

Химическая технология

УДК 542.943-92

DOI 10.26456/vtchem2025.1.10

Мультиферментные системы на основе целлюлазы как перспективные биокатализаторы переработки лигнинцеллюлозного сырья

О.В. Гребенникова¹, А.М. Сульман¹, А.Е. Филатова^{1,2},
Д.В. Балакшина¹

¹ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», г. Тверь

²ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», г. Тверь

В настоящее время миллионы тонн лигноцеллюлозной биомассы ежегодно сжигаются впустую, не принося пользы. Поэтому разработка стратегии использования этого биологического сырья для производства возобновляемых источников энергии является актуальной задачей. В работе было показано, что мультиферментные комплексы, включающие целлюлазу очень эффективны в деградации биомассы. Они могут катализировать ряд реакций, преобразующих сложную биомассу в более простые соединения, которые можно легко трансформировать в биотопливо и другие продукты. Гидролиз сырья с использованием мультиферментных систем помогает избежать многоступенчатых, затратных по времени и дорогостоящих методов. К тому же, такие системы можно применять нескольких повторных рециклах.

Ключевые слова: ферменты, мультиферментная система, целлюлаза.

В настоящее время поиск эффективных способов биотрансформации целлюлозного материала в устойчивые биохимические продукты является актуальным биотехнологическим направлением. Перед учеными стоит задача создания нанобиокатализаторов, стабильных при гетерогенном катализе без ущерба для их каталитической активности. Существует множество стадий переработки лигноцеллюлозной биомассы в прямой источник биотоплива, но наиболее важным этапом является разложение целлюлозы до ферментируемых (промежуточных) сахаров, которые могут быть приемлемыми субстратами для биотоплива [1]. Экологически благоприятным способом переработки биомассы является использование ферментов, которые разлагают целлюлозу до глюкозы [2]. Существует три основных фермента («ферменты целлюлолитического комплекса») разлагающих целлюлозу, в совокупности известные как целлюлаза. Основная функция целлюлазы включают гидролиз полимерной

целлюлозы до мономера глюкозы [3]. Целлюлаза действует последовательно и совместно, чтобы расщепить целлюлозу на мономеры глюкозы. Дальнейшая конверсия образующейся глюкозы дает такие ценные платформенные химикаты, как биоэтанол, бутанол, этиленгликоль, пропиленгликоль, сорбит, глюконовая кислота, леулиновая кислота, гамма-валеролактон и др., востребованные в различных отраслях промышленности [4]. Однако низкая термическая стабильность целлюлазы, нестабильность при хранении, наличие примесей и невозможность ее повторного использования создают большие проблемы во всех этих процессах. Решить данные проблемы можно путем иммобилизации ферментов на различных носителях [5].

Мультиферментативные каскадные реакции, представляющие собой синтез нескольких одновременно протекающих биокаталитических процессов, открывают широкие перспективы и новые возможности для создания высокоценных продуктов. Эти системы оптимизируют биокаталитические процессы, позволяя сократить время и уменьшить количество отходов, в то же время будучи самодостаточными с точки зрения требований к сопутствующим факторам. В условиях растущей потребности в более экологичных и устойчивых методах производства химических веществ и биопродуктов, каскадные реакции выглядят как многообещающий метод, который предлагает альтернативу традиционному последовательному синтезу. Этот подход способен устранить недостатки, связанные с классическими многоступенчатыми процессами, что делает его важным направлением для дальнейших исследований и разработок. В итоге, каскадные реакции открывают новые горизонты в области биокатализа и устойчивого производства.

Совместная иммобилизация нескольких ферментов наряду с целлюлазой представляет собой эффективный подход для повышения эффективности осахаривания лигноцеллюлозной биомассы в целях производства биоэтанола и других ценных химических соединений. Для того чтобы улучшить функциональные характеристики иммобилизованной целлюлазы, можно применять комплекс различных ферментов [6].

Известно, что лакказы могут окислять лигнин и фенольные соединения, присутствующие в лигноцеллюлозной биомассе, и, таким образом, предотвращает их негативное влияние на биокаталитическую активность целлюлазы [7]. Авторы [8] совместно иммобилизовали лакказу и целлюлазу на аминокфункциональные магнитные наночастицы. В этом исследовании было изучено, как ферментная смесь с иммобилизованной лакказой влияет на процессы сахарификации и ферментации. Было обнаружено, что эта смесь снижает количество образующихся фенольных соединений, что способствует более эффективному расщеплению рисовой соломы. Сахарификация рисовой соломы с использованием ферментного коктейля с иммобилизованной

лакказой привела к снижению уровня фенольных соединений на 73,8%. Это, в свою очередь, повысило эффективность процесса осахаривания до 84,6%. Кроме того, было отмечено улучшение работы дрожжей в процессе ферментации. Это привело к более высокой конверсии сахара в этанол – 78,3% и повышению производительности этанола до 0,478 г/л в ч. Таким образом, с помощью полученного биокатализатора стало возможным напрямую получать биоэтанол из рисовой соломы. Имобилизованные лакказа и целлюлаза на мезопористом диоксиде кремния, покрытым оксидом графена, были использованы для экологического применения – разложения метоксихлора в моделируемых загрязненных почвах [9]. Здесь роль оксида графена заключается в повышении термической и кислотной стабильности, а также возможности повторного использования нанобиокатализатора. Была проведена оценка влияния полученного биокатализатора на разложение метоксихлора в почве. Для трех загрязненных почв с концентрацией метоксихлора 25 мг/кг, 50 мг/кг и 100 мг/кг, удаление метоксихлора составило 93.0%, 85.8% и 65.1% соответственно. Гидролиз с помощью иммобилизованных целлюлазы и лакказы может атаковать слабое место молекулы метоксихлора с ее свободным радикалом -ОН и в конечном итоге удалить три атома хлора из молекулы метоксихлора.

Биокатализатор с регулируемой активностью для разрушения клеточных стенок *Nannochloropsis sp.* был получен путем совместной иммобилизации целлюлазы и лизоцима на поверхности аминифункционализированных магнитных наночастиц с использованием глутаральдегида [10]. Конкуренция между целлюлазой и лизоцимом во время иммобилизации была вызвана ограниченными активными центрами магнитных наночастиц. Максимальное восстановление активностей (целлюлазы: 78.9% и лизоцима: 69.6%) было достигнуто за счет синергических эффектов во время совместной иммобилизации двух ферментов. Термическая стабильность с точки зрения периода полураспада совместно иммобилизованных ферментов была в три раза выше, чем в нативной форме, и имела более высокую каталитическую эффективность для гидролиза клеточных стенок. Более того, совместно иммобилизованные ферменты показали большую термическую стабильность и более широкую толерантность к рН, чем свободные ферменты в жестких условиях. Кроме того, совместно иммобилизованные ферменты сохранили до 60% остаточной активности после 6 рециклов. В данном исследовании представлен реальный подход к индустриализации фермента при разрушении клеточных стенок и экстракции липидов из *Nannochloropsis sp.*

Ковалентную иммобилизацию целлюлазы и α -амилазы проводили на аминифункциональных наночастицах Fe_3O_4 , покрытых диоксидом кремния [11]. Ферменты в этом нанобиокатализаторе проявили более

высокую стабильность и большую каталитическую активность, чем нативные ферменты, включая хорошую термическую стабильность (от 50 до 70°C) и стабильность pH (pH 4,5-7,5). Эффективность нанобиокатализатора была продемонстрирована путем извлечения антоцианов из черного риса с максимальным выходом 266 мг антоциана/100 г черного риса. После шести циклов повторного использования целлюлазы и α -амилазы сохранили около 70% и 64% своей активности соответственно. Этот магнитный нанобиокатализатор может быть рекомендован и для других применений в пищевой промышленности, благодаря легкому извлечению и высокой эффективности.

Ковалентное присоединение ксиланазы, целлюлазы и амилаза-кум-глюканотрансферазы к магнитным наночастицам с помощью глутарового альдегида привело к получению многофункционального и магнитно извлекаемого катализатора для эффективного осахаривания биомассы [12]. Ферменты и магнитные наночастицы были полностью охарактеризованы до и после иммобилизации. Было обнаружено, что иммобилизованные ферменты активны при 50°C для синтетических субстратов, а также предварительно обработанной биомассы, полученной из кукурузного початка и рисовой шелухи. Связанные с ферментами магнитные наночастицы показали высокую стабильность при хранении, высокую операционную стабильность, а также высокую пригодность к повторному использованию после 13 рециклов. Таким образом, такие иммобилизованные комбинации ферментов на магнитных наночастицах могут использоваться при осахаривании растительной биомассы.

Биокатализатор, содержащий иммобилизованную лакказу, целлюлазу и β -глюкозидазу, был изучен при осахаривании четырех источников лигноцеллюлозной биомассы, таких как *Typha angustifolia*, *Arundo donax*, *Saccharum arundinaceum* и *Ipomoea carnea* [13]. Совместно иммобилизованная ферментная система была более стабильной при различных температурах и при более длительном хранении по сравнению со свободными ферментами. Результаты показали, что совместная иммобилизация трех ферментов позволяет проводить эффективную предварительную обработку в одной емкости для производства биоэтанола.

Коктейль из ферментов, таких как целлюлазы, гемицеллюлазы, хитиназы, эстеразы, амилазы и т.д., обнаруженный в голоцеллюлазе из *Aspergillus niger SH3* был иммобилизован на нескольких различных классах магнитных наночастиц и показал перспективность при гидролизе рисовой соломы, предварительно обработанной щелочью [14]. Существенным преимуществом этого подхода является то, что все ферменты производятся в одно и то же время, не требуют очистки и

значительно упрощают изготовление нанобиокатализатора. Тот же способ был использован Мьюли и соавт., используя ферментационный бульон культуры *Aspergillus niger*, содержащий целлюлазу, пектиназу и ксиланазу, ковалентно иммобилизованных на магнитных наночастицах с помощью глутарового альдегида [15]. Совместная иммобилизация ферментов после 3 часов инкубации с 30 мМ глутарового альдегида дала максимальное восстановление активности целлюлазы ($80.25 \pm 1.03\%$), пектиназы ($84.76 \pm 1.71\%$) и ксиланазы ($75.62 \pm 0.76\%$) соответственно. Биокаталитические системы показали сдвиг оптимальной температуры с 55 до 60°C с улучшенной толерантностью к рН наряду с небольшим ростом кинетических констант и улучшенными термодинамическими параметрами. Биокатализатор был стабилен в течение 36 дней при 5°C и сохранял >90% активности до 4 циклов. Триферментные магнитные наночастицы были успешно использованы для извлечения пиперина из черного перца, приготовления протопластов клеток сахарного тростника и осветления сока папайи с заметным выходом и возможностью повторного использования по сравнению с традиционными методами.

Смесь целлюлазы, ксиланазы и β -1,3-глюканазы (разлагающей глюкан-хитозан) прикрепляли к наночастицам оксида железа, покрытым кремнеземом содержащий аминокислотные группы на периферии и используемый для гидролиза мякоти жома сахарного тростника в мономерные сахара с высокой активностью и возможностью повторного использования [16]. Биокатализаторы продемонстрировали самую высокую термическую стабильность 95% при 50°C в течение 2 ч и сохранили длительную стабильность хранения 97% по сравнению с 60% его нативного аналога. Кроме того, сшивание позволило повторно использовать ферментную систему в течение как минимум восьми последовательных циклов, сохраняя более 70% его первоначальной активности. К тому же, биокаталитические системы продемонстрировали приблизительно 15%-ное увеличение усвояемости углеводов на жоме сахарного тростника и эвкалиптовой мякоти по сравнению с нативным ферментом.

Надежный метод ковалентной совместной иммобилизации ферментов был разработан Дедиш и др. с помощью способствующих адгезии пептидов, называемых Matter-tags [17]. Авторы использовали три метки вещества – кекропин А (СесА), пик I жидкостной хроматографии (LCI) и тахистатин А2 (ТА2) – которые были соединены с зеленым флуоресцентным белком и двумя ферментами: фитазой и целлюлазой. Было обнаружено, что LCI является универсальным стимулятором адгезии, который позволяет иммобилизовать оба фермента на различных полимерах, металлах и кремниевой пластине в течение ~10 мин при температуре окружающей среды. Авторы полагают, что любые ферменты могут быть иммобилизованы таким образом, это делает его

универсальной платформой для многократной иммобилизации ферментов.

Заключение

Разработка мультиферментных комплексов стала важным способом сделать химические реакции более эффективными и селективными. Одним из основных применений мультиферментных комплексов является производство биотоплива или биоэтанола из биомассы. Биомасса является возобновляемым ресурсом, который может быть преобразован в продукты с добавленной стоимостью с помощью процесса, называемого деградацией биомассы. Разработка мультиферментных комплексов произвела революцию в различных областях, включая производство биотоплива, фармацевтическую промышленность, биосенсоры и другие промышленные применения. Благодаря иммобилизации целлюлазы и других ферментов на различных носителях стали возможны эффективные процессы, которые имеют значительные экономические и экологические преимущества. Мультиферментные системы также могут найти еще больше применений в различных областях промышленности, что приведет к дальнейшему прогрессу в биокатализе и разработке более устойчивых промышленных процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (24-79-10042).

Список литературы

1. Houfani A.A. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars – A review / N. Anders, A.C. Spiess, P. Baldrian, S. Benallaoua // *Biomass Bioenergy*. – 2020. – №134. P. 105481.
2. Arumugam A. Contemporary Pretreatment Strategies for Bioethanol Production from Corncobs: A Comprehensive Review / V.V. Malolan, V. Ponnusami // *Waste Biomass Valorization*. – 2021. – №12. – P. 577–612.
3. Gaurav N. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review / S. Sivasankari, G.S. Kiran, A. Ninawe, J. Selvin // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2017. – Vol. 73. -2. – P. 205-214.
4. Рабинович М.Л. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биodeградации высокоупорядоченных форм целлюлозы / М.С. Мельник // *Успехи биологической химии*. – 2000. – № 40. – С. 205–266.
5. Zanuso E. Enzyme immobilization as a strategy towards efficient and sustainable lignocellulosic biomass conversion into chemicals and biofuels: Current status and perspectives / D.G. Gomes, H.A. Rui, J.A. Teixeira, L. Domingues // *Sustain. Energy Fuels*. – 2021. №5. – P. 4233–4247.

6. Farhan B.A. Multiple strategies for the development of multienzyme complex for one-pot reactions // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2023. – Т.30. – №.24. – P. 64904-64931.
7. Chavan S. Extraction and recovery of lignin derived phenolic inhibitors to enhance enzymatic glucose production / A. Gaikwad // *Biomass Bioenergy*. – 2021. №144. – P. 105897.
8. Kumar V. Enhanced Saccharification and Fermentation of Rice Straw by Reducing the Concentration of Phenolic Compounds Using an Immobilized Enzyme Cocktail / S.K.S. Patel, R.K. Gupta, S.V. Otari, H. Gao, J.-K. Lee, L. Zhang // *Biotechnol. J.* – 2019. – №14. – P. 1800468.
9. Huang Y. Characterization of enzyme-immobilized catalytic support and its exploitation for the degradation of methoxychlor in simulated polluted soils / J. Li, Yang, H. Yuan, Q. Wei, X. Liu, Y. Zhao, C. Ni // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2019 – №26 – P. 28328–28340.
10. Chen, Q. Co-immobilization of cellulase and lysozyme on aminofunctionalized magnetic nanoparticles: An activity-tunable biocatalyst for extraction of lipids from microalgae / D. Liu, C. Wu, K. Yao, Z. Li, N. Shi, F. Wen, I.D. Gates // *Bioresour. Technol.* – 2018. – 263. – P. 317–324.
11. Yi J. Robust and recyclable magnetic nanobiocatalysts for extraction of anthocyanin from black rice / M. Qiu, Z. Zhu, Dong, D.E. Andrew, McClements // *Food Chem.* – 2021. – 364. – P. 130447.
12. Kumari A. Multiple thermostable enzyme hydrolases on magnetic nanoparticles: An immobilized enzyme-mediated approach to saccharification through simultaneous xylanase, cellulase and amylolytic glucanotransferase action / P. Kaila, P. Tiwari, V. Singh, S. Kaul, N. Singhal, P. Guptasarma // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – №120. P. 1650–1658.
13. Kirupa S. Development of co-immobilized tri-enzyme biocatalytic system for one-pot pretreatment of four different perennial lignocellulosic biomass and evaluation of their bioethanol production potential / M. Ravikumar, R. Naresh Kumar, M. Sivakumar // *Bioresour. Technol.* – 2018. – №269. – P. 227–236.
14. Kumar A. Immobilization of indigenous holocellulase on iron oxide (Fe₂O₃) nanoparticles enhanced hydrolysis of alkali pretreated paddy straw / S. Singh, R. Tiwari, R. Goel, L. Nain // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2017. – №96. – P. 538–549.
15. Muley A.B. A tri-enzyme co-immobilized magnetic complex: Process details, kinetics, thermodynamics and applications / A.S. Thorat, R.S. Singhal, B.K. Harinath // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – №118. P. 1781–1795.
16. Periyasamy K. Bioconversion of Lignocellulosic Biomass to Fermentable Sugars by Immobilized Magnetic Cellulolytic Enzyme Cocktails / L. Santhalembi, G. Mortha, M. Arousseau, A. Boyer, S. Subramanian // *Langmuir*. – 2018. – №34. – P. 6546–6555.
17. Dedisch S. A universal immobilization platform for enzymes on polymers, metals, and silicon-based materials / A. Wiens, M.D. Davari, D. Soeder, C. Rodriguez-Emmenegger, F. Jakob, U. Schwaneberg // *Biotechnol. Bioeng.* – 2020. – 117. – P. 49–61.

Об авторах:

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22), e-mail: olechkamatveeva@mail.ru
СУЛЬМАН Александрина Михайловна – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22), e-mail: alexsulman@mail.ru
ФИЛАТОВА Анастасия Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22), доцент кафедры биохимии и биотехнологии, ФГБОУ ВО “Тверской государственный университет” (170100, г. Тверь, ул. Желябова, 33), e-mail: afiletova@mail.ru
БАЛАКШИНА Дарья Вадимовна – магистрант 2 года обучения, Кафедра Биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22), e-mail: dasha.balakshina.01@bk.ru

Multi-enzyme systems based on cellulose as promising biocatalysts for processing lignin-cellulose raw materials

**¹O.V. Grebennikova, ¹A.M. Sulman, ^{1,2}A.E. Filatova,
¹D.V. Balakshina**

¹*Tver State Technical University, Tver*

²*Tver State University, Tver*

Currently, millions of tons of lignocellulosic biomass are burned for nothing every year. Therefore, the development of a strategy for the use of these biological raw materials for the production of renewable energy sources is an urgent task. It has been shown that multi-enzyme complexes including cellulose are very effective in the degradation of biomass. They can catalyze a number of reactions that convert complex biomass into simpler compounds that can be easily transformed into biofuels and other products. Hydrolysis of raw materials using multi-enzyme systems helps to avoid multi-stage, time-consuming and expensive methods. In addition, such systems can be used in multiple repeated recycles.

Keywords: *enzymes, multi-enzyme system, cellulose.*

Дата поступления в редакцию: 22.01.2025.

Дата принятия в печать: 25.01.2025.

