

МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ НА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ НОСИТЕЛЯХ

А.М. Сульман, Д.В. Балакшина, О.В. Гребенникова,
А.Е. Филатова, В.Г. Матвеева

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», Тверь

Целлюлаза катализирует переработку отходов целлюлозной биомассы. В этом кратком обзоре анализируются основные способы иммобилизации этого фермента на наноструктурированные носители. Такие носители обеспечивают большую площадь поверхности, повышенную ферментативную нагрузку и благоприятную среду для повышения эффективности целлюлазы и ее стабильности, что приводит к созданию нанобиокатализаторов для получения различных химических соединений. В работе обсуждаются такие способы иммобилизации как адсорбция, инкапсуляция, ковалентное связывание и сшивка ферментов.

Ключевые слова: целлюлаза, иммобилизация, наноструктурированные носители.

Фермент целлюлаза представляет собой конструкцию, состоящую из трех ферментов (экзо-глюканазы, эндо-глюканазы и β -глюкозидазы) которая может естественным образом продуцироваться различными микроорганизмами и имеет экологическое значение, поскольку перерабатывает целлюлозу в биосфере. Целлюлаза может применяться при получении моющих целлюлозы и бумаги, биоактивных соединений, продуктов питания, кормов для животных, биотоплива, в текстильной промышленности и т.д.

Нанобиокатализаторы на основе целлюлазы, иммобилизованной на наноструктурированные носители используются, главным образом, для каталитического гидролиза отходов биомассы, а также в пищевой промышленности и в области охраны окружающей среды. Типичные методы иммобилизации целлюлазы на наноструктурированных носителях аналогичны тем, которые используются для других ферментов на различных носителях. Они включают адсорбцию на поверхности носителя, инкапсуляцию в носитель, ковалентное присоединение и сшивание. В последние годы, одним из распространенных методов является ковалентное присоединение, поскольку оно обеспечивает более высокую стабильность иммобилизованного фермента и не влияет на его структуру, если используемая сшивка позволяет защитить вторичную

структуру фермента. С другой стороны, инкапсуляция и поперечное сшивание также могут быть полезны для работы биокатализатора, если конформация фермента сохраняется. В данной работе более подробно обсуждаются вышеуказанные методы иммобилизации целлюлазы.

Адсорбция

Адсорбция является одним из самых простых методов иммобилизации ферментов. Так, для иммобилизации целлюлазы использовались высокопористые металлоорганические каркасы [1,2], Fe₃O₄/кислотные монтмориллонитовые композиты различной структуры [3], многостенные углеродные нанотрубки [4] и др. Большая площадь поверхности подложки, заряд фермента и носителя, размер пор носителя и т.д. являются важными факторами для успешной адсорбции ферментов [5].

Авторы [6] продемонстрировали, что модификация металлоорганических каркасов (состоящих из кластеров циркония, соединенных 1,4-бензодикарбоновой кислотой) аминогруппами увеличивает физическую адсорбцию целлюлазы за счет дополнительных якорей. Постферментно-адсорбционная модификация была продемонстрирована в нескольких работах. Целлюлаза, адсорбированная на многостенные углеродные нанотрубки и затем защищенная альгинатом натрия, позволила повысить стабильность нанобиокатализатора [7]. Постепенное снижение активности с каждым циклом было приписано слабым нековалентным связям между целлюлазой и носителем. Zhu и др. [8] предложили адсорбировать целлюлазу на магнитные наночастицы, покрытые тонким слоем кремнезема для усиления адсорбции целлюлазы. Таким образом, модификация/функционализация носителя часто позволяет получать эффективные нанобиокатализаторы, полученные адсорбцией целлюлазы. В случае модификации после адсорбции нанесенный внешний слой должен быть достаточно пористым или набухшим, чтобы позволить целлюлазе контактировать с источником отходов биомассы. Возможными недостатками этого метода являются низкая загрузка и потеря фермента, приводящая к загрязнению конечного продукта.

Инкапсуляция

Инкапсуляция целлюлазы может быть осуществлена тремя основными способами. При одном из методов молекулы целлюлазы задерживаются в порах пористых материалов, следовательно, в таком случае размеры пор играют важную роль в инкапсуляции. При втором подходе целлюлаза инкапсулируется при формировании пористого

наноматериала. Согласно третьему способу, фермент инкапсулируется в полимерах, часто во время их совместного осаждения.

Zr-содержащие металлоорганические каркасы (UIO-66) с различными мезопорами (6.46, 7.55, 10.80 нм) были использованы для инкапсуляции нескольких ферментов, включая целлюлазу [9]. Стоит отметить, что целлюлаза имеет эллипсоидальную форму диаметром 4-6.5 нм и длиной 18-21.5 нм, следовательно поры носителя подходящих размеров могут инкапсулировать фермент [10]. Удивительно, но мельчайшие поры металлоорганических каркасов обеспечивали максимальную загрузку без ущерба для структуры фермента, что было подтверждено сравнением активности свободных и иммобилизованных ферментов. Специфическая структура пор металлоорганических каркасов (наличие мезопор наряду с микропорами) не влияет на массоперенос и обеспечивает эффект обогащения субстрата, вероятно, из-за расположения последнего на подложке. Добавление мезопор размером 4.6 нм в микропористые Zr-содержащие металлоорганические каркасы, полученный биоминерализацией с использованием декстрана в качестве матрицы, позволяет лучше удерживать целлюлазу внутри материала, улучшая нагрузочную способность и стабильность иммобилизованной целлюлазы [11]. Мезопористые металлоорганические каркасы на основе Zn также использовались для инкапсуляции целлюлазы путем одновременного осаждения предшественников металлоорганических каркасов и целлюлазы [12]. Это значительно увеличило загрузку целлюлазой и создало структурные дефекты (крупные поры) во время образования металлоорганических каркасов, способствуя массопереносу и увеличивая ферментативную активность.

Образование наногелей в присутствии целлюлазы с помощью сшивающего агента поли(N-винилпирролидон-со-N-метакрилоксисукцинимид) с усиленным зеленым флуоресцентным белком позволяет успешно инкапсулировать фермент [13]. Самосборка хитозана вокруг целлюлазы путем высаливания из смешанного раствора позволила сформировать наногидрид, который был нанесён на альгинатные шарики [14]. Нанобиокатализатор показал повышенную стабильность и эффективность при гидролизе жома сахарного тростника.

Наиболее важным преимуществом инкапсуляции является надежность, хотя возможные недостатки, такие как сопутствующая адсорбция и потеря целостности конформации, могут свести к минимуму ее положительные стороны. Кроме того, подобно физической адсорбции, капсулирование целлюлазы является благоприятным только в том случае, если доступ к ферменту в наноматериале не затруднен.

Ковалентное связывание

Ковалентное присоединение является более предпочтительным для иммобилизации целлюлазы, поскольку обеспечивает повышенную стабильность и активность фермента – важное преимущество этого подхода. Ковалентная иммобилизация, однако, требует функционализации носителя, если только носитель изначально не обладает функциональными группами [15,16-19]. Кроме того, для сохранения конформации фермента необходим подходящий линкер [20,25]. Наиболее часто используемым бифункциональным линкером является глутаровый альдегид, который взаимодействует с аминогруппами в условиях окружающей среды и не требует какого-либо катализатора [9,24,25,26]. Несмотря на то, что длина глутарового альдегида составляет всего 0.75 нм [27], он, обеспечивает достаточное расстояние для предотвращения неспецифической адсорбции фермента. Были исследованы и более длинные линкеры, такие как тетрадекандиевая и докозандиевая дикарбоновые кислоты с приблизительной длиной удлиненной цепи 1.4 и 2.2 нм соответственно [28], однако, взаимодействие концевых линкеров карбоксильной группы с аминифункциональными носителями (образование пептидной связи) является менее благоприятным, требующим повышенных температур или/и катализатора [29,30].

В случае носителя с карбоксильными группами на поверхности (например, оксид графена) сначала кислоты активируются карбодиимидом, за которым следует взаимодействие с N-гидроксисукцинимидом, создавая, таким образом, функциональную группу для присоединения фермента [31].

Целлюлаза, ковалентно иммобилизованная на аминифункционализированные магнитные наночастицы $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, обладала высокой стабильностью при различных значениях pH и температурах при ферментативном осахаривании древесины тополя [32]. Этот биокатализатор обеспечивал скорость ферментативного осахаривания 38.4% за 72 ч, что является перспективным применением для переработки лигноцеллюлозной биомассы. Тот же принцип иммобилизации целлюлазы с использованием аминогрупп был использован на совершенно другом носителе: гибридном проводящем наногидрогеле, полученном с помощью полианилиновых наностержней, сформированных на электроспиртованном катионном поли(ϵ -капролактон) гидрогеле, содержащем катионную макромолекулу оксида фосфина [33]. Гибридный нанобиокатализатор показал хорошую производительность при гидролизе целлюлозных материалов, не проявляя потери активности по сравнению со свободным ферментом.

Правильная функционализация носителя может иметь решающее значение для эффективного ковалентного присоединения фермента. Этот

путь был исследован Гао и др. [34]. Авторы модифицировали листы оксида графена, используя этерификацию эфиром р-β-серной кислоты этилсульфон анилин, который создает гидрофобный линкер для дальнейшей быстрой иммобилизации целлюлазы (~10 мин) после диазотирования. Примечательно, однако, что надежности быстрого присоединения целлюлазы противостоит сложная процедура функционализации, что делает это достижение сомнительным.

В работе [35] был разработан и протестирован метод иммобилизации ферментов с помощью сортазы на микрогелях для пяти различных ферментов, включая целлюлазу. Этот метод позволяет осуществить специфическую иммобилизацию фермента за счет ковалентного связывания на чувствительных к раздражителям частицах микрогеля на основе поли(N винилкапролактама)/глицидилметакрилата.

Таким образом, возможным недостатком ковалентного присоединения целлюлазы является сложность химической модификации носителя и/или фермента.

Сшивание ферментов

Сшивание ферментов в агрегаты приводит к иммобилизации ферментов без использования вспомогательных материалов, что делает его надежным подходом. Низкая плотность агрегатов является решающим фактором, обеспечивающим контакт между целлюлазой и целлюлозной биомассой. Такое сшивание может быть достигнуто простым взаимодействием с глутаровым альдегидом [36] или более сложными методами. Было обнаружено, что активность сшитых ферментных агрегатов зависит от типа осадителя, который может влиять на их плотность [37,38]. При нанесении сшитых целлюлазных агрегатов на магнитные наночастицы добавляется дополнительное преимущество легкого магнитного манипулирования нанобиокатализатором [39].

Оригинальный способ получения четко определенных мультиферментных гибридных наноцветов был предложен Нап и др. путем сшивания всех целлюлазных ферментов (целлобиогидролазы, эндоглюканазы и β-глюкозидазы) и комбинирования эластиноподобного полипептида и *His* [40-41]. Образовавшиеся наноцветки катализировали гидролиз целлюлозы в глюкозу с высоким рН, термической стабильностью и стабильностью при хранении, а также лучшей каталитической активностью по сравнению со свободными ферментами. В этом случае открытая структура ферментных агрегатов является ключом к успешному катализу.

Недостатком этого метода является невысокая активность биокатализатора из-за плохого доступа к активным центрам при плотной сшивке ферментов.

Выводы

Анализируя работы ученых за последние несколько лет, можно сделать вывод, что методы иммобилизации не стоят на месте. Одним из примеров является иммобилизация целлюлазы на магнитоотделяемом мезопористом кремнезем. Благодаря уникальному характеру и морфологии носителя можно получать эффективные и стабильные нанобиокатализаторы, путем простой адсорбции целлюлазы. Адсорбированная целлюлаза обладает высокой стабильностью и активностью за счет модификации носителя макромолекулами, изменяющими заряд. К тому же, при использовании магнитных наночастиц можно легко и быстро отделять нанобиокатализатор от реакционной среды для повторного использования. Свободные мультиферментные наноцветки позволяют достичь аналогичной цели благодаря пушистым ферментным структурам с хорошим сродством к целлюлозной биомассе. Необходимо отметить, что совместная иммобилизация нескольких ферментов на различных носителях является наиболее многообещающим направлением для будущей разработки нанобиокатализаторов. Это могло бы значительно улучшить результат осахаривания целлюлозы до сахаров или биоэтанола за счет эффективного гидролиза лигнина, крахмала и т.д., которые сопровождают целлюлозу в отходах биомассы и являются вредными для гидролиза целлюлозы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта УМНИК № 16434ГУ/2021 от 28.05.2021.

Список литературы

1. Zhou Z., Ju X., Chen J., Wang R., Zhong Y., Li L. // *Bioresour. Technol.* – 2021. V. 319. P. 124-159.
2. Wang Z., Fan C., Zheng X., Jin Z., Bei K., Zhao M., Kong H. // *Front. Chem.* 2022. V. 10. P. 8843-898.
3. Bosu S., Pooja R.P., Rajasimman M. // *Fuel*. 2022. V. 320. P. 123905-12915.
4. Rajnish K.N., Samuel M.S., John J.A., Datta S., Chandrasekar N., Balaji R., Jose S., Selvarajan E. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 182. P. 1793–1802.
5. Zhou M., Ju X., Zhou Z., Yan L., Chen J., Yao X., Xu X., Li L.-Z. // *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2019. V. 7. P. 19185–19193.
6. Zhou M., Yan L., Chen H., Ju X., Zhou Z., Li L. // *Fuel*. 2021. V. 304. P. 121484-121492.
7. Wu L.M., Zeng Q.H., Ding R., Tu P.P., Xia M.Z. // *Appl. Clay Sci.* 2019. V. 179. P. 105129-105137.
8. Li L.-J., Xia W.-J., Ma G.-P., Chen Y.-L., Ma Y.-Y. // *AMB Express*. 2019. V. 9. P.112-123.
9. Costantini A., Venezia V., Pota G., Bifulco A., Califano V., Sannino F. // *Nanomaterials*. 2020. V. 10. P. 1799.

10. Saha K., Verma P., Sikder J., Chakraborty S., Curcio S. // *Renew. Energy*. 2019. V. 133. P. 66–76.
11. Grewal J., Ahmad R., Khare S.K. // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 242. P. 236–243.
12. Kaur H., Mohanta G.C., Gupta V., Kukkar D., Tyagi S. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2017. V. 41. P. 106–112.
13. Khudozhnikov A.E., Arzumanov S.S., Kolokolov D.I., Stepanov A.G. // *J. Phys. Chem. C*. 2021. V. 125. P. 13391–13400.
14. Ahmed I.N., Yang X.-L., Dubale A.A., Li R.-F., Ma Y.-M., Wang L.-M., Hou G.-H., Guan R.-F., Xie M.-H. // *Bioresour. Technol.* 2018. V. 270. P. 377–382.
15. Liu T., Malkmes M.J., Zhu L., Huang H., Jiang L. // *Bioresour. Technol.* 2021. V. 332. P. 125117.
16. Zhu Y., Han J., Wu J., Li Y., Wang L., Mao Y., Wang Y. // *New J. Chem.* 2021. V. 45. P. 6144–6150.
17. Wu J., Han J., Mao Y., Wang L., Wang Y., Li Y., Wang Y. // *Sep. Purif. Technol.* 2022. V. 297. P. 121505.
18. Bubner P., Dohr J., Plank H., Mayrhofer C., Nidetzky B. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 2759–2765.
19. Wu J., Wang Y., Han J., Wang L., Li C., Mao Y., Wang Y. // *Biochem. Eng. J.* 2022. V. 180. P. 108342.
20. Zhang X., Zheng S., Tao J., Wang X. // *Catal. Lett.* 2022. V. 152. P. 699–706.
21. Peng H., Ruebsam K., Jakob F., Schwaneberg U., Pich A. // *Biomacromolecules*. 2016. V. 17. P. 3619–3631.
22. Ahmad R., Khare S.K. // *Bioresour. Technol.* 2018. V. 252. P. 72–75.
23. Amaro-Reyes A., Diaz-Hernandez A., Gracida J., Garcia-Almendarez B.E., Escamilla-Garcia M., Arredondo-Ochoa T., Regalado C. // *Catalysts*. 2019. V. 9. P. 966.
24. Zheng T., Yang L., Ding M., Huang C., Yao J. // *Bioresour. Technol.* 2022. V. 344. P. 126163.
25. Mo H., Qiu J., Yang C., Zang L., Sakai E., Chen J. // *Enzym. Microb. Technol.* 2020. V. 138. P. 109561.
26. Kaur P., Taggar M.S., Kalia A. // *Biomass Convers. Biorefin.* 2021. V. 11. P. 955–969.
27. Salem M., Mauguén Y., Prange T. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2010. V. 66. P. 225–228.
28. Kumar S., Morya V., Gadhavi J., Vishnoi A., Singh J., Datta B. // *Heliyon*. 2019. V. 5. P. 1702.
29. Yamato K., Yoshida Y., Kumamoto Y., Isogai A. // *Cellulose*. 2022. V. 29. P. 2839–2853.
30. Handoko N.R., Panigrahi P.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2022. V. 144. P. 3637–3643.
31. Paz-Cedeno F.R., Carceller J.M., Iborra S., Donato R.K., Godoy A.P., Veloso de Paula A., Monti R., Corma A., Masarin F. // *Renew. Energy*. 2021. Vol. 164. P. 491–501.
32. Huang Y.-Y., Zhan P., Wang F., Shao L.-S., Zhang L., Qing Y., Chen J.-N. // *Chem. Pap.* 2022, In Press.

33. Zarei A., Alihosseini F., Parida D., Nazir R., Gaan S. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2021. V. 13. P. 49816–49827.
34. Gao J., Lu C.-L., Wang Y., Wang S.-S., Shen J.-J., Zhang J.-X., Zhang Y.-W. // Catalysts. 2018. V. 8. P. 180-188.
35. Zou Z., Gau E., El-Awaad I., Jakob F., Pich A., Schwaneberg U. // Bioconjugate Chem. 2019. V. 30. P. 2859–2869.
36. Hojnik Podrepsek G., Knez Z., Leitgeb M. // J. Supercrit. Fluids. 2019. V. 154. P. 104629.
37. Perzon A., Dicko C., Cobanoglu O., Yuekselen O., Eryilmaz J., Dey E.S. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2017. V. 92. P. 1645–1649.
38. Blanco-Llamero C., Garcia-Garcia P., Senorans F.J. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. P. 794672.
39. Jia J., Zhang W., Yang Z., Yang X., Wang N., Yu X. // Molecules. 2017. V. 69. P. 269-275.
40. Han J., Feng H., Wu J., Li Y., Zhou Y., Wang L., Luo P., Wang Y. // J. Agric. Food Chem. 2020. V. 69. P. 7910–7921.
41. Geng H., Mou Z., Liu Z., Li F., Yang C. // Catalysts. 2020. V. 10. P. 604-612.

Об авторах:

СУЛЬМАН Александрна Михайловна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: alexsulman@mail.ru

БАЛАКШИНА Дарья Вадимовна – студентка 4-го курса химико-технологического факультета направления «19.03. 01 Биотехнология», кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: dasha.balakshina.01@bk.ru

ФИЛАТОВА Анастасия Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: afilatowa@mail.ru

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: olechkamatveeva@mail.ru

МАТВЕЕВА Валентина Геннадьевна – доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: valen-matveeva@yandex.ru

METHODS FOR CELLULASE IMMOBILIZATION ON NANOSTRUCTURED SUPPORTS

**A.M. Sulman, D.V. Balakshina, O.V. Grebennikova,
A.E. Filatova, V.G. Matveeva**

Tver State Technical University, Tver

Cellulase catalyzes the processing of waste cellulosic biomass. This brief review analyzes the main ways of immobilizing this enzyme on nanostructured supports. Such carriers provide a large surface area, an increased enzymatic load, and a favorable environment for improving the efficiency of cellulase and its stability, which leads to the creation of nanobiocatalysts for the production of various chemical compounds. The paper discusses such methods of immobilization as adsorption, encapsulation, covalent binding and cross-linking of enzymes.

Keywords: cellulase, immobilization, nanostructured carriers.

Дата поступления в редакцию 10.01.2023.

Дата принятия в печать 22.02.2023.