

УДК 577.15, 663.15

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ СМЕСЯМИ МУТАНТНЫХ ФОРМ ЦЕЛЛЮЛАЗ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

А.С. Доценко, А.В. Гусаков\*, А.М. Рожкова, П.В. Волков, О.Г. Короткова,  
А.П. Сеницын

(Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; \*e-mail: avgusakov@enzyme.chem.msu.ru)

Целлюлазы – главные компоненты ферментных комплексов, применяемых в процессах биоконверсии возобновляемого лигноцеллюлозного сырья в различные полезные продукты. Проведено сравнение гидролитической способности смесей на основе гомогенных рекомбинантных эндоглюканазы II, целлобиогидролаз I и II дикого типа из гриба *Penicillium verruculosum* (в присутствии β-глюкозидазы из *Aspergillus niger*) со смесями мутантных форм этих ферментов при гидролизе целлюлозосодержащих материалов, а также изучено влияние температуры и концентрации субстратов на выход глюкозы. Мутантные целлюлазы представляли собой белки, в которых часть N-связанных гликанов была удалена методом сайт-направленного мутагенеза. При гидролизе микрокристаллической целлюлозы и измельченной осиновой древесины под действием смесей на основе мутантных форм целлюлаз выходы глюкозы через 24–72 ч ферментативной реакции были выше по сравнению с композициями исходных ферментов на 31–38 и 11–27% соответственно. При варьировании температуры в диапазоне 40–60 °С для смесей мутантных форм ферментов наиболее высокие концентрации продукта были достигнуты при 50 °С. Увеличение концентрации субстрата в реакционной смеси с 5 до 50 г/л при сохранении общей дозировки ферментов приводит к повышению выхода глюкозы в 2,6–2,8 раза, однако при этом снижается степень конверсии целлюлозы.

**Ключевые слова:** *Penicillium verruculosum*, целлюлаза, эндоглюканаза, целлобиогидролаза, мутантные формы ферментов, N-гликозилирование.

В последнее время процессы биоконверсии возобновляемого лигноцеллюлозного сырья в различные продукты (спирты, органические кислоты, аминокислоты и др.) достигли промышленного масштаба [1, 2]. Главный компонент такого сырья – целлюлоза, ее содержание в исходном материале может достигать 40–50% и выше [3]. Стадия ферментативного гидролиза целлюлозы до глюкозы в этих процессах ключевая и наиболее трудоемкая. Для эффективного гидролиза целлюлозы необходимо наличие сбалансированного по составу целлюлазного комплекса, включающего эндоглюканазы (ЭГ) и целлобиогидролазы (ЦБГ), которые осуществляют расщепление полимерного субстрата до целлобиозы и других олигосахаридов, а также β-глюкозидазы (БГ), катализирующие гидролиз олигосахаридов до глюкозы [4]. В настоящее время поиск новых, более активных целлюлаз остается актуальной задачей. Ведутся также интенсивные разработки по увеличению удельной активности ферментов и улучшению других их свойств методами белковой инженерии [5–7]. Для

оптимизации состава целлюлазного комплекса часто используют подходы, основанные на создании модельных смесей очищенных ферментов и тестировании их гидролитической способности по отношению к различным целлюлозосодержащим субстратам [7–9].

Мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* – эффективный продуцент высокоактивных целлюлаз, главными из которых являются ЦБГ I и ЦБГ II, принадлежащие соответственно к семействам 7 и 6 гликозидгидролаз, а также ЭГ II (семейство 5) [10, 11]. Ранее с помощью сайт-направленного мутагенеза нами были получены мутантные формы этих целлюлаз, в которых один из остатков Asn, представляющий собой сайт N-гликозилирования соответствующего белка, был заменен на остаток Ala, в результате чего удельная активность целлюлаз заметно увеличилась [12–14].

Цель данной работы – сравнение гидролитической способности смесей на основе гомогенных ЭГ II, ЦБГ I и ЦБГ II дикого типа со смесями мутантных форм этих ферментов при гидролизе

целлюлозосодержащих материалов, а также исследование влияния температуры и концентрации субстратов на выход глюкозы.

### Материалы и методы

**Ферменты.** Рекомбинантные ЦБГ I и ЦБГ II *P. verruculosum* дикого типа, а также их мутантные формы (N45A и N219A соответственно) были получены и очищены, как описано в работах [12, 14]. Получение и очистка рекомбинантной ЭГ II и ее мутантной формы N194A описаны в работе [13]. Гомогенная БГ из *Aspergillus niger* была получена, как описано в работе [15].

**Ферментативный гидролиз целлюлозосодержащих субстратов.** В качестве субстратов использовали микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ, «Sigma», США) и измельченную осиную древесину (измельчение проводили на лабораторной планетарной шаровой мельнице «АГО-2» в ОАО «ГосНИИсинтезбелок»). Гидролиз материалов проводили в пробирках объемом 2 мл при 40–60 °С в 0,1 М Na-ацетатном буфере (рН 4,5) при постоянном перемешивании (1000 об/мин) на термостатируемом шейкере «TS-100» («Biosan», Латвия). Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 5 г/л по сухим веществам. В ряде экспериментов концентрацию субстрата варьировали в пределах 2,5–50 г/л. Во всех случаях дозировка смесей гомогенных целлюлаз

составляла 10 мг общего белка (по Лоури) на 1 г субстрата (состав смесей для каждого субстрата был оптимизирован в предварительных экспериментах и приведен в табл. 1). В целях предотвращения ингибирования ферментов целлобиозой и полной конверсии олигосахаридов в глюкозу в реакционную смесь дополнительно вносили избыток β-глюкозидазы *A. niger* (0,015 мг/мл). Для предотвращения микробного заражения в реакционную смесь добавляли 1 мМ азид натрия. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы объемом 0,1 мл, центрифугировали 2 мин при 13 400 об/мин, а затем в супернатанте определяли концентрацию глюкозы глюкозооксидазно-пероксидазным методом с использованием набора «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия); при калибровке использовали D-глюкозу («Реахим», Россия). Все эксперименты проводили в трех повторностях.

### Результаты и их обсуждение

Первоначально гидролиз МКЦ под действием композиции ферментов на основе гомогенных ЭГ II, ЦБГ I и ЦБГ II дикого типа и смеси мутантных форм этих целлюлаз такого же состава был осуществлен при температуре 40 °С. Смесь на основе мутантных форм ферментов обладала существенно более высокой гидролитической способностью, для нее выход глюкозы был выше по сравнению с

Таблица 1

Компонентный состав тройных смесей целлюлаз, использованных для гидролиза целлюлозных субстратов

Субстрат	Содержание, %		
	ЦБГ I	ЦБГ II	ЭГ II
МКЦ	40	40	20
Древесина осины	20	60	20

Таблица 2

Выход глюкозы (%) для смесей мутантных форм целлюлаз относительно смесей исходных (диких) форм ферментов для разного времени гидролиза

Субстрат	Выход глюкозы (%) при разном времени гидролиза		
	24 ч	48 ч	72 ч
МКЦ	138 ± 11	133 ± 11	131 ± 11
Древесина осины	111 ± 9	121 ± 10	127 ± 10

исходными ферментами на 31–38% в зависимости от времени реакции (табл. 2).

При использовании композиции мутантных форм целлюлаз увеличение температуры гидролиза с 40 до 50 °С привело к возрастанию концентрации глюкозы на 34–41% через 6–72 ч ферментативной реакции (рис. 1, *a*). Дальнейшее повышение температуры до 60 °С вызвало уве-

личение выхода глюкозы по сравнению с гидролизом при 40 °С только в первые 6 ч. Через 6 ч гидролиза выход глюкозы оказался на 7% выше, тогда как через 24 и 48 ч – соответственно на 26 и 34% ниже по сравнению с процессом при 40 °С; после 48 ч гидролиз при 60 °С практически прекращался, что было вызвано, вероятно, термоинактивацией ферментов. Таким образом,

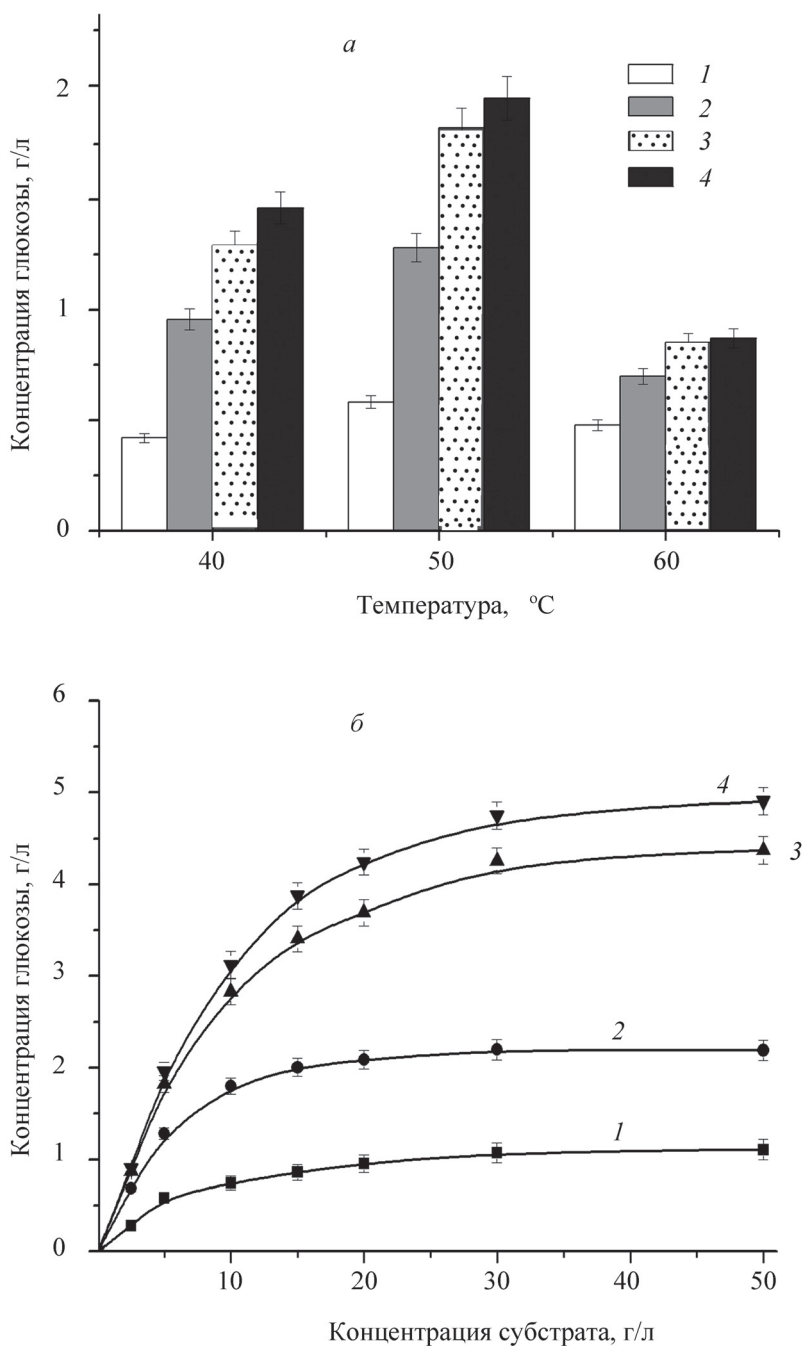


Рис. 1. Влияние температуры при концентрации субстрата 5 г/л (*a*) и концентрации субстрата при температуре 50 °С (*б*) на выход глюкозы при гидролизе МКЦ под действием смеси мутантных форм целлюлаз (табл. 1). Условия реакции: рН 4,5 (0,1 М Na-ацетатный буфер), дозировка ферментной смеси 10 мг белка на 1 г субстрата, дополнительно добавлена БГ из *A. niger* (0,015 мг/мл). Продолжительность ферментативной реакции, ч: 1 – 6, 2 – 24, 3 – 48, 4 – 72

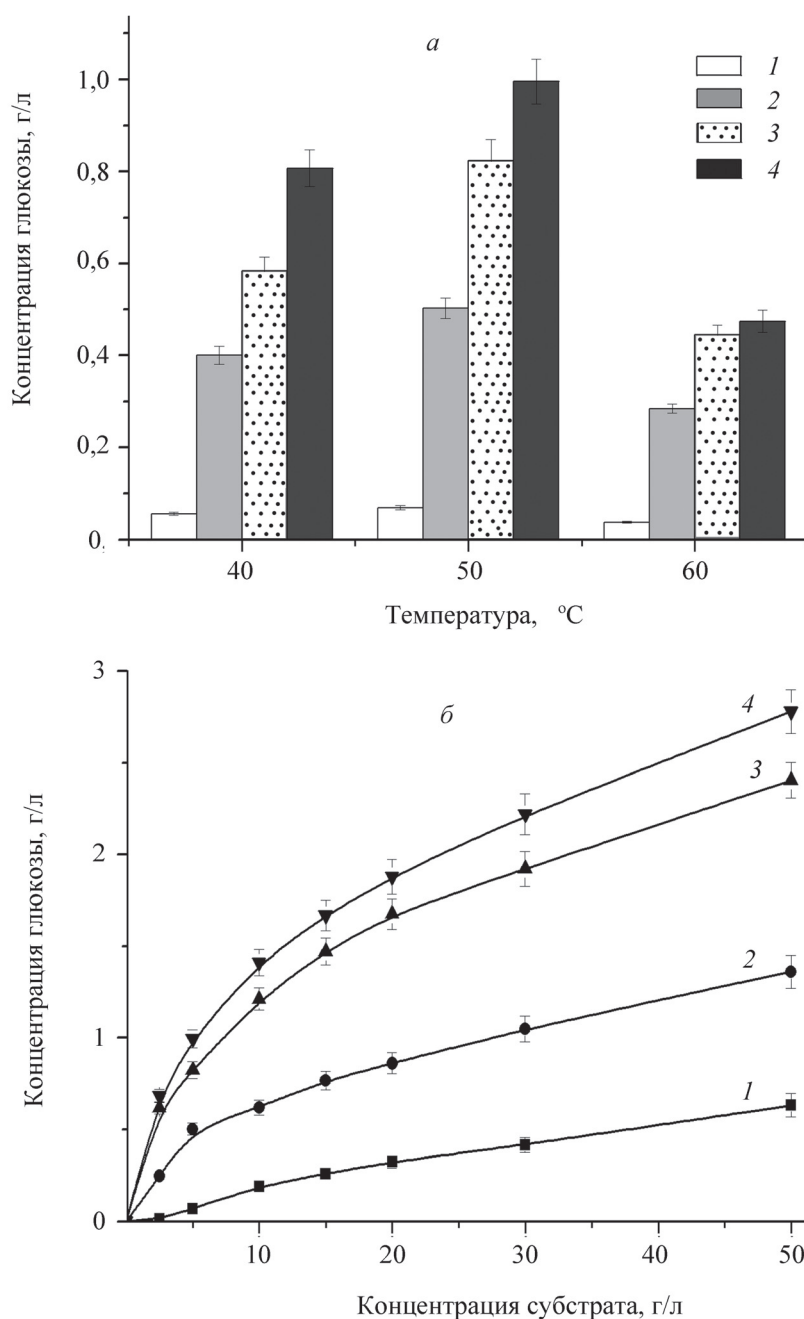


Рис. 2. Влияние температуры при концентрации субстрата 5 г/л (а) и концентрации субстрата при температуре 50 °С (б) на выход глюкозы при гидролизе измельченной осиновой древесины под действием смеси мутантных форм целлюлаз (табл. 1). Условия реакции: рН 4,5 (0,1 М Na-ацетатный буфер), дозировка ферментной смеси 10 мг белка на 1 г субстрата, дополнительно добавлена БГ из *A. niger* (0,015 мг/мл). Продолжительность ферментативной реакции, ч: 1 – 6, 2 – 24, 3 – 48, 4 – 72

наилучшей для проведения гидролиза МКЦ оказалась температура 50 °С.

Для исследования зависимости эффективности гидролиза от концентрации субстрата был проведен гидролиз МКЦ под действием смеси мутантных форм целлюлаз при температуре 50 °С; концентрацию целлюлозы варьировали в диапазоне

2,5–50 г/л, сохраняя при этом одинаковую дозировку ферментов на уровне 10 мг/г субстрата (рис. 1, б). Увеличение концентрации субстрата в 10 раз (с 5 до 50 г/л) привело к возрастанию в 2,6 раза концентрации глюкозы в реакционной среде через 72 ч гидролиза, однако степень конверсии целлюлозы уменьшилась при этом с 35 до 9%.

Эксперименты, подобные описанным выше, были проведены с использованием предобработанной осиновой древесины в качестве субстрата, однако по сравнению с гидролизом МКЦ смеси на основе диких и мутантных форм целлюлаз были обогащены ЦБГ II. Как и в случае МКЦ, композиция из мутантных форм ферментов оказалась более эффективной (на 11–27% по выходу глюкозы через 24–72 ч ферментативной реакции, табл. 2).

Увеличение температуры гидролиза с 40 до 50 °С привело к возрастанию концентрации глюкозы, полученной при гидролизе древесины под действием мутантных форм целлюлаз через 6–72 ч гидролиза, на 22–25% (рис. 2, а). При 60 °С выход глюкозы был наименьшим для каждой временной отметки ферментативной реакции.

Повышение концентрации осиновой древесины с 5 до 50 г/л при сохранении общей дозировки ферментов на единицу массы субстрата привело к увеличению концентрации глюкозы в реакционной среде через 72 ч гидролиза с 1,0 до 2,8 г/л, при этом степень конверсии целлюлозы уменьшилась с 36 до 10% (рис. 2, б).

Таким образом, использование смесей на основе рекомбинантных форм ЦБГ I, ЦБГ II и ЭГ II *P. verruculosum*, в которых часть N-связанных гли-

канов была удалена методом сайт-направленного мутагенеза, позволило увеличить финальный выход глюкозы при гидролизе целлюлозосодержащих материалов примерно на 30% по сравнению с композициями исходных ферментов такого же состава. Наибольшие концентрации продукта при гидролизе целлюлозы под действием смесей мутантных целлюлаз были получены при 50 °С, т.е. при температуре, которая является оптимальной для действия ферментного комплекса *P. verruculosum*, хотя некоторые его компоненты могут сохранять активность в течение длительного времени и при более высокой температуре [16]. В настоящей работе мы использовали относительно простые композиции целлюлаз, состоящие из эндоглюканазы, двух целлобиогидролаз и β-глюкозида. Поскольку в состав полного ферментного комплекса, секретируемого данным грибом, входят и другие эндоглюканазы (ЭГ I, ЭГ III), а также вспомогательные ферменты, действующие в синергизме с целлюлазами [10, 16], дальнейшая оптимизация состава ферментных смесей, вероятно, позволит достичь более высоких степеней конверсии целлюлозы и выхода конечного продукта гидролиза – глюкозы при сохранении (или уменьшении) общей дозировки ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00163) с использованием оборудования ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН «Промышленные биотехнологии».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar R., Singh S., Singh O.V. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 35. N 5. P. 377.
2. Gusakov A.V. // Biofuels. 2013. Vol. 4. N 6. P. 567.
3. Роговин З.А. // Химия целлюлозы. М., 1972.
4. Payne C.M., Knott B.C., Mayes H.B., Hansson H., Himmel M.E., Sandgren M., Ståhlberg J., Beckham G.T. // Chem. Rev. 2015. Vol. 115. N 3. P. 1308.
5. Bommarius A.S., Sohn M., Kang Y., Lee J.H., Realff M.J. // Curr. Opin. Biotechnol. 2014. Vol. 29. P. 139.
6. Tishkov V.I., Gusakov A.V., Cherkashina A.S., Sinitsyn A.P. // Biochimie. 2013. Vol. 95. N 9. P. 1704.
7. Trudeau D.L., Lee T.M., Arnold F.H. // Biotechnol. Bioeng. 2014. Vol. 111. N 12. P. 2390.
8. Gusakov A.V., Salanovich T.N., Antonov A.I., Ustinov B.B., Okunev O.N., Burlingame R., Emalfarb M., Baez M., Sinitsyn A.P. // Biotechnol. Bioeng. 2007. Vol. 97. N 5. P. 1028.
9. Billard H., Faraj A., Ferreira N.L., Menir S., Heiss-Blanquet S. // Biotechnol. Biofuels. 2012. Vol. 5. N 9. P. 1.
10. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravitnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. // Biotechnol. J. 2010. Vol. 5. N 8. P. 871.
11. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. // Biofuels. 2012. Vol. 3. N 4. P. 463.
12. Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Biotechnol. Bioeng. 2016. Vol. 113. N 2. P. 283.
13. Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Sinitsyna O.A., Nemashkalov V.A., Sinitsyn A.P. // Protein Eng. Des. Sel. 2016. Vol. 29, N 11, P. 495.
14. Gusakov A.V., Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Biochimie. 2017. Vol. 132. N 1. P. 102.
15. Korotkova O.G., Semenova M.V., Morozova V.V., Zorov I.N., Sokolova L.M., Bubnova T.M., Okunev O.N., Sinitsyn A.P. // Biochemistry (Moscow). 2009. Vol. 74. N 5. P. 569.
16. Sinitsyn A.P., Osipov D.O., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Dotsenko G.S., Sinitsyna O.A., Kondrat'eva E.G., Zorov I.N., Okunev O.N., Nemashkalov V.A., Matys V.Y., Koshelev A.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. Vol. 50. N 8. P. 761.

## ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELLULOSE USING MIXES OF MUTANT FORMS OF CELLULASES FROM *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

A.S. Dotsenko, A.V. Gusakov\*, A.M. Rozhkova, P.V. Volkov, O.G. Korotkova, A.P. Sinitsyn

(Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences; Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; \*e-mail: avgusakov@enzyme.chem.msu.ru)

Cellulases are the major components of multienzyme systems that found applications in the processes of bioconversion of renewable lignocellulosic feedstocks to various useful products. A comparison of hydrolytic efficiency of enzyme mixes based on recombinant wild-type endoglucanase II, cellobiohydrolases I and II from *Penicillium verruculosum* fungus (in the presence of *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase) with mixes of mutant forms of these enzymes in hydrolysis of cellulosic materials was carried out, and the influence of temperature and substrate concentration on the glucose yield was studied. The mutant cellulases represented proteins, in which N-linked glycans have partially been removed using site-directed mutagenesis. In hydrolysis of microcrystalline cellulose and milled aspen wood by mixes of mutant cellulases, the yields of glucose after 24–72 h of the enzymatic reaction were higher by 31–38% and 11–27%, respectively, relative to the compositions based on the wild-type enzymes. On variation of hydrolysis temperature in the range of 40–60 °C, using mutant enzyme compositions, the highest product concentrations were achieved at 50 °C. Increasing the substrate concentration in the reaction system from 5 to 50 g/l (while maintaining the enzyme dosage at the same level) led to a 2,6–2,8-fold increase in the glucose yield, accompanied by a decrease in the cellulose conversion degree.

**Key words:** *Penicillium verruculosum*, cellulase, endoglucanase, cellobiohydrolase, enzyme mutant forms, N-glycosylation.

**Сведения об авторах:** Доценко Анна Сергеевна – мл. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (dotsenko-as@yandex.ru); Гусаков Александр Васильевич – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова и лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, докт. хим. наук, профессор (avgusakov@enzyme.chem.msu.ru); Рожкова Александра Михайловна – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (amrojtkova@yahoo.com); Волков Павел Валерьевич – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (palman2008@yandex.ru); Короткова Ольга Генриховна – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (littletempo@yandex.ru); Синицын Аркадий Пантелеймонович – зав. лаб. на кафедре химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова и зав. лаб. биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, докт. хим. наук, профессор (apsinitsyn@gmail.com).