

Технология биопрепаратов

УДК 663.1, 633.34, 633.367

А.П. СИНИЦЫН^{1,2}, Д.О. ОСИПОВ^{2,*}, Н.В. ЦУРИКОВА³, И.А. ВЕЛИКОРЕЦКАЯ³, И.А. ШАШКОВ², С.В. ЗВЕРЕВ⁴

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071

³ Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии РАН, Москва, 111033

⁴ Всероссийский научно-исследовательский институт зерна и продуктов его переработки РАН (ВНИИ зерна), Москва, 127434

e-mail: inbi@inbi.ras.ru
doosipov@gmail.com

Возможности использования оболочек люпина белого и сои в биотехнологии

Показано, что оболочки люпина и сои после их предварительной обработки разбавленными растворами серной кислоты могут быть использованы в качестве сырья для получения сахаров с помощью ферментативной конверсии. Глубина конверсии оболочек люпина и сои под действием комплекса карбогидраз *Penicillium verruculosum* после предобработки (1%-ной H₂SO₄ при 125–140° в течение 1 ч) составила 68% и 38%, соответственно. Установлено, что оболочки люпина и сои (без предобработки) можно использовать в качестве дешевого компонента питательной среды для проведения культивирования микроскопического гриба *P. verruculosum* — продуцента целлюлаз и ксиланаз. Применение оболочек люпина вместо микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) (замена 25 % МКЦ на оболочки люпина) приводит к приросту в культуральной жидкости (КЖ) целлюлазной (КМЦазной) активности на 12% по сравнению с контролем (использование 100% МКЦ), а ксиланазной активности — на 21%. Замена 75% МКЦ на оболочки сои обеспечивает прирост КМЦазной активности на 34%, а ксиланазной — на 117%. Продемонстрировано, что оболочки люпина или сои могут быть также использованы как источник углерода при культивировании гриба *P. canescens* в качестве продуцента протеазы; в результате замены ими свекловичного жома протеазная активность в КЖ повышалась на 50–67 %.

Ключевые слова: оболочки люпина, оболочки сои, предобработка разбавленной кислотой, реакционная способность, ферментативный гидролиз, *Penicillium canescens*, *Penicillium verruculosum*.

Люпин — бобовая культура, которая в последнее время все более интенсивно возделывается в России в качестве источника растительного белка, альтернативного белку сои. Люпин, как и соя, может быть использован в ряде областей пищевой промышленности, а также при производст-

ве комбикормов. Для России представляет большой интерес белый люпин (*Liupinus albus*), который превосходит другие виды (узколистный, желтый) по ряду агротехнических показателей, в том числе выходу белка с 1 гектара [1].

Синицын Аркадий Пантелеймонович, Осипов Дмитрий Олегович, Цурикова Нина Васильевна, Великорецкая Ирина Александровна, Шашков Игорь Александрович, Зверев Сергей Васильевич.

Список сокращений: АСВ — абсолютно сухое вещество; ВС — восстанавливающие сахара; КЖ — культуральная жидкость; КМЦ — карбоксиметилцеллюлоза; МКЦ — микрокристаллическая целлюлоза; ПА — протеолитическая активность; ПААГ — полиакриламидный гель; пНФГ — *para*-нитрофенил-β-D-глюкопиранозид; ПО — предварительная обработка; ФП — ферментный препарат.

* Автор для переписки.

Хотя зерна люпина, в отличие от сои, не содержат ингибиторы протеаз, их состав характеризуется наличием других антипитательных веществ — алкалоидов (люпинин, люпанин, гидроксиллюпанин, спартеин и др.), придающих продуктам из зерна горький вкус и в больших дозах являющихся ядами. Избавиться от этих веществ помогают простые технологические приемы (например, вымачивание), а также селекция растений: продукт селекции — безалкалоидный сладкий люпин — содержит менее 0,025 % алкалоидов [2].

Соя может быть использована в пище или кормах после удаления (с помощью термообработки, экструзии, обработки ферментами) таких антипитательных факторов, как ингибиторы трипсина, β -конглицинин, глицинин и галактоолигосахариды [3].

В процессе первичной переработки зерна люпина и сои необходимо удалять оболочки (в них содержатся ингибиторы протеаз, кроме того, их питательная ценность низка из-за значительного содержания неметаболизируемых углеводов), которые могут составлять, например, 20% от массы зерна в бобах белого люпина и 6% от массы зерна сои [4]. Таким образом, в условиях промышленного использования и переработки люпина и сои актуальной становится проблема утилизации этих оболочек.

Оболочки люпина и сои представляют собой возобновляемое растительное сырье, в состав которого входят целлюлоза и гемицеллюлозы [5, 6] (табл. 1) и поэтому могут являться привлекательным ресурсом для ферментативной конверсии в простые C_6 - и C_5 -сахара с их последующим превращением в спирты (биотопливо), органические и аминокислоты, биополимеры и другие продукты микробного синтеза [7]. Кроме того, они могут представлять интерес в качестве источника углеводов при проведении микробиологических (ферментационных) процессов, направленных на получение полезных продуктов, например, различных ферментных препаратов.

Данная работа посвящена изучению возможности использования оболочек люпина и сои в качестве биотехнологического сырья — в первую очередь в процессе их биоконверсии в сахара, а также путем их ферментации с целью биосинтеза различных технических энзимов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Ферментные препараты (ФП). В работе были использованы сухие ФП целлюлаз *P. verruculosum* В1-151-221 № 3-338.Н и целлюбиазы

Состав оболочек люпина белого и сои, % [5, 6]

Composition of white lupin hulls and soybean hulls, % [5, 6]

Компоненты оболочек Hulls components	Люпин Lupin	Соя Soybean
Белки Proteins	2,1 ± 0,2	12,4 ± 0,1
Жиры Fats	0,9 ± 0,05	1,8 ± 0,01
Углеводы, в том числе: Carbohydrates including:	8,6 ± 0,1	11,6 ± 0,1
крахмал starch	3,5 ± 0,1	5,5 ± 0,1
сахароза sucrose	2,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1
глюкоза glucose	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,1
Все пищевые волокна All edible fibers	74,5 ± 0,1	57,5 ± 0,1
Растворимые пищевые волокна Soluble edible fibers	19,4 ± 0,1	5,8 ± 0,1
Целлюлоза Cellulose	48,8 ± 0,1	36,0 ± 0,08
Гемицеллюлоза Hemicellulose	6,0 ± 0,05	14,6 ± 0,1
Лигнин Lignin	1,1 ± 0,05	1,05 ± 0,1
Зола Ashes	3,9 ± 0,05	4,3 ± 0,1
Сухие вещества Dry material	90 ± 0,1	87,5 ± 0,1

(β -глюкозидазы) *P. verruculosum* F10 № 3-341.Н, представляющие собой лиофильно высушенные ультраконцентраты КЖ, полученные в ИБФМ РАН, Пушкино (см. ниже).

Материалы. Оболочки белого люпина сорта Дега предоставлены ВНИИ зерна РАН; оболочки сои предоставлены ОАО «Эфко», Белгородская обл.

Активность использованных ферментных препаратов, ед/г**Activities of used enzyme preparations, U/g**

Название ФП Preparation	Содержание белка, мг/г Content of protein, mg/g	КМЦаза CMCase	Ксиланаза Xylanase	β-Глюкозидаза β-Glucosidase
<i>P. verruculosum</i> B1-221-151	960 ± 20	21500 ± 100	26600 ± 100	1280 ± 20
<i>P. verruculosum</i> F10	655 ± 5	7000 ± 20	3800 ± 50	39850 ± 20

Ферментативный гидролиз исходных и предобработанных оболочек люпина и сои проводили в термостатируемых при 50° отдельных ячейках объемом 50 мл, помещенных на качалку (250 об/мин). В ячейку вносили навеску субстрата, рассчитанное количество 0,1 М Na-ацетатного буфера (рН 5,0) («Хеликон», Россия) и 1 мл раствора 0,1 М Na-ацетатного буфера, содержащего необходимое количество ФП. Общий объем реакционной смеси составлял 20 мл; содержание субстрата в ней было равно 100 г/л в пересчете на АСВ. Количество добавленного ФП *P. verruculosum* B1-221-151 составляло 10 мг белка на 1 г АСВ субстрата. Совместно с ФП штамма B1-221-151 в реакционную среду добавляли ФП *P. verruculosum* F10 так, чтобы концентрация белка F10 в реакционной среде составляла 0,88 мг на 1 г АСВ субстрата. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы (по 0,5 мл), центрифугировали (10000 g, 3 мин) и измеряли содержание восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомодьи—Нельсона, а концентрацию глюкозы — глюкозооксидазно-пероксидазным методом [8].

Активность используемых ФП по отношению к натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦазная активность), глюкуроноксиану из березы (ксиланазная активность), *n*-нитрофенил-β-D-глюкопиранозиду (пНФГ, β-глюкозидазная активность) (все субстраты производства фирмы Sigma, США) приведена в табл. 2. Активность определяли согласно методикам, изложенным в работе [8]. КМЦазную и ксиланазную активность измеряли по начальной скорости образования ВС (50°, рН 5,0, 0,1 М Na-ацетатный буфер) при концентрации полисахаридного субстрата в реакционной смеси 5 г/л. β-Глюкозидазную активность определяли по начальной скорости образования *n*-нитрофенола, о которой судили по изменению поглощения при длине волны 400 нм (40°, рН 5,0, 0,1 М нат-

рий-ацетатный буфер), при начальной концентрации субстрата 0,05 М. Реакцию останавливали добавлением раствора 1 М Na₂CO₃.

Активность ферментов выражали в международных единицах: 1 единица соответствовала количеству фермента, обеспечивающему образование 1 мкмоль продукта за 1 мин при действии на соответствующий субстрат.

Протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона [9]. В качестве субстрата использовали гемоглобин производства фирмы Sigma (США). За единицу протеолитической активности (ПА) принимали количество фермента, которое за 1 мин в условиях опыта (30°, рН 4,7) катализирует переход в не осаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние такого количества гемоглобина, которое содержит 1 мкмоль тирозина (т.е. 0,181 мг).

Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури, в качестве стандарта использовали бычий сывроточный альбумин [10].

Предварительная обработка (ПО) оболочек люпина и сои. Образцы оболочек люпина и сои были обработаны 0,25%, 0,5 и 1 % (масса/об.) серной кислотой («Химмед») в завинчивающихся металлических капсулах (НПП «Компрессор»), помещенных в масляную баню с регулятором температуры. Температура ПО составляла 100°, 125 и 140°, время — 0,5 ч и 1 ч. Объем реакционной смеси был равен 30 мл, концентрация сухого вещества (АСВ) — 12 % (масса/об.). После обработки биомассу отделяли центрифугированием, затем ресуспендировали в 50 мл дистиллированной воды и рН суспензии доводили до 5,0 1 М раствором NaOH. После этого биомассу трижды промывали дистиллированной водой (по 50 мл) и хранили в запечатанном пластиковом пакете при 4° для последующего ферментативного гидролиза. Содержание сухих веществ в предобработанной биомассе определяли гравиметрически.

Культивирование *P. verruculosum* 105 (продуцента целлюлаз) проводили в качалочных колбах Эрленмейера (емкостью 750 мл) с использованием питательной среды следующего состава, г/л: МКЦ (ООО «МК-Центр») или дробленые оболочки люпина или сои — 40; пшеничные отруби — 10 (ООО «Биотех»); дрожжевой экстракт — 10 («Хеликон»); глюкоза — 10 (Roquette, Франция); KH_2PO_4 — 15; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,3 (все соли производства «Хеликон»). Объем среды составлял 100 мл. Культивирование проводили в течение 144 ч в термостатируемой качалке (250 об/мин) при 32°. После завершения процесса ферментации отбирали пробы КЖ, центрифугировали и в супернатанте определяли концентрацию белка, а также КМЦазную, ксиланазную и β -глюкозидазную активность.

Культивирование *P. canescens* ПерА cl.4 (продуцента протеаз) проводили в качалочных колбах с использованием питательной среды следующего состава, г/л: шелуха люпина или сои — 45, кукурузный экстракт (ООО «СибПромЛес») — 50, NaH_2PO_4 — 25 («Химмед»). Культивирование проводили в течение 144 ч в термостатируемой качалке (250 об/мин) при 30° в объеме среды 100 мл. После завершения ферментации отбирали пробы КЖ, центрифугировали их и в супернатанте определяли концентрацию белка, а также ПА по Ансону [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ферментативная конверсия оболочек люпина и сои

На первом этапе был осуществлен ферментативный гидролиз исходных оболочек люпина и сои. Его проводили с помощью ФП, представляющего собой высушенную КЖ, в состав которой входит комплекс целлюлаз и ксиланаз *P. verruculosum* В1-221-151, в присутствии целлюбиазы (β -глюкозидазы) *P. verruculosum* F10. Характеристики использованных ФП приведены в табл. 1, а условия гидролиза описаны в разделе «Условия эксперимента». Выход ВС через 48 ч ферментативного гидролиза оболочек люпина составил 22 г/л, глюкозы — 12 г/л (при исходной концентрации оболочек в реакционной смеси 100 г/л), т.е. глубина конверсии оболочек люпина с образованием ВС и глюкозы составила 20% и 10,9 % от АСВ исходного сырья, соответственно (табл. 3). В случае ферментативного гидролиза оболочек сои выход ВС и глюкозы составил 16 г/л и 6 г/л (глубина конверсии 14,5% и 5,5 %, соответственно).

В целом, как видно из табл. 3, реакционная способность исходных оболочек люпина и сои при ферментативном гидролизе оказалась низкой: глубина конверсии до сахаров была небольшой. Реакционная способность исходных оболочек люпина несколько превосходила таковую для исходных оболочек сои (что может быть обусловлено меньшим содержанием целлюлозы и гемицеллюлоз в оболочках сои по сравнению с оболочками люпина, см. табл. 1).

Отметим, что низкая реакционная способность при ферментативном гидролизе не является индивидуальным недостатком, присущим только оболочкам люпина или сои — подавляющее большинство видов растительного сырья характеризуется низкой реакционной способностью и нуждается для ее увеличения в предварительной обработке [11].

Предобработку оболочек люпина и сои проводили серной кислотой, варьируя концентрацию кислоты (0,5—1%), температуру (100—140°) и время обработки (0,5—1 ч). После ПО эффективность ферментативного гидролиза оболочек как люпина, так и сои существенно возрастала. Наиболее эффективной оказалась предобработка при использовании 1% H_2SO_4 и 125—140° в течение 1 ч. Выход ВС при ферментативном гидролизе предобработанных в этих условиях оболочек люпина увеличивался до 70—75 г/л, глюкозы — до 52—58 г/л (при исходной концентрации предобработанного субстрата в реакционной смеси 100 г/л по АСВ). Глубина конверсии предобработанных оболочек люпина по выходу ВС и глюкозы возрастала до примерно 64—68% и 47—52%, соответственно (см. табл. 3). Выход ВС и глюкозы при ферментативном гидролизе предобработанных в указанных условиях оболочек сои увеличивался до 35—38 г/л, глюкозы — до 23—24 г/л; глубина конверсии по ВС и глюкозе в этом случае возрастала до примерно 32—35% и 21—22%, соответственно (см. табл. 3). В целом, предобработка позволила в более чем в 3 раза увеличить выход ВС и примерно в 4,5 раза выход глюкозы при ферментативном гидролизе оболочек люпина; для оболочек сои эти характеристики возросли более чем в 2 раза и примерно в 4 раза, соответственно.

Таким образом, предобработка оболочек люпина и сои существенно увеличила их реакционную способность при ферментативном гидролизе и позволила в лучшем случае (для оболочек люпина) добиться 68 %-ной конверсии до ВС. Для оболочек сои максимальная глубина конверсии до ВС составила 38 % (т.е. оболочки сои как в исходном, так и в предобработанном виде уступали по реак-

Выход ВС и глюкозы после 48 ч ферментативного гидролиза интактных и предобработанных оболочек люпина и сои (Условия реакции: концентрация субстрата 100 г/л по АСВ; количество внесенного ФП *P. verruculosum* B1-221-151 (целлюлаза) – 10 мг белка на 1 г оболочек; количество ФП *P. verruculosum* F10 (целлобиаза) – 0,88 мг на 1 г оболочек; pH 5,0, 50°)

Yield of RS and glucose after 48-h enzymatic hydrolysis of intact and pretreated lupin hulls and soybean hulls (Conditions: substrate concentration, 100 g/l by ADM; amount of introduced enzyme preparation of *P. verruculosum* B1-221-151 (cellulase), 10 mg protein per 1 g hulls; amount of introduced enzyme preparation of *P. verruculosum* F10 (cellobiase), 0.88 mg per 1 g hulls; pH, 5.0; 50°C)

Субстрат Substrate		Условия предобработки Conditions for pretreatment			Концентрация продуктов ферментации, г/л Concentrations of enzymatic hydrolysis products, g/l		Степень конверсии в результате ферментации, г/л Rate of conversion during enzymatic hydrolysis, g/l	
		H ₂ SO ₄ , %	t, °C	Время, ч Time, h	BC RS	Глюкоза Glucose	BC RS	Глюкоза Glucose
Оболочки люпина Lupin hulls	1	Без ПО Without pretreatment			22,2 ± 1,0	12,4 ± 0,4	20,2 ± 0,9	11,2 ± 0,4
	2	1,00	100	1	50,5 ± 3,6	32,0 ± 1,8	45,9 ± 3,1	29,1 ± 1,6
	3	0,50	125	0,5	45,0 ± 3,0	26,2 ± 1,3	41,0 ± 2,6	23,8 ± 1,2
	4	0,50	125	1	40,9 ± 2,6	29,2 ± 1,6	37,2 ± 2,3	26,6 ± 1,4
	5	1,00	125	1	69,4 ± 5,8	51,6 ± 3,7	63,2 ± 5,0	47,0 ± 3,2
	6	0,25	140	1	47,2 ± 3,2	30,5 ± 1,7	43,0 ± 2,8	27,8 ± 1,5
	7	0,50	140	1	52,8 ± 3,8	32,8 ± 1,9	48,0 ± 3,3	29,8 ± 1,6
	8	1,00	140	0,5	56,0 ± 4,2	35,6 ± 2,1	51,0 ± 3,6	32,4 ± 1,8
	9	1,00	140	1	73,4 ± 6,3	57,4 ± 4,3	66,8 ± 5,5	52,2 ± 3,8
Оболочки сои Soybean hulls	10	Без ПО Without pretreatment			16,0 ± 0,6	6,4 ± 0,2	14,6 ± 0,6	5,8 ± 0,1
	11	1,00	100	1	30,5 ± 1,7	17,1 ± 0,7	27,8 ± 1,5	15,6 ± 0,6
	12	0,50	125	1	29,8 ± 1,6	18,0 ± 0,8	27,1 ± 1,4	16,3 ± 0,7
	13	1,00	125	0,5	30,0 ± 1,7	15,6 ± 0,6	27,3 ± 1,4	14,2 ± 0,5
	14	1,00	125	1	37,6 ± 2,3	23,6 ± 1,1	34,3 ± 2,0	21,2 ± 1,0
	15	0,25	140	1	23,6 ± 1,1	13,8 ± 0,5	21,4 ± 1,0	12,6 ± 0,4
	16	0,50	140	1	21,9 ± 1,0	14,9 ± 0,6	19,9 ± 0,9	13,6 ± 0,5
	17	1,00	140	0,5	31,7 ± 1,8	20,4 ± 0,9	28,9 ± 1,6	18,5 ± 0,8
	18	1,00	140	1	34,1 ± 2,0	24,2 ± 1,2	31,1 ± 1,7	22,0 ± 1,0

ционной способности оболочкам люпина, что может быть обусловлено меньшим содержанием целлюлозы у оболочек сои по сравнению с оболочками люпина, см. табл. 1).

Использование оболочек люпина и сои в качестве компонента питательной среды для биосинтеза целлюлаз и гемицеллюлаз

Одним из наиболее перспективных продуцентов промышленных целлюлаз (и других карбогидраз) является микроскопический гриб *P. verruculosum* [12]. Он способен синтезировать внеклеточные комплексы эндоглюканаз, целлобиогидролаз, ксиланаз и β -глюкозидаз, которые эффективно расщепляют целлюлозосодержащее сырье; кроме того, индивидуальные ферменты *P. verruculosum* обладают высокой удельной активностью и операционной стабильностью [13]. Именно по этой причине в данной работе для ферментативной конверсии оболочек люпина и сои нами были использованы ФП, полученные с помощью штаммов-продуцентов *P. verruculosum* (см. предыдущий раздел). В этой связи представлялось целесообразным проверить возможность использования оболочек люпина и сои в качестве компонента среды (источника углерода) при выращивании продуцента карбогидраз с целью биосинтеза ферментов, которые далее можно использовать для био-конверсии тех же оболочек, а также других видов возобновляемого растительного сырья.

В питательной среде при культивировании *P. verruculosum* оболочки люпина или сои (без их предобработки серной кислотой) использовали для замены МКЦ — наиболее важного и дорогостоящего компонента питательной среды, являющегося индуктором биосинтеза секреторных ферментов продуцента [14]. Культивирование *P. verruculosum* 105 проводили в качалочных колбах, используя в составе питательной среды МКЦ (контроль), смесь МКЦ и оболочек люпина (сои) в различном соотношении или оболочки люпина и сои в индивидуальном виде. Результаты определения в КЖ продуцента КМЦазной (целлюлазной), ксиланазной и β -глюкозидазной активности, а также концентрации белка приведены в табл. 4.

Очевидно, что использование индивидуальных соевых оболочек вместо МКЦ приводит к получению более высоких показателей активности в КЖ, чем в случае МКЦ (контроль); использование оболочек люпина обеспечивает примерно одинаковые с МКЦ результаты. Интересно отметить, что использование смесей соевых

или люпиновых оболочек с МКЦ обеспечивает заметно более высокую активность в КЖ по сравнению с индивидуальным использованием МКЦ или индивидуальным использованием оболочек: замена 25% МКЦ на оболочки люпина приводит к приросту в КЖ КМЦазной активности на 12% по сравнению с контролем, ксиланазной — на 21%; замена 75 % МКЦ на оболочки сои обеспечивает прирост КМЦазной активности на 34%, ксиланазной — на 117%.

Таким образом, данные полученные при проведении ферментации *P. verruculosum* 105 в качалочных колбах свидетельствуют о том, что оболочки люпина или сои вполне могут заменить МКЦ в данном процессе. Отметим, что по данным анализа КЖ с помощью ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях состав секретируемого ферментного комплекса при использовании оболочек люпина или сои вместо МКЦ или при использовании смесей оболочек с МКЦ не изменялся по сравнению с контролем (данные не приведены).

Использование оболочек люпина и сои в качестве компонента питательной среды для получения других ферментов (на примере кислой протеазы)

Представлялось интересным проверить возможность использования оболочек люпина и сои в качестве субстрата (источника углерода) для осуществления ферментационных процессов получения каких-либо других (помимо карбогидраз) биотехнологически важных ферментов. Для этого нами был выбран штамм *P. canescens* РерА cl.4 — продуцент внеклеточной кислой протеазы, находящей применение в пищевой промышленности, а также в качестве кормовой добавки [15, 16]. Следует отметить, что *P. canescens* широко используется в качестве штамма-хозяина для экспрессии гомологичных и гетерологичных генов с целью получения различных промышленно значимых ФП (кси-ланаз, пектиназ, арабиназ, инулиназ, α - и β -галактозидаз, фитазы и т.д.) [17] и результаты, полученные при культивировании штамма *P. canescens* РерА cl.4, могут быть использованы для культивирования других штаммов *P. canescens* — продуцентов различных ферментов.

В питательной среде для биосинтеза кислой протеазы *P. canescens* оболочки люпина или сои использовали для замены свекловичного жома (компонента питательной среды, являющегося индуктором биосинтеза секреторных ферментов *P. canescens* [17]). Ферментацию проводили в качалоч-

Активность по отношению к разным субстратам, ед/мл, и концентрация белка, мг/мл, в КЖ в результате культивирования в течение 144 ч *P. verruculosum* 105 в качалочных колбах на средах различного состава

Activities to various substrates, U/ml, and protein concentrations in CL after culturing of *P. verruculosum* 105 for 144 h in shaker flasks on various media

Источник углерода Carbon source	КМЦаза, ед/мл CMCase, U/ml	Ксиланаза, ед/мл Xylanase, U/ml	β -Глюкозидаза, ед/мл β -Glucosidase, U/ml	Концентрация белка, мг/мл Protein concentration, mg/ml
100% МКЦ (контроль) MCC (100%, control)	167 \pm 5	68 \pm 2	5,5 \pm 0,2	9,1 \pm 0,1
75% МКЦ + 25% оболочек сои MCC (75%) + soybean hulls (25%)	205 \pm 5	89 \pm 2	3,3 \pm 0,1	13,4 \pm 0,1
50% МКЦ + 50% оболочек сои MCC (50%) + soybean hulls (50%)	195 \pm 2	130 \pm 3	5,6 \pm 0,2	13,5 \pm 0,2
25% МКЦ + 75% оболочек сои MCC (25%) + soybean hulls (75%)	223 \pm 3	148 \pm 5	5,9 \pm 0,1	13,3 \pm 0,1
100% соевых оболочек Soybean hulls (100%)	188 \pm 5	88 \pm 2	6,0 \pm 0,1	13,1 \pm 0,2
75% МКЦ + 25% оболочек люпина MCC (75%) + lupin hulls (25%)	187 \pm 5	82 \pm 1	1,8 \pm 0,1	12,0 \pm 0,1
50% МКЦ + 50% оболочек люпина MCC (50%) + lupin hulls (50%)	153 \pm 5	64 \pm 2	1,2 \pm 0,05	12,6 \pm 0,2
25% МКЦ + 75% оболочек люпина MCC (25%) + lupin hulls (75%)	124 \pm 2	79 \pm 4	1,5 \pm 0,1	12,3 \pm 0,2
100% оболочек люпина Lupin hulls (100%)	158 \pm 3	63 \pm 2	2,4 \pm 0,1	12,2 \pm 0,1

ных колбах. Результаты определения ПА, а также концентрации белка в КЖ приведены в табл. 5.

Использование оболочек люпина (как цельных, так и дробленых) позволяет увеличить ПА в КЖ на 50—67% по сравнению с контролем. Оболочки сои обеспечивают чуть более низкую ПА по сравнению с оболочками люпина, однако и в первом случае целевая активность была выше контрольных значений. Таким образом, данные, полученные при проведении ферментации *P. canescens* РерА cl.4 свидетельствуют о том, что оболочки люпина и/или сои являются перспективными заменителями традиционно используемого в этом про-

цессе свекловичного жома, способными увеличить выход активности кислой протеазы.

Таким образом, в настоящей работе показано, что интактные оболочки люпина и сои при ферментативной конверсии комплексом карбогидраз в ВС проявляли относительно невысокую реакционную способность: глубина конверсии до ВС (и глюкозы) составляла 20% (10,9%) и 14,5% (5,5)%, соответственно. Предварительная обработка 1%-ной H_2SO_4 при 125—140° в течение 1 ч позволила более чем в 3 раза увеличить выход ВС и примерно в 4,5 раза выход глюкозы при последующем ферментативном гидролизе оболочек люпина. Использо-

Протеазная активность (ПА, ед/мл) и концентрация белка, мг/мл, в КЖ в результате культивирования *P. canescens* PepA cl.4 в течение 144 ч в качалочных колбах на средах различного состава

Protease activities (PA, U/ml) and protein concentrations, mg/ml, in CL after culturing of *P. canescens* PepA cl.4 in shaker flasks on various media for 144 h

Источник углерода Carbon source	ПА, ед/мл PA, U/ml	Концентрация белка, мг/мл Protein concentration, mg/ml
Свекловичный жом (контроль) Sugar beet pulp (control)	73 ± 2	14,0 ± 1,0
Оболочки сои (дробленые) Soybean hulls (crushed)	110 ± 5	18,0 ± 1,0
Оболочки люпина (дробленые) Lupin hulls (crushed)	120 ± 5	15,5 ± 0,5
Оболочки люпина (цельные) Lupin hulls (intact)	122 ± 2	15,5 ± 0,5

вание предобработанных оболочек сои позволило увеличить выход ВС более чем в 2 раза, а выход глюкозы — примерно в 4 раза. Для предобработанных оболочек люпина удалось добиться 68%-ной конверсии до ВС от АСВ субстрата, для предобработанных оболочек сои — 38%-ной конверсии. Оболочки люпина после предобработки можно рассматривать как привлекательное возобновляемое сырье для биоконверсии в простые сахара и другие полезные продукты.

Оболочки люпина или сои могут быть использованы в качестве дешевого сырья (источника углерода) для биосинтеза микроскопическим грибом *P. verruculosum* комплекса внеклеточных карбогидраз (целлюлаз и гемицеллюлаз), которые далее могут быть использованы для биоконверсии возобновляемого растительного сырья (включая сами оболочки люпина и сои).

Гриб *P. canescens* также может утилизировать оболочки люпина или сои в качестве источника углерода для биосинтеза других (помимо карбогидраз) ферментов, имеющих значение для биотехнологии, например, кислой протеазы. Возможно, что данный подход окажется полезным для повышения эффективности биосинтеза данным грибом других ферментов — пектиназ, арабиназ, фитазы, α- и β-галактозидаз, и др.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки России в рамках

ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014—2020 годы” (идентификационный номер проекта RFMEFI60714X0050) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” ФИЦ биотехнологии РАН.

The work was supported by the Ministry of Education and Science of Russian Federation within the frames of the Federal Target Program “Investigations and Design in Prior Directions of Research-and-Technique Complex in Russia for 2014—2020” (Identification Number of Project RFMEFI60714X0050). The research equipment of the Center for Common Use *Industrial Biotechnologies*, FIC of Biotechnology, Russ. Acad. Sci., was used.

Получено 27.01.16

ЛИТЕРАТУРА

1. Цыгуткин А.С. Белый люпин как сельскохозяйственная культура / А.С. Цыгуткин, С.В. Зверев // Хранение и переработка зерна. — 2014. — № 4. — С. 20—23.
Tsygutkin, A.S. White lupin as farm culture / A.S. Tsygutkin, and S.V. Zverev // Grain storage and Processing. — 2014. — N 4. — P. 20—23.
2. Зверев С.В., Цыгуткин А.С. Подготовка зерна белого люпина к глубокой переработке: Инновационные технологии производства и хранения материальных ценностей

- для государственных нужд. Межд. сб. науч. ст. — М.: Галлея-Принт, 2014. — С. 115—121.
- Zverev, S.V., and Tsygutkin, A.S.* Preparation of white lupin grain to deep processing: Innovation techniques in production and storage of material values for state demands. *Internat. Symp. Res. Articles.* — Moscow: Galleya-Print, 2014. — P. 115—121.
3. *Bardc, M.B.* Soy protein modification: A review / M.B. Bardc, S.P. Stanojevic', S.T. Jovanovic', M.B. Pešic' // *Acta Periodica Technol.* — 2014. — N 35. — P. 3—16.
 4. *Перов А.А.* Белый люпин: дробление, шелушение и сепарация / А.А. Перов, С.В. Зверев // *Комбикорма.* — 2014. — № 2. — С. 41—45.
Perov, A.A. White lupin: crushing, shelling and separation / A.A. Perov, and S.V. Zverev // *Kombikorma (Mixed Feeds).* — 2014. — N 2. — P. 41—45.
 5. *Цыгуткин А.С.* Аминокислотный состав зерна белого люпина сортов Гамма и Дега / А.С. Цыгуткин, А.Л. Штеле, Е.Н. Андрианова, Н.В. Медведева // *Достижения науки и техники АПК.* — 2011. — № 9. — С. 41—43.
Tsygutkin, A.S. Aminoacid composition of grain of Gamma and Dega breeds white lupin / A.S. Tsygutkin, A.L. Shtele, E.N. Andrianova, and N.V. Medvedeva // *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK (Proceedings in Research and Technique in Agro-Industrial Complex).* — 2011, N 9. — P. 41—43.
 6. *Лакхмоткина Г.Н.* Использование пищевых волокон продовольственного люпина для обогащения продуктов из рубленого мяса птицы / Г.Н. Лакхмоткина, В.И. Криштафович // *Товаровед продовольственных товаров.* — 2012. — №12. — С.18—23.
Lakhmotkina, G.N. Use of Edible Fibers of Food Lupin to Enrich Products from Chopped Poultry Meat / G.N. Lakhmotkina, and V.I. Krishtafovich // *Tovaroved Prodovol'stvennykh Tovarov (Merchandizing Specialist in Food Stuffs).* — 2012. — N 12. — P. 18—23.
 7. E4tech, RE-CORD and WUR (2015) «From the sugar platform to biofuels and biochemicals». Final report for the European Commission, contract No. ENER/C2/423-2012/SI2.673791. <https://ec.europa.eu/energy/sites/ener/files/documents/EC%20Sugar%20Platform%20final%20report.pdf>
 8. *Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М.* Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
Sinitsyn, A.P., Gusakov, A.V., and Chernoglazov, V.M. Bioconversion of lignocelluloses materials. — Moscow: Izd-vo MGU, 1995. — 225 p.
 9. *Польгалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В.* Определение активности ферментов. Справочник. — М.: ДеЛи принт, 2003. — 375 с.
Polygalina, G.V., Cherednichenko, V.S., and Rimareva, L.V., Determination of enzyme activities. A reference book. — Moscow: DeLi Print, 2003. — 375 p.
 10. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. — М.: Мир, 1991. — 464 с.
Dowson R., Elliot, D., Elliot, U., and Jones, K., A handbook for biochemist — Moscow: Mir (Translated into Russian), 1991. — 464 p.
 11. *Доценко Г.С.* Реакционная способность различных целлюлозосодержащих материалов при ферментативном гидролизе / Г.С. Доценко, А.В. Чекушина, Е.Г. Кондратьева, А.Г. Правильников, Р.М. Андрианов, Д.О. Осипов, О.А. Сеницына, О.Г. Короткова, В.И. Степанов, Е.В. Новожилов, Е.Р. Ачильдиев, С.А. Константинова, А.П. Сеницын // *Лесной вестник.* — 2012. — № 8. — С. 129—135.
Dotsenko, G.S., Reaction capacity of various cellulose-containing materials in enzymatic hydrolysis / G.S. Dotsenko, A.V. Chekushina, E.G. Kondratieva, A.G. Pravit'nikov, R.M. Andrianov, D.O. Osipov, O.A. Sinitsyna, O.G. Korotkova, V.I. Stepanov, E.V. Novozhilov, E.R. Achil'diev, S.A. Konstantinova, and A.P. Sinitsyn // *Lesnoy Vestnik (Forrest Journal).* — 2012. — N 8. — P. 129—135.
 12. *Короткова О.Г.* Получение комплексных биокатализаторов на основе ферментных препаратов из рекомбинантного гриба *Penicillium verruculosum* и применение их в гидролизе отходов деревообрабатывающей и сельскохозяйственной промышленности / О.Г. Короткова, А.М. Рожкова, В.Ю. Матыс, А.В. Кошелев, О.Н. Окунев, В.А. Немашкалов, О.А. Сеницына, А.Г. Правильников, Р.М. Андрианов, И.Н. Овешников, Е.Р. Давидов, А.П. Сеницын // *Катализ в промышленности.* — 2011. — № 5. — С. 61—68.
Korotkova, O.G., Obtaining of Complex Biocatalysts on the basis of Enzyme Preparations from a Recombinant Fungus of *Penicillium verruculosum* and their Use in Hydrolysis of Side Products in Wood Working and Agrarian Industries / O.G. Korotkova, A.M. Rozhkova, V.Yu. Matys, A.V. Koshelev, O.N. Okunev, V.A. Nemashkalov, O.A. Sinitsyna, A.G. Pravit'nikov, R.M. Andrianov, I.N. Oveshnikov, E.R. Davidov, and A.P. Sinitsyn // *Kataliz v Promyshlennosti (Catalysis in Industry).* — 2011. — N 5. — P. 61—68.
 13. *Castellanos, O.F.* Comparative evaluation of hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases / O.F. Castellanos, A.P. Sinitsyn, E.Yu. Vlasenko // *Biores. Technol.* — 1995. — V. 52. — P. 119—124.
 14. *Gusakov, A.V.* Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass / A.V. Gusakov, A.P. Sinitsyn // *Biofuels.* — 2012. — V. 3. — N 4. — P. 1—5.
 15. *Rani, K.* Review on latest overview on proteases / K. Rani, R. Rana, S. Datt // *Internat. J. Curr. Life Sci.* — 2012. — V. 2. — N 2. — P. 12—18.
 16. *Abbas, C.A., Bao, W.-L.* Increased fiber hydrolysis by protease addition // Patent US N 8815571, C 12 N 9/62. 2014.
 17. *Sinitsyn, A.P., Rozhkova, A.M.* *Penicillium canescens* host as the platform for development of a new recombinant strains producers of carbohydrases: Microorganisms in Biorefineries [Ed. B.Kamm]. — Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2015. — P. 1—20.

A.P. SINITSYN^{1,2}, D.O. OSIPOV^{2,*}, N.V. TSURIKOVA³,
I.A. VELIKORETSKAYA³, I.A. SHASHKOV²,
and S.V. ZVEREV⁴

¹The Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow Russia

²The Bach Institute for Biochemistry, Federal Research Center *Fundamentals of Biotechnology*, Russ. Acad. Sci., 119071, Moscow Russia

³The All-Russian Research Institute for Food Biotechnology, Russ. Acad. Sci. 111033, Moscow Russia

⁴The All-Russian Institute of Grain and Products of its Processing, Russ. Acad. Sci., 127434, Moscow Russia

e-mail: inbi@inbi.ras.ru
doosipov@gmail.com

Possible Uses of White Lupin Hulls and Soybean Hulls in Biotechnology

It has been shown that lupine and soybean hulls can be used as raw material for the enzymatic conversion to sugars after

a pretreatment with diluted sulfuric acid. The conversion rate of the lupine and soybean hulls by the *Penicillium verrucosum* carbohydrase complex after a pretreatment (1% H₂SO₄ at 125—140°C for 1 h) was 68% and 38%, respectively. It was found out that lupine and soybean hulls (without pretreatment) can be used as a cheap ingredient in the culture medium for the *P. verrucosum* microscopic fungus, a producer of cellulases and xylanases. The 25% substitution of the lupine for microcrystalline cellulose (MCC) resulted in the increase in the cellulase (CMCase) activity by 12% and xylanase activity by 21% in culture liquid as compared to control (100% MCC), whereas the 75% substitution of soybean hulls for MCC provided a gain of 34% in the cellulase activity and 117% in xylanase activity. It was also demonstrated that lupine or soybean hulls can be used as a carbon source for culturing of *P. canescens* as a protease producer; the protease activity in the culture liquid increased by 50—67% after the substitution of hulls for sugar beet pulp.

Key words: enzymatic hydrolysis, lupine hulls, *Penicillium canescens*, *Penicillium verrucosum*, pretreatment with diluted acid, reactivity, soybean hulls.

Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. , N 1, P. 27— 36.

* Author for correspondence.