

ГЕТЕРОГЕННЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ГАММА ОКСИДА АЛЮМИНИЯ С ИММОБИЛИЗОВАННОЙ КСИЛАЗОЙ ДЛЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО РАЗЛОЖЕНИЯ КСИЛАНА

Д.П. Тамбасова, П.Н. Любякина, Д.О. Антонов, Е.Г. Ковалева

Уральский федеральный университет, г. Екатеринбург, Россия

В данной работе были получены гетерогенные катализаторы на основе порошкового γ -оксида алюминия с иммобилизованным ферментом ксиланазой и проведено исследование их каталитической активности возможности их многократного использования. Целью работы являлось создание эффективной гетерогенной каталитической системы на основе γ -оксида алюминия с иммобилизованным ферментом для разложения природного полисахарида ксилана с максимальным выходом целевого продукта. В ходе работы проводилась иммобилизация ксиланазы на γ - Al_2O_3 двумя способами, а именно, физической адсорбцией и ковалентным связыванием с использованием глутарового альдегида как сшивающего агента. Реакции ферментативного гидролиза ксилана, исследование каталитической активности и операционной стабильности иммобилизованного фермента в 4-х циклах проводились на полученных системах. Образец оксида алюминия синтезирован золь-гель методом с температурой обжига $550\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 4 часов, что соответствует γ фазе оксида алюминия. Заряд поверхности полученного образца был охарактеризован методом ЭПР рН-чувствительных нитроксильных радикалов. Установлено, что по сдвигам кривых ЭПР титрования поверхность γ - Al_2O_3 имеет положительный заряд, что подразумевает наличие центров Льюиса на поверхности. Было установлено, что каталитическая активность ксиланазы, иммобилизованной на поверхности γ - Al_2O_3 методом ковалентного присоединения через глутаровый альдегид выше, чем при иммобилизации посредством физической адсорбции в 1,83 раза и составляет 12,23 U/мг. Найдено, что, ферментативная активность ковалентно иммобилизованной ксиланазы при первых двух циклах достаточно высока, на третьем цикле она снижается до 37,5 % и выходит на плато. При иммобилизации фермента физической адсорбцией активность продолжает снижаться до 23 % в 4-м цикле. Разложение ксилана гетерогенными каталитическими системами на основе γ - Al_2O_3 и иммобилизованного на нем различными способами фермента ксиланазы, и проведение сравнительного анализа полученных данных, позволяет сделать вывод о перспективности дальнейшего использования полученных систем, например, в птицеводстве в силу эффективности применения иммобилизованной ксиланазы в высвобождении редуцирующих сахаров.

Ключевые слова: гетерогенный катализ, полисахариды, гидролиз, ксилан, иммобилизованные ферменты, ксиланаза, оксид алюминия, нитроксильные радикалы, электронный парамагнитный резонанс.

Введение

Одной из актуальных задач инженерной энзимологии является биodeградация природных полимеров, одним из которых является ксилан [1–5]. По распространенности в природе ксилан занимает второе место после целлюлозы, содержится в различном растительном сырье, где является антинутриентом, препятствуя усвоению питательных веществ. Кроме того, во многих технологических процессах в пищевой, целлюлозно-бумажной, текстильной промышленности он является нежелательной примесью. Ранее были проведены исследования гидролитического разложения ксилана как химическим, так и ферментативным методом [6–8]. Ферментатив-

ный гидролиз является наиболее перспективным, так как наименьшим образом повреждает структуру волокон ксилана, широко применяется в пищевой промышленности, является более экологичным и безотходным.

Гидролитический фермент ксиланаза [9, 10] является специфическим для разложения ксилана и обеспечивает полное ферментативное разложение ксилана, включая в себя расщепление боковых цепей. Иммобилизация ксиланазы обеспечивает значительные преимущества – возможность непрерывной переработки и повторного использования фермента [11, 12]. Такие ферменты являются предпочтительными в промышленном масштабе,

так как с их помощью можно уменьшить себестоимость процесса переработки.

Перспективным методом иммобилизации ферментов является их адсорбция на мезопористых γ -оксидах алюминия, обладающих необходимыми для закрепления фермента поверхностными свойствами. Повысить эффективность иммобилизации ферментов можно с помощью его ковалентного связывания с поверхностью носителя с помощью бифункционального реагента глутарового альдегида [13]. Также модификация поверхности γ -оксида алюминия силансодержащими органическими соединениями может положительно повлиять на степень и прочность иммобилизации фермента.

Целью исследования являлось создание эффективной гетерогенной каталитической системы на основе γ -оксида алюминия с иммобилизованным ферментом для разложения природного полисахарида ксилана с максимальным выходом целевого продукта с возможностью ее (системы) многократного использования.

Объекты и методы исследования

Для проведения гидролитической реакции использовался очищенный ксилан из древесины березы (молекулярная масса 30000 U/g) China. CAS Регистрационный номер: 9014-63-5 EINECS:232-760-6.

Для каталитического разложения ксилана использовалась эндо-1.4- β -ксилаза, изолированная из микромицета *Trichoderma viride*. CAS Регистрационный номер: 9025-57-4 EINECS:232-760-6 (молекулярная масса 6000 U/mg) China.

В качестве носителя для иммобилизации фермента использовался порошкообразный мезопористый γ -оксид алюминия, представляющий собой белый порошок рыхлого строения с зернистой структурой с большой удельной поверхностью 204 м²/г. Средний диаметр пор γ -Al₂O₃ равен 2,60 мкм. Диаметр частиц преобладающей фракции – 0,41 мкм. Температура отжига – 550 °С.

γ -Al₂O₃ удобен в применении, так как при проведении экспериментов и съемах на ЭПР-спектрометре для определения электроповерхностных свойств образцов легко отделяется от раствора, его можно отделять от фильтровальной бумаги, что уменьшает потери при повторном использовании.

Образец γ -Al₂O₃ синтезирован химическим осаждением, используя 0,5М раствор 9-

ти водного нитрата алюминия, после приготовления раствор выдерживают при температуре 70 °С в течение суток. Выделение продукта Al(OH)₃ в виде гелеобразного осадка проводилось его осаждением из раствора Al(NO₃)₃ по реакции 1 с использованием 25 % NH₄OH [14, 15]:



Водный раствор аммиака добавлялся маленькими порциями и pH получившейся суспензии контролировался с помощью pH-метра. Наиболее устойчивая суспензия формировалась при pH 8–9. Затем осадок фильтровался и промывался дистиллированной водой. Сушка образца проводилась в течение 3-х дней при 60 °С. Затем получившийся продукт подвергался термообработке при температуре 550 °С в течение 4-х часов.

Для определения ксиланазной активности были использованы следующие реактивы: кислота уксусная ледяная, натрий уксуснокислый 3-водный, калий-натрий виннокислый 4-водный, натрия гидроксид, кислота 3,5-динитросалициловая (ДНС) кристаллическая с содержанием основного вещества 98 %. Все реактивы были марки ХЧ или ЧДА.

Для приготовления 1,0 % раствора 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС-реактива) предварительно готовится раствор NaOH с массовой долей 10,7 %. Навеска NaOH 16,05 г растворяется в 150 мл дистиллированной воды, и раствор охлаждается до комнатной температуры. В стакан объемом 2 л добавляются 10 г 3,5-динитросалициловой кислоты, добавляются 400 мл дистиллированной воды и полученная смесь перемешивается в течение 25–30 мин. Далее при постоянном перемешивании добавляются 150 мл раствора NaOH. При этом цвет жидкости изменяется от светло-желтого до ярко-желтого.

Стакан с полученной жидкостью ставится в водяную баню с температурой (47 ± 1) °С и далее 300 г виннокислого калия-натрия добавляются аккуратно, маленькими количествами. Перемешивание проводится до полного растворения.

Охлажденный до комнатной температуры раствор переносится в мерную литровую колбу, и объем жидкости доводится до метки дистиллированной водой. Полученный раствор должен иметь ярко-желтый окрас (без красного оттенка). Реактив хранится в темной бутылке не более 6 месяцев [16].

Заряд поверхности полученного оксида алюминия был охарактеризован методом ЭПР рН-чувствительных нитроксильных радикалов (НР) как спиновых рН-зондов [17, 18]. Для регистрации спектров ЭПР образцы готовились следующим образом. Навеска $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ массой 0,20 г была добавлена в водный раствор НР R имидазолинового типа: 4-диметиламино-5,5-диметил-2-(4-(хлорметил)фенил)-2-этил-2,5-дегидро-1Н-имидозол-1-оксил гидрохлорид семигидрата с ионной силой 0,1М, созданной с помощью NaCl, и выдерживалась в этом растворе в течение суток. Для построения кривых титрования НР (зависимостей константы сверхтонкого расщепления, a , Гс (рН-чувствительного параметра спектров ЭПР НР) от рН внешнего раствора (рН) как в растворе, так и в фазе исследуемых материалов варьировали рН раствора НР с помощью 0,1М HCl и 0,1М NaOH, который контролировался с помощью рН-метра Mettler-Toledo Five plus с точностью 0,01 единиц. Образцы отделялись от раствора, промокались фильтровальной бумагой и небольшое количество помещалось в ампулы для регистрации ЭПР-спектров на ЭПР-спектрометре Bruker Elexsys CW E-500 в трехсантиметровом диапазоне длин волн при комнатной температуре. Использовались запаянные с одной стороны кварцевые тонкостенные ампулы, которые помещались в резонатор ЭПР-спектрометра. Для съемки спектров были подобраны оптимальные условия СВЧ мощности и амплитуды модуляции магнитного поля.

Определение ксиланазной активности проводилось согласно ГОСТ 3148-2012 «Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности ксиланазы» [16] с некоторыми допустимыми модификациями. ферментативной активности ксиланазы. Метод, использованный нами, основан на определении редуцирующих сахаров, полученных при ферментативном гидролизе ксилана раствором гидролитического фермента, который при реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой дает окрашенное комплексное соединение. Полученные продукты определяются фотометрически при длине волны 540 нм. Количество образовавшихся редуцирующих сахаров определяют по градуировочному графику, построенному для ксилозы-целевого продукта реакции. Единицей ферментативной активности фермента (1 ед. КсА) является такое количество фермента, которое при дейст-

вии на субстрат за 1 минуту в стандартных условиях образует 1 мкмоль редуцирующих сахаров (в пересчете на ксилозу).

Для приготовления раствора субстрата ксилана с массовой долей 1 % бралась навеска ксилана 0,125 г, которая вносилась в колбу объемом 25 мл, далее добавлялись 6,25 мл фосфатного буфера (рН = 7,0) вместо ацетатного буфера (рН = 4,7). Подобный выбор был обусловлен подбором оптимальных условий для использования фермента ксиланазы. Содержимое перемешивалось на водяной бане 10 минут с температурой 60–70 °С. Далее колба охлаждалась и добавлялся буферный раствор до 12,5 г (по массе). Приготовление субстрата проводилось в день проведения эксперимента.

Для приготовления рабочего раствора ксиланазы навеска фермента массой 0,002 г помещалась в стеклянный бюкс вместимостью 10 мл. Затем добавлялись 5 мл воды, и содержимое перемешивалось на магнитной мешалке в течение 15 мин. После добавлялись 5 мл дистиллированной воды. Полученный раствор центрифугировался при частоте оборотов 6000 мин⁻¹ в течение 25 мин. Оптическая плотность полученного раствора измерялась на фотоколориметре при 540 нм относительно дистиллированной воды. Раствор готовится в день проведения эксперимента.

Определение активности ксиланазы проводилось следующим способом. В три стеклянные пробирки: две опытные и контрольную добавлялся 1 мл раствора субстрата ксилана, далее пробирки закрывались пробками и помещались в водяную баню с температурой (50 ± 1) °С на 5 мин. В опытные пробирки добавлялось по 1 мл раствора фермента, подогретого при температуре 50 °С. Содержимое пробирок перемешивалось.

Все пробирки помещались в водяную баню с температурой (50 ± 1) °С на 10 мин. В контрольную пробирку добавлялся 1 мл раствора ксиланазы. Во все пробирки добавлялись 3 мл реактива ДНС, и содержимое перемешивалось.

Параллельно готовилась контрольная проба на реактивы: в чистую пробирку добавляют 1 мл ацетатного буфера, 1 мл дистиллированной воды и 3 мл реактива ДНС. Все пробирки (опытные, контрольную, пробу на реактивы) кипятятся на водяной бане в течение 5 мин. Далее пробирки охлаждались под струей воды до комнатной температуры.

После этого проводилось измерение оптических плотностей окрасившихся растворов на фотоэлектроколориметре КФК-3-01 при 540 нм, в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм, против приготовленной контрольной пробы на реактивы.

Каталитическая активность фермента ксиланазы КсА, У/мг определялась по формуле:

$$KcA = \frac{(C_0 - C_k)}{t \times c}, \quad (2)$$

где C_0 – молярная концентрация ксиланазы в анализируемой пробе в соответствии с градуировочным графиком, мкмоль/мл; C_k – молярная концентрация ксиланазы в контрольной пробе в соответствии с градуировочным графиком, мкмоль/мл; t – продолжительность гидролиза, мин; c – массовая концентрация ферментного препарата в 1 мл рабочего раствора анализируемого образца, г/мл, рассчитывалась по формуле:

$$c = \frac{m}{VP}, \quad (3)$$

где m – масса навески ферментного препарата, г; V – объем разведения навески при приготовлении основного раствора, мл; P – разведение основного ферментного препарата для приготовления рабочего раствора.

Иммобилизация ксиланазы на $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ проводилась следующим методом: фермент ксиланазы иммобилизовалась на $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ как методом физической адсорбции, так и ковалентным связыванием при помощи сшивающего агента – глутарового альдегида [19–22].

В два стеклянных бюкса вместимостью 10 мл помещались две навески массой 0,2 г $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. В первый бюкс добавлялись 2 мл 4 % глутарового альдегида. После этого смесь перемешивалась и выдерживалась в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем микропипеткой отбиралась надосадочная жидкость над $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. Образец трижды промывался 2 мл дистиллированной воды с целью отделения непрореагировавшего глутарового альдегида, при этом надосадочная жидкость каждый раз отбиралась в отдельный бюкс. В оба бюкса с $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ добавлялись 2 мл раствора фермента ксиланазы и содержимое выдерживалось при комнатной температуре в течение 1,5 часов. По истечении времени микропипеткой отбиралась надосадочная жидкость. Полученный после ковалентной иммобилизации $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ три раза промывался 2 мл дистиллированной воды. Отобранные надосадоч-

ные жидкости центрифугировались при 6000 мин⁻¹ в течение 10 мин. Оптическая плотность (D) определялась с помощью фотоэлектроколориметра при длине волны 540 нм против дистиллированной воды.

Выход иммобилизации определялся по формуле:

$$Y = \frac{(KcA_{\text{порошка}})}{(KcA_{\text{в растворе}})} \times 100\%. \quad (4)$$

Эффективность иммобилизации определялась по формуле:

$$E = \frac{(KcA_{\text{в порошке}})}{(KcA_{\text{в растворе}} - KcA_{\text{в надосадочной жидкости}})} \times 100\%. \quad (5)$$

Гидролитическое разложение ксилана гетерогенными системами с иммобилизованной ксиланазой проводилось по ниже разработанному методу.

В бюксы с иммобилизованной ксиланазой (с применением глутарового альдегида и без) вносились по 1 мл субстрата ксилана, предварительно подогретого до 50 °С. Бюксы ставились в термостат при 50 °С на 10 мин. Затем из каждого бюкса микропипеткой отбирался 1 мл надосадочной жидкости и помещался в пробирку. Далее в пробирку добавлялись 1 мл дистиллированной воды, 3 мл ДНС реактива и содержимое ставилось в кипящую водяную баню на 5 минут, засекая время с точностью до секунды.

Параллельно подготавливалась проба на реактивы: в чистую пробирку вносились 1 мл фосфатного буфера, 1 мл дистиллированной воды, 3 мл ДНС реактива. Полученная смесь также помещалась в кипящую водяную баню на 5 мин. По истечении времени пробирки охлаждались под проточной водой до комнатной температуры. Оптические плотности растворов (D) определялись при длине волны 540 нм в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего светового слоя 10 мм против контрольной пробы на реактивы с помощью фотоколориметра КФК-3-01.

Для того, чтобы оценить собственную каталитическую активность порошкового γ -оксида алюминия, была проведена гидролитическая реакция разложения ксилана по методике, описанной выше, без применения раствора фермента. В два бюкса помещались 0,2 г γ -оксида алюминия. В один из них добавлялся 2 мл глутарового альдегида и выдерживался в течение 1 часа. Затем образец промывался 3 раза 2 мл воды от остатков не прореагировавшего глутарового альдегида. Далее

проводилась реакция гидролиза ксилана и определялись оптические плотности растворов с помощью фотоколориметра КФК-3-01 при 540 нм.

Для оценки стабильности ксиланазы, иммобилизованной на $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ для ее многократного применения, проведено 4 цикла реакций гидролитического разложения ксилана, где повторно использовалась гетерогенная каталитическая система – порошок $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ с иммобилизованной ксиланазой.

Реакции проводились для ксиланазы, иммобилизованной как физической адсорбцией, так и ковалентным связыванием. Реакции проводились по методике, описанной ранее. После каждого цикла образец промывался 3 мл дистиллированной воды с целью вымывания остатков редуцированных сахаров предыдущего цикла.

Относительная активность ксиланазы рассчитывалась по формуле:

$$\alpha = \frac{K_{сА_n}}{K_{сА_1}} \cdot 100 \%, \quad (6)$$

где $K_{сА_n}$ – каталитическая активность фермента в n-м цикле; $K_{сА_1}$ – каталитическая активность фермента в 1 цикле.

Результаты и их обсуждение

Для того, чтобы оценить эффективность как физической адсорбции специфического

фермента ксиланазы на поверхность $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, так и ковалентного его присоединения к оксидной поверхности, было проведено исследование электроповерхностных свойств, а именно заряда поверхности, этого оксида методом ЭПР рН-чувствительных нитроксильных радикалов (НР) [23].

В основе метода лежит определение рН-чувствительных параметров из спектров ЭПР НР в растворе и вблизи поверхности оксида при разных рН внешнего раствора НР, контактирующего с навеской оксида, построение зависимостей рН-чувствительного параметра спектров ЭПР НР (кривых ЭПР титрования) от рН внешнего раствора, и определение сдвигов кривой титрования вблизи поверхности относительно таковой для свободного водного раствора НР.

В случае ЭПР спектра НР вблизи поверхности $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, приведенного на рис. 1, рН-чувствительным параметром был выбран параметр a , характеризующий константу сверхтонкого расщепления a_N , определяемый как расстояние между первой и второй компонентами триплета тонких линий.

Нами установлено ранее в [24], что сдвиг кривой НР в порах γ -оксида алюминия влево (рис. 2) указывает на концентрирование вбли-

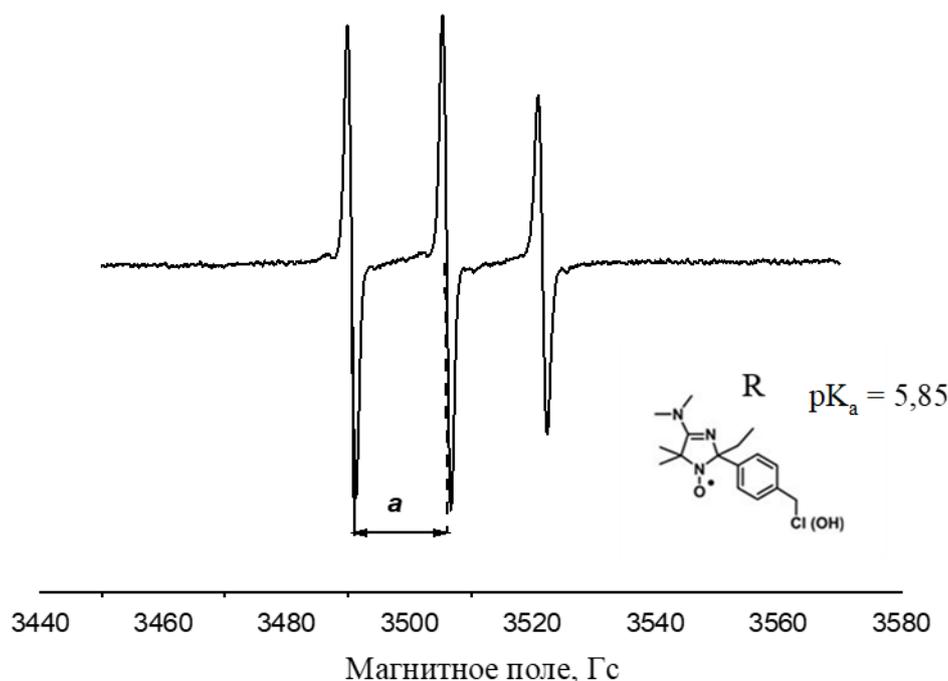


Рис. 1. Типичный спектр НР вблизи поверхности $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, где R – НР, использованный в качестве зонда, a – рН-чувствительный параметр спектров ЭПР, pK_a – антилогарифм константы ионизации НР

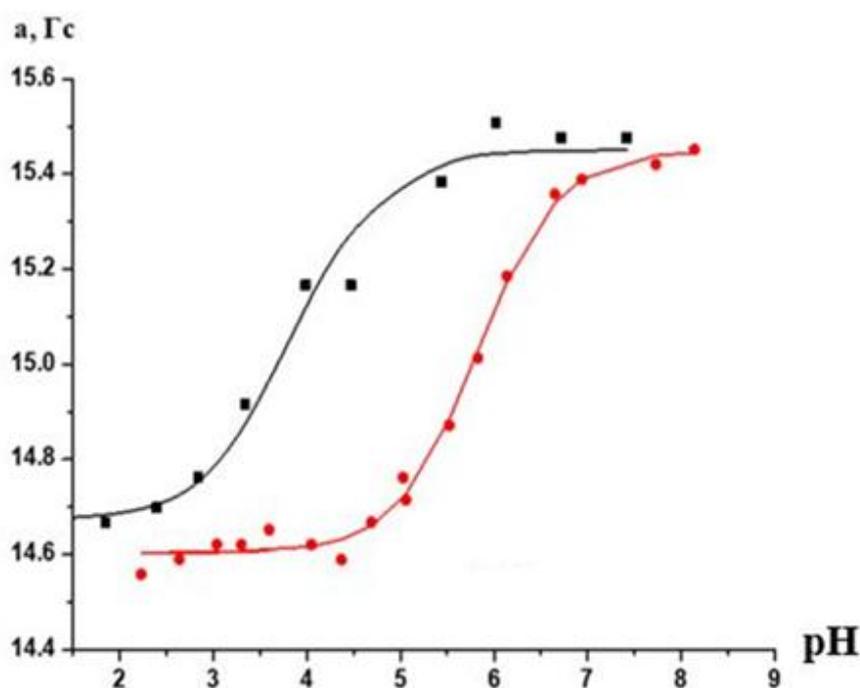


Рис. 2. Кривые титрования НР в во внешнем водном растворе с ионной силой $I = 0,1$ (●) и вблизи поверхности $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (■)

зи поверхности и связывание самой поверхностью ионов H^+ из раствора. Это делает pH локальное (pH^{loc}) выше pH внешнего раствора (pH) и, одновременно, обеспечивает положительный заряд поверхности $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ по крайней мере в диапазоне pH, в котором чувствителен НР.

Как видно из сдвига кривой титрования (см. рис. 2), поверхность оксида обладает положительным зарядом, что говорит о наличии на поверхности центров Льюиса, они обеспечивают возможность ковалентного пришивания фермента при использовании глутарового альдегида, как сшивающего агента.

Выше в разделе «Объекты и методы исследования» нами был изложен метод определения активности гидролитического фермента ксиланазы.

Концентрация получившейся в ходе реакции ксилозы определялась по градуировочному графику зависимости оптической плотности (D) раствора, от концентрации ксилозы. Из формул (2) и (3) была определена активность используемой нами неиммобилизованной ксиланазы, которая составила 3,16 U/мг, что указывает на высокую активность фермента в разложении ксилана.

Как отмечено выше, ксиланаза была иммобилизована на порошках $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ как посредством физической адсорбции, так и путем ковалентного связывания посредством глутарового альдегида.

Глутаровый альдегид, который использовался в качестве сшивающего агента, являясь по химической природе жестким основанием Льюиса за счет наличия полярной связи $\text{C}=\text{O}$, с одной стороны, образует ковалентную связь с кислотными льюисовскими центрами на поверхности оксида алюминия, а с другой – реагирует со свободными аминогруппами белков, таким образом сшивая молекулы.

Формулы (2) и (3) были также использованы для определения суммарной каталитической активности гетерогенных каталитических систем, состоящей из активности иммобилизованного фермента с использованием сшивающего агента и физической адсорбцией, и активности носителя, которые были равны 12,23 U/мг и 6,68 U/мг, соответственно. Таким образом, ковалентная иммобилизация фермента на поверхности $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ приводила к каталитической активности гетерогенной системы в 1,83 раза большей, чем в случае адсорбционной иммобилизации ксиланазы.

Большая активность гетерогенной системы с ковалентно иммобилизованной ксиланазой обусловлена большими выходом ($Y\% = 60$) и эффективностью иммобилизации ($E\% = 90,1$) по сравнению со случаем физической адсорбции ($Y\% = 55,5$ и $E\% = 86,2$, соответственно), хотя эффективность иммобилизации фермента в обоих случаях иммобилизации была довольно высокой, позволяя сделать вывод, что все иммобилизованные молекулы фермента проявляли каталитическую активность.

В ходе экспериментов было установлено, что каталитическая суммарная активность гетерогенной каталитической системы выше, чем при гомогенной реакции. Процесс можно проводить непрерывно, в проточных колонках, регулируя скорость реакции. При многократном использовании гетерогенной каталитической системы значительно снижается себестоимость продукта, реакцию можно остановить в любой момент и получать продукты, не загрязненные ферментом.

С целью подтвердить возможность многократного использования наших гетерогенных каталитических систем была исследована операционная стабильность иммобилизованного фермента в четырех последовательных циклах каталитической реакции гидролиза ксилана (рис. 3).

Данное количество циклов является оп-

тимальным и обеспечивает достоверность полученных данных, при этом уменьшается расход реактивов. Из рис. 3 видно, что ковалентно иммобилизованная ксиланаза проявляет большую операционную стабильность при многократном использовании, чем в случае физической адсорбции фермента на поверхность носителя.

Было установлено, что ферментативная активность ковалентно иммобилизованной ксиланазы при первых двух циклах достаточно высока, на третьем цикле она снижается до 37,5 % и выходит на плато. При иммобилизации фермента физической адсорбцией активность продолжает снижаться до 23 % в 4-м цикле.

Разложение ксилана гетерогенными каталитическими системами на основе оксида алюминия и иммобилизованного на нем различными способами фермента ксиланазы, и проведение сравнительного анализа полученных данных позволяет сделать вывод о перспективности дальнейшего использования полученных систем.

Дальнейшее изучение каталитической активности фермента иммобилизованной ксиланазы в реакции гидролитического разложения ксилана и подбор оптимальных условий для иммобилизации позволит увеличить число циклов использования ксиланазы для увеличения выхода восстанавливающих сахаров,

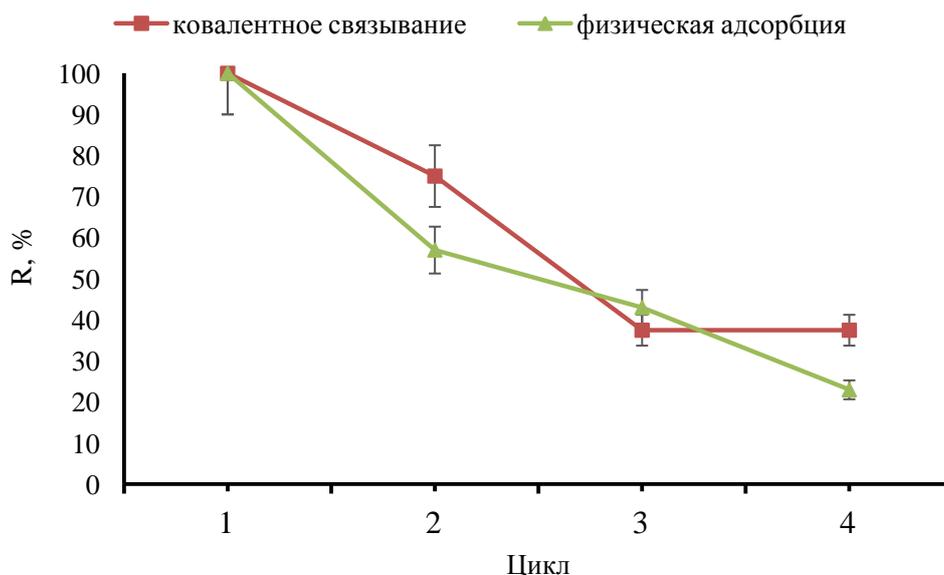


Рис. 3. Операционная стабильность ксиланазы, иммобилизованной на порошковом $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. R – относительная активность ксиланазы в %, вычисленная по формуле (6)

в т. ч. целевого продукта ксилозы. Имобилизованная ксиланаза имеет потенциал для применения в кормовой промышленности, поскольку эффективна в высвобождении восстанавливающих сахаров, и может быть использована в птицеводстве.

Статья подготовлена при финансовой поддержке гранта РФФИ по научному проекту № 18-29-12129 МК.

Литература

1. Bajpai P. *Xylanolytic Enzymes* / P. Bajpai. – Academic press, 2014. – 121 p.
2. Laine C. [et al.] *Extraction of xylan from wood pulp and brewer's spent grain* // *Industrial Crops and Products*. – 2015. (70). – P. 231–237.
3. Sousa S. [et al.] *Surface properties of xylan and xylan derivatives measured by inverse gas chromatography* // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2016. – (506). – P. 600–606.
4. Ramawat K. G., Mérillon J. M. *Polysaccharides: Bioactivity and biotechnology* / K. G. Ramawat, J. M. Mérillon, 2015. 1–2241 p.
5. Li H. [et al.] *The hydrolytic efficiency and synergistic action of recombinant xylan-degrading enzymes on xylan isolated from sugarcane bagasse* // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. – (175). – P. 199–206.
6. Soleimani M., Tabil L. G., Panigrahi S. *A kinetic study of xylose recovery from a hemicellulose-rich biomass for xylitol fermentative production* // *Chemical Engineering Communications*. – 2019. – № 2 (206). – P. 193–206.
7. Болотова К. С. *Применение ферментных технологий для повышения экологической безопасности целлюлозно-бумажного производства* / К.С. Болотова, Е. В. Новожилов // *Химия растительного сырья*. – 2015. – № 3. – С. 5–23.
8. Саловарова В.П. *Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов: учеб. пособие* / Ю.П. Козлов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Издательский дом «Энергия», 2006. – 544 с.
9. Carvalho E.A. [et al.] *Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: Application in bread making and manufacturing xylooligosaccharides* // *Food Chemistry*. – 2017. – (221). – P. 1499–1506.
10. Thomas L. [et al.] *Industrial Enzymes: Xylanases* // *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*. – 2016. – P. 127–148.
11. Krajewska B. *Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review* // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2004. – № 2–3 (35). – P. 126–139.
12. Arya S.K., Srivastava S.K. *Kinetics of immobilized cyclodextrin gluconotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244* // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – № 3 (39). – P. 507–510.
13. Nagar S. [et al.] *Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed* // *Process Biochemistry*. – 2012. – № 9 (47). – P. 1402–1410.
14. Тихонов В. Н. *Аналитическая химия алюминия*. – М: Наука, 1971. – 266 с.
15. Пантелеев И.Б. *Получение и свойства алюмооксидного прекурсора* / И.Б. Пантелеев, А.А. Циренников, Н.А. Андреева // *Известия СПбГТИ(ТУ)*. – 2017. – № 40. – С. 8–12.
16. ГОСТ 31488-2012 *Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности ксиланазы*. – М: Стандартинформ, 2012. – С. 2–10.
17. Kovaleva E.G. [et al.] *Interfacial Electrostatic Properties of Hydrated Mesoporous and Nanostructured Alumina Powders by Spin Labeling EPR* // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – № 2 (75). – P. 159–170.
18. Akrapulu K. C., Vordonis L., Lycourghiotis A. *Effect of temperature on the point of zero charge and surface dissociation constants of aqueous suspensions of γ -Al₂O₃* // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*. – 1986. – № 12 (82). – P. 3697–3708.
19. Fadouloglou V.E., Kokkinidis M., Glykos N.M. *Determination of protein oligomerization state: Two approaches based on glutaraldehyde crosslinking* // *Analytical Biochemistry*. – 2008. – № 2 (373). – P. 404–406.
20. Xiao H.Y. [et al.] *Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nanocomposite by glutaraldehyde crosslinking method* // *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*. – 2006. – (16). – P. 414–418.
21. López-Gallego F. [et al.] *Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports* // *Journal of Biotechnology*. – 2005. – № 1 (119). – P. 70–75.

22. Lee H. R. [et al.] Preparation of glutaraldehyde-treated lipase-inorganic hybrid nanoflowers and their catalytic performance as immobilized enzymes // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2017. – (105). – P. 24–29.

23. Khramtsov V.V. and Volodarsky L.B. *Biological Magnetic Resonance*. – New York:

Kluwer Academic Publishers, 2002. – P. 109–180.

24. Молочников Л.С. Метод спинового зонда в исследовании кислотности неорганических материалов / Л.С. Молочников, Е.Г. Ковалева, Е.Л. Головкина и др. // *Коллоидный журнал*. – 2007. – № 6. – С. 821–828.

Тамбасова Дарья Павловна, инженер-исследователь лаборатории органического синтеза инновационного центра химико-фармацевтических технологий, Химико-технологический институт, Уральский федеральный университет (г. Екатеринбург), d.p.tambasova@urfu.ru

Любякина Полина Николаевна, аспирант кафедры «Технологии органического синтеза», Химико-технологический институт, Уральский федеральный университет (г. Екатеринбург), lubiakina.polina@urfu.ru

Антонов Денис Олегович, аспирант кафедры «Технологии органического синтеза», Химико-технологический институт, Уральский федеральный университет (г. Екатеринбург), d.o.antonov@urfu.ru

Ковалева Елена Германовна, кандидат химических наук, профессор кафедры Технологии органического синтеза, Химико-технологический институт, Уральский федеральный университет (г. Екатеринбург), e.g.kovaleva@urfu.ru

Поступила в редакцию 11 ноября 2020 г.

DOI: 10.14529/food210107

HETEROGENEOUS CATALYSTS BASED ON GAMMA ALUMINUM OXIDE WITH IMMOBILIZED XYLANASE FOR HYDROLYTIC DECOMPOSITION OF XYLANE

D.P. Tambasova, P.N. Lyubyakina, D.O. Antonov, E.G. Kovaleva

Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

In this work, heterogeneous catalysts based on powdered γ -alumina with an immobilized xylanase enzyme were obtained and a study of their catalytic activity and the possibility of their repeated use was carried out. The aim of this research work was to create an effective heterogeneous catalytic system based on γ -alumina with an immobilized enzyme for the decomposition of the natural polysaccharide xylan with the maximum yield of the target product. In the course of the work, xylanase was immobilized on γ -Al₂O₃ by two methods, namely, physical adsorption and covalent binding using glutaraldehyde as a cross-linking agent. The reactions of enzymatic hydrolysis of xylan, the study of the catalytic activity and operational stability of the immobilized enzyme in 4 cycles were carried out on the obtained systems. An alumina sample was synthesized by the sol-gel method with a temperature of calcination of 550 °C for 4 hours, which corresponds to the γ -phase of alumina. The surface charge of the obtained sample was characterized by EPR of pH-sensitive nitroxide radicals. According to the shifts of the EPR titration curves, the surface of γ -Al₂O₃ was found to have a positive charge which implies the presence of Lewis centers on its surface. The catalytic activity of xylanase immobilized on the γ -Al₂O₃ surface by the method of covalent attachment through glutaraldehyde is 1.83 times higher than in case of immobilization by physical adsorption and is equal to 12.23 U / mg. The enzymatic activity of covalently immobilized xylanase in the first two cycles was found to be quite high, in the third cycle it decreases to 37.5 % and reaches a plateau. When the enzyme is immobilized by physical adsorption, the activity continues to decrease to 23 % in the 4th cycle. The decomposition of xylan by heterogeneous

catalytic systems based on γ -Al₂O₃ and the xylanase enzyme immobilized on it by various methods, and a comparative analysis of the data obtained, allows us to conclude that further use of the obtained systems is promising, for example, in poultry farming due to the effectiveness of the use of immobilized xylanase in the release of reducing sugars.

Keywords: heterogeneous catalysis, polysaccharides, hydrolysis, xylan, immobilized enzymes, xylanase, aluminum oxide, nitroxyl radicals, electron paramagnetic resonance.

References

1. Bajpai P. *Xylanolytic Enzymes*. Academic press, 2014. 121 p.
2. Laine C. [et al.] Extraction of xylan from wood pulp and brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 2015, (70), pp. 231–237. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.03.009
3. Sousa S. [et al.] Surface properties of xylan and xylan derivatives measured by inverse gas chromatography. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016, (506), pp. 600–606. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.07.006
4. Ramawat K.G., Mérillon J.M. *Polysaccharides: Bioactivity and biotechnology*. 2015. 1–2241 p.
5. Li H. [et al.] The hydrolytic efficiency and synergistic action of recombinant xylan-degrading enzymes on xylan isolated from sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*, 2017, (175), pp. 199–206. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.07.075
6. Soleimani M., Tabil L. G., Panigrahi S. A kinetic study of xylose recovery from a hemicellulose-rich biomass for xylitol fermentative production. *Chemical Engineering Communications*, 2019, no. 2 (206), pp. 193–206. DOI: 10.1080/00986445.2018.1478294
7. Bolotova K.S., Novozhilov E.V. [Application of enzyme technologies to improve the ecological safety of pulp and paper production]. *Himija rastitel'nogo syr'ja* [Chemistry of plant raw materials], 2015, no. 3, pp. 5–23. (in Russ.)
8. Salovarova V.P. *Jekologo-biotehnologicheskie osnovy konversii rastitel'nyh substratov* [Ecological and biotechnological foundations of the conversion of plant]. 2nd ed., rev. and add. Moscow, 2006. 544 p.
9. Carvalho E.A. [et al.] Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: Application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides. *Food Chemistry*, 2017, (221), pp. 1499–1506. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.144
10. Thomas L. [et al.] Industrial Enzymes: Xylanases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*, 2016, pp. 127–148.
11. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, no. 2–3 (35), pp. 126–139. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013
12. Arya S.K., Srivastava S.K. Kinetics of immobilized cyclodextrin gluconotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, no. 3 (39), pp. 507–510. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.12.019
13. Nagar S. [et al.] Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. *Process Biochemistry*, 2012, no. 9 (47), pp. 1402–1410. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.05.013
14. Tikhonov V.N. *Analiticheskaja himija aljuminija* [Analytical chemistry of aluminum]. Moscow, 1971. 266 p.
15. Pantelev I.B., Tsirelnikov A.A., Andreeva N.A. [Preparation and properties of alumina precursor]. *Izvestija SPbGTI(TU)* [Proceedings of the SPbGTI(TU)], 2017, no. 40, pp. 8–12. (in Russ.)
16. *GOST 31488-2012 Preparaty fermentnye. Metody opredelenija fermentativnoj aktivnosti ksilanazy* [GOST 31488-2012 Enzyme preparations. Methods for determining the enzymatic activity of xylanase]. Moscow, 2012, pp. 2–10.
17. Kovaleva E.G. [et al.] Interfacial Electrostatic Properties of Hydrated Mesoporous and Nanostructured Alumina Powders by Spin Labeling EPR. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2017, no. 2 (75), pp. 159–170.

18. Akrapotulu K.C., Vordonis L., Lycourghiotis A. Effect of temperature on the point of zero charge and surface dissociation constants of aqueous suspensions of γ -Al₂O₃. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 1986, no. 12 (82), pp. 3697–3708. DOI: 10.1039/f19868203697
19. Fadoulglou V.E., Kokkinidis M., Glykos N.M. Determination of protein oligomerization state: Two approaches based on glutaraldehyde crosslinking. *Analytical Biochemistry*, 2008, no. 2 (373), pp. 404–406. DOI: 10.1016/j.ab.2007.10.027
20. Xiao H.Y. [et al.] Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*, 2006, (16), pp. 414–418. DOI: 10.1016/s1003-6326(06)60223-9
21. López-Gallego F. [et al.] Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology*, 2005, no. 1 (119), pp. 70–75. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.05.021
22. Lee H.R. [et al.] Preparation of glutaraldehyde-treated lipase-inorganic hybrid nanoflowers and their catalytic performance as immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, (105), pp. 24–29. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2017.06.006
23. Khrantsov V.V. and Volodarsky L.B. *Biological Magnetic Resonance*. New York, Kluwer Academic Publishers, 2002, pp. 109–180.
24. Molochnikov L.S., Kovaleva E.G., Golovkina E.L. et al. [The spin probe method in the study of the acidity of inorganic materials]. *Colloid journal*, 2007, 6, pp. 821–828. (in Russ.)

Daria P. Tambasova, Research Engineer of the Laboratory of Organic Synthesis of the Innovation Center for Chemical and Pharmaceutical Technologies, Institute of Chemical Engineering, Ural Federal University, Yekaterinburg, d.p.tambasova@urfu.ru

Polina N. Lyubyakina, Post-graduate student of the Department of Organic Synthesis Technologies, Institute of Chemical Engineering, Ural Federal, Yekaterinburg, lubiakina.polina@urfu.ru

Denis O. Antonov, Post-graduate student of the Department of Organic Synthesis Technologies, Institute of Chemical Engineering, Ural Federal, Yekaterinburg, d.o.antonov@urfu.ru

Elena G. Kovaleva, Candidate of Chemical Sciences, Professor of the Department of Organic Synthesis Technologies, Institute of Chemical Engineering, Ural Federal University, Yekaterinburg, e.g.kovaleva@urfu.ru

Received November 11, 2020

ОБРАЗЕЦ ЦИТИРОВАНИЯ

Гетерогенные катализаторы на основе гамма оксида алюминия с иммобилизованной ксиланазой для гидролитического разложения ксилана / Д.П. Тамбасова, П.Н. Любякина, Д.О. Антонов, Е.Г. Ковалева / Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 57–67. DOI: 10.14529/food210107

FOR CITATION

Tambasova D.P., Lyubyakina P.N., Antonov D.O., Kovaleva E.G. Heterogeneous Catalysts Based on Gamma Aluminum Oxide with Immobilized Xylanase for Hydrolytic Decomposition of Xylane. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology*, 2021, vol. 9, no. 1, pp. 57–67. (in Russ.) DOI: 10.14529/food210107