuconojirimycin [1,5-dideoxy-1,5-imino-L-fucitol] from D-lyxonolactone / Fleet G.W., Petursson S., Campbell A.L., Mueller R.A., Behling J.R., Babiak K.A., Ng J.S., Scarosc M.J. // *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I* – 1989. – T. 3 – C.665–666.
334. Tu Z. Development of fucosyltransferase and fucosidase inhibitors / Tu Z., Lin Y.-N., Lin C.-H. // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – T. 42 – № 10 – C.4459–4475.
335. Winchester B. Inhibition of α -L-fucosidase by derivatives of deoxyfuconojirimycin and deoxymannojirimycin / Winchester B., Barker C., Baines S., Jacob G.S., Namgoong S.K., Fleet G. // *Biochem. J.* – 1990. – T. 265 – № 1 – C.277–282.
336. Kato A. Synthesis and biological evaluation of *N*-(2-fluorophenyl)-2 β -deoxyfuconojirimycin acetamide as a potent inhibitor for α -L-fucosidases / Kato A., Okaki T., Ifuku S., Sato K., Hirokami Y., Iwaki R., Kamori A., Nakagawa S., Adachi I., Kiria P.G., Onomura O., Minato D., Sugimoto K., Matsuya Y., Toyooka N. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – T. 21 – № 21 – C.6565–6573.
337. Ghalanbor Z. Binding of Tris to *Bacillus licheniformis* α -amylase can affect its starch hydrolysis activity / Ghalanbor Z., Ghaemi N., Marashi S.-A., Amanlou M., Habibi-Rezaei M., Khajeh K., Ranjbar B. // *Protein Pept. Lett.* – 2008. – T. 15 – № 2 – C.212–214.
338. Ubhayasekera W. Structures of *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D in complex with product and inhibitors / Ubhayasekera W., Muñoz I.G., Vasella A., Ståhlberg J., Mowbray S.L. // *FEBS J.* – 2005. – T. 272 – № 8 – C.1952–1964.
339. Aghajari N. Structural basis of α -amylase activation by chloride / Aghajari N., Feller G., Gerday C., Haser R. // *Protein Sci.* – 2002. – T. 11 – № 6 – C.1435–1441.
340. Sevcík J. Structure of glucoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera* at 1.7 Å resolution / Sevcík J., Solovicová A., Hostinová E., Gasperík J., Wilson K.S., Dauter Z. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 1998. – T. 54 – № Pt 5 – C.854–866.
341. Tsai L.-C. Structural basis for the inhibition of 1,3-1,4- β -D-glucanase by noncompetitive calcium ion and competitive Tris inhibitors / Tsai L.-C., Hsiao C.-H., Liu W.-Y., Yin L.-M., Shyur L.-F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – T. 407 – № 3 – C.593–598.

342. Cornish-Bowden A. Fundamentals of Enzyme Kinetics / A. Cornish-Bowden – Weinheim: Wiley-Blackwell, 2013. Вып. 4– 410с.
343. Borisova A.S. The method of integrated kinetics and its applicability to the exo-glycosidase-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl glycosides / Borisova A.S., Reddy S.K., Ivanen D.R., Bobrov K.S., Eneyskaya E.V., Rychkov G.N., Sandgren M., Stålbbrand H., Sinnott M.L., Kulminskaya A.A., Shabalin K.A. // Carbohydr. Res. – 2015. – Т. 412 – С.43–49.
344. Парсонс Я.К. Исследование *N*-гликанов с использованием экзогликозидаз / Парсонс Я.К., Бьюлик Д.А., Боскес К.Д., Тирунилакантапиллаи Л., Коллинз Б.Э. – С.1–60.
345. Perrella N.N. First characterization of fucosidases in spiders / Perrella N.N., Fuzita F.J., Moreti R., Verhaert P.D.E.M., Lopes A.R. // Archives of Insect Biochemistry and Physiology – 2018. – Т. 98 – № 3 – С.e21462.
346. Песенцева М.С. Ферменты морского моллюска *Littorina sitkana*: 1→3-β-*D*-глюканаза, β-*D*-глюкозидаза, сульфатаза и тирозилпротеин сульфотрансфераза :: дис. ...канд. биол. наук : 03.01.04 / Песенцева М.С. – 2013.
347. Lezyk M. Novel α-*L*-Fucosidases from a Soil Metagenome for Production of Fucosylated Human Milk Oligosaccharides / Lezyk M., Jers C., Kjaerulff L., Gotfredsen C.H., Mikkelsen M.D., Mikkelsen J.D. // PloS One – 2016. – Т. 11 – № 1 – С.e0147438.
348. Lamba D. Structural analysis of methyl α-*L*-fucopyranoside by X-ray crystallography, NMR spectroscopy, and molecular mechanics calculations / Lamba D., Segre A.L., Fabrizi G., Matsushiro B. // Carbohydr. Res. – 1993. – Т. 243 – № 2 – С.217–224.
349. Vliegthart J.F.G. Fucosylation of linear alcohols: A study of parameters influencing the stereochemistry of glycosylation / Vliegthart J.F.G., Vermeer H.J., Dijk C.M. van, Kamerling J.P. // Eur. J. Org. Chem. – 2001. – Т. 2001 – № 1 – С.193–203.
350. Liu S. The fucosidase-pool of *Emericia oligotrophica*: Biochemical characterization and transfucosylation potential / Liu S., Kulinich A., Cai Z.P., Ma H.Y., Du Y.M., Lv Y.M., Liu L., Voglmeir J. // Glycobiology – 2016. – Т. 26 – № 8 – С.871–879.
351. Rodríguez-Díaz J. Synthesis of fucosyl-*N*-acetylglucosamine disaccharides by transfucosylation using α-*L*-fucosidases from *Lactobacillus casei* / Rodríguez-Díaz J., Carbajo R.J., Pineda-Lucena A., Monedero V., Yebra M.J. // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Т. 79 – № 12 – С.3847–3850.
352. Trytek M. An efficient method for the immobilization of inulinase using new types of polymers containing epoxy groups / Trytek M., Fiedurek J., Podkościelna B., Gawdzik B., Skowronek M. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Т. 42 – № 7 – С.985–996.
353. Verma M.L. Immobilization of β-glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: application in cellobiose hydrolysis / Verma M.L., Chaudhary R., Tsuzuki T., Barrow C.J., Puri M. // Bioresour. Technol. – 2013. – Т. 135 – С.2–6.
354. Silva T.M. da Immobilization and high stability of an extracellular β-glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions / Silva T.M. da, Pessela B.C., Silva J.C.R. da, Lima M.S., Jorge J.A., Guisan J.M., Polizeli M. de L.T.M. // J. Mol. Catal. B-Enzym. – 2014.

355. Barbosa O. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts / Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia Á., Torres R., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. // *Biotechnol. Adv.* – 2015. – T. 33 – № 5 – C.435–456.
356. Skoronski E. Substrate specificity and enzyme recycling using chitosan immobilized laccase / Skoronski E., Fernandes M., Magalhães M. de L.B., Silva G.F. da, João J.J., Soares C.H.L., Júnior A.F. // *Molecules* – 2014. – T. 19 – № 10 – C.16794–16809.
357. Wang P. Influence of silica-derived nano-supporters on cellobiase after immobilization / Wang P., Hu X., Cook S., Hwang H.-M. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2009. – T. 158 – № 1 – C.88–96.
358. Tan I.S. Immobilization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* on κ -carrageenan hybrid matrix and its application on the production of reducing sugar from macroalgae cellulosic residue / Tan I.S., Lee K.T. // *Bioresour. Technol.* – 2015. – T. 184 – C.386–394.

Приложение А

Кривые ингибирования для гидролиза *pNPFuc*, катализируемого *FpFucA*, в зависимости от концентрации пропилфукозида и фукобиозидов.

Кажущиеся максимальные скорости $V_{\text{макс}}^{\text{каж}}$ и константы Михаэлиса $K_M^{\text{каж}}$ были определены в отсутствие или в присутствии 1-6 мМ *L-Fuc- α -OPr* (А); 0,5-5 мМ *L-Fuc- α -(1 \rightarrow 2)-L-Fuc- α -OPr* (Б), 2-10 мМ *L-Fuc- α -(1 \rightarrow 3)-L-Fuc- α -OPr* (В) и 0,6-3 мМ *L-Fuc- α -(1 \rightarrow 4)-L-Fuc- α -OPr* (Г). Корреляционный график изменений кажущихся $V_{\text{макс}}^{\text{каж}}$ и $K_M^{\text{каж}}$ с увеличением концентрации ингибитора для каждого соединения подтверждает конкурентный тип ингибирования.

