

УДК 663.031.2/.4

DOI: 10.46548/21vek-2021-1055-0023

**ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ С РАЗЛИЧНОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ
НА ГИДРОЛИЗ ЛУЗГИ СЕМЯН ПОДСОЛНЕЧНИКА**

© 2021

Фоменко Иван Андреевич, аспирант*Московский государственный университет пищевых производств
(125080, Россия, Москва, Волоколамское ш., д. 11, e-mail: iv.fomenko@mail.ru)*

Аннотация. В статье представлено исследование влияния ферментных препаратов с различной субстратной специфичностью на гидролиз лузги семян подсолнечника. Лузга подсолнечника является трудноутилизируемым отходом масличных производств ввиду ее химического состава и непригодности для сельскохозяйственных животных. По различным оценкам в России в год образуется около 200 тыс. т в год этого отхода. Перспективным решением в вопросе ее утилизации может быть микробная биоконверсия, осуществимая при участии дрожжей. Кормовой белок является очень востребованным продуктом для сельского хозяйства. Дрожжи способны эффективно утилизировать сбраживаемые сахара, накапливая при этом до 60% сырого протеина и витаминов, однако дрожжевые культуры обладают слабой способностью к синтезу целлюлолитических ферментов и не способны самостоятельно гидролизовать полимеры лузги подсолнечника. Гидролиз с использованием коммерческих ферментных препаратов с различной субстратной специфичностью является исходной стадией получения полноценного кормового белка. В работе представлены результаты гидролиза измельченной подсолнечной лузги с применением ферментных препаратов компании Novozymes (*Celluclast 1,5 L FG* (целлюлаза), *Shearzyme Plus 2X PDS* (целлюлаза и ксиланаза), *Viscoferm HT FG* (целлюлаза), *Viscozyme Wheat HT* (ксиланаза), *Ultraflo XL* (целлюлаза)). Для каждого ферментного препарата проведено исследование количества образующихся редуцирующих веществ в процессе 24-часового гидролиза при оптимальных условиях и различных дозировках. В работе доказана целесообразность использования комплексного ферментного препарата *Shearzyme Plus 2X PDS*, обладающего целлюлазной и ксиланазной активностями (670 Ед.ЦЛС/г, 4800 Ед.КС/г). При 24-часовом гидролизе 10% суспензии измельченной лузги подсолнечника при температуре 50°C, pH 5,0 и дозировке 120 Ед.ЦЛС/г субстрата, образуется 2,8% восстанавливающих сахаров. Полученный гидролизат может быть использован для культивирования кормовых дрожжей.

Ключевые слова: лузга подсолнечника, гидролиз, ферменты, субстратная специфичность, целлюлаза, ксиланаза, биоконверсия.

**INFLUENCE OF ENZYME PREPARATIONS WITH DIFFERENT SUBSTRATE SPECIFICITY ON
HYDROLYSIS OF SUNFLOWER HUSK**

© 2021

Fomenko Ivan Andreevich, graduate student*Moscow State University of Food Production
(125080, Russia, Moscow, Volokolamskoe highway, 11, e-mail: iv.fomenko@mail.ru)*

Abstract. The article presents a study of the effect of enzyme preparations with different substrate specificity on the hydrolysis of sunflower seed husks. Sunflower husk is a hard-to-use waste from oilseeds; according to various estimates, about 200 thousand tons of this waste are generated in Russia per year. A promising solution to the issue of its utilization can be microbial bioconversion, which is carried out with the participation of yeast. Fodder protein is a highly demanded product for agriculture. Yeast is able to efficiently utilize fermentable sugars, while accumulating up to 60% of crude protein and vitamins; however, yeast cultures have a weak ability to synthesize cellulolytic enzymes and are not able to independently hydrolyze polymers of sunflower husk. Hydrolysis using commercial enzyme preparations with different substrate specificities is the initial stage of obtaining a complete feed protein. The paper presents the results of hydrolysis of crushed sunflower husk using enzyme preparations from Novozymes (*Celluclast 1.5 L FG* (cellulase), *Shearzyme Plus 2X PDS* (cellulase and xylanase), *Viscoferm HT FG* (cellulase), *Viscozyme Ultraat HT* (xylanase), *XL* (cellulase)). For each enzyme preparation, a study of the amount of forming reducing substances in the course of 24-hour hydrolysis was carried out under optimal conditions and various dosages. The work proved the feasibility of using the complex enzyme preparation *Shearzyme Plus 2X PDS*, which has cellulase and xylanase activities (670 U. CLS / g, 4800 U.C./g). With a 24-hour hydrolysis of a 10% suspension of crushed sunflower husk at a temperature of 50 ° C, pH 5.0 and a dosage of 120 U CLS / g of substrate, 2.8% of reducing sugars are formed. The resulting hydrolyzate can be used for the cultivation of feed yeast.

Keywords: sunflower husk, hydrolysis, enzymes, substrate specificity, cellulase, xylanase, bioconversion.

Введение. Одной из проблем российских масло-прессовых заводов, является необходимость утилизации лузги семян подсолнечника. В зависимости от сорта масличной культуры лузжистость семени может

достигать 23% от массы неочищенного семени [9]. Одно предприятие ежедневно перерабатывает около 150 т семян подсолнечника, при этом образуется порядка 30 т лузги. Утилизация такого количества отхо-

да требует больших материальных затрат со стороны предприятия, что как следствие неблагоприятно сказывается на стоимости подсолнечного масла [5].

На сегодняшний день предложено несколько способов использования лузги подсолнечника, однако их эффективность достаточно мала. Лузгу в измельченном виде предложено использовать в качестве кормовой добавки в животноводстве [3]. Она содержит пентозаны, однако перевариваемость лузги достаточно низка, составляет порядка 20–30%, поэтому заменить ей большую долю ежедневного рациона животного не получится [8].

Применение подсолнечной лузги в качестве удобрения возможно только после ее предварительного компостирования, использование этого целлюлозного отхода может нанести вред, когда почва бедна азотистыми соединениями. Мульча из лузги в зимнее время привлекает грызунов, которые наносят вред корневым системам растений и уничтожают посевы.

Лузга подсолнечника богата целлюлозой, лигнином и гемицеллюлозой, они составляют 79–90 % от ее состава. Остальные 10% АСВ представлены липидами, восками, протеином и минералами [1]. По другим - подсолнечная лузга содержит 32,3% целлюлозы, от 24,8% до 29,6% лигнина, 26,8% гемицеллюлозы, 1,3% жирных масел, 1,8% азота, 4,6% минеральных элементов и около 1,4% устойчивого пигмента фитомеланина [6, 7]. Благодаря своему составу подсолнечную лузгу уже используют как сырье для получения кормовых дрожжей, для получения фурфурола [2, 16], брикетируется для сжигания [8].

Оптимальным способом утилизации подсолнечной лузги является получение биогаза и пеллетирование. Однако таким способом возможно переработать только 30% образующегося отхода [9]. Предприятия по выработке биогаза или изготовлению пеллет должны располагаться в непосредственной близости от масляного производства, так как транспортировать лузгу очень дорого из-за ее низкой насыпной плотности (120 кг/м³) [17, 19].

Перспективным методом утилизации подсолнечной лузги может быть ее биоконверсия в высокобелковые дрожжевые препараты кормового назначения. Мицелиальные грибы способны утилизировать негидролизованную целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин, содержащиеся в лузге. Грибная биоконверсия имеет ряд недостатков: низкое накопление белка, низкая скорость удвоения биомассы. Эти недостатки нивелируются при дрожжевой биоконверсии, однако дрожжи не способны эффективно утилизировать полимеры лузги. Дрожжи способны утилизировать простые сахара, образующиеся в процессе гидролиза.

Гидролиз целлюлозосодержащего сырья осуществляется в присутствии ферментов с различной субстратной специфичностью. Лузга подсолнечника содержит в себе большое количество целлюлозы и гемицеллюлозы, поэтому целесообразно использовать ферментные препараты преобладающей целлюлазной и ксиланазной активностью [13, 14, 20].

Первой стадией начала действия фермента является стадия их адсорбции на поверхности нерастворимого субстрата. Скорость адсорбции ферментов выше скорости гидролиза, и перенос ферментов к поверхности субстрата нельзя назвать лимитирующим фактором процесса расщепления нерастворимого субстрата [15, 18]. Скорость гидролиза будет напрямую зависеть от площади поверхности частиц измельченной лузги. Эффективность гидролиза полисахаридного субстрата зависит от двух факторов: качественного и количественного [21]. К первому относятся сбалансированность состава ферментного комплекса, ко второму – уровень активности компонентов [10-12].

Целью настоящей работы являлся подбор ферментного препарата для эффективного гидролиза лузги семян подсолнечника.

Материалы и методы исследования. В качестве исходного сырья использовали лузгу подсолнечника, образующуюся на масляном производстве ООО «Бунге СНГ».

В качестве ферментных препаратов использовали коммерческие препараты Novozymes, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика коммерческих ферментных препаратов, использованных в работе

Наименование препарата	Ферментативная активность		Температурный диапазон	Диапазон pH
	ЦлС (Ед/г) по ГОСТ Р 55293-2012	КС (Ед/г) по ГОСТ Р 55302-2021		
Celluclast 1,5 L FG	780	–	50 – 60 °C	4,5 – 6,0
Shearzyme Plus 2X PDS	670	4800	40 – 65 °C	4,5 – 6,0
Viscoferm HT FG	550	–	40 – 70 °C	4,0 – 6,0
Viscozyme Wheat HT	–	9250	50 – 60 °C	4,5 – 6,0
Ultraflo XL	620	–	40 – 70 °C	4,0 – 6,0

С целью повышения площади гидролизуемой поверхности, подсолнечную лузгу измельчали на роторной ударной мельнице *Retsch SR 200* до размера частиц не более 150 мкм.

Лигнин является ингибитором целлюлаз и ксиланаз, поэтому целесообразно провести щелочную делигнификацию, для этого измельченную лузгу суспендировали при гидромодуле 1:9, в качестве дисперсной среды использовали 3% раствор гидроксида натрия. Процесс делигнификации проводили при нагревании суспензии до 120°C с последующей выдержкой в течение 1 ч. Об эффективности процесса делигнификации судили по изменению числа Каппа (ГОСТ 10070-74).

Ферментативный гидролиз 10% суспензии измельченной лузги в водопроводной воде вели в колбах Эрленмейера объемом 250 см³ на термостатируемой качалке с частотой оборотов 200 мин⁻¹. Температура и значение pH устанавливалось в зависимости от оптимального значения для конкретного ферментного препарата. Для установления оптимального значения pH суспензии использовали 10% раствор гидроксида

нтария и 10% раствор серной кислоты. Длительность ферментализации – 20 ч.

В полученных ферментализатах определяли количество растворенных сухих веществ (СВ) весовым методом и количество редуцирующих веществ (РВ) методом Бертрана-Шоорля.

Результаты исследования. Ферментативный гидролиз подсолнечной лузги ферментом *Celluclast 1,5 L FG* вели при температуре 55°C и pH 5,0. Ведущая активность у данного ферментного препарата – целлюлолитическая. Дозировку варьировали от 30 до 150 Ед.ЦлС на 1 г АСВ лузги. Данные об образовании РВ в процессе гидролиза представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Содержание РВ (%) в ферментализате, полученном при участии ФП *Celluclast 1,5 L FG*

Время гидролиза, ч	Дозировка ФП <i>Celluclast 1,5 L FG</i> , Ед.ЦлС/г субстрата				
	150	120	90	60	30
1	1,3	1,1	0,85	0,55	0,4
2	1,55	1,4	1,1	0,75	0,6
4	1,9	1,8	1,3	0,95	0,8
8	2,25	2,2	1,5	1,05	0,9
16	2,5	2,4	1,65	1,15	1
24	2,55	2,5	1,7	1,2	1,1

Наибольшее количество редуцирующих веществ наблюдается при дозировке ФП 120 Ед.ЦлС/г субстрата и составляет 2,5% при длительности взаимодействия – 24 ч.

Ферментом с ведущей ксиланазной активностью является *Viscozyme Wheat HT*. Гидролиз измельченной подсолнечной лузги вели при температуре 50°C и pH 5,0. Дозировку ФП вели по ксиланазной активности и варьировали от 1800 до 750 Ед.КС/г субстрата. Данные о накоплении РВ в процессе гидролиза представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Содержание РВ (%) в ферментализате лузги, полученном при участии ФП *Viscozyme Wheat HT* (температура 50 °C, pH 5,0)

Время гидролиза, ч	Дозировка ФП <i>Viscozyme Wheat HT</i> , Ед.КС/г субстрата			
	1800	1500	1100	750
1	0,4	0,2	0,15	0,1
2	0,65	0,5	0,4	0,3
4	1	0,9	0,6	0,5
8	1,35	1,3	0,8	0,6
16	1,6	1,55	0,95	0,7
24	1,65	1,65	1	0,75

Применение ФП с ведущей ксиланазной активностью позволяет получить меньшее количество РВ, чем при использовании ФП с ведущей целлюлазной активностью. Наибольшая активность получена при 24-х часовом гидролизе с дозировкой фермента 1500 Ед.КС/г субстрата (1,65% РВ).

Ферментный препарат *Shearzyme Plus 2X PDS* является комплексным и обладает высокой целлюлолитической (670 Ед.ЦлС/г) и умеренной ксиланазной активностью (4800 Ед.КС/г). Данный ФП характеризуется высокой активностью в широком диапазоне pH среды от 4,5 до 6,0 и температуры – 40 – 65°C. Данные о накоплении РВ в процессе гидролиза ФП *Shearzyme Plus 2X PDS* представлены в таблице 4. Дозировку ФП осуществляли по целлюлазной активности и варьиро-

вали в диапазоне от 150 до 30 Ед.ЦлС/г субстрата.

Таблица 4 – Содержание РВ (%) в ферментализате, полученном при участии ФП *Shearzyme Plus 2X PDS* (температура 50 °C, pH 5,0)

Время гидролиза, ч	Дозировка ФП <i>Shearzyme Plus 2X PDS</i> , Ед.ЦлС/г субстрата				
	150	120	90	60	30
1	1,4	1,25	1,1	0,7	0,4
2	1,8	1,65	1,4	1,1	0,6
4	2,2	2,1	1,65	1,35	0,8
8	2,4	2,35	1,9	1,6	0,9
16	2,6	2,65	2,2	1,8	1
24	2,8	2,8	2,4	1,95	1,1

Наибольшее накопление РВ составляет 2,8%. Данное количество восстанавливающих сахаров образуется в течение 24 ч гидролиза с дозировкой ФП *Shearzyme Plus 2X PDS* в количестве 120 Ед.ЦлС/г субстрата, при этом дозировка по ксиланазной активности составляет 750 Ед.КС/г субстрата. Комплексный ферментный препарат *Shearzyme Plus 2X PDS*, включающий в себя целлюлазу и протеазу показал наибольший эффект по накоплению редуцирующих веществ, чем *Celluclast 1,5 L FG* и *Viscozyme Wheat HT*.

Характеристика ферментализата, получаемого с помощью комплексного ФП *Shearzyme Plus 2X PDS*: содержание сухих веществ – 6,8%, редуцирующих веществ – 2,6% из них глюкоза – 76,7%, целлюбиоза – 10,5%, высшие сахара – 12,8%. Соотношение сахаров установлено с помощью ВЭЖХ.

Так же был проведен гидролиз с двумя термолабильными целлюлазами *Viscoferm HT FG* и *Ultraflo XL* их активность составляет 550 Ед.ЦлС/г и 670 Ед.ЦлС/г соответственно. Данные ФП сохраняют высокую активность в широком диапазоне pH (4,0 – 6,0) и температуре (40 – 70°C). Дозировка данных ФП составляла 120 Ед.ЦлС/г субстрата, данные о накоплении РВ представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Содержание РВ (%) в ферментализате, полученном при участии ФП *Viscoferm HT FG* и *Ultraflo XL* (температура 50°C, pH 5,0)

Время гидролиза, ч	<i>Viscoferm HT FG</i> 120 Ед.ЦлС/г субстрата	<i>Ultraflo XL</i> 120 Ед.ЦлС/г субстрата
1	1,05	0,9
2	1,45	1,2
4	1,9	1,45
8	2,15	1,7
16	2,45	2
24	2,6	2,2

По данным таблицы видно, что скорость накопления РВ в процессе гидролиз при участии ФП *Viscoferm HT FG* выше, чем при использовании ФП *Ultraflo XL* 120. За 24 ч гидролиза образовалось 2,6 и 2,2% редуцирующих веществ соответственно.

Заключение. В ходе исследования влияния ферментных препаратов с различной субстратной специфичностью на гидролиз измельченной подсолнечной лузги, показано, что целесообразно использовать комплексный ФП *Shearzyme Plus 2X PDS*, обладающий целлюлазной и ксиланазной активностями (670 Ед.ЦлС/г, 4800 Ед.КС/г). При 24 часовом гидролизе

при температуре 50°C, pH 5,0 и дозировке ФП 120 Ед. ЦД/г субстрата образуется 2,8% восстанавливающих сахаров. Полученный гидролизат может быть использован для культивирования кормовых дрожжей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Евтушенко С.Л. Влияние качественных показателей сырья и технологического процесса на содержание протеина в семенах подсолнечника и продуктах его переработки // Вестник национального технического университета "ХПИ". Сборник научных трудов. – 2008. – №3. – С. 89-97.
2. Клещевников Л.И., Логинова И.В., Харина М.В., Емельянов В.М. Методы получения фурфурола и его применение // Вестник технологического университета. – 2015. – № 18(19). – С. 95-101.
3. Коротков В.Г., Соловых С.Ю. Кишкилев С.В., Антимонов С.В. Получение кормовых экструдатов на основе подсолнечной лузги // Технические науки – от теории к практике. – 2013. – №18. – С. 124-131.
4. Масютин Я.А., Литвин А.А., Новиков А.А., Винокуров В.А. Исследование влияния различных методов предобработки целлюлозосодержащего сырья на его физико-химические свойства // Actualscience. – 2016. – № 12. – С. 221-223.
5. Рязанова О.А. Классификация растительных масел // Масложировая промышленность. – 2014. – № 1. – С. 25-29.
6. Хусид С.Б., Гиеуш А. Н., Нестеренко Е.Е. Подсолнечная лузга как источник получения функциональных кормовых добавок // Политематический сетевой электронный научный журнал кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 107. – С. 142-155.
7. Чепчак Т.П., Олишевская С.В., Курченко И.Н. Целлюлозолитическая активность штаммов *Fenellia Flavipes* и *Fusarium oxysporum* // Микробиологический журнал. – 2013. – Т. 72. – № 6. – С. 51-58.
8. Шаяхметова А.Х., Тимербаева А.Л., Сафина А.В. Лузга подсолнечника и отходы деревообработки как альтернативное биотопливо // Деревообрабатывающая промышленность. – 2015. – № 2. – С. 41-45.
9. Шмидт К.М., Худайгулов Г.Г. Выделение новых штаммов-деструкторов целлюлозы, их роль в снижении антропогенной нагрузки на экосистему // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. – 2016. – Т. 4. – №4. – С. 54-63
10. Abdel-Azeem A. M., Gherbawy Y. A., Sabry A. M. Enzyme profiles and genotyping of *Chaetomium globosum* isolates from various substrates // Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. – 2019. – Т. 150. – № 3. – С. 420-428.
11. Cejas L, Romano N, Moretti A, Mobili P, Golowczyc M, Gómez-Zavaglia A. Malt sprout, an underused beer by-product with promising potential for the growth and dehydration of lactobacilli strains // Food Sci Technol. – 2017. – № 54(13).
12. Hendriks A.T.W.M. and Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass // Bioresource Technology. – 2019. – № 1. С. 10–18
13. Jorgensen H., Olsson L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888—Effect of substrate on hydrolytic performance // Enzyme and Microbial Technology. – 2016. – № 3. – С. 381-390.
14. Karnaouri A. et al. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila* // Frontiers in microbiology. – 2014. – Т. 5. – С. 281.
15. Novotný Č. et al. *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential // Folia Microbiologica. – 2009. – Т. 54. – № 5. – С. 375-390.
16. Panagiotou G., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation // Industrial Crops and Products. – 2003. – № 1. – С. 37-45.
17. Rosgaard L. et al. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates // Biotechnology progress. – 2007. – Т. 23. – № 6. – С. 1270-1276.
18. Shulin Chen, Xiaoyu Zhang, Deepak Singh et al. Biological pretreatment of lignocellulosics: potential, progress and challenges // Biofuels. – 2010. – № 1. – С. 177–199
19. Vries R.P., Visser J.. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides // American Society for Mycobiology. – 2001. – № 4. – С. 497-522.
20. Xu F., Chen H.-Z., Li Z.-H. Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – № 1. – С. 45-48.
21. Ye Sun, Jiayang Cheng. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review // Bioresource Technology. – 2002. – № 1. – С. 1-11.

Статья поступила в редакцию 23.07.2021

Статья принята к публикации 15.09.2021