

Оригинальная статья / Original article

УДК 577.152.321+579.26

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-2-261-273>

Гидролиз целлюлозы ферментным комплексом *Trichoderma viride* в присутствии фторида натрия: влияние структуры субстрата и сорбционной активности целлюлаз

© Е.Р. Чашина, З.А. Ефременко, В.П. Саловарова,
Д.Е. Гавриков, А.А. Приставка

Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Исследована зависимость активности целлюлаз *Trichoderma viride* от трех факторов – вида субстрата, сорбционных свойств ферментов и концентрации фторида натрия (NaF). Изучено влияние четырех водонерастворимых субстратов: два нативных (древесина березы и пшеничная солома) и два модельных (микrokристаллическая целлюлоза и фильтровальная бумага). Дополнительно исследован водорастворимый субстрат – Na-карбоксиметил-целлюлоза, специфичный к эндоглюканазной активности. Целлюлазный комплекс *T. viride* из препарата «Целловирин ГЗх» был разделен методом аффинной хроматографии на фракции, различающиеся сорбционными свойствами. Измерена целлюлазная активность исходного комплекса и полученных фракций по отношению ко всем субстратам при разной концентрации NaF – от 0 до 1000 мг/л. Качественные различия в белковом составе препарата и фракций исследованы методом SDS-диско-электрофореза. При внесении NaF (100–500 мг/л) активность исходного целлюлазного комплекса возрастала по отношению ко всем субстратам, особенно повысилась скорость гидролиза модельных образцов (до 100 %). Сравнение активности хроматографических фракций относительно модельных субстратов показало, что NaF оказывает противоположное действие на каталитические и сорбционные свойства целлюлаз: активность высокоаффинных фракций, содержащих целлобиогидролазы и низкомолекулярные эндоглюканазы, в присутствии фторида снижалась по отношению ко всем субстратам на 35–90 %. Слабосорбирующиеся фракции (эндоглюканазы I, II + целлобиаза) в этих же условиях ингибировались на 15–20 % по отношению к целлюлозе с высокой степенью кристалличности (МКЦ), но активировались в 1,3–3 раза относительно водорастворимого субстрата (Na-КМЦ) и субстрата с меньшей кристалличностью (фильтровальная бумага). Таким образом, суммарное действие фторидов на ферментативный гидролиз растительного субстрата определяется степенью кристалличности целлюлозы, а также соотношением сильно- и слабосорбирующихся компонентов в целлюлазном комплексе. Рассмотрены возможные молекулярные механизмы этих эффектов.

Ключевые слова: *Trichoderma viride*, целлюлазный комплекс, эндоглюканазы, целлобиогидролазы, фториды, цветная металлургия

Информация о статье: Дата поступления 20 декабря 2019 г.; дата принятия к печати 29 мая 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 июня 2020 г.

Для цитирования: Чашина Е.Р., Ефременко З.А., Саловарова В.П., Гавриков Д.Е., Приставка А.А. Гидролиз целлюлозы ферментным комплексом *Trichoderma viride* в присутствии фторида натрия: влияние структуры субстрата и сорбционной активности целлюлаз / Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 2. С. 261–273. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-2-261-273>

Cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* enzyme complex in the presence of sodium fluoride: effect of substrate structure and cellulase sorption activity

Ekaterina R. Chashina, Zinaida A. Efremenko, Valentina P. Salovarova,
Dmitrii E. Gavrikov, Aleksey A. Pristavka

Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: The dependence of cellulase activity of the *Trichoderma viride* fungus on three factors – substrate type, enzyme sorption properties and sodium fluoride (NaF) concentration – was studied. The four studied water-insoluble substrates were based on two native (birch wood and wheat straw) and two model (micro-crystalline cellulose and filter paper) materials. In addition, a water-soluble Na-carboxymethyl-cellulose substrate specific for endoglucanase activity was studied. The *T. viride* cellulase complex from the “Celloviridin G3x” preparation was separated into fractions differing in sorption properties using the affinity chromatography method. The cellulase activity of the initial complex and obtained fractions was measured with respect to all substrates at different concentrations of NaF ranging from 0 to 1000 mg/L. Qualitative differences in the protein composition of the preparation and fractions were studied by SDS electrophoresis. With the introduction of NaF (100–500 mg/L), the initial cellulase complex activity increased with respect to all substrates. The hydrolysis rate of model samples was observed to increase by up to 100 %. Comparison of chromatographic fraction activity relative to model substrates demonstrated the NaF to have the opposite effect on the catalytic and sorption properties of cellulases. The activity of high affinity fractions containing cellobiohydrolases and low molecular weight endoglucanases in the presence of fluoride decreased by 35–90 % in relation to all substrates. Although weakly adsorbing fractions (endoglucanases I, II + cellobiasis) under the same conditions were inhibited by 15–20 % with respect to cellulose with a high degree of crystallinity (MCC), these were activated 1.3–3 times slower with respect to a water-soluble substrate (Na-CMC) and a substrate with less crystallinity (filter paper). Thus, the total effect of fluorides on the enzymatic hydrolysis of the plant substrate is determined by the crystallinity degree of the cellulose substrate, as well as by the ratio of strongly- and weakly-sorbed components in the cellulase complex. Possible molecular mechanisms of these effects are additionally proposed.

Keywords: *Trichoderma viride*, cellulase complex, endoglucanases, cellobiohydrolases, fluorides, non-ferrous metallurgy

Information about the article: Received December 20, 2019; accepted for publication May 29, 2020; available online June 30, 2020.

For citation: Chashina ER, Efremenko ZA, Salovarova VP, Gavrikov DE, Pristavka AA. Cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* enzyme complex in the presence of sodium fluoride: effect of substrate structure and cellulase sorption activity. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2020;10(2):261–273. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-2-261-273>

ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение экосистем аэровыбросами промышленных предприятий представляет собой серьезную экологическую проблему. Одним из мощнейших источников эмиссии загрязнителей в ряде регионов России, включая Прибайкалье, являются предприятия алюминиевой промышленности, выбросы которых содержат разнообразные токсичные вещества (тяжелые металлы, полициклические ароматические углеводороды, фториды и др.), оказывающие негативное воздействие на разные компоненты биосферы [1, 2].

Важнейшим звеном биотического круговорота углерода являются почвенные микроорганизмы, разлагающие растительные полимеры, в том числе целлюлозу. В результате накопления загрязнителей в почве нарушается структура почвенных микробиоценозов, снижается видовое богатство микроорганизмов, меняется их ферментативная активность, угнетается жизнедеятельность даже наиболее толерантных видов [3–6]. Вследствие этого нарушается процесс редукции растительных остатков, что

сопровождается негативными экологическими последствиями как минимум на уровне региональных экосистем.

Среди загрязнителей, характерных для алюминиевой промышленности, серьезную опасность представляет фторид, соли которого используются в технологическом цикле производства металла [7–9]. Эффекты и механизмы токсического действия фторидов на живые организмы неоднократно обсуждались в научной литературе, однако, данные о непосредственном влиянии фторидов на активность целлюлазных комплексов, продуцируемых конкретными видами микроорганизмов, были впервые получены авторами работы [10], где были описаны и обсуждены эффекты, которые фторид оказывает на каталитические и сорбционные свойства целлюлаз, продуцируемых грибами рр. *Trichoderma* и *Aspergillus*, и высказано предположение, что суммарное влияние фторида на целлюлазный комплекс определяется, с одной стороны, соотношением прочно- и слабосорбирующихся ферментов в целлюлазном комплексе, а с другой – соотношением

аморфных и кристаллических участков целлюлозы в субстрате. Однако эти эффекты были показаны, во-первых, при использовании модельных субстратов, состоящих из чистой целлюлозы, в то время как в природных условиях субстратом для микробных целлюлаз являются лигноцеллюлозные комплексы; во-вторых, для объединенных целлюлазных комплексов, которые на самом деле состоят из карбогидраз четырех типов – эндоглюканаза (EG), целлобиогидролаза (CBH), целлобиаз (β -глюкозидаз) и экзоглюкозидаз, различающихся молекулярными характеристиками, каталитической активностью, константой адсорбции и субстратной специфичностью [11–13].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния фторида натрия на активность отдельных компонентов целлюлазного комплекса, продуцируемого грибом *Trichoderma viride*, по отношению к целлюлозосодержащим субстратам с различной устойчивостью к ферментативному гидролизу.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве модельного целлюлазного комплекса использовался коммерческий ферментный препарат «Целловиридин ГЗх» на основе целлюлаз, продуцируемых *Trichoderma viride* (производство ОАО «ВОСТОК», Москва) с остаточной общей целлюлазной активностью 14,5 МЕ/г а.с.в.

На первом этапе была изучена ферментативная активность препарата по отношению к нескольким целлюлозосодержащим субстратам при различной концентрации фторида натрия, которую варьировали в диапазоне от 10 до 1000 мг/л в зависимости от задач исследования.

Всего было исследовано четыре не растворимых в воде субстрата: два нативных, измельченных до мелкодисперсного состояния и содержащих, помимо углеводных компонентов, лигнин в разных соотношениях; два модельных субстрата, состоящих только из полисахаридов. Каждая пара субстратов различалась соотношением кристаллической и аморфной целлюлозы. Также была измерена эндоглюканазная активность по водорастворимому субстрату Na-карбоксиметилцеллюлозе (Na-KMЦ) (таблица).

Содержание лигнина в нативных субстратах определяли весовым методом после кислотного гидролиза и отделения углеводного компонента².

Далее, в соответствии с рабочей гипотезой о связи сорбционных свойств целлюлаз с эффектами, которые фторид оказывает на их активность, было проведено хроматографическое разделение ферментов целлюлазного комплекса по их аффинным свойствам. Компоненты, различающиеся по степени адсорбции на целлюлозе, были исследованы на общую целлюлазную и эндоглюканазную активности в тех же условиях, что и исходный препарат.

Качественные различия в составе полученных аффинных комплексов были исследованы методом электрофореза.

Общая целлюлазная активность определялась с использованием динитросалицилового реагента по скорости образования восстанавливающих сахаров из навески целлюлозосодержащего субстрата (50 мг) [18]. Соотношение субстрата и жидкой фазы в реакционной среде составило 1:20 (W/V), а количество ферментного препарата – 3 МЕ/г субстрата (по фильтровальной бумаге).

Таблица 1
Характеристика целлюлозосодержащих субстратов, использованных в работе

Table 1
Characterization of cellulose-containing substrates applied in research

Субстрат	Доля лигнина, %	Степень кристалличности, % (по данным рентгенодифракционного анализа)
Пшеничная солома	12±0,9	50–52 ¹
Древесина березы	25±1,4	60–62 ¹
Фильтровальная бумага (ФБ)	–	63–68 [14, 15]
Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) марки Avicel (Sigma)	–	75–80 [16, 17]
Na-карбоксиметилцеллюлоза (Na-KMЦ), марка 250000M.W (НеваРеактив).	–	–

¹ Kargarzadeh H., Ahmad I., Thomas S., Dufresne A. (eds.) Characterization of Various Kinds of Nanocellulose. Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites. John Wiley & Sons. 2017. Vol. 1. Ioelovich M. Chapter 2. P. 51–100.

² TAPPI Test Method T222 om-02. Acid-Insoluble Lignin in Wood and Pulp. 2002.

Активность эндоглюконаз измерялась по начальной скорости уменьшения вязкости 1,5 %-го раствора Na-карбоксиметилцеллюлозы [19]. Для этого использовался вискозиметр Оствальда с объемом верхнего резервуара 1 мл и диаметром капилляра 0,6 мм. Все измерения активности проводились в 0,05 М натрий-ацетатном буфере, при температуре 45 °С, pH = 4,6.

Разделение компонентов целлюлазного комплекса осуществлялось в стеклянной хроматографической колонке (30x1,5 см) на аффинном сорбенте (МКЦ, Avicel), который предварительно был уравновешен Na-ацетатным буфером (0,05 М, pH = 4,6). Скорость потока подвижной фазы составляла 1,5 мл/мин. После выхода несорбирующихся компонентов ферменты, связанные с носителем, элюировались дистиллированной водой. Элюируемые белки детектировались на спектрофотометре IMPLIN P330; элюат распределялся по фракциям объемом 1 мл.

Состав фракции с различной аффинностью к целлюлозе был исследован посредством SDS-диск-электрофореза в полиакриламидном геле при концентрации разделяющего геля 12,5 %.

Все эксперименты по исследованию фторидзависимой активности целлюлаз проводились минимум в трех повторностях, для полу-

ченных выборок рассчитывалось математическое ожидание и стандартная ошибка среднего. Сравнение выборок осуществлялось U-критерием. Калибровочные графики были получены линейной аппроксимацией экспериментальных данных с оценкой достоверности коэффициентов регрессии при $p < 0,05$. Достоверность влияния вида субстрата и сорбционных свойств ферментов на относительную активность целлюлаз (отношение активности в контроле к активности в присутствии NaF) оценивалась с помощью двухфакторного непараметрического метода PERMANOVA при $p < 0,05$. Все расчеты проводились в программе Past v. 4.01.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе [10] показано, что фторид натрия в низких концентрациях (в пределах 10–100 мг/л) ингибирует активность по фильтровальной бумаге (FPA) целлюлазного комплекса из *T. viride* примерно в 2 раза, однако дальнейшее повышение концентрации фторида приводило к реактивации ферментного препарата.

Результаты измерений активности ферментного комплекса по отношению к различным субстратам в присутствии высоких концентраций NaF представлены на рис. 1. В контроле эффективность начального гидролиза для разных субстратов различается: наиболее

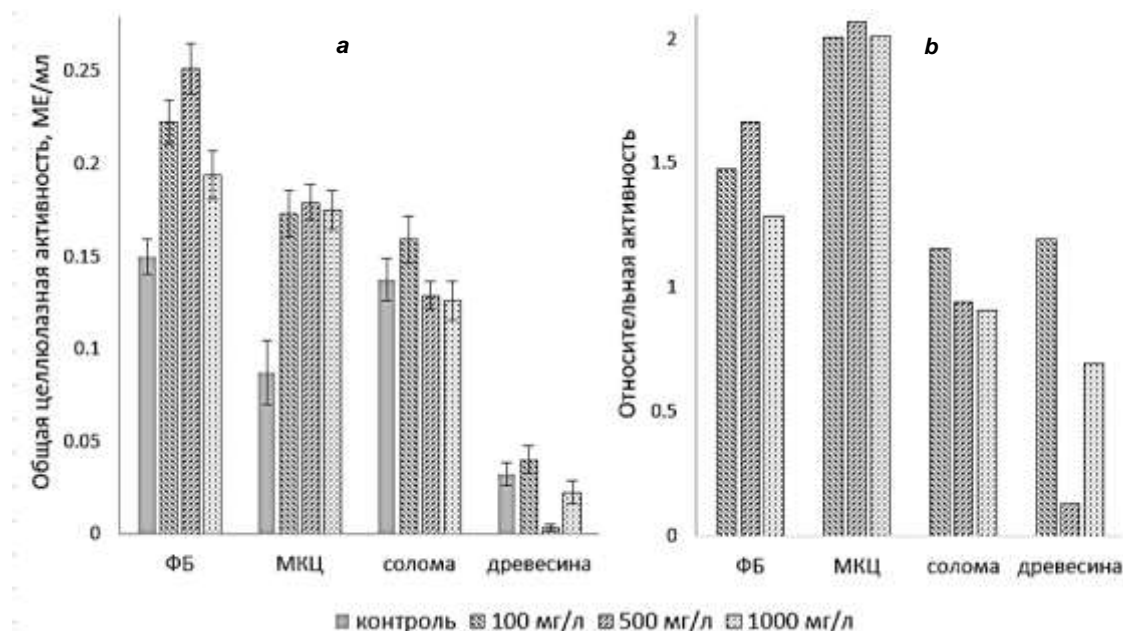


Рис. 1. Влияние высоких концентраций фторида натрия на эффективность начального гидролиза целлюлозосодержащих субстратов целлюлазным комплексом:

a – активность, выраженная в абсолютных единицах;

b – активность в относительных показателях

(отношение активности в присутствии NaF к активности в контроле)

Fig. 1. Effect of high concentrations of sodium fluoride on the effectiveness of the initial hydrolysis of cellulose-containing substrates by the cellulase complex.

a – activity in absolute units;

b – activity in relative terms: the ratio of activity in the presence of NaF to activity in the control study

глубокая (и примерно одинаковая) степень гидролиза характерна для ФБ и соломы, то есть субстратов с пониженным содержанием кристаллической целлюлозы. Высококристаллическая МКЦ более устойчива к действию целлюлазного комплекса, а древесина гидролизуются с наименьшей эффективностью, так как в ней высокое содержание лигнина, который создает барьер для ферментов.

При внесении в реакцию среду NaF в концентрации 100 мг/л скорость гидролиза всех субстратов повышалась, но количественно этот эффект проявлялся по-разному. Сильнее всего он был выражен для модельных объектов ФБ и МКЦ (увеличение активности в 1,5 и 2 раза соответственно). Глубина гидролиза нативных субстратов менялась сходным образом, хотя и в меньших масштабах: 15 % – для соломы, 19 % – для древесины, то есть эффект активации пропорционален степени кристалличности целлюлозы в обеих группах субстратов. Но для ряда «солома–древесина» эта связь менее заметна, так как в нативных субстратах доля целлюлозы в целом ниже, а также в них присутствуют неуглеводные компоненты.

При повышении концентрации NaF еще на порядок скорость гидролиза большинства субстратов снижалась: по отношению к модельным объектам фермент оставался в зоне активации, а для многокомпонентных субстратов наблюдалось ингибирование, особенно заметное для древесины, более чем на треть.

Эндоглюканазная активность препарата, измеренная с помощью Na-КМЦ, также зависит от концентрации фторида (рис. 2). При низких концентрациях соли (до 50 мг/л) активность снижалась почти в 2 раза, а при повышении уровня NaF до 250 мг/л происходила реакти-

зация эндоглюканаза. Эта зависимость имеет сходный характер с аналогичными результатами, полученными для общей целлюлазной активности [10], и аппроксимируется предложенным в той же работе феноменологическим уравнением.

Для эффективного гидролиза сложных целлюлозосодержащих субстратов необходимо «полноценный» целлюлазный комплекс, в который входят как прочнособирующиеся ферменты, отвечающие за разрушение кристаллической целлюлозы, так и слабособирующиеся компоненты, основной субстрат которых – аморфный полисахарид [20]. Возможно, эффекторные свойства фторидов по-разному проявляются для ферментов с высокой и низкой аффинностью к субстрату, и именно этим объясняются различия в субстратзависимой активности ферментного комплекса. С другой стороны, целлюлазный комплекс *T. viride* включает, как минимум, пять эндоглюканаз, которые различаются по молекулярной массе, структуре и способности адсорбироваться на субстрате [21]. Нелинейный характер зависимости эндоглюканазной активности от концентрации NaF также может определяться соотношением прочно- и слабособирующихся ферментов с Na-КМЦ-азной активностью.

Аппроксимирующая функция записывается выражением

$$Akt_{EG} = b(1 - e^{-a(C-C_0)}),$$

где a и b – эмпирические коэффициенты; C – концентрация NaF; C_0 – концентрация фторида, при которой ингибирование фермента максимально; $a = 0,06$; $b = 1$; $C_0 = 50$ мг/л.

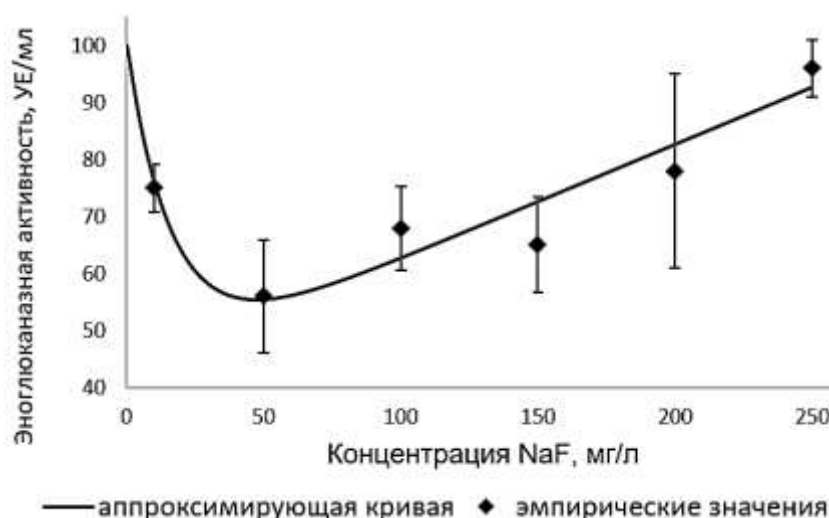


Рис. 2. Зависимость эндоглюканазной активности препарата «Целловиридин Г3х» от концентрации NaF в реакционной среде

Fig. 2. Relationship between the «Celloviridin G3x» endoglucanase activity and NaF concentration in the reaction medium

Для проверки этого предположения компоненты ферментного комплекса были разделены по их аффинным свойствам на три основные фракции (рис. 3):

- F1 – белки, не сорбирующиеся на носителе и выходящие в потоке исходной подвижной фазы в диапазоне 4–6 мл;
- F2 – слабосорбирующиеся компоненты, покидающие неподвижную фазу сразу после смены элюента (максимум при 30 мл);
- F3 – прочносорбирующиеся компоненты, выходящие из колонки после продолжительной

отмывки сорбента (70–72 мл).

Удельная целлюлазная активность этих фракций была ниже, чем у исходного препарата в 10–15 раз, что объясняется нарушением синергических взаимосвязей между компонентами целлюлазного комплекса в результате разделения. В присутствии NaF каждая из фракций характеризовалась собственной, отличной от исходного фермента, зависимостью относительной активности от вида субстрата (рис. 4).

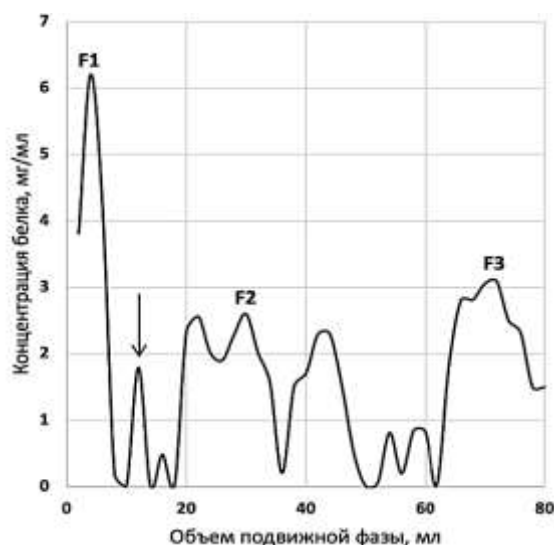


Рис. 3. Хроматограмма разделения целлюлазного комплекса *T. Viride* на аффинном носителе (МКЦ). Стрелкой указан момент смены подвижной фазы

Fig. 3. Affinity chromatography of the *T. viride* cellulase complex on microcrystalline cellulose (MCC). The arrow indicates the moment of change of the mobile phase

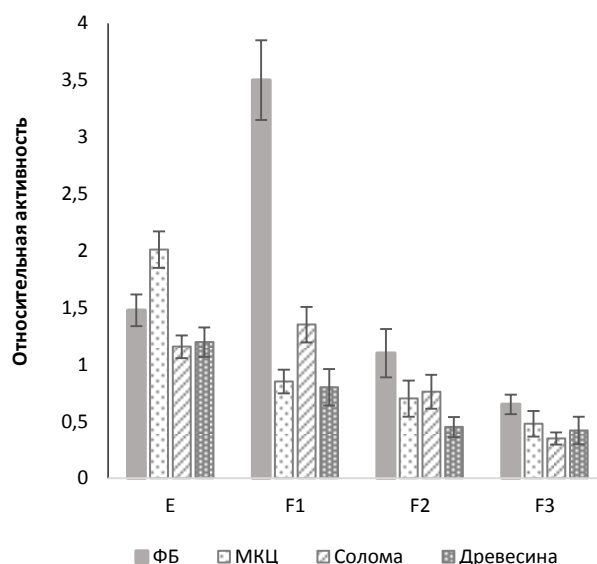


Рис. 4. Влияние фторида на активность аффинных фракций по отношению к разным целлюлозосодержащим субстратам.

По оси ординат – отношение целлюлазной активности в присутствии NaF (100 мг/л) к активности в контроле (без фторида)

Fig. 4. Effect of fluoride on activity of affinity fractions in relation to different cellulose-containing substrates.

Двухфакторный PERMANOVA свидетельствует, что вид субстрата и аффинные свойства фракций значимо влияют на относительную активность. В присутствии NaF активность несорбирующегося комплекса (F1) достоверно выше контроля по отношению к модельному (ФБ) и нативному (солома) субстратам с низкой степенью кристалличности. Для двух других субстратов наблюдается ингибирование фермента на 15–20 %. По мере увеличения аффинности фракций к целлюлозе ингибирующее действие фторидов усиливается, и активность фракции F3 снижается по отношению ко всем субстратам на 35–65 % от контроля.

Полученные результаты можно интерпретировать с точки зрения противоположного или, как минимум, различного действия фторида на каталитические и сорбционные свойства целлюлаз. Если предположить, что NaF ингибирует целлюлозосвязывающий домен (ЦСД) фермента и активирует каталитический (КД), то фторид-индуцированное увеличение активности фракции F1 по отношению к субстратам с пониженной кристалличностью целлюлозы объясняется усилением способности слабосорбирующихся ферментов атаковать аморфную целлюлозу без прочной адсорбции на ней. Для ферментов, разрушающих кристаллическую целлюлозу, обязательное условие эффективной работы – адсорбция на субстрате. Если ЦСД ингибируется фторидом, то будет наблюдаться снижение эффективности гидролиза: а) высокоупорядоченных субстратов во всех фракциях (так как доля аморфной целлюлозы низка, а адсорбция на субстрате подавлена фторидом); б) всех субстратов в прочносорбирующейся фракции (F3). В случае нативных субстратов на эти взаимодействия накладывается влияние лигнина, который снижает доступность целлюлозы для ферментов. Вероятно, поэтому гидролиз в парах «ФБ–солома» и «МКЦ–древесина» в одинаковых условиях идет сходным образом, хотя кристалличность целлюлозы в нативных субстратах ниже (см. таблицу). В итоге результирующий эффект NaF на активность целлюлазного комплекса определяется, с одной стороны, степенью кристалличности субстрата, с другой – соотношением сильно- и слабосорбирующихся компонентов в целлюлазном комплексе. В пользу этого свидетельствует характер фторидзависимых активностей отдельных аффинных фракций по отношению к модельным субстратам (рис. 5).

Общая целлюлазная и эндоглюканазная активности подавляются фторидом натрия пропорционально усилению сорбционных свойств ферментов. Если максимум ингибирования эндоглюканазной активности исходного препарата не превышает 45 % (см. рис. 2),

то для слабосорбирующейся фракции (F2) он составляет 65 %, а для прочносорбирующихся эндоглюканаз (F3) – более 90 % (рис. 5, с). Общая целлюлазная активность фракции F3 также снижается в присутствии фторида более чем в два раза, и этот эффект сильнее проявляется для МКЦ (рис. 5 а, б). Несорбирующиеся целлюлазы (F1) в меньшей степени ингибируются относительно МКЦ, а по отношению к остальным субстратам наблюдается активирующий эффект NaF: FPA увеличивается более чем в три раза по сравнению с контролем (см. рис. 5, а), а эндоглюканазная активность возрастает на 25–30 % с последующим снижением до исходного уровня при повышении концентрации фторида до 250 мг/л (рис. 5, с).

После попарного объединения фракций в композицию, в которой один из компонентов – несорбирующийся фермент, а другой – слабоили прочносорбирующаяся эндоглюканаза, зависимость активности от концентрации фторида приближается (с учетом статистической погрешности) к аналогичной зависимости исходного препарата (рис. 5, d). Однако при этом не наблюдается реактивации фермента, что, вероятно, связано с неполным восстановлением эндоглюканазного комплекса *T. viride* при объединении всего лишь двух фракций.

Качественные различия в белковом составе аффинных комплексов были исследованы методом DSN-электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 6). В несорбирующейся (F1) и слабосорбирующейся (F2) фракциях в заметных количествах преобладает, судя по молекулярной массе, β -глюкозидаза (75 кДа). Данный фермент гидролизует короткие целлоолигосахариды и, не имея целлюлозосвязывающего домена, обладает низким сродством к высокомолекулярной целлюлозе. Кроме целлобиазы эти фракции содержат эндоглюканазы I и II (40–55 кДа), которые, несмотря на наличие ЦСД, достаточно легко десорбируются с нерастворимого субстрата. Фракция F3 отличается заметным содержанием целлобиогидролаз I и II (60–68 кДа) и низкомолекулярных белков (20–25 кДа), возможно, эндоглюканаз IV и/или V. Преобладание целлобиогидролаз (особенно СВН I) в составе прочносорбирующихся комплексов согласуется с предыдущими данными о более сильной сорбции этих ферментов на нерастворимых субстратах по сравнению с другими целлюлазами [22].

Если предположение о противоположном влиянии NaF на каталитические и сорбционные свойства целлюлаз верно, то преобладание целлобиогидролаз (и, возможно, низкомолекулярных эндоглюканаз) в F3 объясняет фторид-опосредованное снижение активности этой фракции по отношению ко всем целлюло-

зосодержащим субстратам, а доминирование целлюбиаз и слабосорбирующихся эндоглюканаз обуславливает повышение эффективности гидролиза аморфной части субстрата комплексом F1.

Влияние фторида на каталитический домен целлюлаз можно объяснить его вмешательством в процесс кислотно-основного катализа: взаимодействуя со специфическими ли-

гандами вблизи активного центра, анион, вероятно, меняет степень поляризации аминокислотных остатков (D, E) и молекул воды. В зависимости от особенностей пространственной организации активного центра это может сопровождаться изменением активности фермента, как это происходит, например, при активации некоторых α -амилаз хлоридом [23].

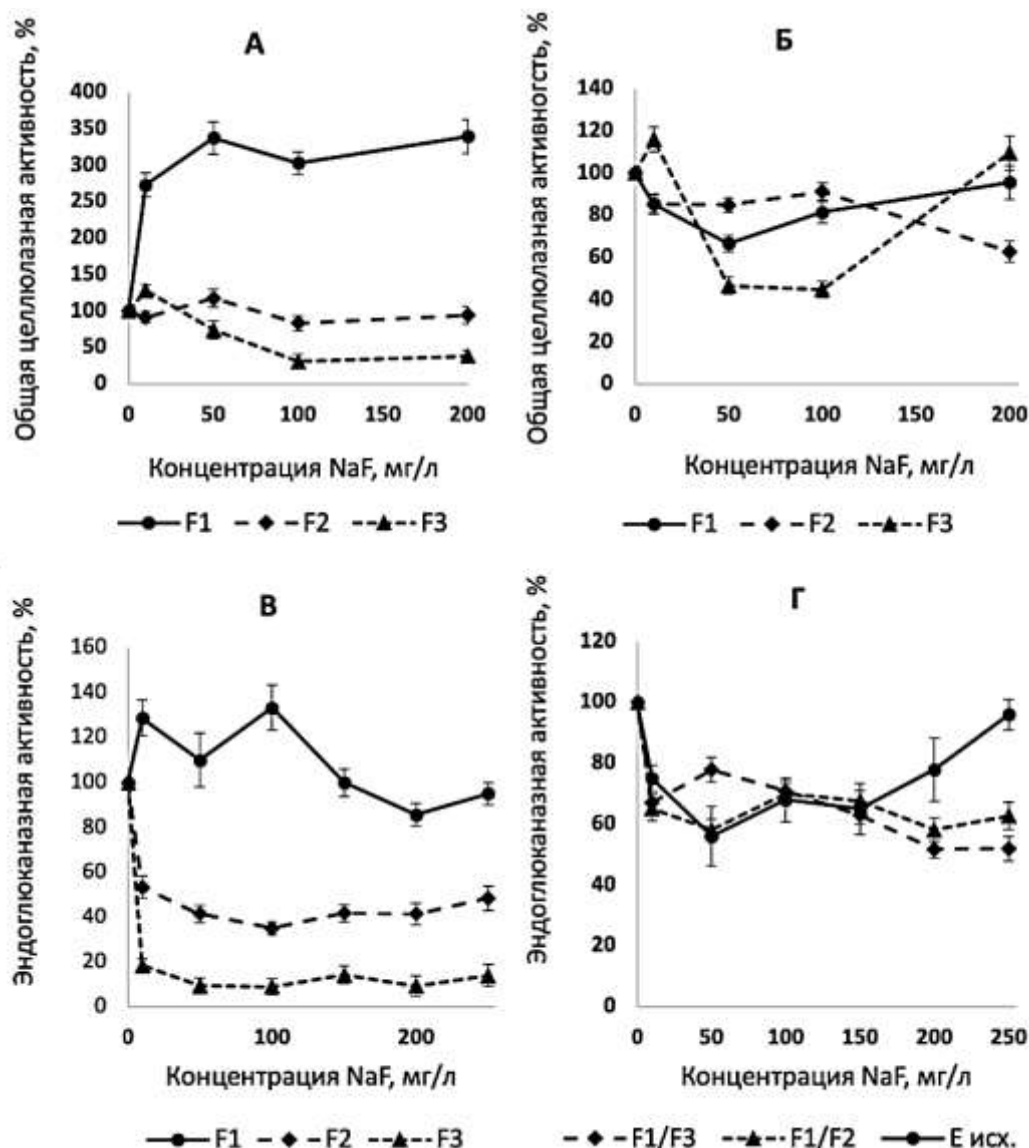


Рис. 5. Фторидзависимые активности фракций, различающихся адсорбционными свойствами по отношению к нерастворимым и водорастворимым субстратам (за 100 % принята активность в контроле):

а – целлюлазная активность по фильтровальной бумаге (FPA); б – целлюлазная активность по МКЦ;
с – эндоглюканазная активность отдельных фракций;
д – эндоглюканазная активность объединенных фракций в сравнении с исходным ферментом

Fig. 5. Fluoride-dependent enzymatic activity of fractions differing in adsorption property, in relation to insoluble and water-soluble substrates (activity in the control study was accepted for 100%):

а – cellulase activity by filter paper (FPA); б – cellulase activity by MCC;
с – endoglucanase activity of individual fractions;
д – endoglucanase activity of the combined fractions in comparison with the starting enzyme

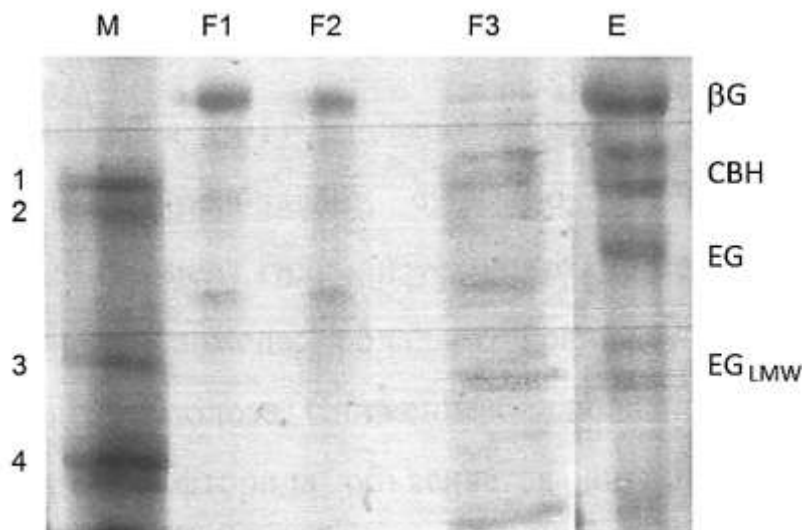


Рис. 6. Электрофорез целлюлазных фракций в сравнении с исходным целлюлазным комплексом:
М - маркерные белки: 1 – бычий сывороточный альбумин (68 кДа); 2 – холинэстераза (*Homo sapiens*; 58 кДа);
3 – Трипсин (24 кДа); 4 – Лизоцим (14 кДа).
Е – ферментный препарат:
βG – β-глюкозидаза (целлобиаза); **CBH** – целлобиогидролазы;
EG – эндоглюканазы I и II; **EG_{LMW}** – низкомолекулярные минорные эндоглюканазы

Fig. 6. Electrophoresis of cellulase fractions in comparison with the initial cellulase complex.
M – marker proteins: 1 – Bovine serum albumin (68 kDa); 2 – Cholinesterase (*Homo sapiens*; 58 kDa);
3 – Trypsin (24 kDa); 4 – Lysozyme (14 kDa).
E – an enzyme preparation;
βG – β-glucosidase (cellobiase); **CBH** – cellobiohydrolases;
EG – main endoglucanases; **EG_{LMW}** – low molecular weight minor endoglucanases

Механизм влияния фторидов на сорбционный центр менее очевиден. Известно, что адсорбция целлобиогидролазы I из *T. viride* на субстрате осуществляется за счет взаимодействий между тремя остатками тирозина ЦСД и остатками глюкозы на поверхности целлюлозы [24]. Возможно, в присутствии фторида нарушаются «стэкинг»-взаимодействия между ароматическими кольцами аминокислот и пиранозными кольцами гликозильных остатков в системе «фермент–субстрат», что приводит к снижению константы адсорбции целлюлоз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ферментный состав хроматографических фракций, различающихся аффинностью к целлюлозному субстрату, зависимость их активностей от степени кристалличности целлюлозы и содержания NaF свидетельствуют о том, что фторид может оказывать разнонаправленное действие на активность целлюлаз, которое определяется соотношением в целлюлазном комплексе ферментов с высоким и низким коэффициентом адсорбции на субстрате. Чем сильнее эффективность разложения растительного субстрата зависит от способности фермента адсорбироваться на целлюлозе, тем ярче проявляется ингибирующее действие

фторида, и наоборот – гидролиз аморфной целлюлозы, не требующий прочного взаимодействия ЦСД с субстратом, протекает более эффективно в присутствии NaF. В итоге суммарный результат будет определяться составом целлюлазного комплекса, степенью кристалличности целлюлозы и содержанием лигнина в субстрате.

В литературе уже отмечалось, что интенсивность разложения растительных остатков не зависит от загрязнения среды соединениями фтора, но на этот процесс влияет состав субстрата [25]. С другой стороны, степень кристалличности нативной целлюлозы зависит от типа растительной биомассы, увеличиваясь в ряду: травянистые растения < древесина < лубяные волокна < хлопковые волокна [17]. Поэтому не исключено, что для нативных целлюлазных комплексов, продуцируемых почвенными микромицетами, эффекторная роль фторидов в целом может оказаться положительной, и это компенсирует снижение скорости редукции растительного субстрата, вызванное нарушением видовой структуры почвенных микоценозов, длительное время обитающих в условиях постоянного воздействия аэропромвыбросов алюминиевых производств.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Каницкая Л.В., Колмогоров А.В. Влияние газовых выбросов при производстве алюминия на состояние окружающей среды // Успехи современного естествознания. 2009. 8. С. 17–18.
2. Евдокимова Г.А., Мозгова Н.П. Оценка загрязнения почв и растений в зоне воздействия газовой воздушных выбросов алюминиевого завода // Теоретическая и прикладная экология. 2015. N 4. С. 64–68. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2015-4-064-068>
3. Берсенева О.А., Саловарова В.П., Приставка А.А., Мелентьев В.А. Видовая структура почвенных микроценозов в серых лесных почвах Прибайкалья, подверженных воздействию аэропромвыбросов алюминиевого производства // Вестник РУДН. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2010. N 1. С. 24–29.
4. Евдокимова Г.А., Корнейкова М.В., Лебедева Е.В. Сообщества микромицетов в почвах в зоне воздействия алюминиевого завода // Микология и фитопатология. 2007. Т. 41. N 1. С. 20–28.
5. Благодатская Е.В., Семенов М.В., Якушев А.В. Активность и биомасса почвенных микроорганизмов в изменяющихся условиях окружающей среды. М.: Изд-во ООО «Товарищество научных изданий КМК», 2016. 243 с.
6. Katiyar P., Pandey N., Sahu K.K. Biological approaches of fluoride remediation: potential for environmental clean-up // Environmental Science and Pollution Research. 2020. Vol. 27. P. 13044–13055. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08224-2>
7. Евдокимова Г.А., Зенкова И.В., Мозгова Н.П., Переверзев В.Н. Почва и почвенная микробиота в условиях загрязнения фтором. Апатиты: Изд-во Кольского научного центра РАН, 2005. 135 с.
8. Макарова А.П., Буковская Н.Е., Напрасникова Е.В. Воздействие аэротехногенных выбросов алюминиевых производств в Иркутской области на почвенную микробиоту // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. 2017. Т. 19. С. 57–62.
9. Горностаева Е.А., Фукс С.Л. Влияние фторсодержащих соединений на живые организмы (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2017. N 1. С. 14–24. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2017-1-014-024>
10. Приставка А.А., Попова И.В. Влияние фторида натрия на ферментативную активность грибных целлюлаз // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2015. N 1 (12). С. 36–46.
11. Клесов А.А., Рабинович М.Л., Синицын А.П., Чурилова И.В., Григораш С.Ю. Ферментативный гидролиз целлюлозы. I. Активность и компонентный состав целлюлазных комплексов из различных источников // Биоорганическая химия. 1980. Т. 6. N 8. С. 1225–1242.
12. Sinitsyn A.P., Osipov D.O., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Dotsenko G.S., Sinitsyna O.A., et al. The production of highly effective enzyme complexes of cellulases and hemicellulases based on the *Penicillium verruculosum* strain for the hydrolysis of plant raw materials // Applied Biochemistry and Microbiology. 2014. Vol. 50. Issue 8. P. 761–772. <https://doi.org/10.1134/S0003683814080055>
13. Beheraa B.C., Sethib B.K., Mishra R.R., Dutta S.K., Thatoi H.N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2017. Vol. 15. Issue 1. P. 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>
14. Thygesen A., Oddershede J., Lilholt H., Thomsen A.B., Stahl K. On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres // Cellulose. 2005. Vol. 12. Issue 6. P. 563–576. <https://doi.org/10.1007/s10570-005-9001-8>
15. Kaschuk J.J., Frollini E. Effects of average molar weight, crystallinity, and hemicelluloses content on the enzymatic hydrolysis of sisal pulp, filter paper, and microcrystalline cellulose // Industrial Crops and Products. 2018. Vol. 15. P. 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.011>
16. Ahvenainen P., Kontro I., Svedström K. Comparison of sample crystallinity determination methods by X-ray diffraction for challenging cellulose I materials // Cellulose. 2016. Vol. 23. Issue 2. P. 1073–1086. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0881-6>
17. Иоелович М.Я. Модели надмолекулярной структуры и свойства целлюлозы // Высокомолекулярные соединения, Серия А. 2016. Т. 58. N 6. С. 604–624. <https://doi.org/10.7868/S2308112016060109>
18. Ghose T.K. Measurement of cellulase activity // Pure and Applied Chemistry. 1987. Vol. 59. P. 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
19. Рабинович М.Л., Клесов А.А., Березин И.В. Кинетика действия целлюлолитических ферментов из *Geotrichum candidum*. Вискозиметрический анализ кинетики гидролиза карбоксиметилцеллюлозы // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. N 3. С. 405–414.
20. Klyosov A.A., Mitkevich O.V., Sinitsyn A.P. Role of the activity and adsorption of cellulases in the efficiency of the enzymic hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose // Biochemistry. 1986. Vol. 25. Issue 3. P. 540–542. <https://doi.org/10.1021/bi00351a003>
21. Saloheimo M., Nakari-Setälä T., Tenkanen M., Penttilä M. cDNA cloning of a *Tricho-*

derma reesei cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast // European Journal of Biochemistry. 1997. Vol. 249. Issue 2. P. 584–591. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00584.x>

22. Pristavka A.A., Salovarova V.P., Zacchi G., Berezint I.V., Rabinovich M.L. Enzyme Recovery in High-Solids Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Willow: Requirements for the Enzyme Composition // Applied Biochemistry and Microbiology. 2000. Vol. 36. Issue 3. P. 237–244. <https://doi.org/10.1007/BF02742572>

23. Aghajari N., Feller G., Gerday C., Haser R. Structural basis of α -amylase activation by chloride // Protein Science. 2002. Vol. 11. Issue 6.

P. 1435–1441. <https://doi.org/10.1110/ps.0202602>

24. Linder M., Mattinen M.L., Kontteli M., Lindeberg G., Stihlberg J., Drakenberg T., et al. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I // Protein Science. 1995. Vol. 4. Issue 6. P. 1056–1064. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040604>

25. Evdokimova G.A., Mozgova N.P., Pereverzev V.N. Transformation of plant residues in the soil of a zone exposed to emissions from an aluminum smelter // Eurasian Soil Science. 2013. Vol. 46. Issue 8. P. 908–917. <https://doi.org/10.1134/S1064229313060033>

REFERENCES

1. Kanitskaya LV, Kolmogorov AV. Impact of gas emissions from aluminum production on the environment. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2009;8:17–18. (In Russian)

2. Evdokimova GA, Mozgova NP. Soil and plant pollution assessment in the zone of exposure to gas-air emissions from an aluminum smelter. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya* = Theoretical and Applied Ecology. 2015;4:64–68. (In Russian) <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2015-4-064-068>

3. Berseneva OA, Salovarova VP, Pristavka AA, Milentyev VA. Specific structure of the soil mycocenoses in grey forest soil of pribaikalye subject to influence of emissions of Irkutsk aluminum plant. *Vestnik RUDN. Seriya Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti* = RUDN Journal of Ecology and Life Safety. 2010;1:24–29. (In Russian)

4. Evdokimova GA, Korneykova MV, Lebedeva EV. Micromycete communities in soils in an aluminum smelter impact area. *Mikologiya i Fitopatologiya* = Mycology and Phytopathology. 2007;41(1):20–28. (In Russian)

5. Blagodatskaya EV, Semenov MV, Yakushev AV. *Activity and biomass of soil microorganisms in changing environmental conditions*. Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK; 2016. 243 p. (In Russian)

6. Katiyar P, Pandey N, Sahu KK. Biological approaches of fluoride remediation: potential for environmental clean-up. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27:13044–13055. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08224-2>

7. Evdokimova GA, Zenkova IV, Mozgova NP. *Soil and soil microbiota under fluorine pollution*. Apatity: Kol'skii nauchnyi tsentr RAN; 2005. 135 p. (In Russian)

8. Makarova AP, Bukovskaja NE, Naprasnikova EV. The Impact of Aerotechnogenic Emissions from Aluminum Smelters in the Irkutsk Region on the Soil Microbiota. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Biologiya*.

Ekologiya = The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology. 2017;19:57–62. (In Russian)

9. Gornostaeva EA, Fuks SL. The effect of fluorinated compounds on living organisms (review). *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya* = Theoretical and Applied Ecology. 2017;1:14–24. (In Russian)

10. Pristavka AA, Popova IV. Influence of sodium fluoride on enzymatic activity of fungal cellulases. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2015;1:36–46. (In Russian)

11. Klyosov AA, Rabinowitch ML, Sinitsyn AP, Churilova IV, Grigorash SYu. Enzymatic hydrolysis of cellulose. I. Activity and composition of cellulase complexes from various sources. *Bioorganicheskaya Khimiya* = Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 1980;6(8):1225–1242. (In Russian)

12. Sinitsyn AP, Osipov DO, Rozhkova AM, Bushina EV, Dotsenko GS, Sinitsyna OA, et al. The production of highly effective enzyme complexes of cellulases and hemicellulases based on the *Penicillium verruculosum* strain for the hydrolysis of plant raw materials. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014;50(8):761–772. <https://doi.org/10.1134/S0003683814080055>

13. Beheraa BC, Sethib BK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15(1):197–210. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>

14. Thygesen A, Oddershede J, Lilholt H, Thomsen AB, Stahl K. On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. *Cellulose*. 2005;12(6):563–576. <https://doi.org/10.1007/s10570-005-9001-8>

15. Kaschuk JJ, Frollini E. Effects of average molar weight, crystallinity, and hemicelluloses content on the enzymatic hydrolysis of sisal pulp,

filter paper, and microcrystalline cellulose. *Industrial Crops and Products*. 2018;15:280–289. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.011>

16. Ahvenainen P, Kontro I, Svedström K. Comparison of sample crystallinity determination methods by X-ray diffraction for challenging cellulose I materials. *Cellulose*. 2016;23(2):1073–1086. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0881-6>

17. Ioelovich MYa. Models of supramolecular structure and properties of cellulose. *Vysokomolekulyarnye soedineniya, Seriya A.* = Polymer Science, Series A. 2016;58:925–943. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0965545X16060109>

18. Ghose TK. Measurement of cellulase activity. *Pure and Applied Chemistry*. 1987;59:257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

19. Rabinowitch ML, Klyosov AA, Berezin IV. Kinetics of the action of cellulolytic enzymes from *Geotrichum candidum*. Viscometric analysis of the kinetics of carboxymethyl cellulose hydrolysis. *Bioorganicheskaya khimiya* = Russian Journal of Bioorganic Chemistry 1977;3(3):405–414. (In Russian)

20. Klyosov AA, Mitkevich OV, Sinitsyn AP. Role of the activity and adsorption of cellulases in the efficiency of the enzymic hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose. *Biochemistry*. 1986;25(3):540–542 <https://doi.org/10.1021/bi00351a003>

21. Saloheimo M, Nakari-Setälä T, Tenkanen M, Penttilä M. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. *European Journal of Biochemistry*. 1997;249(2):584–591. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00584.x>

22. Pristavka AA, Salovarova VP, Zacchi G, Berezint IV, Rabinovich ML. Enzyme Recovery in High-Solids Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Willow: Requirements for the Enzyme Composition. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2000;36(3):237–244. <https://doi.org/10.1007/BF02742572>

23. Aghajari N, Feller G, Gerday C, Haser R. Structural basis of α -amylase activation by chloride. *Protein Science*. 2002;11(6):1435–1441. <https://doi.org/10.1110/ps.0202602>

24. Linder M, Mattinen ML, Kontteli M, Lindeberg G, Stihlberg J, Drakenberg T., et al. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein Science*. 1995;4(6):1056–1064. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040604>

25. Evdokimova GA, Mozgova NP, Pereverzev VN. Transformation of plant residues in the soil of a zone exposed to emissions from an aluminum smelter. *Eurasian Soil Science*. 2013;46(8):908–917. <https://doi.org/10.1134/S1064229313060033>

Критерии авторства

Чашина Е.Р., Ефременко З.А., Саловарова В.П., Гавриков Д.Е., Приставка А.А. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Чашина Екатерина Руслановна,
студент магистратуры,
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: chashina-ek@mail.ru

Contribution

Ekaterina R. Chashina, Zinaida A. Efremenko, Valentina P. Salovarova, Dmitrii E. Gavrikov, Aleksey A. Pristavka carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina R. Chashina,
Master Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: chashina-ek@mail.ru

Ефременко Зинаида Александровна,
аспирант,
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: makar.efremenko@mail.ru

Саловарова Валентина Петровна,
д.б.н., профессор,
заведующая кафедрой физико-химической
биологии, биоинженерии и биоинформатики,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: vsalovarova@rambler.ru

Гавриков Дмитрий Евгеньевич,
к.б.н., доцент кафедры
естественнонаучных дисциплин,
Педагогический институт Иркутского
государственного университета,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: dega.irk@gmail.com

Приставка Алексей Александрович,
к.б.н., доцент кафедры физико-химической
биологии, биоинженерии и биоинформатики,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: pristavk@gmail.com

Zinaida A. Efremenko,
Postgraduate Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: makar.efremenko@mail.ru

Valentina P. Salovarova,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the Department of Physico-Chemical
Biology, Bioengineering and Bioinformatics
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: vsalovarova@rambler.ru

Dmitrii E. Gavrikov,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Department of Natural Sciences,
Pedagogical Institute, Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: dega.irk@gmail.com

Aleksey A. Pristavka,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Department of Physico-Chemical Biology,
Bioengineering and Bioinformatics,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: pristavk@gmail.com