

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ПОЛИСАХАРИДОВ ЛЬНА КСИЛАНАЗОЙ *TRICHODERMA VIRIDE*

Е.В. Ожимкова, аспирант

кафедра Биотехнологии и химии

ГОУ ВПО «Тверской государственной технической университет»

e-mail: sulman@online.tver.ru

Представленная работа посвящена изучению кинетики ферментативного гидролиза полисахаридов льна ксиланазой *Trichoderma viride*.

Ключевые слова: гидролиз, полисахариды, кинетика.

В настоящее время растительные олигосахариды находят все более широкое применение при производстве различных продуктов питания функционального назначения. Основное свойство этих углеводов заключается в их благотворном влиянии на организм человека путем селективной стимуляции роста полезной кишечной микрофлоры [1], кроме того, олигосахариды менее сладкие, чем сахароза, что позволяет рассматривать их в качестве компонентов продуктов для больных диабетом [2].

Существует четыре основных способа получения олигосахаридов:

1. Кислотный и ферментативный гидролиз растительных и микробных полисахаридов (например, инулина до фруктоолигосахаридов).

2. Выделение из растительного сырья (фруктоолигосахариды).

3. Химический синтез.

4. Ферментативный синтез.

При этом наиболее перспективным из выше представленных методов получения олигосахаридов является ферментативный гидролиз природных полисахаридов [3]. Однако для целенаправленного получения олигосахаридов вышеуказанным методом требуется всестороннее изучение кинетических закономерностей проведения процесса.

В работе представлено исследование кинетических закономерностей ферментативного гидролиза полисахаридов льна с применением фермента ксиланазы, вырабатываемого *Trichoderma viride* (эндо-1,4-*D*-ксилилаза, КФ 3.2.1.8). Ксиланазы *Trichoderma viride* является истинной ксилано-гидролазой, то есть не обладает целлюлолитической активностью, представляет собой пептид с молекулярной массой 18 кДа [4]. Ксиланазы *Trichoderma viride* способна гидролизовать производные ксилана, полученного из различных источников, при этом чаще всего продуктами гидролиза являются олигосиланы, ксилобиозы и ксилоза [4].

Используемые для исследования полисахариды льна состоят из двух фракций: кислой (полигалактоуроновые кислоты) и нейтральной (галактоглюканы и арабиноксиланы). В состав слизи семян льна также входит около 5% белка [2].

Экспериментальная часть

Ферментативный гидролиз полисахаридов льна под действием ксиланазы *Trichoderma*

viride (Fluka) проводили в термостатируемом реакторе периодического действия. Процесс гидролиза проводился при непрерывном встряхивании реактора (300 кач./мин). Указанная интенсивность перемешивания позволяет устранить влияние внешнедиффузионных факторов на исследуемый процесс. В ходе реакции проводился отбор проб в течение 7 ч. Температура проведения процесса 40°C, pH 4.2, начальная концентрация полисахарида варьировалась от 0.07 до 4 г/л, количество фермента составляло 3560 ед. акт.

Анализ гидролизатов проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Была использована хроматографическая система Dionex, Ultimate 3000, USA, снабженная рефрактометром. Также система оснащена перистальтическим насосом с автоматической промывкой рабочих плунжеров, системой очистки растворителя, игольным портом и аналитической колонкой из нержавеющей стали 500x2 мм с предколонкой 50x2 мм. В качестве неподвижной фазы был использован полимерный носитель Reprogel-H, являющийся слабым катионообменником. Колонка характеризовалась наличием 164000 теоретических тарелок, коэффициенты асимметрии пиков не превышали 1.005. В качестве подвижной фазы использовался раствор серной кислоты ($C_{H_2SO_4} 10^{-9}$ моль/л). Скорость подачи элюента 0.5 мл/мин, давление на входе колонки 24 атм. Хроматографический анализ проводился при температуре 30.5°C. Количественное определение продуктов гидролиза проводилось методом исправленной нормировки площадей пиков.

Результаты и обсуждение

В ходе проведения экспериментов были идентифицированы основные (арабиноза, ксилоза, галактоза, галактуроновая кислота три- и диксилон-галактоуронаны) и промежуточные продукты гидролиза (тетра- и пента- ксилонгалактоуронаны) (рис. 1).

Максимальное накопление промежуточных продуктов, в том числе пентагалактоксилоуронанов, наблюдается в первые 30 мин проведения процесса (рис. 2), впоследствии происходит закономерное снижение их содержания в реакционной среде в связи с последующим гидролизом до более мелких олиго- и моносахаридов.

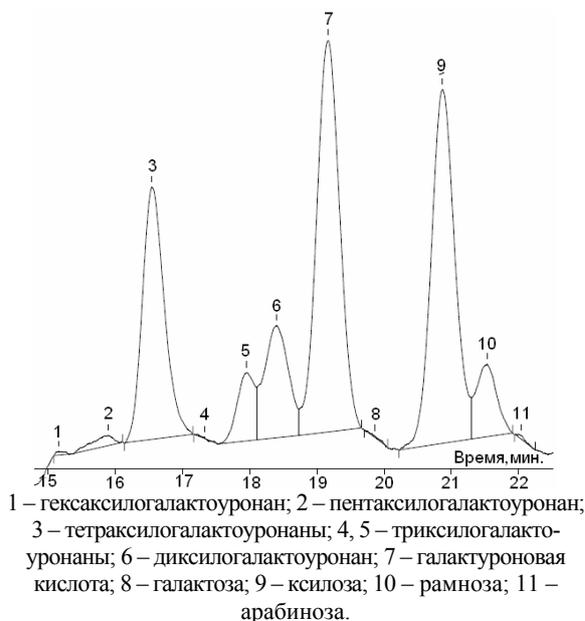


Рис. 1. Хроматограмма продуктов гидролиза полисахаридов льна ксиланазой *Trichoderma viride* (условия см. Эксперимент. часть).

В ходе проведения работы было изучено влияние начальной концентрации полисахаридов на скорость гидролиза, при этом было установлено достижение максимальной скорости образования пентагаллактоксилоуронанов при концентрации полисахаридов 1 г/л, дальнейшее увеличение концентрации поли-

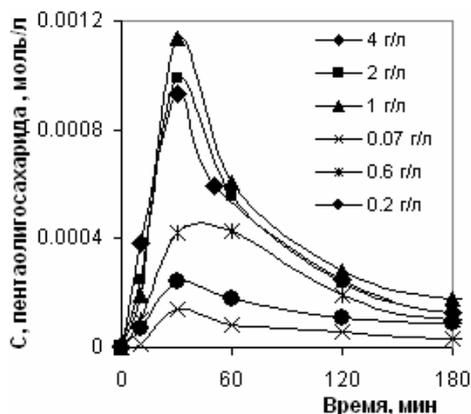


Рис. 2. Зависимость накопления пентагаллактоксилоуронанов – продуктов гидролиза полисахаридов льна ксиланазой *Trichoderma viride* – от времени.

сахаридов приводит к субстратному ингибированию процесса.

В процессе проведения гидролиза наблюдается закономерное увеличение содержания продуктов полного гидролиза полисахаридов, в том числе ксилозы (рис. 3), максимальное содержание которых лимитируется составом полисахарида. Максимальное накопление ксилозы происходит за 200 мин проведения процесса, после чего наблюдается замедление скорости накопления. Также было изучено влияние начальной концентрации полисахаридов на скорость образования ксилозы, установлено достижение максимальной скорости образования ксилозы при концентрации полисахаридов 1 г/л.

Таким образом, на основании экспериментальных данных были установлены условия проведения ферментативного гидролиза полисахаридов льна ксиланазой *Trichoderma viride*, соответствующие максимальному накоплению олигосахаридов: pH раствора 4.2, температура процесса 40°C (являются оптимальными для данного фермента), концентрация гетерополисахаридов льна 1 г/л, скорость перемешивания 300 кач./мин, продолжительность процесса 30–40 мин. Определены значения константы Михаэлиса–Ментен – 3.5 ммоль/л; кажущейся энергии активации – 12 кДж/моль; максимальной скорости процесса – 0.163 мкмоль/(л·мин).

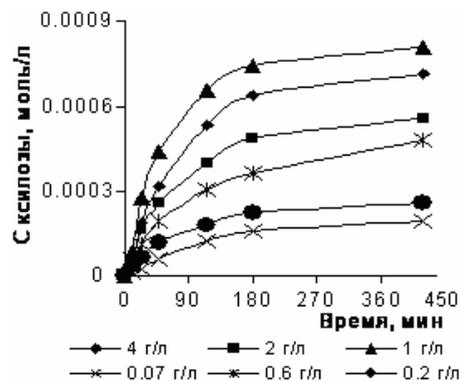


Рис. 3. Зависимость накопления ксилозы – продукта гидролиза полисахаридов льна ксиланазой *Trichoderma viride* – от времени.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Тихомирова, Н. А. Технология продуктов функционального питания / Н. А. Тихомирова. – М.: Франтэра, 2002. – 213 с.
2. Mussatto, S. I. Non-digestible oligosaccharides: a review / S. I. Mussatto, I. M. Manchilha // Carbohydrate Polymers. – 2007. – Vol. 68, № 5. – P. 587–597.
3. Playne, M. Commercially available oligosaccharides / M.J. Playne, R. Crittenden / Bull. of IDF. – 1996. – № 313. – P. 10–22.
4. Mariko, U. Low-molecular-weight xylanase from *Trichoderma viride* / U. Mariko, R. Camille, Y. Makoto // Appl. and Environm. Microbiology. – 1991. – Vol. 57, № 6. – P. 1860–1862.
5. *Trichoderma* xylanases: their properties and application / Y. Kenk, A. Wong, N. John, A. Saddler // Critical Rev. in Biotechnology. – 2008. – Vol. 12, № 5. – P. 413–435.