

ОСНОВНЫЕ ВИДЫ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ

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

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», г. Тверь

Ферментам, иммобилизованным на наноструктурированные носители, уделяется большое внимание, поскольку у них отсутствуют недостатки традиционных биокатализаторов: низкая эффективность массопереноса, нестабильность во время каталитических реакций и возможная дезактивация. Наноструктурированные носители обеспечивают большую площадь поверхности, повышенную ферментативную нагрузку и благоприятную среду для повышения эффективности целлюлазы и ее стабильности, что приводит к созданию перспективных нанобиокатализаторов для получения биотоплива. В работе приводятся примеры наноструктурированных носителей таких как, пористые наноматериалы, наногели, полимерные наночастицы, магнитные наночастицы.

Ключевые слова: целлюлаза; иммобилизация; наноструктурированные носители.

Фермент целлюлаза представляет собой смесь эндоглюканазы, целлобиогидролазы и β -глюкозидазы, которые могут гидролизовать нерастворимую целлюлозу до ее мономерных субъединиц глюкозы. Эти ферменты находят применение в пищевой, целлюлозно-бумажной, текстильной и фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве и производстве биотоплива [1]. Однако, невысокая термостабильность ферментов, нестабильность при хранении, наличие примесей, и проблема их повторного использования являются основными недостатками применения нативных ферментов. Эти недостатки могут быть сведены к минимуму или даже устранены путем иммобилизации ферментов на различные носители [2].

Широкий ассортимент материалов различного происхождения, таких как неорганические, органические, гибридные и/или композитные, могут быть использованы в качестве матрицы-носителя для иммобилизации ферментов. Используемые материалы должны не только сохранять структурную конформацию ферментов, но и создавать устойчивое взаимодействие с ферментом. Выбор подходящей матрицы-носителя связан с типом фермента и процессом, в котором предлагается использовать эти иммобилизованные системы. Тем не менее следует

подчеркнуть, что выбор материалов носителя является важнейшей задачей ввиду серьезного влияния материала носителя на свойства биокаталитической системы [3].

В последнее десятилетие значительное внимание уделялось ферментам, иммобилизованным на наноструктурированные носители, называемые нанобиокатализаторами. Наноструктурированные носители - это материалы, содержащие элементы нанометрового размера (обычно от 1 до 100 нм), такие как наночастицы различных размеров и форм, включая наностержни и нановолокна, материалы с порами в нанометровом диапазоне, чувствительные к раздражителям наноносители и т.д. [4]. Этот растущий интерес объясняется возможностью нанобиокатализаторов преодолевать недостатки ферментов, иммобилизованных на традиционные носители. Кроме того, наноматериалы обладают высокой площадью поверхности для иммобилизации фермента, увеличивая нагрузку на фермент и улучшая их расположение на поверхности. Последнее часто приводит к более высокой ферментативной активности [5].

Основные наноструктурированные носители, используемые для иммобилизации целлюлазы это пористые наноматериалы, наногидрогели, молимерные магнитные наночастицы и т.д. Большинство этих носителей годами использовались для иммобилизации ферментов, но за последние пять лет наблюдаются инновации в изготовлении или модификации этих наноматериалов для лучшей адаптации к нагрузке и функционированию целлюлазы [6].

В этом миниобзоре мы обсудим основные наноструктурированные носители для иммобилизации целлюлазы.

Пористые наноматериалы

Для иммобилизации целлюлазы были исследованы пористые материалы с различными размерами пор. Были разработаны и использованы для иммобилизации ферментов новые мезопористые наночастицы кремнезема, обладающие радиальными и иерархическими структурами открытых пор. Авторам [7] удалось успешно адсорбировать целлюлазу на сложных пористых кремнеземных наночастицах, за счет водородных связей, не повреждая вторичные структуры фермента. Несмотря на отсутствие химических связей между ферментом и носителем, нанобиокатализаторы продемонстрировали высокую стабильность, вероятно, благодаря сочетанию большой площади поверхности и специфических пор/складок, улавливающих ферменты.

Сравнение мезопористых кремнеземов со средними порами 17,6 нм и 3,8 нм показало, что более крупные поры, размеры которых аналогичны длинной оси целлюлазы, обеспечивают более высокую загрузку фермента [8]. С другой стороны, поры длиной 3,8 нм, близкие по размеру к короткой оси целлюлазы, обеспечивают более высокую

активность за счет сохранения активных центров фермента. Таким образом, несмотря на мнение о том, что меньшие поры могут повредить структуру вторичной целлюлазы, выбор авторами размеров пор в двух мезопористых материалах позволил понять ограничения или их отсутствие при выборе нанопористых носителей.

Наногели

В недавней литературе есть лишь несколько примеров наногелей, обладающих явным преимуществом: набухшее состояние гидрогеля может обеспечить лучший доступ к иммобилизованной целлюлазе, тем самым повышая ферментативную активность. Для адсорбции целлюлазы использовали наногель на основе полиакриловой кислоты, полученный методом обратнoфазной микроэмульсионной полимеризации [9]. Такой биокатализатор продемонстрировал высокую термостойкость, сохраняя 75% активности фермента при 80°C, а также более широкий диапазон рабочих значений pH. В работе [10] обсуждается гибридный наногелевый носитель, в котором наностержни были сформированы *in situ* внутри наногеля. В этой работе наблюдается более высокая активность иммобилизованного фермента по сравнению с его нативной формой в том же диапазоне температур. Так же, иммобилизованная целлюлаза продемонстрировала хорошую термостабильность.

Наногидрогели были получены путем ковалентного связывания карбоксиметилцеллюлозы акриловыми полимерами [11]. После инкапсуляции целлюлазы нанобиокатализатор применяли для усиленного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы и показали значительное увеличение конверсии жома сахарной свеклы, обработанного щелочью. Дополнительное преимущество наногелей в том, что они чувствительны к pH или температуре, это позволяет удалять продукты гидролиза, которые могут оставаться в наногеле.

Полимерные частицы

Полимерные частицы могут быть полезны для поверхностного ковалентного присоединения ферментов, если полимеры обладают функциональными группами. Полимерные наночастицы были получены из сшитого сополимера стирола и малеинового ангидрида с использованием полимеризации осаждением без стабилизатора с последующим ковалентным присоединением целлюлазы через ангидридные группы [12] поли(стирол- α -малеиновый ангидрид), модифицированный нитрилотриуксусной кислотой, самоорганизуется в мицеллы, модификация которых привела к присоединению His₆-меченых целлюлаз (полученных из бактериальной клетки). Таким образом, получены наночастицы с ферментом во внешнем слое. Такая иерархическая структура обеспечивала воздействие целлюлазы на

реакционную среду и сохранение её конформации, благодаря мягкому носителю.

Магнитные наноструктурированные носители

Магнитно-чувствительные наноструктурированные носители обычно основаны на магнитных наночастицах. Использование магнитных наночастиц для разработки нанобиокатализаторов резко возросло в последние годы, благодаря простому магнитному разделению катализатора и реакционной среды. Это свойство позволяет многократно использовать нанобиокатализаторы и делает процессы более надежными, а также экономически и экологически благоприятными. Магнитные наночастицы (чаще всего наночастицы оксида железа) обычно функционализируются для обеспечения присоединения фермента. Для достижения этого такие наночастицы либо покрывают диоксидом кремния с последующим присоединением функциональных (амино) групп [13], либо полимером, содержащим реакционноспособные группы, например, хитозаном или другими функциональными полимерами [14].

Добавление ионов металлов (например, меди) к аминофункциональным магнитным наночастицам позволяет улучшить иммобилизацию целлюлазы за счет сродства к металлу [15]. Авторы [15] использовали золотую оболочку вокруг магнитных наночастиц с последующей кремнеземной оболочкой и функционализацией с помощью полиэтиленгликоля и L-аспарагиновой кислоты для ковалентного присоединения целлюлазы.

Другой путь синтеза магнитного нанобиокатализатора возможен, когда магнитные наночастицы внедряются в пористые или полимерные материалы [16]. Даже «голые» наночастицы магнетита были использованы для адсорбции целлюлазы [17] или после функционализации глутаровым альдегидом [18].

Ещё один пример использования магнитных наночастиц описывается в работе [19]. Авторы использовали послойную технику для изготовления магнитных электродвигателей, верхний слой которых был положительно заряжен. После иммобилизации целлюлазы микромоторы были встроены в бумажные чипы для создания диагностических устройств. Здесь целлюлаза необходима для частичного гидролиза целлюлозы в бумажной крошке, чтобы увеличить подвижность микромотора. Стоит отметить, что дополнительное покрытие микромоторов полиэтиленгликолем уменьшает их взаимодействие с целлюлозой, позволяя сохранить целостность чипа и контролировать подвижность микромотора. Хотя в статье не сообщалось о применении этих диагностических устройств, это первый пример использования магнитных микромоторов в бумажной среде.

Чтобы создать благоприятную подложку для иммобилизации целлюлазы, авторы [20] сформировали магнитные наночастицы оксида

железа в иерархических пористых углеродах, содержащих макропоры (>50 нм), а также взаимосвязанные мезо- и микропоры. Ученые исследовали как ковалентное, так и нековалентное (адсорбционное) присоединение целлюлазы и определили, что ковалентная иммобилизация обеспечивает более высокую активность и стабильность при повторном использовании.

Интересный магнитный носитель был предложен авторами [21]. Для его изготовления первые полые полимерные частицы были получены осаждением из биофенилпропена. За этим следует присоединение аминифункциональных наночастиц Fe_3O_4 с последующей модификацией глутаровым альдегидом с образованием многослойных магнитных полых частиц для ковалентного присоединения целлюлазы.

Также, оригинальный подход был предложен учеными [22] для получения нанокompозита с ориентированной целлюлазой на хитозан/ Fe_3O_4 наночастицах. Для достижения этой цели авторы смешали целлюлазу с целлюлозой, плотно прикрепив фермент к последней. Затем смесь погружали в хитозан с последующим образованием магнитных наночастиц на периферии хитозана и гидролизом целлюлозы. В результате получилась полая магнитно-восстанавливаемая структура с целлюлазой в растянутой и наиболее активной конформации.

Выводы

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. Анализ литературы за последние несколько лет показал, что произошли впечатляющие инновации в методах иммобилизации ферментов. В качестве носителей для ферментов могут применяться различные наноструктурированные материалы. Использование магнитоотделяемых наночастиц в качестве носителей целлюлазы позволяет легко и быстро отделять катализатор от реакционной смеси. А способы оптимизации контакта между иммобилизованной целлюлазой и целлюлозной биомассой с помощью различных материалов являются перспективными для дальнейшей разработки нанобиокатализаторов для переработки целлюлозной биомассы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 22-79-00052)

Список литературы

1. Narisetty, R.R.; Tarafdar, V. // *Bioenerg. Res.* 2023. 16. P. 4–15.
2. Zanuso, E.; Gomes, D.G.; Ruiz, H.A.; Teixeira, J.A.; Domingues, L. // *Sustain. Energy Fuels.* 2021. 5. P. 4233–4247.

3. Sulman, A.; Grebennikova, O.; Tikhonov, B.; Molchanov, V.; Matveeva, V. // *BIO Web of Conferences*. 2023. 64.
4. Hong, K.; Sajjadi, M.; Suh, J.M.; Zhang, K.; Nasrollahzadeh, M.; Jang, H.W.; Varma, R.S.; Shokouhimehr, M. // *ACS Appl. Nano Mater.* 2020. 3. P. 2070–2103.
5. Cavalcante, F.T.T. // *Electrochem.* 2021. 2. P. 149–184.
6. Geng, H.; Mou, Z.; Liu, Z.; Li, F.; Yang, C. // *Catalysts*. 2020. 10. P. 604.
7. Costantini, A.; Venezia, V.; Pota, G.; Bifulco, A.; Califano, V.; Sannino, F. // *Nanomaterials*. 2020. 10. P. 1799.
8. Chen, B.; Qiu, J.; Mo, H.; Yu, Y.; Ito, K.; Sakai, E.; Feng, H. // *New J. Chem.* 2017. 41. P. 9338–9345.
9. Ahmed, I.N.; Chang, R.; Tsai, W. B. // *Colloids Surf. B.* 2017. 152. P. 339–343.
10. Ariaeenejad, S.; Motamedi, E.; Hosseini Salekdeh, G. // *Carbohydr. Polym.* 2020. 230. P. 115661.
11. Wang, Y.; Chen, D.; Wang, G.; Zhao, C.; Ma, Y.; Yang, W. // *Chem. Eng. J.* 2018. 336. P. 152–159.
12. Yu, D.; Ma, X.; Huang, Y.; Jiang, L.; Wang, L.; Han, C.; Yang, F. // *Int. J. Food Eng.* 2022., 18. P. 15–26.
13. Javid, A.; Amiri, H.; Kafrani, A.T.; Rismani-Yazdi, H. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. 207. P. 324–332.
14. Abbaszadeh, M.; Hejazi, P. // *Food Chem.* 2019. 290. P. 47–55.
15. Poorakbar, E.; Saboury, A.A.; Laame Rad, B.; Khoshnevisan, K. // *Protein J.* 2020. 39. P. 328–336.
16. Jannah Sulaiman, N.; Mansor, A.F.; Rahman, R.A.; Illias, R.M.; Shaarani, S.M. // *Chem. Eng. Technol.* 2019. 42. P. 1825–1833.
17. Schnell, F.; Kube, M.; Berensmeier, S.; Schwaminger, S.P. // *ChemNanoMat.* 2019. 5. P. 422–426.
18. Ingle, A.P.; Rathod, J.; Pandit, R.; da Silva, S.S.; Rai, M. // *Cellulose.* 2017. 24. P. 5529–5540.
19. De Dios Andres, P.; Ramos-Docampo, M.A.; Qian, X.; Stingaciu, M.; Stadler, B. // *Nanoscale.* 2021. 13. P. 17900–17911.
20. Papadopoulou, A.; Zarafeta, D.; Galanopoulou, A.P.; Stamatis, H. // *Protein J.* 2019. 38. P. 640–648.
21. Raza, S.; Yong, X.; Deng, J. // *Microporous Mesoporous Mater.* 2019. 285. P. 112–119.
22. Tan, L.; Tan, Z.; Feng, H.; Qiu, J. // *New J. Chem.* 2018. 42. P. 1665–1672.

Об авторах:

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

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

БАЛАКШИНА Дарья Вадимовна – магистрант 1-го курса кафедры биотехнологии, химии и стандартизации ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, д. 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, д. 22); e-mail: afilatowa@mail.ru.

THE MAIN TYPES OF CARRIERS FOR CELLULOSE IMMOBILIZATION

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

Tver State Technical University, Tver

The enzyme immobilized on nanostructured carriers is given great attention, since they lack the disadvantages of traditional biocatalysts: low mass transfer efficiency, instability during catalytic reactions and possible deactivation. Nanostructured carriers provide a large surface area, increased enzymatic load and a favorable environment for increasing the effectiveness of cellulase and its stability, which leads to the creation of promising nanobiocatalysts for biofuel production. The paper provides examples of nanostructured carriers such as porous nanomaterials, nanogels, polymer nanoparticles, and magnetic nanoparticles.

Keywords: *cellulose; immobilization; nanostructured carriers.*

Дата поступления в редакцию: 05.02.2024.

Дата принятия в печать: 26.02.2024.