

УДК 577.15

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА УГЛЕВОДОВ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА

© 2019 г. М. В. Семёнова^{1, *}, А. М. Рожкова¹, Д. О. Осипов¹, А. Д. Сатрутдинов¹,
О. А. Сеницына², Е. А. Рубцова¹, Е. Г. Кондратьева¹, А. П. Сеницын^{1, 2}

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: margs@mail.ru

Поступила в редакцию 27.12.2018 г.

После доработки 08.04.2019 г.

Принята к публикации 20.06.2019 г.

Показано, что для эффективного гидролиза свекловичного жома (СЖ) необходимо присутствие целлюбогидролазы, β-глюкозидазы, эндо-глюканазы, арабиноксилан-арабинофурангидролазы, пектинлиазы, полигалактуроназы. Подобраны оптимальные мультиферментные смеси, включающие эти ферменты, а также дополнительно эндо- или экзо-арабиназы, эндо-галактаназу, β-ксилозидазу, эндо-ксиланазу и/или α-арабинофуранозидазу, которые обеспечивали степень гидролиза СЖ по выходу восстанавливающих сахаров (ВС) 61–68%, по выходу арабинозы – 94%, глюкозы – 63–79%. Мультиферментная композиция из сухих ферментных препаратов (ФП) целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ, полученных на основе штаммов грибов *Penicillium canescens*, *P. verruculosum* и *Aspergillus foetidus*, давала степень гидролиза СЖ по арабинозе и глюкозе близкой к 100% при исходной концентрации субстрата 100–250 г/л и концентрации ФП 5–10 мг белка/г субстрата после 24–48 ч гидролиза.

Ключевые слова: свекловичный жом, арабиноза, глюкоза, этанол, целлюлазы, арабиназы

DOI: 10.1134/S0555109919050118

Свекловичный жом (СЖ) является побочным продуктом переработки сахарной свеклы и, как правило, используется в животноводстве как ценный и дешевый корм. После извлечения сахарозы в СЖ остается 18–23% сухих веществ [1], ~80% которых полисахариды, включающие 22–24% (от сухого вещества) целлюлозы, 24–32% гемицеллюлозы (преимущественно арабинана), 15–32% пектиновых веществ [2, 3]. В небольших количествах содержатся также белок (8–11%), жиры (1–2%) и лигнин (3–6%). Анализ компонентного состава СЖ [4] свидетельствует о высоком содержании арабинозы и глюкозы (каждая до 21% от сухого вещества), которые могут быть конвертированы в спирты, amino- и органические кислоты и другие продукты микробиологического синтеза [5, 6].

Гидролиз полисахаридов СЖ осуществляли и ранее с целью получения пектина [7, 8], арабинана [9], олиго- [3] и моносахаров [4–6, 10–12]. В работе [10] изучался процесс гидролиза СЖ коммерческими ферментными препаратами (ФП) целлюлаз и пектиназ. Было показано, что большую роль при гидролизе СЖ играют пектиназы, необходимые для удаления пектина с поверхно-

сти целлюлозных волокон. В работах [3, 4, 6] для конверсии СЖ были использованы коммерческие ФП пектиназ или смесь пектиназ с целлюлазами. Обработку СЖ при концентрации субстрата 6–10% по сухому веществу проводили в течение нескольких суток.

Цель работы – подбор состава ферментов для осуществления глубокой конверсии СЖ с максимальным выходом сахаров (арабинозы, глюкозы), наименьшими затратами ФП при максимальной концентрации СЖ.

МЕТОДИКА

Штаммы и ферменты. В работе были использованы ФП, представляющие собой лиофильно высушенные культуральные жидкости (КЖ) штаммов гриба *P. canescens* с клонированными гомологичными пектинлиазой (штамм РСА-ПЛ), арабиноксилан-арабинофурангидролазой (РСА-АКГ), экзо-арабинозой (РСА-экзоА), гетерологичной эндо-арабинозой (РСА-эндоА), штаммов гриба *P. verruculosum* В1-Целл и Ф-10 – продуцентов целлюлаз и гетерологичной β-глюкозидазы соот-

ветственно, а также штамма гриба *A. foetidus* 70a – продуцента пектиназы и гемицеллюлазы.

Гомогенные ферменты были выделены из перечисленных выше ФП по методикам, описанным в работах [11, 13–19].

Реагенты. Для создания буферных смесей использовали реактивы фирм “Bio-Rad” (США), “Panreac” (Германия), “Helicon” и “Реахим” (Россия). В качестве стандартов при хроматографическом исследовании продуктов гидролиза использовали ксилозу, арабинозу, фруктозу, глюкозу, галактозу, сахарозу, целлобиозу (“Megazyme”, Австралия).

Коммерческий СЖ (содержание сухих веществ 96%) был измельчен до частиц 0.5–1.0 мм на мельнице MF10 basic (“IKA Werke”, Германия).

Субстраты для определения специфических активностей: арабинаны линейный и разветвленный из сахарной свеклы, арабиноксилан из пшеницы, галактан из картофеля – все “Megazyme” (Австралия); К-соль полигалактуроновой кислоты (ПГК), Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), ксилан из бука, цитрусовый пектин со степенью этерификации около 70%, *n*-нитрофенил- α -арабинофуранозид (пНФАФ), *n*-нитрофенил- β -глюкопиранозид (пНФГл), *n*-нитрофенил- β -ксилопиранозид (пНФК) – “Sigma” (США); гемоглобин и микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) – “Витек” (Россия).

Определение активности ферментов. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин.

Активности по отношению к полисахаридным субстратам (концентрация 5 г/л в реакционной смеси) определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС) при pH 5.0 и 50°C методом Шомоди–Нельсона [20].

Активности по отношению к *n*-нитрофенильным производным сахаров (0.9 мМ в реакционной смеси) определяли по скорости образования *n*-нитрофенола при pH 5.0 и 40°C [20].

Общую протеолитическую активность ФП определяли по отношению к гемоглобину (1% раствор в реакционной смеси) при pH 4.7 и 30°C методом Ансона [21].

Лиазную активность определяли по изменению оптической плотности при 232 нм, регистрирующей накопление 4,5-ненасыщенного продукта трансэлиминирования пектина [22].

Концентрацию глюкозы в гидролизатах СЖ определяли с помощью набора “Фотоглюкоза” (“Импакт”, Россия) согласно инструкции.

Содержание белка в ФП определяли методом Лоури, используя БСА в качестве стандарта. Концентрацию гомогенных ферментов оценивали по оптической плотности при 280 нм, используя рас-

считанные по аминокислотной последовательности коэффициенты экстинкции.

Электрофорез в 12%-ном ПААГ с Na-ДДС проводили на приборе MiniProtein (“Bio-Rad”, США) согласно руководству к прибору. Содержание индивидуальных белков в ФП оценивалось методом денситометрии.

Ферментативный гидролиз СЖ. Гидролиз СЖ проводили под действием гомогенных ферментов или их смесей, при сохранении общей суммарной дозировки по белку 2 мг/г субстрата или 0.2 мг/мл реакционной смеси (весовые доли индивидуальных ферментов в их смесях были равными, если не оговорено отдельно) в пробирках объемом 2 мл (объем реакционной смеси 1.5 мл) в термостатируемом шейкере. Гидролиз СЖ ФП проводили при концентрации ФП 10 мг белка/г субстрата или 1 мг/мл реакционной смеси в пластиковых ячейках объемом 60 мл (объем реакционной смеси 20 мл) в термостатируемом шейкере. Во всех случаях процесс гидролиза вели в присутствии 0.1 г/л антибиотика ампиокса и 0.001 М азида натрия при pH 5.0 и 40°C.

В ходе процесса отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию ВС (методом Шомоди–Нельсона), глюкозы (с помощью набора “Фотоглюкоза”), белка (методом Лоури). Состав низкомолекулярных продуктов определяли с помощью ионообменной хроматографии на системе HPLC Agilent 1100 Series (“Agilent”, США) на колонке Диасфер-110-Амин 5 мкм 4.0 × 250 мм (элюент ацетонитрил : вода 77 : 23, скорость потока 1 мл/мин, объем анализируемого образца 10–100 мкл). Пробу для анализа готовили, добавляя к 0.2 мл гидролизата 0.8 мл ацетонитрила с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 9000 g.

Глубину гидролиза СЖ рассчитывали исходя из содержания в нем полисахаридов, арабинозы и глюкозы [2–4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гидролиз СЖ гомогенными ферментами. Из ФП штаммов грибов *P. verruculosum*, *P. canescens* и *A. foetidus* были выделены 12 очищенных ферментов (гомогенных по данным электрофореза в ПААГ с Na-ДДС) и определены их удельные активности (табл. 1).

Ферменты целлюлазного комплекса: целлюбиогидролаза 1 (ЦБГ1), эндо-глюканаза 2 (ЭГ2) и β -глюкозидаза (β Г) – обладали высокими активностями по отношению к МКЦ, КМЦ и пНФГл соответственно. Пектиназы – пектинлиаза (ПЛ) и полигалактуроноаза (ПГ) были активны по отношению к пектину и ПГК соответственно. Эндо-арабиназа (эндоА) и экзо-арабиназа (экзоА) обладали высокой активностью по отношению к

Таблица 1. Гомогенные ферменты и их удельные активности по отношению к специфическим субстратам

Фермент	Мол. масса, кДа	Источник (штамм)	Активность (субстрат), ед./мг белка
ЦБГ1	66	<i>P. verruculosum</i> , В1-Целл	0.19 ± 0.02 (МКЦ)
ЭГ2	39	<i>P. verruculosum</i> , В1-Целл	19.81 ± 0.97 (КМЦ)
βГ	116	<i>A. niger</i> , Ф-10	94.54 ± 4.73 (пНФГл)
ПЛ	38	<i>P. canescens</i> , РСА-ПЛ	19.01 ± 0.95 (пектин)
ПГ	38	<i>A. foetidus</i> , Af-70a	360.30 ± 18.02 (ПГК)
ЭндоА	40	<i>A. foetidus</i> , РСА-эндоА	52.40 ± 2.62 (АЛ*)
ЭкзоА	47	<i>A. niger</i> , РСА-экзоА	113.03 ± 5.65 (АЛ*)
АКГ	70	<i>P. canescens</i> , РСА-АКГ	81.19 ± 4.06/27.98 ± 1.40 (АК**/АР***)
ЭК	31	<i>P. canescens</i> , РСА-экзоА	119.26 ± 5.96 (ксилан)
ЭГал	42–44	<i>A. foetidus</i> , Af-70a	497.19 ± 9.86 (галактан)
βК	110	<i>A. foetidus</i> , Af-70a	34.85 ± 1.74 (пНФК)
АФ	65	<i>A. foetidus</i> , Af-70a	18.06 ± 0.90 (пНФАФ)

* Линейный арабинан; ** арабиноксилан; *** разветвленный арабинан.

Таблица 2. Содержание ВС и моносахаридов (г/л) в реакционной смеси после 48 ч гидролиза СЖ (100 г/л) гомогенными ферментами (2 мг/г СЖ)

Фермент	ВС	Арабиноза	Фруктоза	Глюкоза	Ксилобиоза	Олигосахарид	Целлобиоза
ЦБГ1 + βГ	7.52 ± 0.77	0	0.73 ± 0.07	2.42 ± 0.21	0	0	0
ЭГ2	2.39 ± 0.25	0	0.32 ± 0.03	0.44 ± 0.04	0	0	0.13 ± 0.01
ПЛ	14.09 ± 1.14	4.20 ± 0.41	0.39 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0	0	0
АКГ	11.70 ± 0.72	1.99 ± 0.19	0.99 ± 0.09	1.44 ± 0.14	0	0	0
ЭК	6.94 ± 0.50	2.07 ± 0.24	0.45 ± 0.04	0.39 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0	0
ЭкзоА	8.94 ± 0.62	2.93 ± 0.35	0.75 ± 0.08	0.74 ± 0.07	0	0	0
ЭндоА	7.99 ± 0.37	1.30 ± 0.12	0.68 ± 0.06	1.04 ± 0.09	0	0	0
ЭГал	9.75 ± 0.94	0.59 ± 0.05	0.57 ± 0.05	0.60 ± 0.06	0	6.27 ± 0.61	0
βК	1.73 ± 0.16	0.24 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0	0	0
ПГ	6.14 ± 0.30	0	0.80 ± 0.07	1.09 ± 0.10	0	0	0
АФ	10.48 ± 0.75	1.90 ± 0.18	1.00 ± 0.09	1.59 ± 0.14	0	0	0

линейному арабинану, арабиноксилан-арабинофурангидролаза (АКГ) — к разветвленному арабинану (неспецифическому для нее субстрату) и арабиноксилану; эндо-ксиланаза (ЭК) и эндо-галактаназа (ЭГал) — к ксилану и галактану соответственно; β-ксилозидаза (βК) и α-арабинофуранозидаза (АФ) — к пНФК и пНФАФ соответственно.

Гидролиз СЖ индивидуальными гомогенными ферментами (исключение составляла ЦБГ1, которая находилась в смеси с избытком βГ в соотношении 9 : 1), как и ожидалось, привел к незначительному образованию сахаров (табл. 2). Наибольшая концентрация ВС (11–14 г/л) после 48-часового гидролиза при исходной концентрации СЖ 100 г/л наблюдалась при внесении ПЛ, АКГ и АФ; действию смеси ЦБГ1 с βГ, а индивидуальных ЭК,

эндоА, экзоА, ЭГал и ПГ — 6–10 г/л ВС; индивидуальных ЭГ2 и βК — ~2 г/л ВС.

При выдерживании СЖ в условиях реакции гидролиза без ферментативной обработки в небольшом количестве определялись фруктоза и глюкоза (0.2 г/л). Действие ЭГ на СЖ привело к накоплению небольшого количества целлобиозы (0.13 г/л), при воздействии смеси ЦБГ1 с βГ — 2.42 г/л глюкозы, ЭК — 2.07 г/л арабинозы и 0.23 г/л ксилобиозы, βК, АКГ, АФ, эндоА, экзоА — арабинозы как основного продукта (0.24–2.93 г/л), ЭГал — олигомерного продукта со степенью полимеризации (СП) 2 (6.27 г/л) и ПЛ — 4.20 г/л арабинозы.

Далее был проведен гидролиз СЖ различными по составу смесями (табл. 3). Смесь всех ферментов (№ 1) давала концентрацию ВС 33.6 г/л, что соответствовало конверсии полисахаридов СЖ 42%.

Таблица 3. Содержание ВС и моносахаридов в реакционной смеси после 48 ч гидролиза СЖ (100 г/л) смесями гомогенных ферментов (2 мг/г СЖ)

№ смеси: состав	ВС, г/л	Арабиноза, г/л	Галактоза, г/л	Глюкоза, г/л
1: все ферменты	33.6 ± 1.7	12.6 ± 0.6	0.8 ± 0.1	9.1 ± 0.4
2: ЦБГ1 с βГ, АКГ, ПЛ	31.3 ± 1.1	11.5 ± 0.6	0.7 ± 0.1	7.8 ± 0.3
3: ЦБГ1 с βГ, АКГ, ПЛ, ЭГ2, ПГ	35.7 ± 1.9	14.5 ± 0.7	0.9 ± 0.1	10.9 ± 0.6
4: ЦБГ1 с βГ, АКГ, ПЛ, ЭГ2, ПГ, ПФ, экзоА	43.1 ± 2.5 (49.1 ± 2.9)*	19.6 ± 1.0*	1.3 ± 0.2*	15.8 ± 0.8*
5: ЦБГ1 с βГ, АКГ, ПЛ, ЭГ2, ПГ, АФ, экзоА, ЭГал	41.2 ± 2.8 (53.5 ± 3.5)*	19.3 ± 0.9*	2.1 ± 0.3*	16.7 ± 0.7*
6: ЦБГ1 с βГ, АКГ, ПЛ, ЭГ2, ПГ, ЭК, βК, эндоА, ЭГал	42.7 ± 2.3 (54.1 ± 3.3)*	17.8 ± 0.8*	1.4 ± 0.2*	13.2 ± 0.6*
7: ЦБГ1 с βГ, АКГ, ПЛ, ЭГ2, ПГ, βК, АФ, экзоА, ЭГал	44.9 ± 2.6 (54.5 ± 3.7)*	17.6 ± 0.9*	1.5 ± 0.2*	14.3 ± 0.7*

* Данные за 72 ч.

Выход арабинозы составил 12.6 г/л (60% от максимально возможного), глюкозы — 9.1 г/л (43% от максимально возможного).

Для выявления ключевых для конверсии СЖ ферментов и оптимизации состава ферментативной смеси далее из смеси № 1 исключали по одному ферменту, что в ряде случаев привело к сопоставимым с использованием смеси № 1 результатам по выходу ВС (данные не приводятся). Исключение составляли смеси ферментов без ЦБГ1 с βГ, без АКГ и без ПЛ, при исключении которых выход ВС составил 27.4, 30.5 и 28.8 г/л соответственно. Таким образом ферменты ЦБГ1 с βГ, АКГ и ПЛ были необходимыми для эффективного гидролиза СЖ. Однако при составлении смеси только этих ферментов (№ 2) получали 31.3 г/л ВС (11.5 г/л арабинозы, 7.8 г/л глюкозы, табл. 3) — меньше, чем при использовании смеси №1, что указывает на необходимость добавления других (вспомогательных) ферментов.

На следующем этапе из смеси № 1 исключали по два фермента кроме ключевых. Было отмечено, что при использовании смесей, в которых отсутствовали ЭГ2 и/или ПГ, образовывалось не более 39 г/л ВС, в то время как в остальных случаях (когда присутствовали ЭГ2 и ПГ, но исключались ЭК, βК, АФ, эндоА, экзоА и ЭГал) были смеси, приводящие к концентрации ВС >40 г/л. Таким образом, ЭГ2 и ПГ также были отнесены к ключевым для гидролиза СЖ. Смесь ферментов № 3, содержащая ЦБГ1, βГ, АКГ, ПЛ, ЭГ2 и ПГ приводила к образованию 35.7 г/л ВС (14.5 г/л арабинозы, 10.9 г/л глюкозы, табл. 3).

Далее на основе смеси № 3 путем добавления к ней в разном сочетании ЭК, βК, АФ, эндоА, экзоА и/или ЭГал (при добавлении от одного до пяти из этих ферментов) были отобраны четыре

смеси (№ 4–7), использование которых позволяло получать наибольшие значения концентрации ВС и моносахаров. Этими смесями ферментов был проведен гидролиз СЖ в течение 72 ч: при этом концентрация ВС составила 49.1–54.5 г/л, что соответствовало конверсии полисахаридов СЖ 61–68%, арабинозы — 17.6–19.6 г/л (94% от максимально возможного), глюкозы — 13.2–16.7 г/л (63–79% от максимально возможного).

Гидролиз СЖ ферментными препаратами. Для конверсии СЖ были использованы лабораторные ФП (электрофореграммы ФП приведены на рис. 1) с преимущественным содержанием одного клонированного фермента: Ф-10 (содержание βГ от общего белка 70%), РСА-ПЛ (47% ПЛ), РСА-АКГ (29% АКГ), РСА-экзоА (20% экзоА, 12% ЭК), РСА-эндоА (22% эндоА, 11% ЭК), а также мультикомпонентные препараты: целлюлазы (**В1-Целл**) (общее содержание ЦБГ1 и ЦБГ2 50%, ЭГ1, ЭГ2 и ЭГ3 17%), *A. foetidus* (**Аf-70a**) (содержание АФ 24%, ПГ 12%, βК и ЭГал — менее 1%). В табл. 4 представлены активности ФП по отношению к ряду субстратов. Следует отметить высокие активности по отношению к арабинану у ФП РСА-АКГ, РСА-эндоА и РСА-экзоА (23–42 ед./мг) и наличие активности к КМЦ как у целлюлаз В1-Целл и Ф-10 (7.8 ед./мг), так и у остальных ФП (1.2–1.4 ед./мг), что свидетельствовало о присутствии в этих ФП активности эндо-глюканазы.

При гидролизе СЖ (100 г/л) индивидуальными ФП (за исключением смеси В1-Целл с Ф-10 в соотношении 9 : 1, табл. 5) накопление арабинозы (6–8 г/л за 48 ч) наблюдали для всех ФП. Концентрация глюкозы для смеси В1-Целл и Ф-10 составила 11.2 г/л, для остальных ФП — 3–8 г/л. Для всех ФП концентрация галактозы составила 0.5–1.8 г/л. Следует отметить, что для всех использованных

ФП наблюдалось накопление фруктозы до 1.5–3.4 г/л. Используемые ФП обладали относительно низкой протеолитической активностью (табл. 4), однако при конверсии СЖ наблюдали относительно высокий выход растворимого белка – 4.7–6.7 г/л (что составляло 50–65% от общего содержания белка в СЖ). Это происходило, вероятно, благодаря разрушению полисахаридной сетки жома и высвобождению связанного белка.

В дальнейшем моделировали гидролиз СЖ смесями различных ФП. Ранее нами было установлено [15], что гомогенные экзоА и эндоА не проявляли синергизма при совместном гидролизе арабианов. Действие этих ферментов на разветвленный арабинан существенно усиливалось в присутствии ферментов, активных по отношению к боковым арабинозным остаткам субстрата – АКГ и АФ. Предварительные эксперименты на СЖ (данные не приводятся) подтвердили отсутствие синергетического эффекта ФП РСА-экзоА и РСА-эндоА, вследствие этого при составлении оптимальной смеси ФП в нее были включены либо РСА-экзоА, либо РСА-эндоА. Кроме того, было установлено (данные не приводятся), что доля целлюлазного ФП должна составлять не менее половины от общего количества белка – в этом слу-

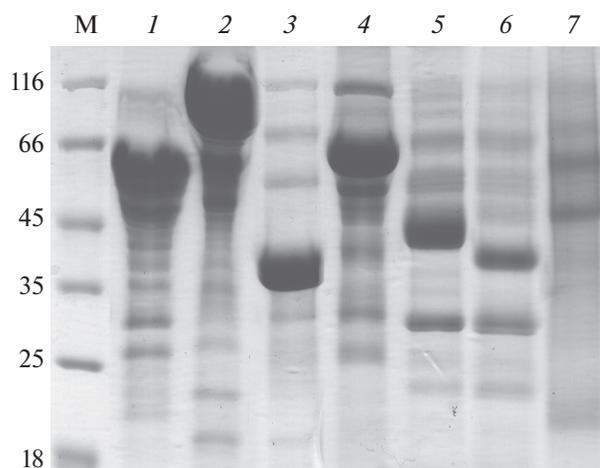


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ с Na-ДДС сухих ФП: 1 – В1-Целл, 2 – Ф-10, 3 – РСА-ПЛ, 4 – РСА-АКГ, 5 – РСА-экзоА; 6 – РСА-эндоА, 7 – Аf-70а. М – маркеры, указаны молекулярные массы стандартных белков.

чае скорость накопления глюкозы становится соизмеримой со скоростью накопления арабинозы.

Были составлены две смеси ФП № 8 и № 9, отличающиеся присутствием РСА-экзоА (смесь

Таблица 4. Удельные активности ФП по отношению к ряду субстратов (ед./мг белка)

ФП	МКЦ	КМЦ	ПГК	АЛ*	Галактан	Ксилан	АК**	пНФГ	Пектин	Гемоглобин
В1-Целл	0.4 ± 0.1	7.8 ± 0.7	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	27.7 ± 2.1	12.7 ± 0.8	1.0 ± 0.1	0	0
Ф-10	0.1 ± 0.1	7.8 ± 0.6	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	4.4 ± 0.3	2.9 ± 0.3	53.4 ± 2.6	0	0
РСА-АКГ	0	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1	41.8 ± 2.9	1.0 ± 0.1	3.4 ± 0.2	32.5 ± 2.6	0.4 ± 0.1	0	0.1 ± 0.1
РСА-ЭкзоА	0	1.3 ± 0.1	0.7 ± 0.1	36.3 ± 2.4	0.6 ± 0.1	17.6 ± 1.4	20.2 ± 1.9	0.1 ± 0.1	0	0
РСА-ЭндоА	0	1.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	23.2 ± 0.8	0.4 ± 0.1	34.2 ± 2.1	32.0 ± 2.3	0.1 ± 0.1	0	0.1 ± 0.1
РСА-ПЛ	0	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.9 ± 0.2	4.3 ± 0.4	0	8.3 ± 0.9	0.1 ± 0.1
Аf-70а	0	1.4 ± 0.1	17.6 ± 1.3	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.1	0	0.6 ± 0.1

* Линейный арабинан; ** арабиноксилан.

Таблица 5. Содержание ВС, моносахаридов и белка в реакционной смеси после 48 ч гидролиза СЖ (100 г/л) ФП и их смесями (10 мг белка/г СЖ)

ФП	ВС, г/л	Арабиноза, г/л	Фруктоза, г/л	Галактоза, г/л	Глюкоза, г/л	Белок, г/л
В1-Целл+Ф-10	34.2 ± 1.7	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2	11.2 ± 0.8	6.2 ± 0.1
РСА-АКГ	43.6 ± 2.4	7.2 ± 0.7	3.1 ± 0.5	1.8 ± 0.2	8.4 ± 0.4	6.5 ± 0.3
РСА-экзоА	31.7 ± 1.6	5.8 ± 0.5	2.8 ± 0.3	0.9 ± 0.1	5.5 ± 0.3	4.7 ± 0.1
РСА-эндоА	35.0 ± 1.7	6.4 ± 0.6	3.0 ± 0.3	0.6 ± 0.1	4.9 ± 0.3	5.3 ± 0.2
РСА-ПЛ	37.0 ± 1.8	7.8 ± 0.4	3.4 ± 0.4	0.5 ± 0.1	3.3 ± 0.2	6.7 ± 0.2
Аf-70а	36.6 ± 1.7	6.0 ± 0.3	3.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1	7.3 ± 0.6	6.5 ± 0.2
Смесь № 8: В1-Целл+Ф-10, РСА-АКГ, РСА-ПЛ, Аf-70а, РСА-экзоА	56.5 ± 1.2	18.5 ± 1.7		4.6 ± 0.7	24.7 ± 1.2	9.5 ± 0.9
Смесь № 9: В1-Целл+Ф-10, РСА-АКГ, РСА-ПЛ, Аf-70а, РСА-эндоА	58.6 ± 1.9	19.9 ± 2.1		3.4 ± 0.6	25.5 ± 1.3	9.7 ± 0.7

ФП № 8) или РСА-эндоА (смесь ФП № 9), следующего состава: В1-Целл + Ф-10 (считали как один ФП): РСА-АКГ : РСА-ПЛ : Af-70a : РСА-экзоА/или РСА-эндоА = 10 : 2 : 2 : 5 : 1. Смесь составляли так, чтобы общая дозировка белка в реакционной смеси была 10 мг/г СЖ (концентрация СЖ 100 г/л). Удаление какого-либо компонента из составленных смесей приводило к снижению выхода продуктов (данные не приводятся). В результате за 48 ч гидролиза СЖ смесями ФП № 8 и № 9 была достигнута концентрация ВС 56.5 и 58.6 г/л (что соответствовало конверсии полисахаридов 71–73%), арабинозы – 18.5 и 19.9 г/л (97% от максимально возможного), глюкозы – 24.7 и 25.5 г/л (до 100% от максимально возможного), галактозы – 4.6 и 3.4 г/л (70–90% от максимально возможного [4]), белка – 9.5 и 9.7 г/л (95–97%) (табл. 5).

Далее проводили гидролиз СЖ (100 г/л) смесями ФП № 8 и № 9, используя различные концентрации ФП по белку 1, 2, 5, 10, 20 мг белка/г СЖ (на рис. 2 представлены результаты только для смеси ФП № 9, поскольку для смеси № 8 были получены близкие к этим данные). После 48 ч гидролиза смесью ФП № 9 при 5–20 мг белка/г СЖ выход основных продуктов был одинаковый и не зависел от концентрации ФП; дальнейшее же ее снижение приводило к существенному уменьшению выхода сахаров.

Был проведен гидролиз СЖ при исходных концентрациях субстрата 100, 150, 200 и 250 г/л с использованием смесей ФП № 8 и № 9 (на рис. 3 представлены данные для смеси ФП № 9). Увеличение концентрации СЖ до 250 г/л приводило к незначительному уменьшению концентрации продуктов за 48 ч гидролиза. Конверсия полисахаридов субстрата по ВС снизилась с 74% (для 100 г/л) до 71% (для 250 г/л), выход арабинозы от максимально возможного составил – от 96 до 84%, глюкозы – от 100 до 90%, белка – от 100 до 88%. Итоговый выход продуктов при исходной концентрации СЖ 250 г/л составил: 142.4 г/л ВС, 44.2 г/л арабинозы, 49.1 г/л глюкозы, 9.3 г/л галактозы, 22.1 г/л белка.

На рис. 4 представлена динамика накопления основных продуктов гидролиза СЖ (250 г/л) под действием смеси ФП № 9 в концентрациях 10 и 5 мг/г в течение 72 ч. За 24 ч выход продуктов гидролиза СЖ составил 3/4 от максимального, достигнутого за 72 ч, даже при концентрации ФП 5 мг/г. При этом скорости накопления арабинозы и глюкозы были соизмеримы. Общий выход продуктов за 72 ч составил: 155.2 г/л по ВС (конверсия полисахаридов 78%), 45.8 г/л арабинозы (89% от максимально возможного), 52.3 г/л глюкозы (99%), 11.2 г/л галактозы (88%), 22.9 г/л белка (92%).

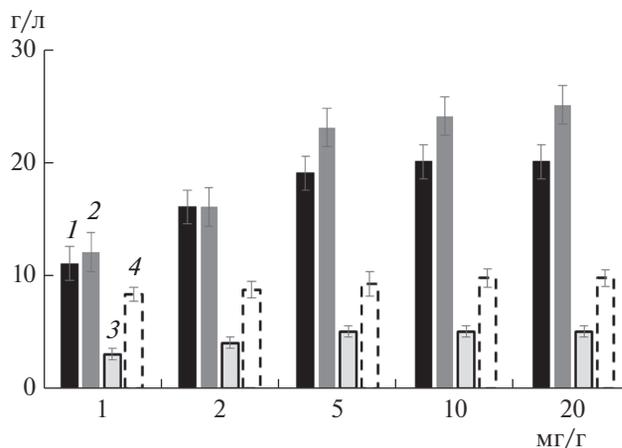


Рис. 2. Содержание арабинозы (1), глюкозы (2), галактозы (3) и белка (4) после 48 ч гидролиза СЖ (100 г/л) в зависимости от концентрации смеси № 9.

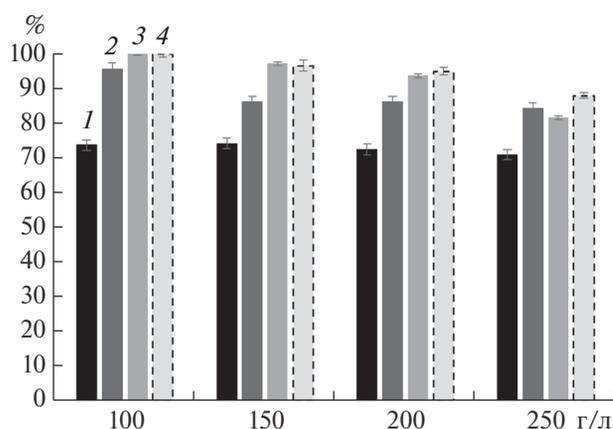


Рис. 3. Степень гидролиза СЖ (250, 200, 150 и 100 г/л) после 48 ч гидролиза смесью № 9 (10 мг/г): 1 – конверсия полисахаридов, %; 2 – арабинозы; 3 – глюкозы; 4 – белка.

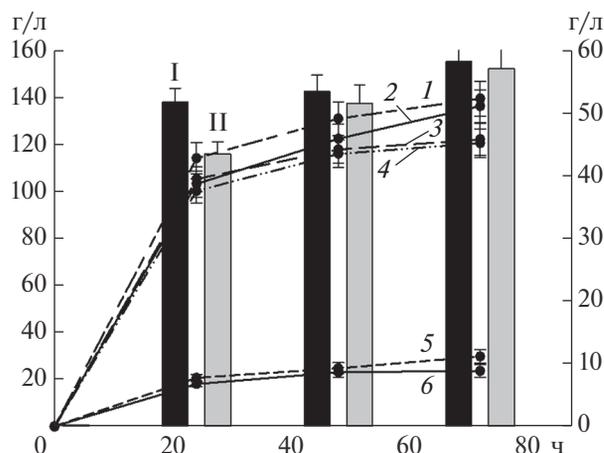


Рис. 4. Изменение концентрации ВС (I-II) и моносахаров (1–6) (г/л) при гидролизе СЖ (250 г/л) в течение 72 ч смесью №9 в концентрациях 10 (I, 1, 3, 5) и 5 мг/г (II, 2, 4, 6): 1, 2 – концентрация глюкозы; 3, 4 – арабинозы; 5, 6 – галактозы.

Таким образом, в ходе исследований были найдены необходимые для глубокой конверсии СЖ до моносахаридов ферменты: ЦБГ1, βГ, ЭГ2, АКГ, ПЛ, ПГ. Добавление к основным ферментам дополнительно гемицеллюлаз эндоА, экзоА, ЭГал, βК, ЭК и/или АФ позволило получить наиболее эффективную композицию из индивидуальных ферментов, обеспечивающую в 1.2–1.4 раза больший выход ВС и моносахаридов.

Подобрана оптимальная смесь из ФП, состоящая из целлюлаз (24% ЦБГ1, 8% ЭГ2, 4% βГ), пектиназ (5% ПЛ, 3% ПГ), гемицеллюлаз (4% АКГ, 1% эндоА или экзоА, 6% АФ, 3% ЭК, менее 1% βК и ЭГал), которая позволила при концентрации 5–10 мг белка/г субстрата достичь степени конверсии СЖ по арабинозе, глюкозе и белку близкой к 100% за 24–48 ч гидролиза при концентрации субстрата до 250 г/л. При этом скорости накопления арабинозы и глюкозы были соизмеримы, что свидетельствовало об оптимальном соотношении целлюлаз (ответственных за накопление глюкозы), гемицеллюлаз (арабинозы) и пектиназ (обеспечивающих доступ к целлюлозным волокнам за счет разрушения поверхностного пектина).

В научной литературе не было найдено работ, посвященных успешной конверсии СЖ при такой высокой исходной концентрации субстрата как использованная нами (250 г/л). Как правило, использовали концентрацию СЖ 50–100 г/л и достигали при этом степени конверсии до моносахаридов 70–100% [3, 4, 6].

В работе [4] также была отмечена роль пектиназ в конверсии СЖ. В настоящей работе также было показано, что ПЛ в небольшом количестве (около 0.24 мг/г СЖ) эффективно разжижала СЖ за 12–15 ч до текучего состояния даже при его концентрации 250 г/л, при которой СЖ представлял набухшую массу без жидкой фракции. Участие ПГ в этом процессе было незначительно.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-54-80027). В работе использовалось научное оборудование ЦКП “Промышленные биотехнологии” и АЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dadi A.P., Schall C.A., Varanasi S. // Chin. Sci. Bull. 2007. V. 51. P. 2432–2436.
2. Sun R., Hughes S. // Carbohydr. Polym. 1998. V. 36. P. 293–299.
3. Concha Olmos J., Zuniga Hansen M.E. // Chem. Eng. J. 2012. V. 192. P. 29–36.
4. Micard V., Renard C.M.G.C., Thibault J.-F. // Enzyme Microb. Technol. 1996. V. 19. P. 162–170.
5. Hutnan M., Drtil M., Mrafkova L. // Biodegrad. 2000. V. 11. P. 203–211.
6. Berlowska J., Cieciora-Wloch W., Kalinowska H., Kregiel D., Borowski S., Pawlikowska E., Bin czarski M., Witonska I. // Food Technol. Biotechnol. 2018. V. 56. № 2. P. 188–196.
7. Spagnuolo M., Crecchio C., Pizzigallo M.D.R., Ruggiero P. // Biotechnol. Bioeng. 1999. V. 64. № 6. P. 685–691.
8. Донченко Л.В. // Технология пектина и пектинопродуктов. Москва: ДеЛи, 2000. 256 с.
9. Westphal Y., Kuhnel S., de Waard P., Hinz S.W.A., Schols H.A., Voragen G.J., Gruppen H. // Carbohydrate Research. 2010. V. 345. P. 1180–1189.
10. Spagnuolo M., Crecchio C., Pizzigallo M.D.R., Ruggiero P. // Bioresour. Technol. 1997. V. 60. P. 215–222.
11. Рубцова Е.А., Бушина Е.В., Рожкова А.М., Короткова О.Г., Немашкалов В.А., Кошелев А.В., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 5. С. 502–510.
12. Харина М.В., Емельянов В.М. // Вестник Казанского технологического университета. 2013. Т. 16. № 18. 3 с.
13. Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Кошелев А.В., Вельков В.В., Окунев О.Н., Бравова Г.Б., Шишкова Э.А., Семенова М.В., Сеницын А.П. // Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК. М.: Пищепромиздат, 2004. С. 33.
14. Сеницына О.А., Бухтояров Ф.Е., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Винецкий Ю.П., Сеницын А.П. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 11. С. 1494–1505.
15. Семенова М.В., Волков П.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 4. С. 375–384.
16. Семенова М.В., Драчевская М.И., Сеницына О.А., Гусаков А.В., Сеницын А.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 9. С. 1230–1237.
17. Сеницына О.А., Федорова Е.А., Семенова М.В., Гусаков А.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Виницкий Ю.П., Сеницын А.П. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 5. С. 699–706.
18. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravitnikov A.G., Osipov D.O., Sinityn A.P. // Biotechnol. J. 2010. V. 5. P. 871–880.
19. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Сеницын А.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 5. С. 699–709.
20. Сеницын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. // Итоги науки и техники. Серия Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1990. № 25. 152 с.
21. Каверзнева Е.Д. // Прикл. биохимия и микробиология. 1971. Т. 7. № 2. С. 225–228.
22. Collmer A., Reid J.L., Mount M.S. Methods in Enzymology / Ed. D.L. Purich. San Diego: Academic Press, 1988. P. 329–335.

Selection of Enzyme Coctails with Optimal Composition for Sugar Beet Pulp Conversion

M. V. Semenova^{a,*}, A. M. Rozhkova^a, D. O. Osipov^a, A. D. Satrutdinov^a, O. A. Sinitsyna^b,
E. A. Rubtsova^a, E. G. Kondrateva^a, and A. P. Sinitsyn^{a,b}

^aFederal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, 119071 Moscow Russia

^bLomonosov Moscow State University, Chemical Department, 119991 Moscow Russia

*e-mail: margs@mail.ru

Received December 27, 2018; revised April 08, 2019; Accepted June 20, 2019

It was shown that for efficient hydrolysis of sugar beet pulp (SBP) the presence of the cellobiohydrolase, β -glucosidase, endo-glucanase, arabinoxylan-arabinofuranhydrolase, pectin lyase, polygalacturonase is necessary. Optimal multienzyme cocktails consisted by the same enzymes and additional endo- or exo-arabinase, endo-galactanase, β -xylosidase, endo-xylanase and/or α -arabinofuranosidase were determined and they gave conversion to total reducing sugars (RS) 61–68%, to arabinose – 94%, to glucose – 63–79%. The optimal cocktail from dry multienzyme preparations (EP) of cellulases, hemicellulases and pectinases, produced by fungal strains *Penicillium canescens*, *P. verruculosum* and *Aspergillus foetidus*, provided SBP conversion to arabinose and glucose closely to 100% at initial concentration of SBP 100–250 g/L and EP dosage 5–10 mg protein/g SBP after 24–48 h of hydrolysis.

Keywords: sugar beet pulp, arabinose, glucose, ethanol, cellulases, arabinases