

Фракционный состав и ксиланолитическая активность белков, продуцируемых бактериями, выделенными из лигноцеллюлозной биомассы

Л. С. Дышлюк, Е. В. Ульрих, С. В. Агафонова, О. В. Казимирченко

Калининградский
государственный технический
университет, г. Калининград,
Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: Исследование фракционного состава и ксиланолитической активности белков, продуцируемых микроорганизмами из лигноцеллюлозного сырья, важно для разработки новых биотехнологических методов переработки растительных отходов в ценные биоактивные вещества, такие как ксилоолигосахариды. Эти вещества могут быть использованы для улучшения пищевых продуктов и создания нутрицевтиков, обладающих пребиотическими свойствами.

Цель: Оценка фракционного состава и ксиланолитической активности белков, продуцируемых бактериями из семян люпина белого с целью идентификации и характеристики энзимов, способных эффективно разлагать ксилан. Это позволяет разрабатывать новые подходы к использованию лигноцеллюлозного сырья для производства биопродуктов, в том числе пребиотиков, что может способствовать улучшению питания и здоровья, а также устойчивому управлению агропромышленными отходами.

Материалы и методы: В качестве исследуемых объектов выступали белковые фракции, изолированные из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*. Для десалинизации белкового осадка использовали метод диализа. Процесс выделения белков и их фракционирование проводили с использованием препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Молекулярные массы белковых фракций определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Ферментативно активные белки высушивали методом сублимации и оценивали их ксиланолитическую активность с использованием спектрофотометрического метода, основанного на определении редуцирующих сахаров, возникающих при действии фермента ксиланазы на β -1,4-связи ксилана. Экспериментальные данные подвергали статистической обработке с применением дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты: Из культуральной жидкости бактерий *Bacillus* были выделены четыре белковые фракции с молекулярными массами от 35,60 до 246,10 кДа. Наибольшее количество белков с молекулярной массой 242,30 кДа, 83,70 кДа и 35,90 кДа было обнаружено во фракции №1. Фракция №2 преобладала белками молекулярной массой 51,50 кДа и 42,70 кДа. В фракции №3 было выявлено большое разнообразие молекулярных масс, а фракция №4 содержала белки с молекулярными массами от 61,80 до 69,30 кДа. Белки с молекулярными массами от 35,60 до 41,00 кДа обладали ксиланолитической активностью на уровне 107,33 ед/г.

Выводы: Разработан метод выделения белков с ксиланолитической активностью из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*, изолированных из семян белого люпина (*Lupinus albus*). Полученные ферменты могут быть применены для переработки агропромышленных отходов с целью получения ксилоолигосахаридов.

Ключевые слова: пребиотики, ксиланолитические ферменты, микроорганизмы-продуценты, лигноцеллюлозная биомасса, фракционный состав, молекулярная масса

Корреспонденция:

Ульрих Елена Викторовна,
E-mail: elen.ulrich@mail.ru

Конфликт интересов:

авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 01.11.2023

Принята: 15.03.2023

Опубликована: 30.03.2023

Финансирование

Статья выполнена
при финансовой поддержке
гранта РНФ, соглашение
№ 23-26-00091.

Copyright: © 2024 Авторы



Для цитирования: Дышлюк, Л. С., Ульрих, Е. В., Агафонова, С. В., & Казимирченко, О. В. (2024). Изучение фракционного состава и ксиланолитической активности белков, продуцируемых бактериями, выделенными из лигноцеллюлозной биомассы. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 23-33. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.36>

Fractional Composition and Xylanolytic Activity of Proteins Produced by Bacteria Isolated from Lignocellulosic Biomass

Lyubov S. Dyshlyuk, Elena V. Ulrikh, Svetlana V. Agafonova, Oksana V. Kazimirchenko

Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Research on the fractionation and xylanolytic activity of proteins produced by microorganisms from lignocellulosic raw materials is crucial for developing new biotechnological methods to convert plant waste into valuable bioactive substances, such as xylooligosaccharides. These substances can be used to enhance food products and create nutraceuticals with prebiotic properties.

Purpose: To assess the fractional composition and xylanolytic activity of proteins produced by bacteria from white lupin seeds to identify and characterize enzymes capable of efficiently degrading xylan. This allows for the development of new approaches to using lignocellulosic raw materials for bioproduct production, including prebiotics, which can improve nutrition and health and facilitate sustainable management of agro-industrial waste.

Materials and Methods: The study objects were protein fractions isolated from the culture fluid of *Bacillus megaterium* bacteria. Desalination of the protein precipitate was performed using dialysis. The extraction of proteins and their fractionation were conducted using preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). The molecular masses of the protein fractions were determined using polyacrylamide gel electrophoresis. Enzymatically active proteins were dried by lyophilization and their xylanolytic activity was assessed using a spectrophotometric method based on the quantification of reducing sugars formed when the enzyme xylanase acts on β -1,4 bonds of xylan. Experimental data were subjected to statistical analysis using analysis of variance (ANOVA).

Results: Four protein fractions with molecular masses ranging from 35.60 to 246.10 kDa were isolated from the bacterial culture fluid of *Bacillus*. The highest concentration of proteins with molecular masses of 242.30 kDa, 83.70 kDa, and 35.90 kDa was found in fraction #1. Fraction #2 was dominated by proteins with molecular masses of 51.50 kDa and 42.70 kDa. A wide variety of molecular masses was observed in fraction #3, and fraction #4 contained proteins with molecular masses ranging from 61.80 to 69.30 kDa. Proteins with molecular masses from 35.60 to 41.00 kDa exhibited xylanolytic activity at a level of 107.33 units/g.

Conclusion: A method for isolating proteins with xylanolytic activity from the culture fluid of *Bacillus megaterium* bacteria isolated from white lupin seeds (*Lupinus albus*) has been developed. The enzymes obtained can be used for the processing of agro-industrial waste to produce xylooligosaccharides.

Keywords: prebiotics, xylanolytic enzymes, producer microorganisms, lignocellulosic biomass, fractional composition, molecular mass

Correspondence:

Elena Victorovna Ulrikh
E-mail: elen.ulrich@mail.ru

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 01.11.2023

Accepted: 15.03.2024

Published: 30.03.2024

Funding

The article was carried out with the financial support of the RGNF grant, agreement No. 23-26-00091.

Copyright: © 2024 The Authors



To cite: Dyshlyuk, L. S., Ulrikh, E. V., Agafonova, S. V., & Kazimirchenko, O. V. (2024). Study of the fractional composition and xylanolytic activity of proteins produced by bacteria isolated from lignocellulosic biomass. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 22-33. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.36>

ВВЕДЕНИЕ

Производство натуральных биоактивных соединений обрело статус ведущего направления в пищевой и нутрицевтической индустрии, что обусловлено многообразием их химической структуры, функциональными свойствами, а также подтвержденным положительным воздействием на состояние здоровья и благополучие человека¹ (Recharla, 2017). Среди широко исследованных и активно используемых биоактивных соединений выделяются фенольные вещества, витамины, натуральные пигменты, жирные кислоты, биоактивные пептиды, пребиотические ингредиенты и прочие, присутствующие в разнообразных пищевых матрицах и производимые микроорганизмами (Chai, 2018; Sarwar, 2019; Wang, 2020).

Среди углеводов с пребиотическим действием ксило-олигосахариды (XOS) представляют особый интерес в связи с их физико-химическими и физиологическими свойствами, полезными для здоровья человека и животных (Meyer, 2015; Gomes, 2019). XOS являются антибактериальными веществами против нескольких желудочно-кишечных расстройств (Liao, 2019). Их употребление повышает иммунитет (Chen, 2012), модулирует микробиоту кишечника (Lin, 2016) и снижает риск развития рака (Maeda, 2012). XOS устойчивы к температурным воздействиям (от 0 до 60 °C) и кислотности (pH=3,5–7,5) (Zhao, 2021).

XOS в промышленном масштабе могут быть получены ферментативным гидролизом ксилана — одного из важных и распространенных компонентов клеточной стенки растений (Arruda, 2017; Borewicz, 2019). Расщепление ксилана происходит полиферментными системами, включающими эндо-1,4-β-ксиланазу, β-ксилозидазу, β-глюкуронидазу, β-арабинофуранозидазу и β-эстеразу.

Бифидо- и лактобактерии в толстом кишечнике человека секретируют гидролитические ферменты, расщепляющие XOS, до моносахаров, которые утилизируются в процессе роста и развития микроорганизмов, при этом выделяется энергия, необходимая для их размножения и роста (Alizadeh, 2019), а также образуются метаболиты (органические кислоты) и короткоцепочечные жирные кислоты, способствующие сокращению популяции патогенной микрофлоры (Artiga-Artigas, 2019). Известны исследования их антипатогенного и ан-

тиканцерогенного воздействий, позволяющих снизить уровень риска заболеваний кишечника (Gibson, 2017, Scott, 2020).

В связи с многообразием строения и функций ксилан-деградирующих ферментов возникает необходимость фракционирования белков, выделенных из микроорганизмов — потенциальных продуцентов ксиланаз, и исследования их свойств (Neri-Numa, 2020, Калинина, 2017).

Целью текущего исследования являлась оценка фракционного состава и ксиланолитической активности белков, продуцируемых бактериями, выделенными из лигноцеллюлозного сырья Калининградской области — семян люпина белого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования являлись: культуральная жидкость бактерий *Bacillus megaterium*, выделенных из семян люпина белого (*Lupinus albus*, сорт «Дега»); белковые фракции, выделенные из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*.

Оборудование

Для проведения исследований использовано научное оборудование: термостат суховоздушный ТВ-80 по ТУ 9452–029–41457390–2006 (Касимовский приборный завод, Россия, год производства 2022), микроскоп биологический Биолаб для лабораторной диагностики *in vitro* (Nigbo Teaching Instrument Co Ltd, Китай, 2022 г.), центрифуга Eppendorf 5810 (Eppendorf, Германия, 2019 г.), УЗ диспергатор Soniprep-150 plus MSE (Soniprep, Великобритания, 2018 г.), хроматограф BIORAD NGC (Bio-Rad Laboratories, США, 2018 г.), прибор для электрофореза PowerPac (Bio-Rad Laboratories, США, 2017 г.), гель-документирующая система Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad Laboratories, США, 2018 г.), сублимационная установка Labconco (Labconco, США, 2018 г.), спектрофотометр УФ-1200 (Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd., Китай, 2021 г.).

¹ Watson (2019). Prebiotic ingredients market to reach usd 11.48 billion by 2028. <https://www.reportsanddata.com/press-release/global-prebiotic-ingredients-market>

Методы

Выделение бактерий *Bacillus megaterium* из лигноцеллюлозного сырья и получение культуральной жидкости

Бактерии изолировали из семян люпина белого, для чего использовали метод десятикратных разведений проб в стерильном физиологическом растворе, исходная навеска семян составила 10 г. Из разведений осуществляли высев по 1 см³ суспензии в стерильные чашки Петри, после чего чашки заливали рыбопептонным агаром, содержащим ксилан (из расчета 2,5 г порошка ксилана на 1 литр питательной среды). Культивирование посевов вели при температуре 30 °С в течение 72 ч. Идентификацию штамма бактерий проводили по совокупности культуральных, морфологических, тинкториальных и физиолого-биохимических признаков (Дышлюк, 2023).

Подготовка культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium* для определения ксиланолитической активности

Образцы суточной культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*, выращенных в рыбопептонном бульоне с добавлением ксилана, центрифугировали при скорости вращения ротора 5000 g. Собирали клеточную массу, которую растворяли в 10 см³ фосфатного буфера (pH = 7,4) и гомогенизировали на УЗ диспергаторе. Процесс измельчения проводили не менее трех раз. Суспензию центрифугировали при скорости вращения ротора 5000 g и собирали супернатант, в котором определяли ксиланолитическую активность по ГОСТ 31488–2012.

Выделение белков из культуральной жидкости и их фракционирование

Для выделения белков из культуральной жидкости бактерий использовали супернатант, полученный при центрифугировании суспензии бактерий, из которого осаждали белки методом высаливания до 80 % насыщения раствора сернокислого аммония. Процесс осаждения белковых фракций сульфатом аммония вели в течение 24 ч при температуре плюс 5 °С.

Полученный белковый осадок отделяли от раствора центрифугированием и обессоливали с помощью диализа (MW 3500 Да) в течение 24 ч против раствора фосфатного буфера (pH=7,4). Очищенный белковый

раствор фракционировали с помощью препаративного хроматографа. Колонка была заполнена сорбентом Biogel для эксклюзионной хроматографии. Элюент для фракционирования — фосфатный буфер pH=7,4 + 1 % хлористый натрий, скорость потока 2 см³/мин. С целью выделения максимального количества фракций детектирование осуществляли при разных длинах волн: 215, 255 и 280 нм.

Определение молекулярной массы белков

Молекулярную массу белковых фракций устанавливали с использованием метода электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) согласно методу, описанному в (Matsumoto, 2019). Белковые полосы в полиакриламидном геле визуализировали окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим R-250. После электрофореза гель замачивали в 50 мМ натрий-цитратном буфере (pH 4) и инкубировали в течение 30 мин при 45 °С для выявления ксиланазной активности. Затем гель окрашивали водным раствором конго красного (2 мг/см³) в течение 15 мин при комнатной температуре. Гель промывали 1М раствором хлористого натрия и переносили в 5 %-ный (по объему) раствор уксусной кислоты. Более подробный анализ электрофоретических диаграмм проводили с помощью гель-документирующей системы.

Сушка белковых фракций

Фракции, содержащие белки с ксиланолитической активностью, высушивали методом сублимации. Параметры сублимационного высушивания: температура на стадии досушки минус 20 °С; вакуум — 0,3 мбар, температура охладителя — минус 80 °С.

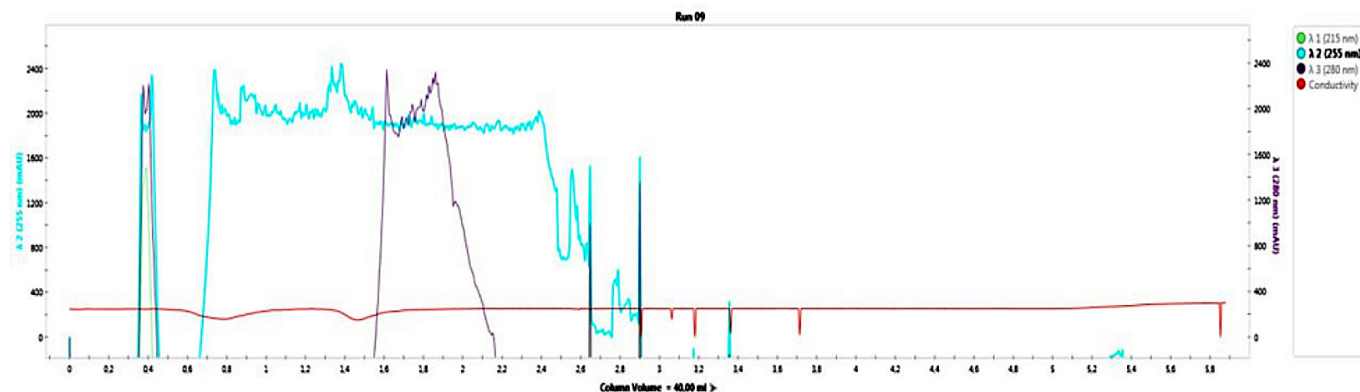
Определение ксиланолитической активности

Ксиланолитическую активность культуральной жидкости бактерий и белковых фракций, выделенных из неё методом хроматографии и высушенных методом сублимации, устанавливали в соответствии с ГОСТ 31488–2012. Метод основан на количественном определении редуцирующих сахаров, образующихся при действии фермента ксиланазы (экзоксиланазы) на β-1,4-связи ксилана при определении в стандартных условиях.

За единицу ферментативной активности ксиланазы (1 ед. КсА) принимали количество фермента, действующего на ксилан с высвобождением 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на ксилозу) за 1 мин

Рисунок 1

Выделение фракций, содержащих белки



при стандартных условиях (температура 50 °С, значение pH 4,7, продолжительность гидролиза 10 мин). Содержание редуцирующих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяли колориметрическим методом с ДНС-реактивом (3,5-динитросалициловая кислота) при длине волны 540 нм и рассчитывали по градуировочному графику, построенному для ксилозы. Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр.

Анализ данных

Все эксперименты и вычисления проводились в трех повторностях. Результаты представляли как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Для обработки полученных данных использовали стандартные статистические методы. Данные подвергали дисперсионному анализу (ANOVA) с применением пакета Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2007, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

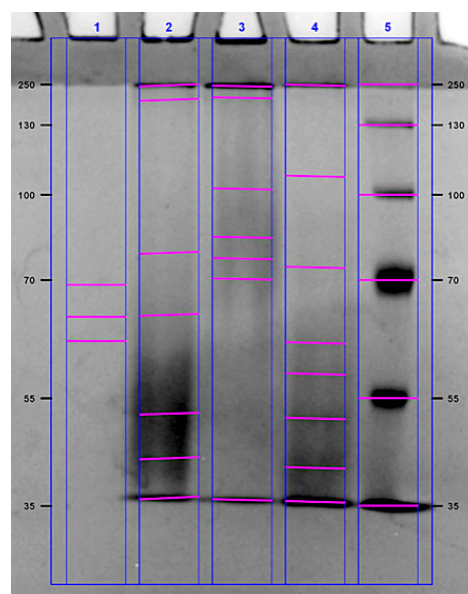
На первом этапе исследования применение трёхстадийной схемы, включающей осаждение сульфатом аммония, диализ и гель-фильтрационную хроматографию, для выделения и первичной очистки (от низкомолекулярных соединений) белков из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium* (использовали накопительную культуру бактерии в объеме 200 см³) позволило выделить 4 белковые фракции с разным временем выхода из колонки, содержащие, в том числе, потенциальные ферменты ксиланолитического действия (Рисунок 1).

На следующем этапе оценивали степень чистоты выделенных фракций и молекулярную массу белков, предполагаемых ксиланолитических ферментов, используя метод электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Полученные результаты представлены на Рисунках 2–6.

Результаты, представленные на Рисунке 2, свидетельствуют о том, что на первом этапе получены фрак-

Рисунок 2

Белки культуральной жидкости *B. megaterium*, разделённые с помощью электрофореза в полиакриламидном геле



Примечание. 1 — фракция №4; 2 — фракция №2; 3 — фракция №1; 4 — фракция №3; 5 — смесь стандартных белков (белковый маркер)

Рисунок 3

Молекулярные массы белков, содержащихся во фракции №1

Lane 3

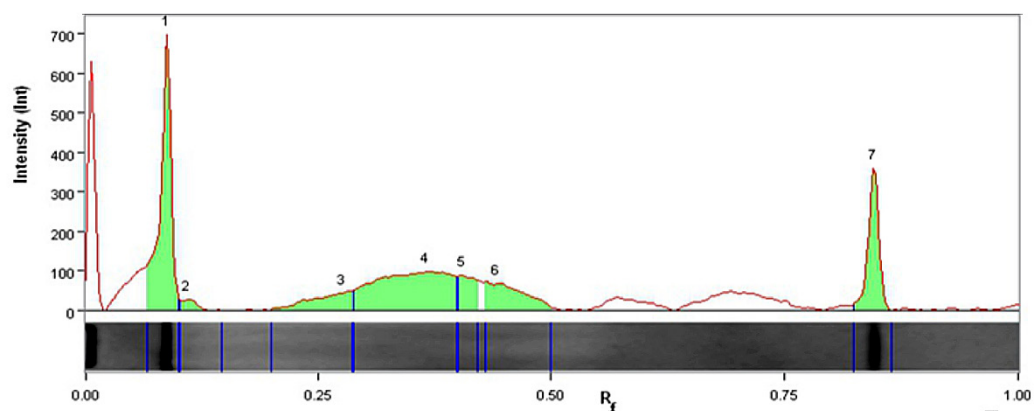


Рисунок 4

Молекулярные массы белков, содержащихся во фракции №2

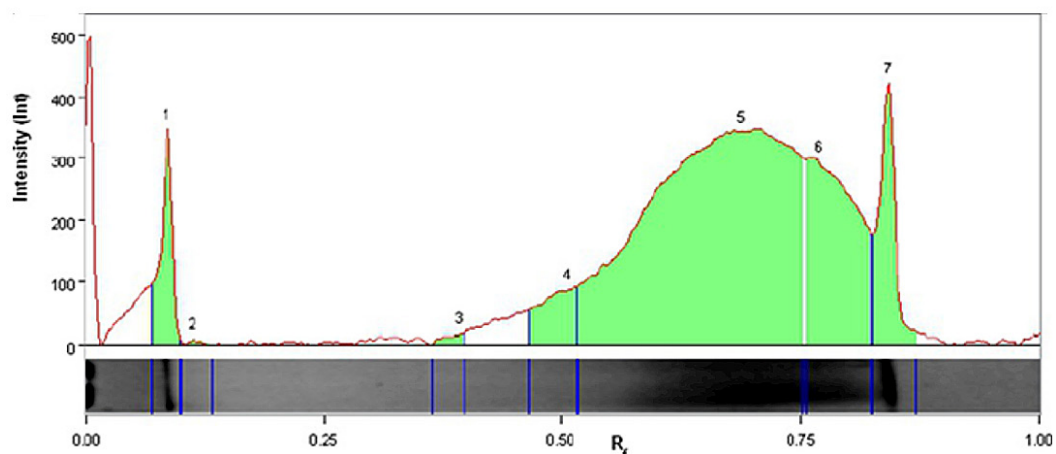


Рисунок 5

Молекулярные массы белков, содержащихся во фракции №3

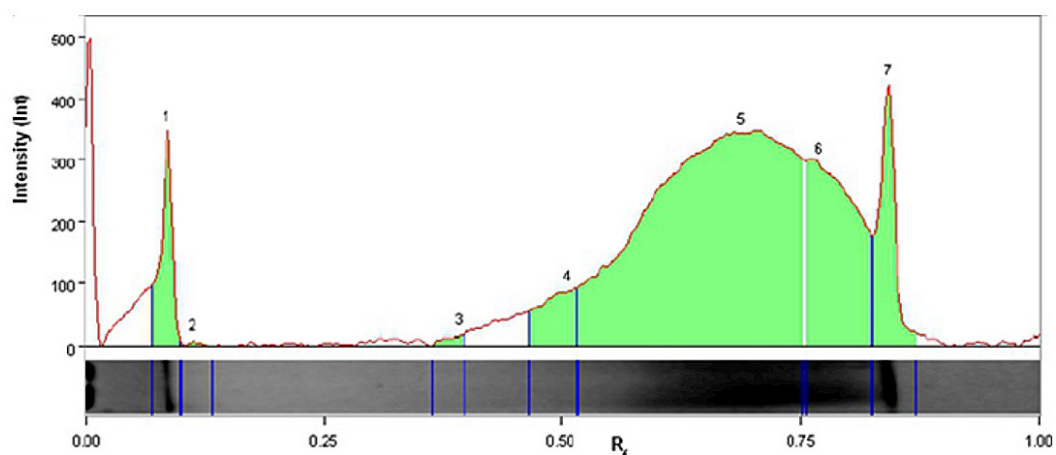
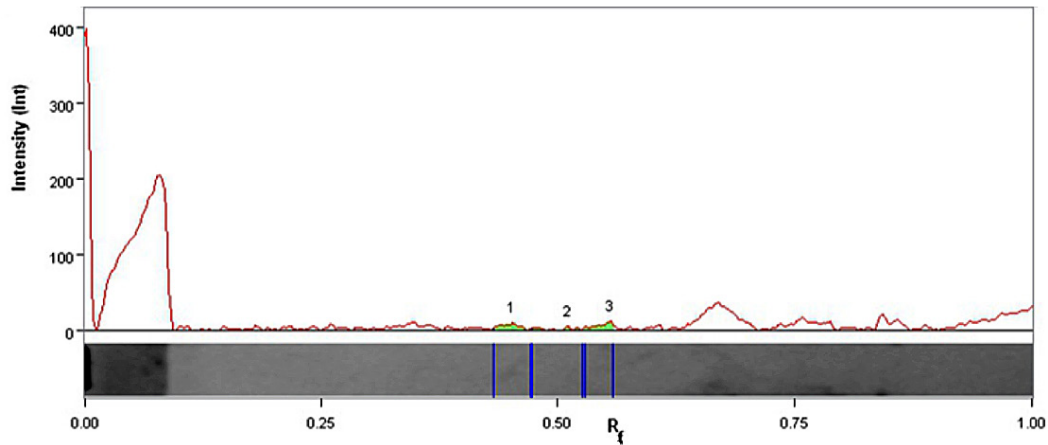


Рисунок 6

Молекулярные массы белков, содержащихся во фракции №4

Lane 1



ции белков с различной молекулярной массой (от 35 до 250 кДа). Также установлено, что полученные фракции не содержат высокомолекулярных соединений не белковой природы.

Из результатов, представленных на Рисунках 2–6, следует, что фракция №4 показала три белковые полосы на SDS-PAGE, в остальных фракциях содержится большее количество индивидуальных белков с различной

молекулярной массой. Так, в дорожке геля, содержащего фракцию №2, обнаружено 7 отчетливых полос в различной области молекулярных масс, а в дорожках геля с фракциями №1 и №3–7 и 8 белков, соответственно.

Детальный анализ данных электрофореза (Рисунки 3–6, Таблица 1) позволил установить концентрации белков и их молекулярные массы.

Таблица 1

Характеристика белков, содержащихся в выделенных фракциях

Номер полосы	Молекулярная масса, кДа	Relative Front	Band, %	Lane, %
Фракция №1				
1	242,30	0,089	29,40	19,90
2	201,00	0,110	1,70	1,10
3	102,20	0,277	7,40	5,00
4	83,70	0,365	29,50	20,00
5	76,50	0,404	6,00	4,00
6	70,30	0,441	10,70	7,30
7	35,90	0,846	15,50	10,50
Фракция №2				
1	246,10	0,087	5,10	4,50
2	194,90	0,113	0,10	0,10
3	78,40	0,394	0,40	0,40
4	65,20	0,507	4,10	3,60
5	51,50	0,688	63,60	56,60
6	42,70	0,770	18,30	16,30
7	36,20	0,842	8,40	7,50

Окончание Таблицы 1

Номер полосы	Молекулярная масса, кДа	Relative Front	Band, %	Lane, %
Фракция №3				
1	246,10	0,087	25,70	19,20
2	107,20	0,254	0,20	0,10
3	73,80	0,420	0,90	0,70
4	61,60	0,559	8,60	6,40
5	57,80	0,615	6,30	4,70
6	50,50	0,697	6,60	4,90
7	41,00	0,787	16,50	12,30
8	35,60	0,849	35,10	26,20
Фракция №4				
1	69,30	0,453	42,10	1,30
2	64,90	0,511	16,80	0,50
3	61,80	0,555	41,10	1,20

Анализ эмпирических данных (Рисунки 3–6, Таблица 1) позволил установить, что фракция №1 содержит высокомолекулярные белки с молекулярной массой от 242,30 кДа (линия 1 на рисунке 2) до 83,0 кДа (линия 4). Также установлено, что в состав фракции входят белки с молекулярными массами 76,50 кДа (линия 5), 70,30 кДа (линия 6) и 35,90 кДа (линия 7). Показано, что во фракции №1 содержится наибольшее количество белков с молекулярной массой 242,30 кДа (линия 1), 83,70 кДа (линия 4) и 35,90 кДа (линия 7), на их долю приходится 29,40, 29,50 и 15,70 %, соответственно. Доля белков с молекулярной массой 76,50 кДа (линия 5) и 70,30 кДа (линия 6) составляет 6,00 и 70,70 %, соответственно. Отмечено низкое содержание высокомолекулярных белков (молекулярная масса 201,00 кДа и 102,20 кДа). На их долю в сумме приходится 9,10 %.

Выявлено, что во фракции №2 преобладают белки с молекулярной массой 51,50 кДа (содержание составило 63,60 %) и 42,70 кДа (содержание составило 18,30 %). Определено, что фракция №2 в своем составе содержит всего 5,10 % белка с молекулярной массой 246,10 кДа и 1,0 % белка с молекулярной массой 194,90 кДа. Содержание белка с молекулярными массами 78,40 и 65,20 кДа в анализируемом образце достигает 0,40 и 4,10 %, соответственно. В то же время, содержание низкомолекулярных белков во фракции №2 составило 18,30 % (белок с молекулярной массой 42,70 кДа) и 8,40 % (белок с молекулярной массой 36,20 кДа).

Установлено, что фракция №3 содержит большое количество белков с различной молекулярной массой. На долю белков с молекулярной массой 41,00 кДа (линия 7) и 35,60 кДа (линия 8) приходится 16,50 и 35,10 %, соответственно. Содержание белка с молекулярной массой 107,20 кДа (линия 2) и 73,80 кДа (линия 3) составляет 0,20 и 0,90 %, соответственно. Выявлено, что фракция №3 содержит до 8,60 % белка с молекулярной массой 61,60 кДа (линия 4), до 6,30 % белка с молекулярной массой 57,80 кДа (линия 5).

Показано, что содержание белка с молекулярной массой 50,50 кДа во фракции №3 составляет 6,60 %, что в 3,89 раз меньше содержания белка с молекулярной массой 246,10 кДа (линия 1).

Экспериментальные данные (таблица 1, рисунок 6) свидетельствуют о том, что фракция №4 содержит белки с молекулярной массой от 61,80 до 69,30 кДа, при этом на долю белков с молекулярными массами 69,30 кДа и 61,80 кДа приходится 42,10 и 41,10 %, соответственно. На долю белка с молекулярной массой 64,90 кДа (линия 2) приходится только 16,80 %.

Далее для четырёх выделенных и высушенных методом сублимации фракций устанавливали ксиланолитическую активность. Выявлено, что фракция №3 проявляет ксиланолитическую активность на уровне $507,33 \pm 15,22$ ед/г. Фракции №1, 2 и 4 не продемонстрировали ферментативной активности в отношении гидролиза ксилана.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты экспериментальных исследований подтвердили нашу гипотезу о наличии в белковых фракциях, выделенных из культуральной жидкости бактерий лигноцеллюлозного сырья, ферментов ксиланолитического действия. Наши результаты согласуются с данными Amir (2013), который показал, что ксиланолитические ферменты имеют низкую молекулярную массу. В частности, он выделил ксиланазу с молекулярной массой 43,0 кДа, которая соответствует диапазону молекулярных масс белков, выделенных из культуры *B. megaterium*, изолированных из семян люпина (35,6–246,1 кДа). Chen (1997) выделил из культурального фильтрата штамма *Trichoderma longibrachiatum* CS-185, выращенного на ксилане овсяной полбы, эндоксилазу (1,4-β-d-ксила-н-ксилангидролаза, КФ 3.2.1.8) с молекулярной массой 37,7 кДа. Эти данные находят подтверждение и в полученных нами результатах, согласно которым максимальную ксиланолитическую активность проявляют белки с молекулярной массой 35,60–41,00 кДа. Сравнивая результаты настоящего исследования и предыдущих исследований по теме, можно сделать вывод о схожести методов выделения белков из лигноцеллюлозного сырья и об их общей ксиланолитической активности.

Ratanakhanokchai и соавт. (1999) установили, что алкалофильная бактерия *Bacillus sp.* (штамм K-1) продуцирует внеклеточные ксиланолитические ферменты, такие как ксиланазы, β-ксилозидаза, арабинофуранозидаза и ацетилэстераза, при выращивании в ксилановой среде. Одну из внеклеточных ксиланаз очищали до гомогенности методом аффинной адсорбции-десорбции на нерастворимом ксилане. Фермент связывался с нерастворимым ксиланом, но не с кристаллической целлюлозой. Молекулярная масса ксилан-связывающей ксиланазы составила примерно 23 кДа. Эти данные свидетельствуют о преимуществе ВЭЖХ перед аффинной адсорбцией-десорбцией на нерастворимом ксилане. Метод аффинной адсорбции-десорбции не позволяет отделить родственные примеси от целевых ферментов, поэтому исследователи получили смеси нефракционированных белков, состоящих из ксиланазы, β-ксилозидазы, арабинофуранозидазы и ацетилэстеразы. Тем не менее, наша гипотеза о наличии ксиланолитических ферментов в белках, выделенных из культуры *B. megaterium* семян люпина, подтверждается, хотя минимальная молекулярная масса белков в нашем исследовании составля-

ет 35,60 кДа (согласно данным Ratanakhanokchai et al. (1999), 23,00 кДа).

Основываясь на данных о молекулярной массе выделенных белков и сопоставляя их с литературными данными (Chen, 1997; Ratanakhanokchai, 1999), авторы пришли к выводу, что фракции №1–3 содержат потенциальные ксиланолитические ферменты. Установлено, что фракция №1 содержит белок с молекулярной массой 35,90 кДа, а фракция №2 — белки с молекулярными массами 42,70 и 36,20 кДа, в которых ожидается наличие ксиланолитической активности. Во фракции №3 потенциальную ксиланазную активность могут иметь белки с молекулярной массой 41,00 кДа и 35,60 кДа. На данном этапе исследования ксиланолитическая активность экспериментально подтверждена только для фракции №3 ($107,33 \pm 5,15$ ед/г). Белковые фракции №1 и №2 не проявили ксиланолитической активности. Требуются дополнительные исследования, которые будут сосредоточены на предварительном выделении целевых белков с высокой степенью очистки с использованием гель-фильтрационной и анионообменной хроматографии (Lee, 2024) и последующей оценке их ферментативной активности в отношении гидролиза ксилансодержащих субстратов.

Ограничением предложенного метода выделения ксиланолитических ферментов из лигноцеллюлозного сырья является невысокая эффективность ферментативного гидролиза лигноцеллюлозы без предварительной обработки из-за ее высокой устойчивости к ферментативному воздействию. Для изменения ультраструктуры лигноцеллюлозы и ее кристалличности проводят предварительное измельчение сырья, а затем гидро-термальную, щелочную или кислотную обработку. Это позволяет извлекать гемицеллюлозы, особенно ксилан, и делает их более доступными для действия ксиланаз. Для оптимизации ферментативного разрушения ксилана необходим контроль pH, температуры и длительности воздействия ферментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана трёхстадийная схема выделения белков — потенциальных ксиланаз из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*, изолированных из семян люпина белого, включающая осаждение сульфатом аммония, диализ и гель-фильтрационную хроматографию. Выделены и высушены методом сублимации 4

Л. С. Дышлюк, Е. В. Ульрих, С. В. Агафонова, О. В. Казимирченко

белковые фракции с молекулярными массами в диапазоне от 35,6 до 246,1 кДа. При сопоставлении полученных результатов с данными литературы установлено, что ксиланолитическая активность ожидается у белков с молекулярными массами от 35,6 до 42,7 кДа. Целевые белки содержатся во фракциях №1, 2 и 3. Для фракции №3, содержащей белки с молекулярной массой от 35,6 до 246,1 кДа, установлена ксиланолитическая активность на уровне 107,33 ед/г. Фракции №1 и 2 не продемонстрировали ксиланолитической активности на данном этапе. Последующие исследования будут направлены на выделение целевых белков с высокой степенью очистки с помощью гель-фильтрационной и анионообменной хроматографии и оценку

их ферментативной активности в отношении гидролиза ксилансодержащих субстратов. Также будущие исследования по данной проблематике будут посвящены изучению физико-химических и биохимических свойств ферментов ксиланолитического действия, выделенных из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*, с последующей разработкой научных основ и технологических приемов биотрансформации агропромышленных отходов с получением ксилоолигосахаридов для кормопроизводства. Оценка возможности использования полученных ферментов в пищевой промышленности будет осуществляться на основании результатов изучения безопасности штамма *Bacillus megaterium*.

ЛИТЕРАТУРА

- Дышлюк, Л.С., Казимирченко, О.В., Ульрих, Е.В., & Агафонова, С.В. (2023). Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов — потенциальных продуцентов ксиланаз. *Вестник Международной академии холода*, 4, 79–90.
- Dyshlyuk, L.S., Kazimirchenko, O.V., Ulrikh, E.V., & Agafonova, S.V. (2023). Morphological, cultural, and physiolo-biochemical properties of microorganisms — potential producers of xylanases. *Bulletin of the International Academy of Cold*, 4, 79–90. (In Russ.).
- Калинина, А.Н., Борщевская, Л.Н., Гордеева, Т.Л., & Синеокий, С.П. (2017). Скрининг и таксономическая характеристика бактериальных продуцентов ксиланаз. *Биотехнология*, 33, 37–41. <https://dx.doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-6-37-41>
- Kalinina, A.N., Borshchevskaya, L.N., Gordeeva, T.L., & Sineokiy, S.P. (2017). Screening and taxonomic characteristics of bacterial xylanase producers. *Biotechnology*, 33, 37–41. (In Russ.). <https://dx.doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-6-37-41>
- Alizadeh, A., Oskuyi, A. S., & Amjadi, S. (2019). The optimization of prebiotic sucrose-free mango nectar by response surface methodology: the effect of stevia and inulin on physicochemical and rheological properties. *Food Science and Technology International*, 25, 243–251. <https://dx.doi.org/10.1177/1082013218818016>
- Amir, A., Arif, M., & Pande, V. (2013). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus fumigatus* isolated from soil. *African Journal of Biotechnology*, 12, 3049–3057
- Arruda, H. S., Pereira, G. A., & Almeida, M. E. F. (2017). Current knowledge and future perspectives of oligosaccharides research. *Frontiers in Natural Product Chemistry*, 3, 91–175. <https://dx.doi.org/10.2174/9781681085340117030005>
- Artiga-Artigas, M., Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., Martin-Belloso, O., Rubio, A. L., Rovira, M. J. F., & Sanz, M. M. (2019). Nanostructured systems to increase bioavailability of food ingredients. In L. G. Gomez-Mascaraque (Ed.), *Nanomaterials for food applications* (pp. 13–33). University of Lleida - Agrotecnio Center. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00002-6>
- Borewicz, K., Suarez-Diez, M., Hechler, C., Beijers, R., de Weerth, C., Arts, I., Penders, J., Thijs, C., Nauta, A., Lindner, C., Van Leusen, E., Vaughan, E. E., & Smidt, H. (2019). The effect of prebiotic fortified infant formulas on microbiota composition and dynamics in early life. *Scientific Reports*, 9, Article 2434. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-38268-x>
- Boucherba, N., Himed, L., Boussalah, N., & et Barkat, M. (2014). Purification and characterization of the xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN-13. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 2694–2705. <https://dx.doi.org/10.1007/s12010-013-0709-x>
- Chai, J., Jiang, P., Wang, P., Jiang, Y., Li, D., Bao, W., Liu, B., Zhao, L., Norde, W., Yuan, Q., Ren, F., & Li, Y. (2018). The intelligent delivery systems for bioactive compounds in foods: Physicochemical and physiological conditions, absorption mechanisms, obstacles and responsive strategies. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 144–154. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.003>
- Chen, C., Chen, J. L., & Lin, T. Y. (1997). Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production.

- Enzyme and Microbial Technology*, 21, 91–96. [https://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00236-0](https://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00236-0)
- Chen, H. H., Chen, Y. K., Chang, H. C., & Lin, S. Y. (2012). Immunomodulatory effects of xylooligosaccharides. *Food Science and Technology Research*, 18, 195–199. <https://dx.doi.org/10.3136/fstr.18.195>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14, 491–502. <https://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gomes, S., Finotelli, P. V., Sardela, V. F., Pereira, H., Santelli, R. E., Freire, A., & Torres, A. G. (2019). Microencapsulated Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake extract powder as an added-value functional food ingredient. *Food Science and Technology*, 116, Article 108495. <https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108495>
- Lee, S., Jo, K., Jeong, S.-K.-C., Choi, Y.-S., & Jung, S. (2024). Production of freeze-dried beef powder for complementary food: Effect of temperature control in retaining protein digestibility. *Food Chemistry*, 433, 137419. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137419>
- Liao, N., Luo, B., Gao, J., Li, X., Zhao, Z., Zhang, Y., Ni, Y., & Tian, F. (2019). Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnology Letters*, 41, 263–272. <https://dx.doi.org/10.1007/s10529-018-02634-6>
- Lin, S. H., Chou, L. M., Chien, Y. W., Chang, J.-S., & Lin, C.-I. (2016). Prebiotic effects of xylooligosaccharides on the improvement of microbiota balance in human subjects. *Gastroenterology Research and Practice*, Article ID 5789232. <https://dx.doi.org/10.1155/2016/5789232>
- Maeda, R., Ida, T., Ihara, H., & Sakamoto, T. (2012). Induction of apoptosis in MCF-7 cells by beta-1,3-xylooligosaccharides prepared from *Caulerpa lentillifera*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76, 1032–1034. <https://dx.doi.org/10.1271/bbb.120016>
- Matsumoto, H., Haniu, H., Komori, N. (2019). Determination of protein molecular weights on SDS-PAGE. In B. Kurien & R. Scofield (Eds.), *Electrophoretic Separation of Proteins. Methods in Molecular Biology* (vol. 1855). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_10
- Meyer, T. S. M., Miguel, A. S. M., Fernandez, D. E. R., & Ortiz, G. M. D. (2015). Biotechnological production of oligosaccharides — applications in the food industry. *Food Production and Industry*, 2, 25–78. <https://dx.doi.org/10.5772/60934>
- Neri-Numa, I. A., Arruda, H. S., Geraldi, M. V., Marostica, M. M., & Pastore, G. (2020). Natural prebiotic carbohydrates, carotenoids and flavonoids as ingredients in food systems. *Current Opinion in Food Science*, 33, 98–107. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.004>
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., & Tanticharoen, M. (1999). Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 694–697. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.65.2.694-697.1999>
- Recharla, N., Riaz, M., Ko, S., & Park, S. (2017). Novel technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review. *Journal of Functional Foods*, 39, 63–73. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.001>
- Samanta, A., Chikkerur, J., Roy, S., Kolte, A., Sridhar, M., Dhali, A., Kandalam, G., & Senani, S. (2019). Xylooligosaccharides production from tobacco stalk xylan using edible acid. *Current Science*, 117, 1521–1525. <https://dx.doi.org/10.18520/cs/v117/i9/1521-1525>
- Sarwar, A., Aziz, T., Al-Dalali, S., Zhao, X., Zhang, J., ud Din, J., Chen, C., Cao, Y., & Yang, Z. (2019). Physicochemical and microbiological properties of synbiotic yogurt made with probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in combination with inulin. *Foods*, 8, 468. <https://dx.doi.org/10.3390/foods8100468>
- Scott, K. P., Grimaldi, R., Cunningham, M., Sarbini, S. R., Wijeyesekera, A., Tang, M. L. K., Lee, J. C.-Y., Yau, Y. F., Ansell, J., Theis, S., Yang, K., Menon, R., Arfsten, J., Manurung, S., Gourineni, V., & Gibson, G. R. (2019). Developments in understanding and applying prebiotics in research and practice—an ISAPP conference paper. *Journal of Applied Microbiology*, 128, 934–949. <https://dx.doi.org/10.1111/jam.14424>
- Wang, Y., Zheng, Z., Wang, K., Tang, C., Liu, Y., & Li, J. (2020). Prebiotic carbohydrates: effect on physicochemical stability and solubility of algal oil nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 228, Article 115372. <https://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115372>
- Zhao, J., Zhang, X., Zhou, X., & Xu, Y. (2021). Selective production of xylooligosaccharides by xylan hydrolysis using a novel recyclable and separable furoic acid. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 660266. <https://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.660266>