



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 66.081:577.32:577.15

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10695

Изучение *in silico* особенностей и механизмов адсорбции целлюлазы из *Aspergillus niger* на синтетических полимерах

Марина Геннадьевна Холявка^{1,2✉}, Даниил Юрьевич Богомолов¹,
Матвей Александрович Албет², Валерий Григорьевич Артюхов¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, holyavka@rambler.ru✉

²Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

Аннотация. В настоящее время целлюлозно-бумажная промышленность основана преимущественно на химическом гидролизе целлюлозы, что приводит к высокой экологической нагрузке. Остроту проблемы можно уменьшить с помощью применения иммобилизованной целлюлазы. Кроме того, целлюлазы обладают способностью превращать лигноцеллюлозный материал в ферментируемые сахара, используемые в качестве субстратов для образования биотоплива.

Предложен ряд ионообменных смол и волокон, а также производных хитозана для получения композиционных биокатализаторов на основе целлюлазы. Установлено, что синтетические ионообменные смолы АВ-17-2П, КУ-2, волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, а также карбоксиметилхитозан и сульфат хитозана могут применяться в качестве носителей для иммобилизации целлюлазы из *Aspergillus niger* (PDB ID: 5I77).

Данные были получены методом молекулярного докинга в программе AutoDock Vina, проанализированы с помощью LigPlot, визуализация проводилась в программе Maestro 10.3. Вычисление параметров туннелей, пор и внутренних полостей осуществлялось при помощи программы MOLE.

В результате исследования было установлено, что все исследуемые носители для иммобилизации связываются в области активного центра фермента, что может, с одной стороны, привести к его экранированию для субстрата, но, с другой стороны, может возникнуть эффект стабилизации пространственной структуры активного центра целлюлазы.

После адсорбции на большинстве изученных нами носителей молекула целлюлазы приобретает более компактную структуру, о чем свидетельствует уменьшение количества туннелей или их полное отсутствие при образовании комплекса фермента с ВИОН АН-1 и сульфатом хитозана. Исключение составляет только КУ-2, иммобилизация на котором приводит к увеличению количества и длины туннелей в структуре энзима.

Поры в молекуле целлюлазы как до, так и после иммобилизации, отсутствуют. Конфигурация и объем внутренних полостей при связывании целлюлазы с ионообменными материалами не изменяются, а при адсорбции на производных хитозана их объем уменьшается, причем после сорбции на сульфате хитозана одна из внутренних полостей исчезает.

Ключевые слова: целлюлазы, пространственная структура, внутренние полости, туннели, поры, иммобилизация, адсорбция, молекулярный докинг.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

Для цитирования: Холявка М.Г., Богомолов Д.Ю., Албет М.А., Артюхов В.Г. Изучение *in silico* особенностей и механизмов адсорбции целлюлазы из *Aspergillus niger* на синтетических полимерах // Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 5. С. 760-773. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10695>



Original article

The study of *in silico* features and mechanisms of cellulase adsorption from *Aspergillus niger* on synthetic polymers

Marina G. Holyavka^{1,2✉}, Daniil Yu. Bogomolov¹,
Matvey A. Albet², Valery G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, holyavka@rambler.ru✉

²Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

Abstract. Currently, the pulp and paper industry is predominantly based on the chemical hydrolysis of cellulose, which results in a high environmental burden. The severity of the problem can be reduced by the use of immobilized cellulase. In addition, cellulases have the ability to convert lignocellulosic material into fermentable sugars used as substrates for the formation of biofuels.

A number of ion-exchange resins and fibres, as well as chitosan derivatives, have been proposed for the preparation of composite biocatalysts based on cellulase. It has been established that synthetic ion-exchange resins AV-17-2P, KU-2, fibres VION KN-1, VION AN-1, as well as carboxymethyl chitosan and chitosan sulphate can be used as carriers for the immobilization of cellulase from *Aspergillus niger* (PDB ID: 5177).

The data were obtained by molecular docking using the AutoDock Vina program, analysed using LigPlot, visualization was carried out using the Maestro 10.3 program. The parameters of tunnels, pores, and interior cavities were calculated using the MOLE program.

As a result of the study, it was found that all the studied carriers for immobilization bind in the region of the active site of the enzyme, which, on the one hand, can lead to its screening for the substrate, but, on the other hand, the effect of stabilizing the spatial structure of the cellulase active site can occur.

After adsorption on most of the studied carriers, the cellulase molecule acquired a more compact structure, as was evidenced by a decrease in the number of tunnels or their complete absence during the formation of the enzyme complex with VION AN-1 and chitosan sulphate. The only exception was KU-2, immobilization on which led to an increase in the number and length of tunnels in the enzyme structure.

There were no pores in the cellulase molecule both before and after immobilization. The configuration and volume of interior cavities did not change when cellulase had bound to ion-exchange materials, while adsorption on chitosan derivatives reduced their volume, and after sorption on chitosan sulphate, one of the internal cavities disappeared.

Keywords: cellulases, spatial structure, internal cavities, tunnels, pores, immobilization, adsorption, molecular docking.

Acknowledgments: the study received financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of State Contract with universities regarding scientific research in 2020-2022, project no. FZGU-2020-0044.

For citation: Holyavka M.G., Bogomolov D.Yu., Albet M.A., Artyukhov V.G. The study of *in silico* features and mechanisms of cellulase adsorption from *Aspergillus niger* on synthetic polymers. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2022. 22(5): 760-773. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10695>

Введение

Целлюлоза является одним из самых распространенных органических материалов в мире, и использование отходов целлюлозной промышленности в качестве сырья для производства этанола является многообещающим подходом к устойчивому удовлетворению текущих и будущих потребностей человечества в энергии.

Ферментативный гидролиз целлюлозы является наиболее эффективным путем ее

промышленной переработки, поскольку биокатализаторы обладают высокой специфичностью и активностью. Среди продуктов реакции в данном случае не образуется большого количества токсичных соединений, что приводит к снижению экологической нагрузки производственного процесса, а также расходов на утилизацию отходов.

Целлюлазы представляют собой группу ферментов, катализирующих гидролиз целлюлозы. Для эффективного расщепления лигноцеллюлозного материала



требуется смесь ферментов, преимущественно целлюлаз и гемицеллюлаз [1]. Существует три типа ферментов, осуществляющих гидролиз целлюлозы: эндоглюканазы (КФ 3.2.1.4), ответственные за случайное расщепление внутренних областей аморфной структуры целлюлозного волокна; целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91), действующие, главным образом, на кристаллическую часть целлюлозы и катализирующие отщепление глюкозы или целлобиозы с концов целлюлозного волокна; β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21), которые не считаются истинными целлюлазами и не действуют непосредственно на целлюлозу, однако, они тесно связаны с процессом ее гидролиза, поскольку действуют на олиго- и дисахариды, в большинстве случаев на целлобиозу [2-4].

Действие целлюлаз на целлюлозное волокно осуществляется в основном в 4 этапа: адсорбция, комплексообразование, гидролиз и десорбция. Первый шаг относится к связыванию целлюлозы с соответствующими участками на поверхности молекулы фермента, второй – к расположению целлюлозы в непосредственной близости к активному центру целлюлазы. Третий – к гидролизу субстрата, последний – к диффузии продукта в жидкую фазу [5]. Ядром этого процесса являются участки связывания углеводов, которые принимают на себя важную роль распознавания субстрата, вызывают аморфогенез и дезорганизацию волокна [6].

Целлюлазы являются одной из распространенных групп ферментов, применяемых в промышленности для обработки тканей, для придания им мягкости и улучшения структуры [7-9], кроме того, их используют для сохранения цвета волокон [10, 11]. В бумажной и целлюлозной промышленности гемицеллюлазы и целлюлазы применяют для модификации биохимического процесса варки грубой пульпы и улучшения ее прочности [12,

13]. Они одинаково полезны для деполяризации переработанной целлюлозы, а также для повышения эффективности бумажных фабрик [14, 15]. Целлюлазы применяются для удаления тонеров и покрытий с бумаги [16, 17], в производстве биоразлагаемого картона [18], для улучшения текстуры продукта при изготовлении гигиенической бумаги и бумажных полотен [19-21].

Производство биотоплива путем биоконверсии лигноцеллюлозных отходов – одно из недавно предложенных направлений применения целлюлаз. Целлюлазы обладают способностью превращать лигноцеллюлозный материал в ферментируемые сахара, такие как глюкоза и мальтоза, используемые в качестве субстратов для образования биоэтанола [22-24].

Однако использование свободных форм энзимов сопровождается рядом недостатков. Самыми большими проблемами при оптимизации производства и, следовательно, повышении осуществимости крупномасштабного промышленного применения являются стабильность и возможность повторного использования ферментов. Данные проблемы решаются путём иммобилизации биокатализаторов на твердых нерастворимых носителях, что делает их пригодными для повторного использования и снижает эксплуатационные расходы, связанные с использованием энзимов [25, 26].

Наиболее простым и дешевым среди физических методов иммобилизации является адсорбция молекул фермента за счет слабых водородных связей, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных и электростатических взаимодействий. При этом конформационная подвижность биокатализатора сохраняется на достаточно высоком уровне [27].

Целью нашей работы является изучение механизмов взаимодействия ионообменных материалов АВ-17-2П, КУ-2, ВИОН АН-1, ВИОН КН-1, а также сульфата хитозана и карбоксиметилхитозана



с целлюлазой из *Aspergillus niger* (PDB ID: 5I77).

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования выступал фермент целлюлаза из *Aspergillus niger* (PDB ID: 5I77, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/5I77>). В качестве потенциальных носителей для иммобилизации мы рассматривали ионообменные смолы АВ-17-2П, КУ-2, ионообменные волокна ВИОН АН-1 и ВИОН КН-1, производные хитозана – сульфат хитозана и карбоксиметилхитозан. Подробная характеристика носителей дана в работах [28-30].

Связывание носителя с ферментом моделировали методом молекулярного докинга с помощью программы AutoDock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit/>). Визуализацию моделей пространственных структур осуществляли с помощью программы Maestro 10.3 (<https://www.schrodinger.com/products/maestro>). Взаимодействия между молекулой носителя и молекулой фермента анализировали программой LigPlot (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>).

Вычисление параметров туннелей, пор и внутренних полостей осуществлялось при помощи программы MOLE (<http://mole.chemi.muni.cz/>). В качестве внутренней полости выступает закрытое пространство внутри молекулы фермента, которое не имеет точек выхода на поверхность глобулы. Порой называется углубление на поверхности или в толще белковой молекулы, которое сообщается с её поверхностью только через единственное отверстие. Туннелем считается сквозное отверстие в белковой молекуле, сообщающееся с её поверхностью через два или более отверстия.

In silico нами были исследованы поверхности моделей целлюлаз до и после ее адсорбции на предлагаемых нами носителях. Вычислены расстояния (r) между аминокислотными остатками на

поверхности фермента на основе координат атомов в их составе по формуле:

$$r = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2},$$

где x_1 и x_2 – координаты атомов двух аминокислот по оси абсцисс, y_1 и y_2 – координаты атомов аминокислот по оси ординат, z_1 и z_2 – координаты по оси аппликат. В случае, если расстояние между ближайшими друг к другу атомами двух аминокислот не превышало 10 Å, они были отнесены нами к одному скоплению [31].

Обсуждение результатов

Аминокислотный состав и расположение контактных участков при связывании целлюлазы с исследуемыми носителями.

Связи и взаимодействия носителей АВ-17-2П, КУ-2, ВИОН АН-1 и ВИОН КН-1 с целлюлазой из *Aspergillus niger* (PDB ID: 5I77) представлены в табл. 1 и на рис. 1.

В активный центр целлюлазы из *Aspergillus niger* входят Glu160 и Glu267. Субстрат-связывающий центр фермента образуют 15 аминокислотных остатков: Glu43, Phe44, Gly45, Asp55, His120, Tyr122, Glu160, Tyr227, Ser233, Gly234, Glu267, Trp300, Trp305, Trp306, Tyr309. [32]. При этом только один из них (Asp55) не принимает участия в формировании связей и взаимодействий ни с одним из полимеров-носителей.

Интересно отметить, что практически все изученные нами носители для иммобилизации целлюлазы образуют связи и взаимодействия с аминокислотными остатками из ее субстрат-связывающего и активного центров. Исключения составили только следующие типы полимеров:

1. целлюлаза не образует ни одной водородной связи с анионитом АВ-17-2П;
2. связи и взаимодействия целлюлазы с катионитом КУ-2 не затрагивают активный центр фермента.

Функциональная группа анионита АВ-17-2П $-N^+(CH_3)_3$ не имеет протонакцепторной группировки, необходимой для образования водородной связи, поэтому между четвертичным аммониевым основа-

Таблица 1. Аминокислотные остатки целлюлазы, формирующие связи и взаимодействия с носителями для ее иммобилизации

Table 1. Amino acid residues of cellulase forming bonds and interactions with carriers for its immobilization

Носитель	Водородные связи, их длина	Иные типы взаимодействий
АВ-17-2П	Водородные связи не обнаружены	Glu43, Phe44, Gly45, Met80, Glu82, His120, Asn121, Tyr122, Arg124, Glu160, His162, Tyr227, Ser233, Gly234, Trp300, Trp305, Trp306, Tyr309
КУ-2	His120 (3.29 Å) Tyr122 (3.10 Å) Trp305 (2.88 Å) Trp306 (2.89 Å) Asp308 (3.02 Å)	Glu43, Phe44, Gly45, Trp300, Tyr309
ВИОН АН-1	Tyr227 (2.87 Å) Glu267 (2.89 Å) Trp300 (2.82 Å)	Glu43, Phe44, Gly45, His120, Tyr122, Glu160, Trp197, Gly199, Trp201, His225, Gln226, Gly232, Ser233, Gly234, Thr235, Trp306 Tyr309
ВИОН КН-1	Glu43 (2.93 Å) Tyr122 (2.99 Å) Gly232 (2.84 Å) Ser233 (2.99 Å) Trp300 (2.95 Å) Tyr309 (3.00 Å)	His120, Glu160, Trp197, Tyr227, Trp306
Карбоксиметилхитозан	Glu43 (3.03 Å) Gly45 (2.36 Å) Glu82 (3.32 Å и 3.11 Å) Gly127 (2.93 Å) Glu160 (2.88 Å) Tyr309 (2.74 Å)	Phe44, Thr46, Met80, His120, Tyr122, Arg124, Tyr125, His162, Tyr227, Ser233, Thr235, Trp300
Сульфат хитозана	Tyr122 (3.02 Å) Ser196 (3.09 Å и 3.03 Å) Trp201 (3.06 Å) Thr202 (2.97 Å) Ser233 (2.85 Å) Glu267 (3.23 Å)	Glu43, Phe44, His120, Glu160, Asp163, Trp197, Gly199, Gln226, Tyr227, Asp231, Gly232, Thr235, Trp300, Trp306

*жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки, которые входят в субстрат-связывающий центр фермента, в рамку обведены остатки, составляющие активный центр целлюлазы

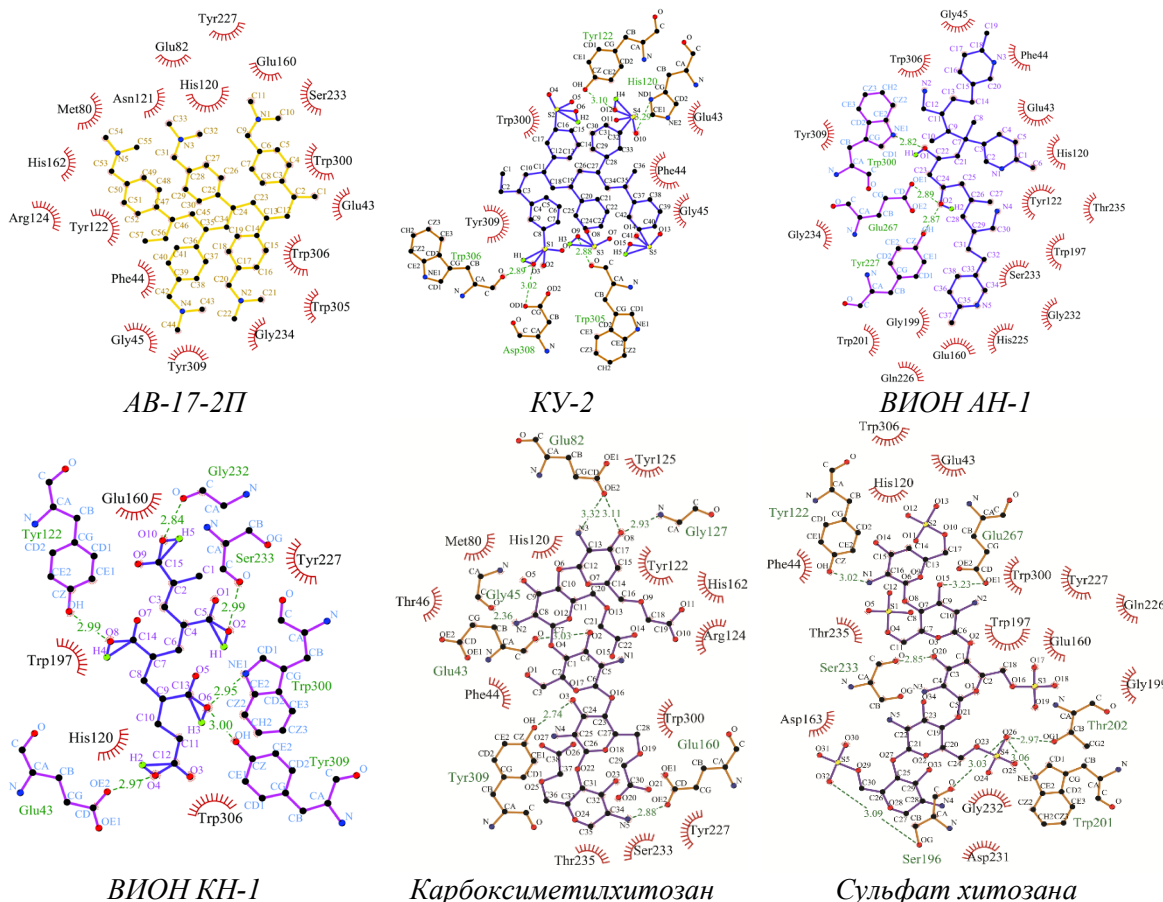


Рис. 1. Связи и взаимодействия между целлюлазой и носителями для ее иммобилизации (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å)
 Fig. 1. Bonds and interactions between cellulase and carriers for its immobilisation (dotted lines indicate hydrogen bonds, bond lengths are given in Å)

нием матрицы носителя и его проти-воионом (участок на поверхности молекулы целлюлазы) образуются ионные пары [33].

На рис. 2 видно, что носители связываются с целлюлазой в непосредственной близости к активному центру. Вероятно, благодаря перекрытию некоторых аминокислотных остатков из субстрат-связывающего и активного центров целлюлазы и тех, которые участвуют в процессах адсорбции фермента на полимерах, могут возникнуть эффекты модуляции каталитической активности энзима при его иммобилизации.

Изменение внутренних структур молекулы целлюлазы (туннелей, полостей и пор) при ее связывании с исследуемыми носителями. Трехмерная структура белка включает очень сложную систему пустот,

таких как внутренние полости, поры и туннели, которые играют существенную роль во многих биологических процессах, поскольку представляют собой подходящую микросреду для биохимических реакций [34, 35]. Во многих ферментах полости скрыты глубоко внутри гидрофобного ядра, экранированы от молекул воды и доступны для растворителя через систему туннелей [36]. Специфичность фермента определяется не только взаимодействием белка с субстратом в активном центре, но также зависит от селективности этих туннелей, которая определяется размером, формой и физико-химическими свойствами аминокислотных остатков, выстилающих их

[37]. Длины и количество туннелей в составе макромолекулы в кристаллическом состоянии и в комплексе с различными лигандами представлены в табл. 2. Профили этих туннелей отражены на рис. 3, расположение туннелей и внутренних полостей в молекуле отражено на рис. 4. Объемы внутренних полостей приведены

в табл. 3. В составе пространственных структур целлюлазы как свободной, так и в комплексе с изученными нами лигандами пор не обнаружено.

В молекуле целлюлазы из *Aspergillus niger* (PDB ID: 5I77) выявлено 2 туннеля, которые после ее иммобилизации на всех исследуемых носителях не сохраняются.

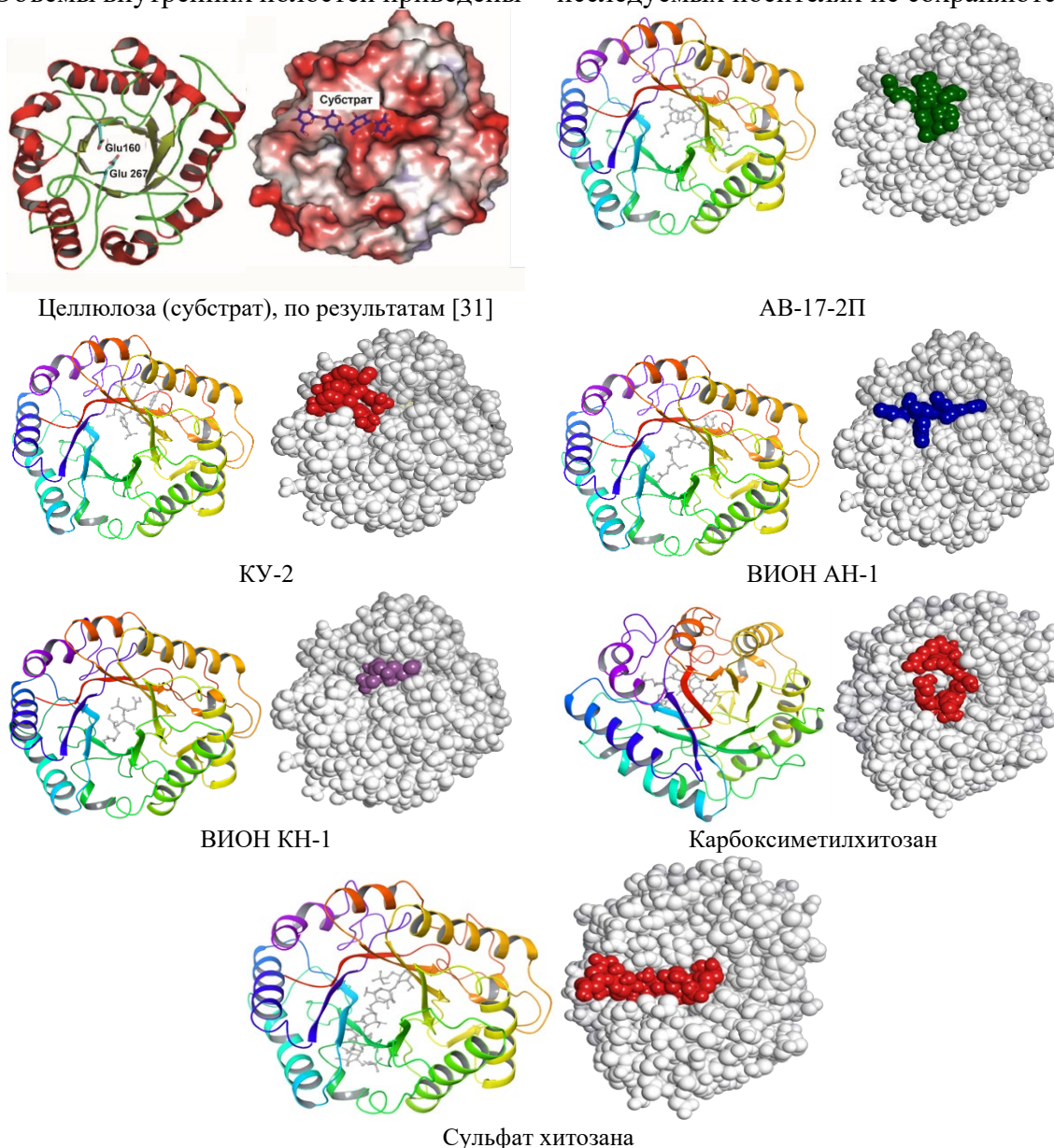


Рис. 2. Участки связывания молекулы целлюлазы из *Aspergillus niger* с различными лигандами: слева представлена модель, отражающая вторичную структуру фермента, справа – модель поверхности молекулы, на которой цветом выделена молекула лиганда

Fig. 2. The binding sites of the cellulase molecule from *Aspergillus niger* with different ligands: the model that reflects the secondary structure of the enzyme is shown on the left, the model of the surface of the molecule, on which the ligand molecule is highlighted in colour is shown on the right

После адсорбции на АВ-17-2П, ВИОН КН-1 и карбоксиметилхитозане в структуре фермента наблюдается лишь один туннель, после связывания с ВИОН АН-1 и сульфатом хитозана туннели в структуре фермента исчезают и только после взаимодействия с матрицей КУ-2 молекула энзима приобретает более «рыхлую» структуру, включающую 3 туннеля,

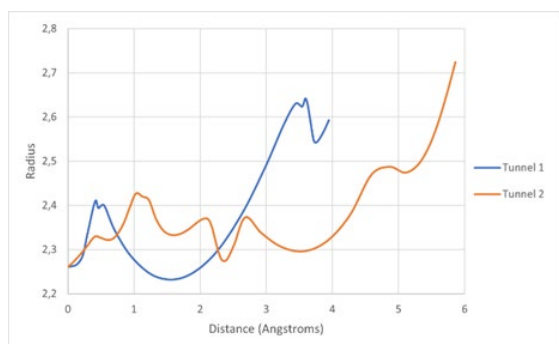
два из которых по своей длине превышают туннели из других полученных нами моделей. Один из туннелей длиной 9.38 Å наблюдается сразу у трех моделей целлюлазы, а именно при ее адсорбции на АВ-17-2П, КУ-2 и карбоксиметилхитозане. Конфигурация и объем внутренних полостей при связывании целлюлазы с ионообменными материалами не изменяются, а при адсорбции на производных хитозана

Таблица 2. Количество и длины туннелей (в ангстремах) в составе пространственной структуры целлюлазы в комплексе с различными лигандами

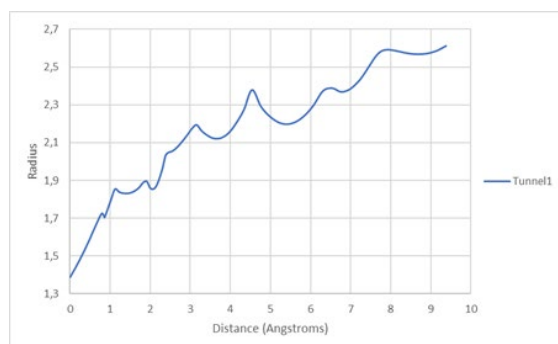
Table 2. The number and lengths of tunnels (in angstroms) in the spatial structure of cellulase in a complex with various ligands

Лиганд	Туннель 1	Туннель 2	Туннель 3
Без лиганда	3.95	5.86	-
АВ-17-2П	9.38	-	-
КУ-2	11.47	15.86	9.38
ВИОН КН-1	9.14	-	-
ВИОН АН-1	-	-	-
Карбоксиметилхитозан	9.38	-	-
Сульфат хитозана	-	-	-

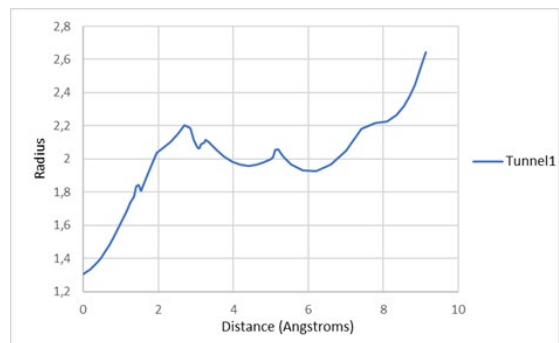
*жирным шрифтом обозначен туннель, одинаковый по всем характеристикам у трех моделей фермента



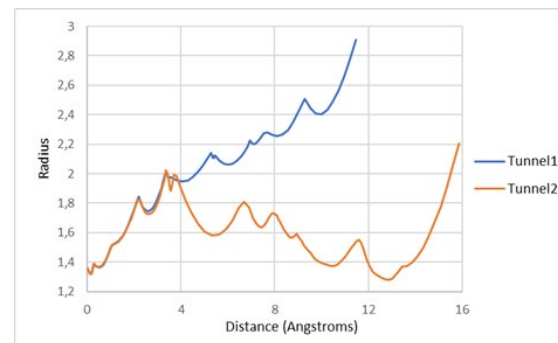
Свободный фермент без лиганда



Одинаковый туннель в составе целлюлазы в комплексе с АВ-17-2П, КУ-2, карбоксиметилхитозаном



Целлюлаза в комплексе с ВИОН КН-1



Остальные туннели в составе целлюлазы в комплексе с КУ-2

Рис. 3. Профили туннелей в составе целлюлазы из *Aspergillus niger*
 Fig. 3. Tunnel profiles in cellulase from *Aspergillus niger*

их объем уменьшается, причем после сорбции на сульфате хитозана одна из внутренних полостей исчезает. Таким образом, адсорбционная иммобилизация

целлюлазы на сульфате хитозана модифицирует ее структуру в наибольшей степени – исчезают оба туннеля и одна внутренняя полость, т.е. молекула становится более компактной.

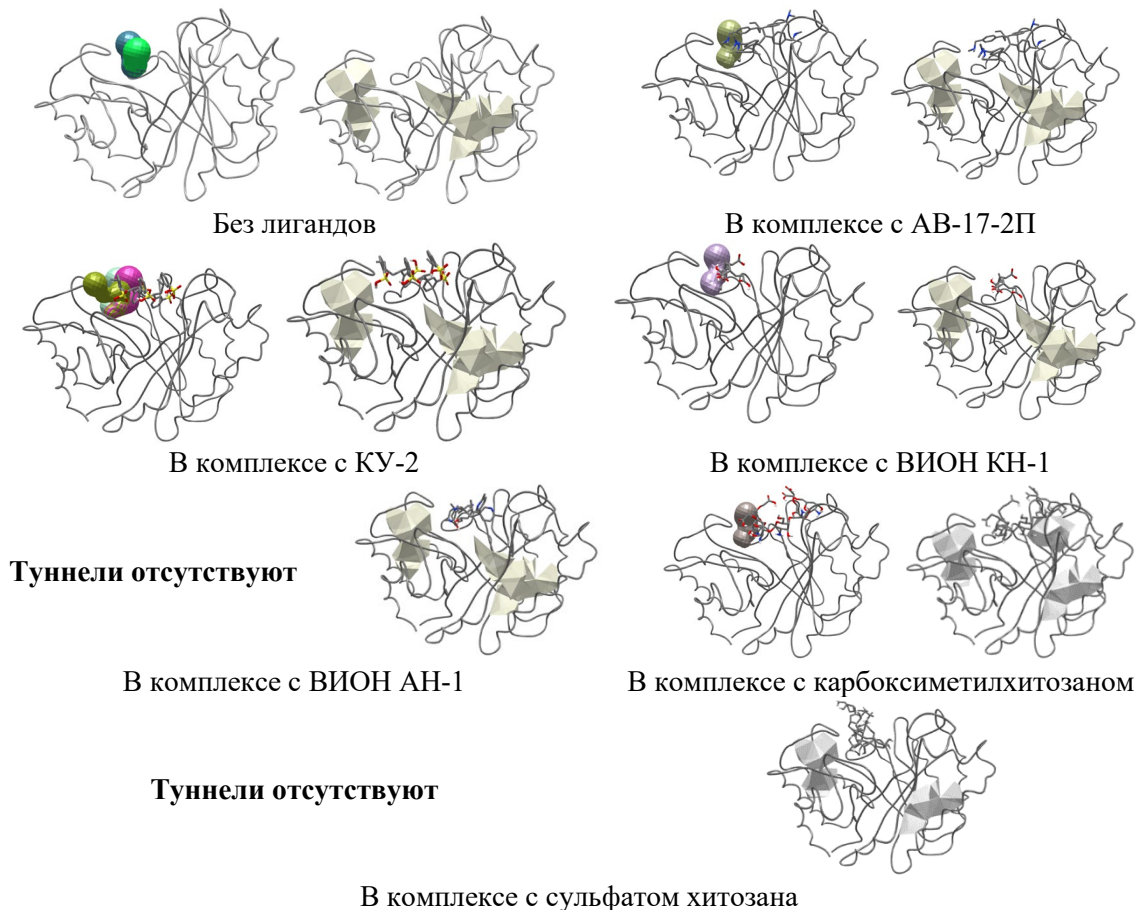


Рис. 4. Туннели (слева) и внутренние полости (справа) в составе моделей целлюлазы из *Aspergillus niger*

Fig. 4. Tunnels (left) and internal cavities (right) in cellulase models from *Aspergillus niger*



Рис. 5. Локализация скоплений заряженных аминокислотных остатков в составе модели целлюлазы из *Aspergillus niger* как до, так и после ее иммобилизации

Fig. 5. Localization of accumulations of charged amino acid residues in the cellulase model from *Aspergillus niger* both before and after immobilization

Таблица 3. Объемы внутренних полостей (нм³) в составе пространственной структуры целлюлазы в комплексе с различными лигандами

Table 3. Volumes of internal cavities (nm³) as part of the spatial structure of cellulase in a complex with various ligands

Лиганд	Полость 1	Полость 2	Полость 3	Полость 4	Суммарный объем полостей
Без лиганда	0.21644	0.15131	0.11861	0.11453	0.60089
АВ-17-2П	0.21644	0.15131	0.11861	0.11453	0.60089
КУ-2	0.21644	0.15131	0.11861	0.11453	0.60089
ВИОН КН-1	0.21644	0.15131	0.11861	0.11453	0.60089
ВИОН АН-1	0.21644	0.15131	0.11861	0.11453	0.60089
Карбоксиметилхитозан	0.19873	0.14999	0.14569	0.10092	0.59533
Сульфат хитозана	0.19873	0.14999	0.10092	-	0.44964

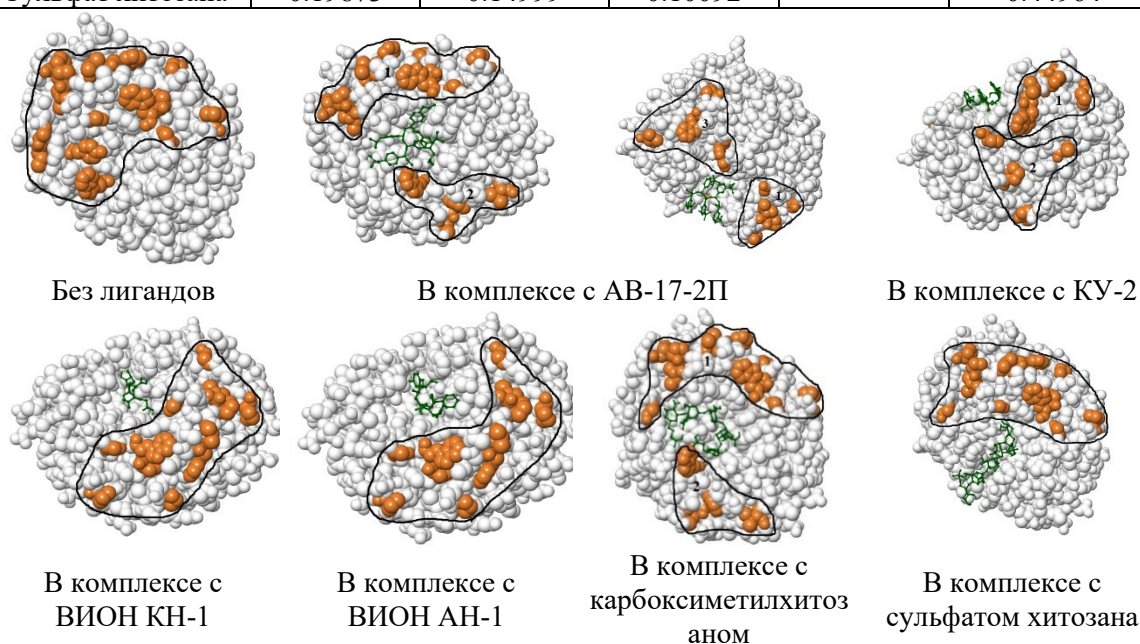


Рис. 6. Локализация скоплений гидрофобных аминокислотных остатков в составе моделей целлюлазы из *Aspergillus niger*

Fig. 6. Localization of accumulations of hydrophobic amino acid residues in the composition of cellulase models from *Aspergillus niger*

Таблица 4. Аминокислотный состав скоплений заряженных аминокислотных остатков в составе пространственной структуры целлюлазы в комплексе с различными лигандами

Table 4. Amino acid composition of clusters of charged amino acid residues in the spatial structure of cellulase in a complex with various ligands

	Аминокислотные остатки
Скопление 1	Asp69, Lys70, Asp274, Arg277, Glu285, Asp317, Asp326, Glu329
Скопление 2	Asp87, Asp94, Glu95, Glu96, Asp135
Скопление 3	Lys106, Asp110, Lys148, Asp149, Asp151
Скопление 4	Glu128, Asp163, Asp165, Asp167
Скопление 5	Asp208, Asp205, Lys211, Asp218, Glu247, Glu251, Lys257, Asp258, Lys260, Asp292

Таблица 5. Аминокислотный состав скоплений гидрофобных аминокислотных остатков в составе пространственной структуры целлюлазы в комплексе с различными лигандами
 Table 5. Amino acid composition of clusters of hydrophobic amino acid residues in the spatial structure of cellulase in a complex with various ligands

Лиганд	Скопление 1	Скопление 2	Скопление 3
Без лиганда	Gly45, Ile48, Pro49, Val51, Trp52, Pro61, Pro86, Tyr122, Gly127, Ile129, Trp197, Pro304, Trp305, Gly307, Pro316	-	-
AB-17-2П	Ile48, Pro49, Val51, Trp52, Pro61, Pro86, Pro304, Trp305, Gly307, Pro316	Trp197, Trp201, Val204, Val240	-
КУ-2	Ile48, Pro49, Val51, Trp52, Pro86, Gly127	Pro61, Ala99, Gly111, Gly112, Pro304	Trp197, Trp201, Val204, Val240
ВИОН КН-1	Gly45, Ile48, Pro49, Val51, Trp52, Pro61, Pro86, Gly127, Pro304, Trp305, Gly307, Pro316	-	-
ВИОН АН-1	Ile48, Pro49, Val51, Trp52, Pro61, Pro86, Gly127, Pro304, Trp305, Gly307, Pro316	-	-
Карбоксиметилхитозан	Ile48, Pro49, Val51, Trp52, Pro61, Pro86, Gly127, Pro304, Trp305, Gly307, Pro316	Trp197, Trp201, Val204, Val240	-
Сульфат хитозана	Gly45, Ile48, Pro49, Val51, Trp52, Pro61, Pro86, Gly127, Pro304, Trp305, Gly307, Pro316	-	-

Состав и локализация скоплений заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности целлюлазы при ее связывании с исследуемыми носителями.

В пространственной структуре целлюлазы из *Aspergillus niger* (PDB ID: 5I77) обнаружено 4 скопления заряженных аминокислотных остатков. После адсорбции на всех исследуемых носителях количество, локализация (рис. 5) и аминокислотный состав (табл. 4) этих скоплений

не изменяются. Для скоплений гидрофобных аминокислотных остатков, напротив, наблюдаются изменения их состава (табл. 5), количества и локализации (рис. 6) при связывании с различными типами носителей.

Заключение

В настоящее время целлюлазы являются перспективными промышленными



катализаторами. Применение энзимов данной группы позволяет снизить экологическую нагрузку и затратность целлюлозно-бумажной промышленности. Кроме того, целлюлазы могут быть использованы в производстве биотоплива, которое также имеет низкую стоимость и отличается значительной экологичностью.

Свободные формы фермента обладают рядом недостатков, таких как низкая стабильность к агрессивным условиям реакционной среды, трудности в отделении катализатора от конечного продукта, а также ограниченный срок хранения и низкий потенциал к регулированию моментов начала и конца реакции. Данные проблемы в значительной степени решаются путем иммобилизации энзимов, в связи с чем значительные перспективы имеют исследования взаимодействий белковых глобул с полимерами различной природы.

В работе изучен механизм взаимодействия целлюлазы из *Aspergillus niger* с по-

тенциальными носителями для ее иммобилизации и вероятные изменения в структуре молекулы фермента после связывания с полимерами различного типа. Установлено, что адсорбционная иммобилизация целлюлазы на сульфате хитозана модифицирует ее структуру в наибольшей степени по сравнению с другими изученными нами носителями – исчезают оба туннеля и одна внутренняя полость, т.е. молекула становится более компактной.

Представленные в работе данные имеют значительную ценность при проектировании промышленных катализаторов на основе целлюлазы, иммобилизованной на представленных в работе типах носителей.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Orencio-Trejo M., la Torre-Zavala D., Rodriguez-Garcia A., Avilés-Arnaut H., Gastelum-Arellanez A. Assessing the performance of bacterial cellulases: the use of *Bacillus* and *Paenibacillus* strains as enzyme sources for lignocellulose saccharification. *BioEnergy Research*. 2016; 9(4): 1023-1033. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9797-0>
2. Jørgensen H., Pinelo M. Enzyme recycling in lignocellulosic biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2017; 11(1): 150-167. <https://doi.org/10.1002/bbb.1724>
3. Kubicek C.P., Kubicek E.M. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. *Current opinion in chemical biology*. 2016; 35: 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.08.028>
4. Silva C.O., Vaz R.P., Filho E.X. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into

the lignocellulosic biorefinery concept. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2018; 12(2): 277-289. <https://doi.org/10.1002/bbb.1832>

5. Jeoh T., Cardona M.J., Karuna N., Mudinoor A.R., Nill J. Mechanistic kinetic models of enzymatic cellulose hydrolysis – a review. *Biotechnology and bioengineering*. 2017; 114(7): 1369-1385. <https://doi.org/10.1002/bit.26277>

6. Rahikainen J.L., Evans J.D., Mikander S., Kalliola A., Puranen T., Tamminen T., Kruus K. Cellulase–lignin interactions – the role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. *Enzyme and microbial technology*. 2013; 53(5): 315-321. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.07.003>

7. Xia L., Cen P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*. 1999; 34(9): 909-912. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00015-1)



8. Belghith H., Chaabouni S. E., Gargouri A. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology*. 2001; 28(2-3): 253-258. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00322-7](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00322-7)
9. Galante Y.M., De Conti A., Monteverdi R. Application of *Trichoderma* enzymes in the textile industry. *Trichoderma & Gliocladium*. 1998; 2: 311-325.
10. Kvietok L.L., Trinh T., Hollingshead J.A. US Patent. no. 5445747, 1995.
11. Galante Y.M., Formantici C. Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. *Current organic chemistry*. 2003; 7(13): 1399-1422. <https://doi.org/10.2174/1385272033486468>
12. Bedford M.R., Morgan A.J., Fowler T., Clarkson K.A., Ward M.A., Collier K.D., Larenas E.A. US Patent. no. 6562340, 2003.
13. Akhtar M. Biochemical pulping of aspen wood chips with three strains of *Ceriporiopsis subvermispora*, *Holzforchung*. 1994; 48: 199-202. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1994.48.3.199>
14. Oksanen T., Pere J., Buchert J., Viikari L. The effect of *Trichoderma reesei* cellulases and hemicellulases on the paper technical properties of never-dried bleached kraft pulp, *Cellulose*. 1997; 4(4): 329-339. <https://doi.org/10.1023/A:1018456411031>
15. Prasad D.Y., Heitmann J.A., Joyce T.W. Enzyme deinking of black and white letterpress printed newsprint waste. *Progress in paper recycling*. 1992; 1(3): 21-30.
16. Pere J., Paavilainen J., Siikaaho M., Cheng Z., Viikari L. Potential use of enzymes in drainage control of nonwood pulps. 1996, Proceedings, *3rd International Nonwood fiber pulping and papermaking conference*, Peter Lang Publishing Group., 421-430.
17. Franks N.E., Bazewicz S.E., Holm H.C. US Patent No. 5525193, 1996.
18. Kubicek C.P. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. *Trichoderma and Gliocladium*. 1998; 2: 357-378.
19. Salkinoja-Salonen M., US Patent No. 4980023, 1990.
20. Hsu J.C., Lakhani N.N., US Patent No. 6413363, 2002.
21. Sharyo M., Sakaguchi H., Ohishi M., Takahashi M., Kida K., Tamagawa H., Schulein M. Franks N., US Patent No. 6468391, 2002.
22. Martin J.W., US Patent No. 4092175, 1978.
23. Deshpande V., Keskar S., Mishra C., Rao M. Direct conversion of cellulose/hemicellulose to ethanol by *Neurospora crassa*. *Enzyme and microbial technology*. 1986; 8(3): 149-152. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90103-1)
24. Sudha Rani K., Swamy M.V., Seenayya G. Increased ethanol production by metabolic modulation of cellulose fermentation in *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology letters*. 1997; 19(8): 819-823. <https://doi.org/10.1023/A:1018312931542>
25. Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G. Characteristics of inulinases: methods for regulation and stabilization of their activity. *Biotechnology in Russia*. 2012; 1: 43-63.
26. Artyukhov V.G., Kholyavka M.G., Kovaleva T.A. Structural and functional properties of inulinases. Ways to regulate their activity. *Biophysics*. 2013; 58(4): 493-501.
27. Holyavka M.G., Kayumov A.R., Baydamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Y., Trushin M.V., Artyukhov V.G. Efficient fructose production from plant extracts by immobilized inulinases from *Kluyveromyces marxianus* and *Helianthus tuberosus*. *International journal of biological macromolecules*. 2018; 115: 829-834. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.107>
28. Kholyavka M.G., Kovaleva T.A., Khrupina E.A., Volkova S.A., Artyukhov V.G. Design of a heterogeneous enzymatic preparation on the basis of immobilized inulinase from *Helianthus tuberosus*. *Biotechnology in Russia*. 2012; 6: 31-41.
29. Ol'shannikova S.S., Malykhina N.V., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Kholyavka



M.G., Artyukhov V.G. Razrabotka biokatalizatora na osnove papaina, stabilizirovannogo v kompleksakh s khitozonom i ego proizvodnymi: karboksimetilkhitozonom i N-(2-gidroksi)propil-3-trimetilammonii khitozonom. *Biotehnologiya*. 2022; 38(1): 39-46.

30. Gorbacheva I.I., Skorikova E.E., Vikhoreva G.A., Gal'braikh L.S., Babievskii K.K. Stroenie i svoistva sul'fata khitozana. *VMS. Seriya A*. 1991; 9: 1899-1904.

31. Sakibaev F.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. Certificate of state registration of the computer program. No 2019616471, 2019.

32. Yan J., Liu W., Li Y., Lai H.L., Zheng Y., Huang J.W., Guo R.T. Functional and structural analysis of *Pichia pastoris*-expressed *Aspergillus niger* 1, 4- β -endoglucanase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016; 475(1): 8-12.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.012>

33. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Eliseeva T.V., Voronyuk I.V., Karpov S.I., Belanova N.A., Mironenko N.V., Sinyaeva L.A. Mezhmolekulyarnye vzaimodejstviya i

obrazovanie peresyshchennykh rastvorov aminokislot v faze vysokoosnovnogo anionita. Soobshchenie 1. *Vestnik VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya*. 2021;1: 20-35. (In Russ.)

34. Janin J., Chothia C., The structure of protein-protein recognition sites. *Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265(27): 16027-16030.

35. Zvelebil M.J.J.M., Thornton J.M., Peptide-protein interactions: an overview. *Quarterly reviews of biophysics*. 1993; 26(3): 333-363.

36. Petrek M., Otyepka M., Banas P., Kosinova P., Koca J., Damborsky J. CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC bioinformatics*. 2006; 7(1): 316.

37. Chaloupkova R., Sykorova J., Prokop Z., Jesenska A., Monincova M., Pavlova M., Tsuda M., Nagata Y., Damborsky J., Modification of activity and specificity of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 by engineering of its entrance tunnel. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(52): 52622-52628.

Информация об авторах / Information about the authors

М.Г. Холявка – профессор кафедры биофизики и биотехнологии, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

Д.Ю. Богомолов – студент кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

М.А. Албет – студент кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

В.Г. Артюхов – д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

M.G. Holyavka – Ph.D. (biology), professor of department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, professor of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation, e-mail: holyavka@rambler.ru

D.Yu. Bogomolov – student, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: danyabogomol-off@yandex.ru

M.A. Albet – student of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

V.G. Artyukhov – Ph.D. (biology), professor, Head of the Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 15.09.2022; одобрена после рецензирования 04.12.2022; принята к публикации 11.12.2022.

The article was submitted 15.09.2022; approved after reviewing 04.12.2022; accepted for publication 11.12.2022.