ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2023, том 59, № 2, с. 182–190

УДК 577.15

СИНЕРГЕТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АРАБИНАЗ РАЗНОГО ТИПА ДЕЙСТВИЯ ПРИ БИОКОНВЕРСИИ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА И ЯБЛОЧНЫХ ВЫЖИМОК

© 2023 г. М. В. Семенова[1, *], М. С. Курышкина[2], А. П. Синицын[1, 2]

[1]Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва, 119071 Россия

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

*e-mail: margs@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2022 г.
После доработки 30.10.2022 г.
Принята к публикации 07.11.2022 г.

Изучено взаимодействие эндоарабиназы (**эндоА**) с ферментами экзо-типа действия при совместном гидролизе разветвленного арабинана (**РАра**), свекловичного жома (**СЖ**) и яблочных выжимок (**ЯВ**). Показано, что при гидролизе РАра наиболее эффективными были смеси эндоА с арабинофуранозидазой (**АФ**) или арабиноксилан-арабинофурангидролазой (**АКГ**) с содержанием эндоА 20 и 40% соответственно. В результате оптимизации комплекса арабиназ, целлюлаз и пектиназы осуществлен практически полный гидролиз ЯВ в моносахариды (арабинозу, глюкозу, фруктозу). При гидролизе СЖ степень конверсии гемицеллюлозы (арабинана) составила более 50%, целлюлозы – 75%.

Ключевые слова: эндоарабиназа, экзоарабиназа, арабинофуранозидаза, арабиноксилан-арабинофурангидролаза, синергизм, свекловичный жом, яблочные выжимки

DOI: 10.31857/S0555109923020137, **EDN:** LVJIXD

Из-за разнообразия содержащих арабинозу полисахаридов в пектине и клеточной стенке растений большую роль в деградации растительного материала играют ферменты, высвобождающие арабинозу (арабиназы). Эти ферменты можно разделить на четыре класса. Эндоарабиназа (**эндоА**, КФ 3.2.1.99, 43 семья гликозил-гидролаз) катализирует расщепление внутренних α-(1 → 5)-гликозидных связей арабинана с образованием α-L-арабинофуранозы и арабиноолигосахаридов. Фермент наиболее эффективен при гидролизе таких субстратов, как незамещенных арабинанов. Экзоарабиназы (**экзоА**, 93 семья гликозил-гидролаз) катализируют отщепление концевых остатков или коротких арабиноолигосахаридов от цепи арабинана на невосстанавливающем конце. Типичными представителями экзоА являются α-L-арабинофуранозидазы (**АФ**, КФ 3.2.1.55, 51 и 54 семьи гликозил-гидролаз). Можно выделить два типа АФ: тип А и тип В. Первый тип не активен в отношении полисахаридов и катализирует гидролиз только олигосахаридов, а второй активен по отношению к обоим субстратам. Существуют также АФ, имеющие в своей структуре ксилан-связывающий домен, способные эффективно гидролизовать расщепление α-гликозидных связей как в арабинанах, так и в арабиноксиланах – арабиноксилан-арабинофураногидролазы (**АКГ**).

Арабинаны (как правило, разветвленные) обнаружены в клеточных стенках плодов яблони (составляют до 27% от общего количества пектиновых веществ), сахарной свеклы (46%), сои (60%) и других растений [1, 2].

Хорошим источником арабинанов является свекловичный жом (**СЖ**). СЖ является побочным продуктом переработки сахарной свеклы и, как правило, используется в животноводстве как ценный и дешевый корм. СЖ представляет собой стружку толщиной не более 2 мм с влажностью не более 82%, из которой диффузионным способом извлечено основное количество сахара – после этого в СЖ остается 18–23% сухих веществ, ~80% которых полисахариды, включающие 22–24% (от сухого вещества) целлюлозы, 24–32% гемицеллюлозы (преимущественно арабинана), 9–11% пектиновых веществ, среди которых преобладают растворимые пектины. В небольших количествах содержатся также белок (8–11%), жиры (1–2%) и лигнин (3–6%) [3].

Яблочные выжимки (**ЯВ**) являются вторичным продуктом при производстве сока. В ЯВ содержится ~20% сухих веществ, из которых на долю целлюлозы приходится 21–23% (от сухого вещества), гемицеллюлозы составляют 6–7% (с сопоставимым содержанием арабинана, ксилана и галактана), 15–32% пектиновых веществ. Стоит отметить так-

же высокое содержание лигнина (20–22%). В небольших количествах содержатся также белок (3–4%) и жиры (2–3%) [4].

Цель работы – изучение взаимодействия арабиназ разных типов действия при гидролизе арабиносодержащих субстратов и подбор оптимального комплекса ферментов, состоящего из гемицелюллаз (арабиназ), целлюлаз и пектиназ, для гидролиза растительного сырья с получением моносахаридов.

МЕТОДИКА

Штаммы и ферментные препараты. В работе были использованы штаммы гриба *Penicillium canescens* – продуценты рекомбинантных эндоА *Aspergillus niger* (штамм РСА-эндоА, [5]), экзоА *P. canescens* (РСА-экзоА, [6]), АКГ *P. canescens* (РСА-АКГ, [7]), АФ *P. canescens* (АФ *Pc*, РСА-АФ, [7]), пектинлиазы А (**ПЛ**) *P. canescens* (РСА-ПЛ, [8]), штаммы гриба *P. verruculosum* B1-537 [9, 10] и F10 [11] – продуценты целлюлаз (целлобиогидролазы I, **ЦБГ** и эндоглюканазы II, **ЭГ**) и рекомбинантной β-глюкозидазы (**БГ**) *A. niger* соответственно, а также штамм гриба *A. foetidus* 70a (Af-70a) [12] – продуцент АФ *A. foetidus* (АФ *Af*).

Ферментные препараты (**ФП**) были получены путем лиофильного высушивания КЖ штаммов на лиофильной сушке Benchtop 6K ES (“SP Scientific/Virtis”, США).

Гомогенные ферменты были выделены из перечисленных выше ФП по методикам, описанным в работах [5–11]. Выделение АФ *Af* описано в настоящей работе.

Реагенты. Для создания буферных смесей использовали реактивы фирм “Bio-Rad” (США), “Panreac” (Германия), “Helicon” и “Реахим” (Россия).

Для определения активностей ферментов в качестве субстратов использовали арабинаны линейный (**ЛАра**) и разветвленный (**РАра**) из сахарной свеклы – все “Megazyme” (Австралия); Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (**КМЦ**), цитрусовый пектин со степенью этерификации около 70%, *n*-нитрофенил-α-арабинофуранозид (**пНФАФ**), *n*-нитрофенил-β-глюкопиранозид (**пНФГл**) – “Sigma” (США); микрокристаллическую целлюлозу (ТУ 20.16.59-001-40693384-209) производства “Кристацелл” (Россия).

При ферментативном гидролизе в качестве субстратов использовали РАра, СЖ и ЯВ.

Сухой СЖ (“Агрин”, Россия) был измельчен до частиц 0.5–1.0 мм на мельнице MF10 basic (“IKA Werke”, Германия). ЯВ (содержание сухих веществ 17%) были получены перетиранием плодов яблок сорта “Мельба” на бытовой шнековой соковыжималке (“Scarlett”, Россия) с отделением сока.

Определение активностей ФП. За 1 ед. 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 [13].

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 50°C [13].

Лиазную активность определяли по изменению оптической плотности при 232 нм, регистрирующей накопление 4,5-ненасыщенного продукта трансэлиминирования пектина [14].

Содержание белка в ФП определяли методом Лоури, используя БСА в качестве стандарта. Концентрацию гомогенных ферментов оценивали по оптической плотности при 280 нм, используя рассчитанные по аминокислотной последовательности коэффициенты экстинкции.

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

Биоконверсия растительного сырья. Биоконверсию субстратов проводили под действием гомогенных ферментов или их смесей, при суммарном содержании белка 0.1 при гидролизе РАра и 2 мг/г субстрата при гидролизе СЖ и ЯВ или 0.001 и 0.2 мг/мл реакционной смеси соответственно. Гидролиз проводили в пластиковых пробирках объемом 2 мл (объем реакционной смеси 1.5 мл) в термостатируемом шейкере Biosan TS-100 (“Biosan”, Латвия) в присутствии 0.1 г/л антибиотика ампициллина (РУП “Белмедпрепараты”, Республика Беларусь) при pH 5.0 и 40°C. Концентрация субстрата составляла 10 (в случае РАра) или 100 г/л (в случае СЖ и ЯВ) в пересчете на сухое вещество.

В ходе гидролиза отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию ВС (методом Шомоди–Нельсона). Качественный и количественный состав низкомолекулярных сахаров определяли с помощью ВЭЖХ-системы Agilent 1100 (“Agilent”, США) на колонке Диасфер-110-Амин (5 мкм, 4.0 × × 250 мм). В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил–вода 75 : 25 при скорости элюции 1 мл/мин, объем анализируемого образца 10–100 мкл.

Глубину гидролиза субстратов рассчитывали исходя из содержания в них полисахаридов [3, 4]. Величину коэффициента синергизма (**КС**) рассчитывали как отношение экспериментально полученного значения концентрации продукта гидролиза (ВС) при совместном действии ферментов

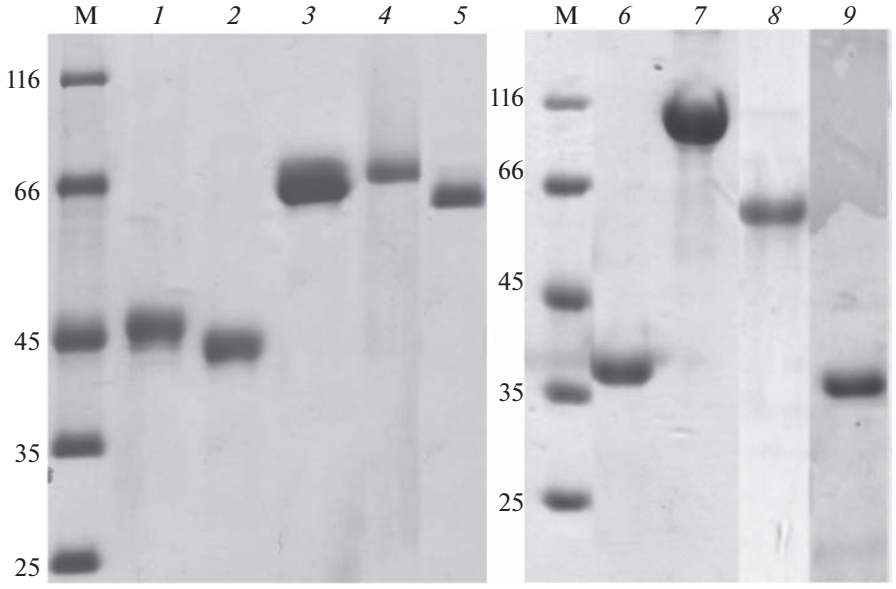

Рис. 1. Электрофорез в ПААГ с Na-ДДС очищенных ферментов: *1* – экзоА, *2* – эндоА, *3* – АФ *Af*, *4* – АКГ, *5* – АФ *Pc*, *6* – ЭГ, *7* – БГ, *8* – ЦБГ, *9* – ПЛ. М-маркеры, указаны молекулярные массы стандартных белков.

к теоретически рассчитанному, последнее определяли как сумму концентраций ВС, полученных при действии отдельных ферментов с учетом доли каждого фермента в смеси.

Очистка АФ *Af* хроматографическими методами. Получение гомогенного фермента проводили с помощью жидкостной хроматографической системы NGC Chromatography Systems ("Bio-Rad", США) со спектрофотометрическим детектором. На первой стадии ФП (10 мг белка) наносили на анионообменную колонку Source 15Q ("Pharmacia", Швеция), уравновешенную 0.02 М бис-трис-HCl буфером с pH 6.8. Связавшиеся с сорбентом белки элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 0.4 М со скоростью 1 мл/мин.

На следующем этапе очистки использовали гидрофобную хроматографию на колонке Source 15 Isopropyl (объем 1 мл, "Pharmacia", Швеция). Во фракцию, содержащую исследуемый фермент, добавляли при перемешивании сухой $(NH_4)_2SO_4$ до концентрации 1.7 М. Затем образец наносили на колонку, уравновешенную 0.02 М Na-ацетатным буфером, содержащим 1.7 М $(NH_4)_2SO_4$. Элюцию проводили в обратном градиенте концентрации $(NH_4)_2SO_4$ от 1.7 до 0 М со скоростью 1 мл/мин.

Для дальнейшей работы фракции, содержащие очищенные белки, обессоливали на колонке с биогелем P4, уравновешенной 0.05 М Na-ацетатным буфером с pH 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Очистка ферментов и анализ их специфичности. Выделение эндоА, экзоА, АКГ, АФ *Pc*, ПЛ, ЦБГ, ЭГ и БГ из соответствующих ФП проводили согласно методикам, описанным в работах [5–11]. Для очистки АФ *Af* использовали двухстадийную схему, включающую анионообменную с последующей гидрофобной хроматографией. На первой стадии фракция, содержащая АФ *Af*, была собрана при концентрации NaCl 0.2 М, на второй стадии – при 0.7 М $(NH_4)_2SO_4$.

Во всех случаях гомогенность очищенных белков составляла более 90% согласно данным ЭФ-ПААГ (рис. 1). Их идентификация была осуществлена на основании результатов масс-спектрометрического анализа трипсиновых гидролизатов [15]. Активности очищенных ферментов к ряду субстратов представлены в табл. 1.

ЭндоА обладала высокой активностью при использовании в качестве субстрата ЛАра (52 ед./мг) и низкой при использовании РАра (4 ед./мг). ЭкзоА проявляла высокую активность по отношению к ЛАра (117 ед./мг) и крайне низкую к РАра (5 ед./мг) и пНФАФ (0.3 ед./мг). В отличие от эндоА и эк-

Таблица 1. Активности очищенных ферментов (ед./мг белка), использованных для создания комплекса

Фермент	Субстрат		
	ЛАра	РАра	пНФАФ
ЭндоА	52 ± 3	4.1 ± 0.2	0
ЭкзоА	117 ± 9	5.0 ± 0.4	0.31 ± 0.01
АКГ	3.8 ± 0.2	28 ± 2	13 ± 1
АФ *Pc*	1.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	16 ± 1
АФ *Af*	0.61 ± 0.03	11 ± 1	18 ± 2

Таблица 2. Концентрация ВС (г/л) и КС после 24 ч гидролиза РАра смесями эндо- и экзоарабиназ

Фермент экзо-типа действия	Содержание эндоА, %	Концентрация ВС	КС
нет	100	0.41 ± 0.02	–
ЭкзоА	80	0.69 ± 0.03	1.4
	60	0.92 ± 0.04	1.6
	40	0.81 ± 0.03	1.3
	20	0.75 ± 0.03	1.1
	нет	0.79 ± 0.04	–
АКГ	80	1.6 ± 0.1	1.9
	60	3.2 ± 0.2	2.5
	40	4.8 ± 0.3	2.8
	20	4.2 ± 0.3	1.9
	нет	2.6 ± 0.2	–
АФ *Pc*	80	0.65 ± 0.04	1.5
	60	0.85 ± 0.06	1.9
	40	0.86 ± 0.05	1.8
	20	0.90 ± 0.07	1.8
	нет	0.51 ± 0.02	–
АФ *Af*	80	0.95 ± 0.07	1.6
	60	1.5 ± 0.1	1.9
	40	2.0 ± 0.2	2.0
	20	2.7 ± 0.2	2.2
	нет	1.4 ± 0.1	–

зоА АКГ, АФ *Pc* и АФ *Af* проявляли крайне низкую активность к ЛАра, обладая при этом высокой активностью к РАра и/или к пНФАФ: активности АКГ к РАра и к пНФАФ составляли 28 и 13 ед./мг соответственно, активности АФ *Pc* и АФ *Af* по отношению к РАра – 2 и 11 ед./мг соответственно, к пНФАФ – 16–18 ед./мг. На основе данных о субстратной специфичности и результатов масс-спектрометрического анализа АФ *Pc* была отнесена к типу А, АФ *Af* – к типу В.

Изучение синергизма при гидролизе РАра под действием арабиназ. Было изучено синергетическое взаимодействие между эндоА и ферментами экзо-типа действия: экзоА, АФ *Af*, АФ *Pc* и АКГ. Для этого подготовлены смеси ферментов, в которых доля эндоА составляла 20, 40, 60 или 80%. С помощью этих смесей, а также индивидуальными ферментами был проведен гидролиз РАра (исходная концентрация 10 г/л). В табл. 2 представлены концентрация ВС после 24 ч гидролиза и значения КС.

Индивидуальная эндоА практически не гидролизовала РАра: концентрация ВС после 24 ч гидролиза составила 0.4 г/л. Также невысокая концентрация ВС (менее 1 г/л) наблюдалась при действии индивидуальных экзоА и АФ *Pc*, а также их смесей с эндоА. Наибольшую концентрацию ВС (4.8 г/л) наблюдали для смеси эндоА и АКГ при содержании ферментов 40 и 60% соответственно. При этом рассчитанное значение КС составило 2.8. Менее эффективной оказалась смесь эндоА с АФ *Af* при содержании ферментов 20 и 80% соответственно: концентрация ВС и значение КС составили 2.7 г/л и 2.2 соответственно. Следует отметить, что индивидуальные АКГ и АФ *Af* были способны активно гидролизовать РАра: после 24 ч гидролиза концентрация ВС составила 2.6 и 1.4 г/л соответственно, в обоих случаях единственным продуктом гидролиза была арабиноза.

Таким образом увеличить доступность основной цепи арабинана для эндоА могли только АКГ и АФ *Af* – ферменты, обладающие способностью не только гидролизовать олигомерные субстраты, но и отщеплять боковые заместители в РАра. Так как смеси эндоА с экзоА или АФ *Pc* были малоэффективны, далее они не рассматривались как воз-

Таблица 3. Концентрация ВС, моносахаридов (г/л) и КС после 48 ч гидролиза ЯВ и СЖ смесями очищенных ферментов

Фермент	ВС	Арабиноза	Фруктоза	Глюкоза	КС
			ЯВ		
Сахара ЯВ	50 ± 4	0	35 ± 3	14 ± 1	–
ЭндоА	54 ± 5	0	39 ± 3	15 ± 2	–
АФ *Af*	65 ± 6	0.68 ± 0.07	46 ± 3	18 ± 2	–
АКГ	54 ± 5	0.93 ± 0.08	37 ± 4	16 ± 2	–
ЭндоА + АФ *Af*	93 ± 7	3.4 ± 0.3	65 ± 5	25 ± 3	1.5
ЭндоА + АКГ	62 ± 6	1.9 ± 0.2	42 ± 4	18 ± 2	1.1
Ц	64 ± 6	0	44 ± 4	21 ± 2	–
ПЛ	54 ± 4	0.11 ± 0.01	39 ± 3	14 ± 1	–
Ц + ПЛ (1 : 1)	64 ± 5	0.09 ± 0.01	46 ± 3	17 ± 2	1.1
Ц + ПЛ (9 : 1)	82 ± 6	0	53 ± 4	29 ± 3	1.3
Смесь А1	105 ± 9	3.2 ± 0.2	67 ± 5	31 ± 2	1.5
Смесь А2	89 ± 5	2.4 ± 0.2	58 ± 4	27 ± 2	1.2
Смесь А3	100 ± 8	2.4 ± 0.3	65 ± 5	32 ± 3	1.6
Смесь А4	95 ± 7	2.0 ± 0.1	61 ± 4	31 ± 2	1.5
			СЖ		
Сахара СЖ	0.96 ± 0.06	0	0.31 ± 0.02	0.42 ± 0.03	–
ЭндоА	6.4 ± 0.4	0.71 ± 0.07	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.2	–
АФ *Af*	6.5 ± 0.4	0.69 ± 0.07	2.8 ± 0.3	3.0 ± 0.3	–
АКГ	6.7 ± 0.5	1.1 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.2	–
ЭндоА + АФ *Af*	9.1 ± 0.7	2.3 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2	1.4
ЭндоА + АКГ	9.6 ± 0.6	2.4 ± 0.2	2.8 ± 0.3	4.3 ± 0.4	1.5
Ц	9.6 ± 0.7	0.08 ± 0.01	2.4 ± 0.2	6.3 ± 0.5	–
ПЛ	7.5 ± 0.7	1.9 ± 0.2	0.37 ± 0.03	0.78 ± 0.06	–
Ц + ПЛ (1 : 1)	17 ± 1	2.9 ± 0.3	0.89 ± 0.07	11 ± 1	2.0
Ц + ПЛ (9 : 1)	13 ± 1	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	9.2 ± 0.8	1.4
Смесь А1	20 ± 2	5.7 ± 0.4	1.9 ± 0.1	10.5 ± 0.8	2.2
Смесь А2	18 ± 2	4.6 ± 0.3	1.4 ± 0.1	7.9 ± 5	2.0
Смесь А3	21 ± 2	6.2 ± 0.4	2.9 ± 0.2	12 ± 1	2.2
Смесь А4	20 ± 2	6.1 ± 0.4	2.6 ± 0.2	9.9 ± 0.7	2.1

можный компонент оптимального ферментного комплекса.

Подбор ферментов для гидролиза ЯВ. Следует отметить, что содержание ВС в исходных ЯВ было высоким – 50 г/л (при исходной концентрации субстрата в реакционной смеси 100 г/л по сухой массе). При этом основными сахарами были фруктоза и глюкоза: 35 и 14 г/л соответственно.

В соответствии с полученными результатами среди экзоарабиназ были выбраны наиболее активные ферменты и оптимальное соотношение ферментов эндо- и экзо-типов – это смеси эндоА + + АФ *Af* (в соотношении 20 : 80) и эндоА + АКГ (40 : 60). Был проведён гидролиз ЯВ (табл. 3) в течение 48 ч индивидуальными ферментами и подобранными смесями.

Можно однозначно выделить АФ *Af* как наиболее эффективный фермент при гидролизе ЯВ. Концентрация ВС после 48 ч гидролиза в присутствии только этого фермента АФ *Af* составила 65 г/л, а в присутствии смеси эндоА + АФ *Af* – 93 г/л (КС 1.5). Основными продуктами гидролиза были фруктоза и глюкоза (65 и 25 г/л соответственно), а также присутствовала арабиноза (3.4 г/л). Гидролиз в присутствии АКГ и ее смеси с эндоА по выходу ВС уступал даже АФ *Af*.

Для эффективного гидролиза растительного сырья ферментная смесь должна содержать целлюлазы ЦБГ, ЭГ, БГ в оптимальном соотношении,

Таблица 4. Состав смесей очищенных ферментов

Смесь ферментов	Содержание фермента, %				
	ЭндоА	АФ *Af*	АКГ	Ц	ПЛ
А1	4	16	–	70	10
А2	8	32	–	50	10
А3	8	–	12	70	10
А4	16	–	24	50	10

обеспечивающем наибольшую скорость превращения субстрата в нужные продукты [16]. В работе были использованы очищенные ЦБГ (активность по отношению к МКЦ 0.65 ед./мг), ЭГ (активность по отношению к КМЦ 33 ед./мг) из *P. verruculosum* как ключевые ферменты целлюлазного комплекса гриба, выделенные из ФП В1-537 по методикам, описанным в работах [9, 10], а также БГ *A. niger* (активность по отношению к п-НФГл 105 ед./мг), выделенная из ФП F10 по методике [11]. Оптимальное соотношение между ЦБГ и ЭГ составляло 4 : 1, как было показано в работе [16]. Для устранения ингибирования ЦБГ продуктом реакции (целлобиозой) в реакционную смесь вносили БГ в соотношении ЦБГ : БГ 9 : 1 [10]. В итоге была использована смесь целлюлаз, обозначаемая далее как Ц, содержащая ЦБГ, ЭГ, БГ в отношении 7 : 2 : 1 соответственно.

Присутствие пектина является важным фактором, затрудняющим ферментативную переработку растительного сырья, так как даже относительно небольшое его содержание обуславливает высокую вязкость раствора. В качестве пектиназы был использован фермент ПЛ *P. canescens* (активность по отношению к пектину 19 ед./мг), выделение которого проводили по методике [8].

Гидролиз ЯВ проводили как отдельными ферментами (Ц и ПЛ), так и их смесями с соотношением компонентов по концентрации белка 1 : 1 и 9 : 1 соответственно. Соотношения были выбраны исходя из предположительного состава субстратов и уровня специфических активностей ферментов. Результаты представлены в табл. 3. Наиболее эффективной была смесь Ц + ПЛ с большим содержанием целлюлазного комплекса (соотношение Ц : ПЛ 9 : 1): после 48 ч гидролиза концентрация ВС составила 82 г/л, КС – 1.3, среди продуктов преобладали фруктоза и глюкоза 53 и 29 г/л соответственно.

На основании полученных результатов были составлены комплексы ферментов А1-А4, содержащие арабиназы, целлюлазы и пектиназу (табл. 4), для проведения гидролиза ЯВ (табл. 3). Смеси А1 и А3 с увеличенным содержанием Ц (70% от общего белка) были более эффективны, чем смеси А2 и А4 с содержанием Ц 50%. Наибольшая концентрация ВС (105 г/л) после 48 ч гидролиза ЯВ была получена при использовании смеси А1 с АФ *Af*. Продуктами гидролиза были арабиноза (3.2 г/л), фруктоза (67 г/л) и глюкоза (31 г/л).

Для всех смесей (А1-А4) значения КС, характеризующего взаимодействие целлюлазного, пектиназного и арабиназного комплексов, были больше 1, в пределах 1.2–1.6, что свидетельствует о присутствии положительного синергетического эффекта.

Подбор ферментов для гидролиза СЖ. Содержание ВС в исходном СЖ было невысоким около 1 г/л при исходной концентрации субстрата 100 г/л. При гидролизе СЖ эффективность индивидуальных арабиназ была примерно одинакова с небольшим преимуществом АКГ: концентрация ВС после 48 ч гидролиза составила 6.4–6.7 г/л, основными сахарами были фруктоза (2.4–2.8 г/л), глюкоза (2.5–3.0 г/л), арабиноза (0.7–1.1 г/л) (табл. 3).

При гидролизе СЖ смесями эндоА + АФ *Af* или эндоА + АКГ во всех случаях наблюдалось синергетическое взаимодействие между ферментами эндо- и экзо-типа действия, значения КС составили 1.4 и 1.5 соответственно. Использование смесей ферментов при гидролизе СЖ по сравнению с действием отдельных ферментов привело к увеличению концентрации ВС на 2.5–3 г/л в основном за счет увеличения выхода арабинозы (табл. 3). Разница между выходом продуктов при использовании смеси эндоА + АФ *Af* или эндоА + АКГ была незначительной.

При гидролизе СЖ в присутствии смесей Ц + ПЛ более эффективной оказалась смесь с равным содержанием Ц и ПЛ: после 48 ч гидролиза концентрация ВС составила 17 г/л, КС – 2.0, а среди продуктов преобладала глюкоза (11 г/л).

Из комплексов ферментов А1–А4, составленных из арабиназ, целлюлаз и пектиназы, смеси А1 и А3 с увеличенным содержанием Ц (70% от общего белка) были более эффективны, чем смеси А2 и А4 с 50%-ным содержанием Ц, что отражалось, в основном, на увеличении выхода глюкозы. Разница между смесями А1 с АФ *Af* и А3 с АКГ была незначительной: концентрация ВС после 48 ч гидролиза СЖ составила 20–21 г/л, продуктами гидролиза были арабиноза (около 6 г/л), глюкоза (11–12 г/л) и фруктоза (2–3 г/л).

Значение КС для всех смесей (А1-А4) составило 2.0–2.2, что свидетельствовало о присутствии значительно более выраженного синергетического эффекта между целлюлазами, пектиназой и арабиназами при гидролизе СЖ, чем при гидролизе ЯВ.

Гидролиз ЯВ и СЖ ферментными препаратами. На основе полученных результатов были сформированы комплексы ФП с преимущественным содержанием одного рекомбинантного фермента: РСА-эндоА (содержание эндоА от общего белка 22%), РСА-АКГ (29% АКГ), Af-70a (12% АФ *Af*),

Таблица 5. Состав комплексов ФП

Смесь ферментов	Содержание ФП, %					
	РСА-эндоА	*Af*-70a	РСА-АКГ	B1-537	F10	РСА-ПЛ
A1	4	16	–	63	7	10
A3	8	–	12	63	7	10

Таблица 6. Концентрация ВС и моносахаридов (г/л) после 48 ч гидролиза ЯВ и СЖ комплексами ФП

ФП	ВС	Арабиноза	Фруктоза	Глюкоза
		ЯВ		
Сахара ЯВ	50 ± 4	0	35 ± 3	14 ± 1
РСА-эндоА	75 ± 5	2.0 ± 0.1	53 ± 4	18 ± 2
Af-70a	77 ± 6	2.9 ± 0.3	52 ± 3	20 ± 2
РСА-АКГ	77 ± 5	2.8 ± 0.08	54 ± 4	18 ± 2
B1-537 + F10	84 ± 6	0	55 ± 4	26 ± 3
РСА-ПЛ	81 ± 4	0.81 ± 0.07	58 ± 3	21 ± 1
B1-537 + F10 + РСА-ПЛ	90 ± 5	0.32 ± 0.02	64 ± 3	25 ± 2
Смесь ФП A1	106 ± 9	3.6 ± 0.4	73 ± 6	28 ± 2
Смесь ФП A3	106 ± 8	3.4 ± 0.3	74 ± 6	27 ± 3
		СЖ		
Сахара СЖ	0.96 ± 0.06	0	0.31 ± 0.02	0.42 ± 0.03
РСА-эндоА	25 ± 2	10 ± 1	5.3 ± 0.5	8.1 ± 0.7
Af-70a	29 ± 2	12 ± 1	5.0 ± 0.3	11 ± 1
РСА-АКГ	34 ± 3	14 ± 1	5.6 ± 0.4	12 ± 1
B1-537 + F10	21 ± 2	1.6 ± 0.2	4.3 ± 0.4	14 ± 1
РСА-ПЛ	23 ± 2	7.8 ± 0.9	5.0 ± 0.4	7.1 ± 0.3
B1-537 + F10 + РСА-ПЛ	24 ± 2	1.9 ± 0.3	4.7 ± 0.4	14 ± 1
Смесь ФП A1	38 ± 3	14 ± 1	6.2 ± 0.4	18 ± 1
Смесь ФП A3	39 ± 3	15 ± 1	6.0 ± 0.5	18 ± 1

РСА-ПЛ (47% ПЛ), B1-537 (ЦБГ 50%, ЭГ 17%), F10 (70% БГ).

Проводился гидролиз как индивидуальными ФП, так и их смесями, составленными в соответствии с наилучшими по составу смесями очищенных ферментов A1 и A3 (ФП A1 и ФП A3 соответственно) (табл. 5). ФП и их смеси дозировали, уравнивая по содержанию белка в реакционной среде – 5 мг/г субстрата. В табл. 6 представлены результаты гидролиза ЯВ и СЖ.

При гидролизе ЯВ наибольший выход продуктов наблюдался для индивидуальных ФП целлюлаз (B1-537 + F10) и пектиназы (РСА-ПЛ), а также их смеси (B1-537 + F10 + РСА-ПЛ): концентрация ВС после 48 ч гидролиза составляла 81–90 г/л с преимущественным содержанием фруктозы (55–64 г/л) и глюкозы (21–26 г/л). Индивидуальные ФП арабиназ давали около 75–77 г/л ВС с преимущественным содержанием фруктозы (52–54 г/л) и глюкозы (18–20 г/л), а также арабинозы – 2.0–2.9 г/л.

Смеси ФП A1 и ФП A3, включающие полный комплекс ФП целлюлаз, пектиназы и арабиназ, но содержащие разные ФП экзоарабиназ, были одинаково эффективны: после 48 ч концентрация ВС составляла 106 г/л, среди моносахаров основной была фруктоза (73–74 г/л), накапливались также глюкоза (27–28 г/л) и небольшое количество арабинозы (3.4–3.6 г/л). При этом наблюдался почти полный гидролиз ЯВ.

Таким образом, использование комплекса ФП целлюлаз, пектиназы и арабиназ при гидролизе ЯВ позволило увеличить выход всех основных моносахаридов (фруктозы, глюкозы, арабинозы) по сравнению с проведением гидролиза только целлюлазами или арабиназами.

При гидролизе СЖ индивидуальные ФП арабиназ были более активными, чем ФП целлюлаз и/или пектиназы. Наибольшая концентрация ВС

после 48 ч гидролиза наблюдалась в случае ФП РСА-АКГ и составляла 34 г/л, основными продуктами были арабиноза и глюкоза – 14 и 12 г/л соответственно. При действии только ФП Af-70a или РСА-эндоА выход продуктов гидролиза был немного ниже: концентрация ВС составляла 25–29 г/л, арабинозы – 10–12 г/л, глюкозы – 8–11 г/л.

Смеси ФП А1 и ФП А3 были одинаково эффективны при гидролизе СЖ: концентрация ВС после 48 ч составляла 38–39 г/л, арабинозы – 14–15 г/л, глюкозы 18 г/л, фруктозы – около 6 г/л. Таким образом, использование комплекса ФП целлюлаз, пектиназы и арабиназ при гидролизе СЖ также позволило увеличить выход всех основных моносахаридов относительно действия только ФП целлюлаз или арабиназ.

* * *

Для осуществления полного гидролиза сложных по составу полисахаридных субстратов используется оптимально подобранный с учетом особенностей структуры субстрата ферментативный комплекс. Ценным для получения сахаров сырьем являются растительные отходы пищевой промышленности и сельского хозяйства, такие как ЯВ и СЖ. Ферментативные гидролизаты этих субстратов содержат пентозы (арабинозу, ксилозу) и гексозы (глюкозу, фруктозу), которые могут использоваться для получения этанола [17, 18], молочной кислоты [19] и других продуктов с помощью микроорганизмов. В работе [20] была показана успешная двухстадийная конверсия гидролизата СЖ в этанол дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* (была утилизирована глюкоза) с последующим получением молочной кислоты из пентоз в присутствии *Lactobacillus plantarum*.

Для получения гидролизатов ЯВ и СЖ с высоким содержанием моносахаридов использовали ФП целлюлаз, пектиназ, ксиланаз [18–21]. ЯВ исходно содержат большое количество растворимых сахаров (глюкоза, фруктоза), поэтому после ферментативного гидролиза ЯВ выход конечных продуктов (ВС, моносахаридов) высок и составляет, как правило, 60–90% от сухой массы [18, 21]. В то же время яблочный жом, получаемый после отмывки ЯВ от растворимых сахаров, является менее реакционно способным и степень его конверсии значительно ниже: в работе [19] из 39 кг жома путем обработки комплексом пектиназ и целлюлаз было получено 4.66 кг растворимых сахаров.

В настоящей работе подбор ферментного комплекса на основе очищенных ферментов позволил осуществить полный гидролиз ЯВ до растворимых сахаров: из 100 г/л (по сухому весу) ЯВ было получено 106 г/л ВС, из которых 50 г/л ВС (≈50%) соответствовали присутствующим в субстрате растворимым сахарам ЯВ, а 56 г/л ВС получали за счет ферментативного гидролиза нерастворимых полисахаридов ЯВ.

Ранее [22] нами был описан полный гидролиз СЖ в присутствии 12 очищенных ферментов различной специфичности. В настоящей работе более подробно изучено взаимодействие эндо- и экзоарабиназ при их гидролизе арабинана из СЖ, был определен оптимальный качественный (эндоА + АФ *Af* или эндоА + АКГ) и количественный состав (соотношение ферментов эндо- и экзо-типа действия) арабиназного комплекса, что позволило упростить состав комплекса используемых ферментов. Концентрация арабинозы и глюкозы достигала 15–18 г/л каждой. С учетом того, что содержание гемицеллюлозы и целлюлозы в СЖ составляло 24–32 и 22–24% соответственно [3], конверсия полисахаридов в моносахариды составляла не менее 50 и 75%.

Высокие значения КС при использовании смесей очищенных ферментов разной субстратной специфичности свидетельствуют о необходимости присутствия всех ферментов в реакционной среде. Так для смеси целлюлаз и пектиназы КС составил 1.3 при гидролизе ЯВ и 2.0 при гидролизе СЖ, а при добавлении также арабиназ – 1.5 и 2.2 соответственно.

Работа была выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (Регистрационный номер Государственного Задания 122041100066-7).

Авторы благодарят сотрудников ЦКП “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Handbook of Food Enzymology. / Eds. J.R. Whitaker, A.G. Voragen, D.W.S. Wong. N.Y., Basel: Marcel Dekker. 2003. P. 832–833.
2. *Hemicellulose and Hemicellulases*. / Eds. M.P. Coughlan, G.P. Hazlewood. London and Chapel Hill: Portland Press Research Monograph. 1993. P. 65–69.
3. *San R., Hughes S.* // Carbohydrate Polymers. 1998. V. 36. P. 293–299. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00255-5
4. *Parmar I., Rupasinghe V.H.P.* // Biores. Technol. 2013. V. 130. P. 613–620. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.084
5. *Рубцова Е.А., Бушина Е.В., Рожкова А.М., Короткова О.Г., Немашкалов В.А., Кошелев А.В., Синицын А.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 5. С. 502–510. https://doi.org/10.7868/S0555109915050141
6. *Семенова М.В., Волков П.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Синицын А.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 4. С. 375–384. https://doi.org/10.7868/S0555109918040062
7. *Синицына О.А., Бухтояров Ф.Е., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Винецкий Ю.П.,*

Синицын А.П. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 11. С. 1494–1505. https://doi.org/10.1023/b:biry.0000009134.48246.7e

8. *Синицына О.А., Федорова Е.А., Семенова М.В., Гусаков А.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М. и др.* // Биохимия. 2007. Т. 72. № 5. С. 699–706.
9. *Синицын А.П., Синицына О.А., Рожкова А.М.* // Биотехнология. 2021. Т. 36. № 6. С. 24–41. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-24-41
10. *Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravilnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P.* // Biotechnol. J. 2010. V. 5. № 8. P. 871–880. https://doi.org/10.1002/biot.201000050
11. *Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P.* // Process Biochem. 2015. V. 50. P. 1258–1263. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.008
12. *Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Кошелев А.В., Вельков В.В., Окунев О.Н., Бравова Г.Б. и др.* // Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК. М.: Пищепромиздат, 2004. С. 33.
13. *Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В.* // Итоги науки и техники. М.: ВИНИТИ, Биотехнология. 1990. № 25. С. 148.
14. *Collmer A., Reid J.L., Mount M.S.* // Methods in Enzymol. / Ed. D.L. Purich. San Diego: Academic Press, 1988. P. 329–335.
15. *Gusakov A.V., Semenova M.V., Sinitsyn A.P.* // J. Anal. Chem. 2010. V. 65. P. 1446–1461. https://doi.org/10.1134/S1061934810140030
16. *Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Sinitsyna O.A., Shashkov I., Sinitsyn A.P.* // Biotech. 2018. V. 8. P. 396–399. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1419-4
17. Патент РФ. 2008. №RU2391402C2.
18. *Семенова М.В., Зоров И.Н., Синицын А.П., Степанов Н.А., Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Щербаков С.С.* // Хранение и переработка сельхозсырья. 2009. № 4. С. 72–74.
19. *Noro S., Takahashi T., Ichita J., Muranaka Y., Kato Y.* // Transactions of the Materials Research Society of Japan. 2008. V. 33. № 4. P. 1173–1175. https://doi.org/10.14723/tmrsj.33.1173
20. *Diaz A.B., Marzo C., Caro I., de Ory I., Blandino A.* // Bioresour. Technol. 2017. V. 225. P. 225–233. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.024
21. *Gama l R., Van Dyk J.S., Pletschke B.I.* // Biotech. 2015. V. 5. P. 1075–1087. https://doi.org/10.1007/s13205-015-0312-7
22. *Семенова М.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Сатрутдинов А.Д., Синицына О.А., Рубцова Е.А. и др.* // Прикл. биохим. и микробиол. 2019. Т. 55. № 6. С. 586–593. https://doi.org/10.1134/S0555109919050118

Synergistic Interaction of Arabinases of Different Types of Action in the Bioconversion of Sugar Beet Pulp and Apple Pomace

M. V. Semenova[a, *], M. S. Kuryshkina[b], and A. P. Sinitsyn[a, b]

[a] *Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

[b] *Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: margs@mail.ru*

The interaction of endoarabinase (endoA) with exo-type enzymes was studied during their joint hydrolysis of branched arabinane (BAra), sugar beet pulp (SBP) and apple pomace (AP). It was shown that mixtures of endoA with arabinofuranosidase (AF) or arabinoxylan-arabinofuranhydrolase (AXH) with endoA content of 20 and 40%, respectively, were the most effective in the hydrolysis of BAra. As a result of the optimization of the complex of arabinases, cellulases and pectinase, almost complete conversion of AP into monosaccharides (arabinose, glucose, fructose) was carried out. During the hydrolysis of SBP, the conversion rate of hemicellulose (arabinane) was more than 50%, cellulose – 75%.

Keywords: endoarabinase, exoarabinase, arabinofuranosidase, arabinoxylan-arabinofuranhydrolase, synergism, sugar beet pulp, apple pomace