

УДК 663.15:663.51:579.66

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НОВОЙ ТЕХНИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ – МИСКАНТУС СОРТ СОРАНОВСКИЙ

© 2013 г. Н.М. Слынько, Т.Н. Горячкова, С.В. Шеховцов,
С.В. Банникова, Н.В. Бурмакина, К.В. Старостин, А.С. Розанов,
Н.Н. Нечипоренко, С.Г. Вепрев, В.К. Шумный, Н.А. Колчанов, С.Е. Пельтек

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: peltek@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 15 августа 2013 г. Принята к публикации 5 сентября 2013 г.

Мискантус сорт Сорановский внесен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, в 2013 г. Методами фенотипирования и анализа ДНК новая техническая культура отнесена к виду *Miscanthus sacchariflorus*. На основе биомассы мискантуса ведется разработка методов получения сахаросодержащего субстрата для биотехнологий. Для выполнения этой задачи было изучено влияние механической и химической обработок в сочетании с ферментативным гидролизом на получение сахаров из биомассы мискантуса. Наилучший результат получен при использовании помолы до размера частиц ~100 мкм с последующей обработкой гидроксидом кальция. После ферментативного гидролиза таких образцов были получены субстраты с концентрацией восстанавливающих сахаров от 10 до 15 г/л.

Ключевые слова: целлюлозосодержащее сырье, мискантус, ферментативный гидролиз, биомасса, генотипирование.

ВВЕДЕНИЕ

Мискантус – род многолетних травянистых растений семейства мятликовых. К роду *Miscanthus* относят более 20 видов, распространенных от тропической и Южной Африки до Восточной и Юго-Восточной Азии. В России на Дальнем Востоке встречается 3 вида: мискантус сахароцветный (*Miscanthus sacchariflorus*), мискантус краснеющий (*Miscanthus purpurascens*), мискантус китайский (*Miscanthus sinensis*) (Открытый иллюстрированный атлас ..., www.plantarium.ru/page/view/item/41884.html).

В настоящее время в мире происходят увеличение площадей культивирования мискантуса (формы *M. × giganteus*) и разработка новых технологий на основе его биомассы. Мискантус считается одним из самых эффективных аккумуляторов солнечной энергии на планете (Dohleman, Long, 2009). Целлюлоза

растительной биомассы представляет собой практически неисчерпаемый источник возобновляемого сырья, которое может быть конвертировано ферментативным путем в глюкозу. В свою очередь, глюкоза является незаменимым сырьем для микробиологических процессов получения жидких и газообразных видов топлива (этанола, бутанола, этилена и др.), органических и аминокислот, кормового белка и многих других полезных продуктов микробиологического синтеза. Основной проблемой, ограничивающей использование растительной биомассы в биотехнологии, является отсутствие технологии обработки сырья, способной превратить клеточную стенку растений в субстрат для микроорганизмов. Разработка энергоэффективных технологий получения сахаросодержащего сырья из целлюлозосодержащей биомассы является краеугольным камнем современной биотехнологии. Задача ферментирования рас-

тительной биомассы решается уже длительное время, но интенсивные исследования были начаты относительно недавно с целью разработки технологии ферментативного биокатализа для промышленного производства (Dashtban *et al.*, 2009; Canilha *et al.*, 2012; Jönsson *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013).

Мискантус культивируется в сибирских условиях Институтом цитологии и генетики СО РАН. Его главные качества:

– высокая урожайность при минимальных затратах на возделывание (возможность получить до 15 т сухой массы в течение 15–20 лет после однократных затрат на его посадку);

– способность расти на почвах, непригодных для традиционного земледелия;

– хорошее соотношение содержания холоцеллюлозы и лигнина (Шумный, 2010а, б).

Мискантус сорт Сорановский внесен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, в 2013 г. По морфологическим данным образцы мискантуса сорта Сорановский могут относиться или к *M. sinensis*, или к *M. sacchariflorus*. Для точной видовой идентификации нового сорта был проведен анализ последовательности ДНК фрагмента пластидного межгенного спейсера.

Для оценки биотехнологического потенциала новой технической культуры проведен сравнительный анализ гидролизатов биомассы мискантуса коммерчески доступными целлюлазами после различных предобработок. Было изучено влияние механической и химических обработок на получение сахаров из биомассы мискантуса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований была использована биомасса мискантуса, выращенного на экспериментальных полях ИЦиГ СО РАН, урожая 2012 г.

Для выделения ДНК к 50 мг молотого мискантуса добавляли 1 мл буфера, содержащего 3 % СТАВ, 1 М NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 2 мМ ЭДТА, и инкубировали 1 ч при 60 °С при постоянном перемешивании. Затем к полученной смеси добавляли 1 мл хлороформа и центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин. К супернатанту добавляли равный объем изопропанола, перемешивали и центрифугировали

10 мин при 13000 об/мин. Осадок промывали 75 %-м этанолом, высушивали и растворяли в бидистиллированной воде.

Праймеры для амплификации фрагмента пластидного межгенного спейсера между генами *tRNA-Leu* и *tRNA-Phe*: Misc-Leu-Fw (5'-TGGAA-GCTGT-TCTAA-CGAAT-C-3') и Misc-Leu-Rv (5'-AATGG-GACTC-TCTCT-TTATC-CTC-3') были синтезированы фирмой «Биосан». Амплификацию фрагмента пластидного межгенного спейсера между генами *tRNA-Leu* и *tRNA-Phe* проводили по следующей схеме: 50 мкл реакционной смеси содержали 1,5 мМ MgCl₂, 65 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,05 % Tween-20, по 0,2 мМ dNTP, 0,3 мМ праймеров (*tRNA-Leu* и *tRNA-Phe*: Misc-Leu-Fw (5'-TGGAA-GCTGT-TCTAA-CGAAT-C-3') и Misc-Leu-Rv (5'-AATGG-GACTC-TCTCT-TTATC-CTC-3')), 1 нг матричной ДНК и 1 е.а. рекомбинантной Taq-полимеразы (SibEnzyme, Новосибирск). Профиль реакции: стадия денатурации – 2 мин при 94 °С; 30 циклов: 94 °С, 20 с; 55 °С, 20 с; 72 °С, 20 с. Полученный продукт секвенировали при помощи набора BigDye 3.1 (Applied Biosystems) с двух сторон при помощи указанных выше праймеров. Капиллярный электрофорез проводили в Межинститутском центре секвенирования СО РАН.

Помол проводили измельчителем МАН-30 (производства ЗАО МВМ, РФ). Порошки смешивали с водой в соотношении жидкая фаза к твердой – Ж/Т, мл/г, равном 10. Методики анализов биомассы взяты из книги «А.В. Оболенской, З.П. Ельницкой, А.А. Леоновича. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы» (М.: Экология, 1991). Определялись: растворимость в горячей воде (экстрактивность), выход холоцеллюлозы (целлюлоза + гемичеселлюлоза) хлорным методом, зольность, содержание альфа-целлюлозы и лигнина.

Ферментативный гидролиз проводили в течение 24 ч коммерчески доступным препаратом ЦеллоЛюксА при 50 °С. Фермент добавляли в соотношении 1 : 100 в расчете на исходную биомассу мискантуса влажностью 8 %, pH реакционной смеси доводили соляной кислотой до 5,5, перед добавлением ферментов смесь автоклавировали при 0,5 атм 20 мин.

Для химической обработки были использованы серная кислота (концентрация 1,5 %;

температура процесса 100 °С; соотношение Ж/Т, мл/г составляло 10, продолжительность реакции 20 ч); уксусная кислота (60 %, 100 °С; Ж/Т = 6, 3 ч), гидроксид натрия (2 %, 100 °С; Ж/Т = 6, 2 ч) и гидроксид кальция (7,5 %, 60 °С; Ж/Т = 10, 240 ч).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение видовой принадлежности мискантуса сорта Сорановский

Мискантус сорт Сорановский внесен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, в 2013 г. Исходный селекционный материал был получен в результате ботанических и ресурсных исследований Дальнего Востока (экспедиции ИЦиГ СО РАН в 1990-х годах) (Шумный, 2010а). В районах обследования род *Miscanthus* представлен тремя видами:

1. *M. sacchariflorus* (Maxim.) Benth. – мискантус сахароцветный. Растения с тонкими, ползучими корневищами. Нижняя цветковая чешуя с короткой прямой остью. Волоски хохолка белые, иногда красноватые.

2. *M. sinensis* Anderss. – мискантус китайский. Растения с укороченным толстым корневищем. Колосковые чешуи несут длинные волоски. Волоски хохолка негустые, сильно оттопыренные, грязно-белые, но нередко бывают красноватые.

3. *M. purpurascens* Anderss. – мискантус краснеющий. Растения с длинными, горизонтальными корневищами. Ветки соцветия неветвистые. Колосковые чешуи несут волосков. Хохолки после цветения густые, красноватые.

По морфологическим данным образцы мискантуса сорта Сорановский не были отнесены к конкретному виду. Для точной идентификации видовой принадлежности был проведен анализ консервативного участка его геномной ДНК.

На основе последовательностей представителей рода *Miscanthus* из GenBank был проведен дизайн праймеров для амплификации фрагмента пластидного межгенного спейсера между генами tRNA-Leu и tRNA-Phe. Этот короткий фрагмент (202 п.н. без праймеров) содержит две полиморфные позиции, отличающие *M. sinensis* от *M. sacchariflorus*. Полученный фрагмент ДНК длиной 202 п.н. был идентичен послед-

овательностям *M. sacchariflorus* из GenBank, а также последовательностям *M. × giganteus*, *M. lutarioriparius* и *M. changii*. Известно, что *M. × giganteus* является аллотриплоидным гибридом *M. sacchariflorus* и *M. sinensis* и имеет пластидный геном от *M. sacchariflorus* (Hodkinson *et al.*, 2002a). *M. lutarioriparius* – одно из названий *M. sacchariflorus* spp. *lutarioriparius* – подвида *M. sacchariflorus* (Sun *et al.*, 2010). *M. changii* встречается также под названием *M. longiberbis* var. *changii*. Указаний на систематические отношения этого вида с *M. sacchariflorus* и *M. sinensis* найти не удалось.

Полученная последовательность отличалась одной заменой T > G в позиции выравнивания 60 от последовательности *M. sinensis* AB622625. От всех остальных последовательностей *M. sinensis*, а также *M. oligostachyus*, *M. junceus* и *M. floridulus* она отличалась двумя заменами: T > G в позиции 60 и A > T в позиции 183 (AB622623, AB622624, AB622626-AB622628, AJ426570-AJ426573, EU434104, GQ870006, JN544253, JN544254, JN642289-JN642291).

Виды *M. oligostachyus*, *M. junceus* и *M. floridulus* – близкородственные виды к *M. sinensis* и *M. sacchariflorus*; *M. oligostachyus* встречается также под названием *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. По данным молекулярно-филогенетического анализа (Hodkinson *et al.*, 2002b), представители этой группы видов не выделяются в монофилетичные ветви. Кроме того, систематика этой группы осложняется случаями неправильного определения.

Так как по морфологическим данным образцы мискантуса сорта Сорановский могут относиться или к виду *M. sinensis*, или к виду *M. sacchariflorus*, то на основании анализа последовательности ДНК фрагмента пластидного межгенного спейсера tRNA-Leu-Phe мискантуса сорта Сорановский был отнесен к виду *M. sacchariflorus*.

Предобработка и гидролиз биомассы

Растворимость нарезанной соломы мискантуса в горячей воде весьма невелика – всего 3,8 % от взятой массы. Помол даже без каких-либо добавок заметно увеличивает растворимость биомассы в горячей воде – до 7,7 % (экстрактивные вещества). Содержание холоцеллюлозы (70 %)

характеризует предельно возможный процент конверсии биомассы в сахара, поскольку других полисахаридов в биомассе нет. На рис. 1 приведен анализ химического состава биомассы.

Альфа-целлюлоза входит в состав холоцеллюлозы, однако ее содержание представляет самостоятельный интерес, в силу того что это наиболее трудно гидролизуемая часть растительной биомассы. Лигнин – сложное полимерное вещество, не относящееся к полисахаридам. Лигнин скрепляет целлюлозные волокна и обеспечивает твердый и жесткий матрикс, усиливающий прочность клеточных стенок на растяжение и в особенности на сжатие. Это главный опорный материал дерева. Он также предохраняет клетки от повреждения под действием физических и химических факторов. Перевод лигнина в растворимую форму является принципиальным моментом, существенно облегчающим гидролиз биомассы. Лигнин имеет самостоятельную коммерческую ценность, возможно, его отделение и реализация как побочного продукта может способствовать повышению рентабельности комплексной переработки биомассы мискантуса.

Размеры клетки листа злаковых составляют 30–40 мкм (Зверева, 2010). Получение порошков биомассы с размерами частиц порядка размеров клетки может привести к существенному увеличению выхода сахаров в процессе ферментативного гидролиза. Развитие современных технологий помола позволяет достигать тонины помола, сопоставимой с размерами клетки листа злаков. Для помола соломы мискантуса использован измельчитель МАН-30. Для повышения степени деструкции биомассы в процессе помола были добавлены хлорид натрия, поташ (K_2CO_3) или речной песок в соотношении 10 % по массе. Предобработку биомассы проводили с целью

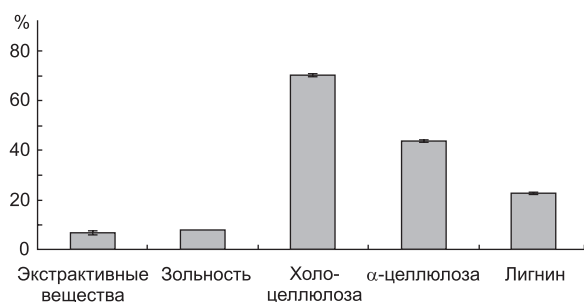


Рис. 1. Химический анализ биомассы мискантуса.

увеличения выхода сахаров при последующем ферментативном гидролизе.

После помола был проведен ферментативный гидролиз. На рис. 2 приведены результаты анализа полученных гидролизатов на содержание глюкозы и восстанавливающих сахаров.

Из рис. 2 видно, что в исходных препаратах практически отсутствует глюкоза, а концентрация общих восстанавливающих сахаров составляет чуть больше 2 г/л. Ферментативный гидролиз неодинаково эффективен после помолов с различными добавками. Интересно, что достаточно высокие концентрации сахаров, как глюкозы, так и общих восстанавливающих, получены после помола с речным песком. Возможно, достаточно твердые частицы песка во время помола увеличивают степень деструкции растительных тканей, облегчая впоследствии доступ ферментов к полисахаридам. Наибольший выход сахаров получен после помола с K_2CO_3 . По-видимому, дополнительная щелочная обработка оказалась достаточно благоприятной для последующего ферментативного гидролиза.

Для той же цели – повышение выхода сахаров при ферментативном гидролизе – после помола биомассы были проведены химические

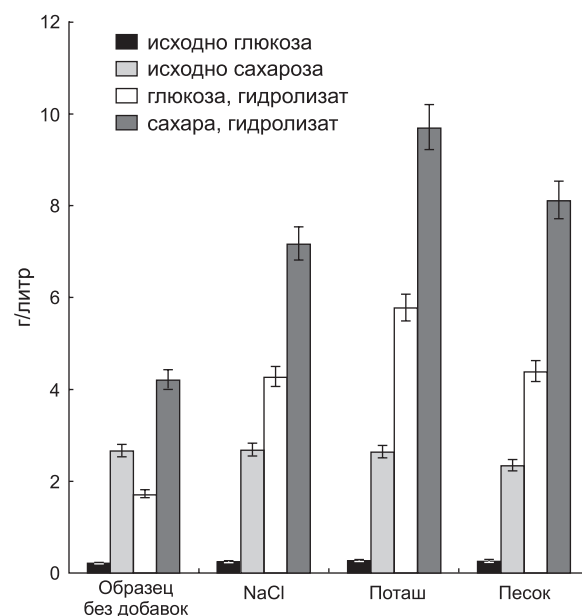


Рис. 2. Концентрация глюкозы и общих восстанавливающих сахаров в образцах биомассы до и после ферментативного гидролиза.

Образец без добавок – суспензия измельченной биомассы в воде, NaCl, поташ и песок – суспензии измельченной с соответствующей добавкой биомассы в воде.

предобработки. По окончании реакции смеси подвергались ферментативному гидролизу. Результаты анализа содержания глюкозы и общих восстанавливающих сахаров до и после ферментативного гидролиза в реакционных смесях приведены на рис. 3.

Из рис. 3 видно, что исходные (негидролизованные ферментативно, но по-разному обработанные) образцы биомассы существенно различаются не только по количеству глюкозы и общих восстанавливающих сахаров, но и по их соотношению, вероятно, в результате частичного гидролиза гемицеллюлозы химическими агентами, например, после обработки серной кислотой. После предобработки серной кислотой наблюдается максимальный химический гидролиз. В этой реакционной смеси ферментативный гидролиз привнес лишь незначительную прибавку по выходу общих сахаров, прибавка по

содержанию глюкозы была значительнее – более 1 г/л. Минимальный химический гидролиз прошел при обработке гидроксидом кальция. В этой реакционной смеси продукция сахаров получена в основном за счет ферментативного гидролиза. Оба помолы и уксуснокислая делигнификация дали около 2 г/л общих восстанавливающих сахаров, однако ферментативный гидролиз эффективно прошел только после уксуснокислой обработки биомассы.

Таким образом, наибольший выход сахаров получен в результате ферментативного гидролиза образцов, полученных помолом с последующими предобработками: уксуснокислой делигнификацией, обработкой серной кислотой или гидроксидом кальция. Следует отметить, что содержание биомассы в образцах неодинаково: в образцах $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и H_2SO_4 Ж/Т = 10, в то время как в образце AcOH Ж/Т = 6.

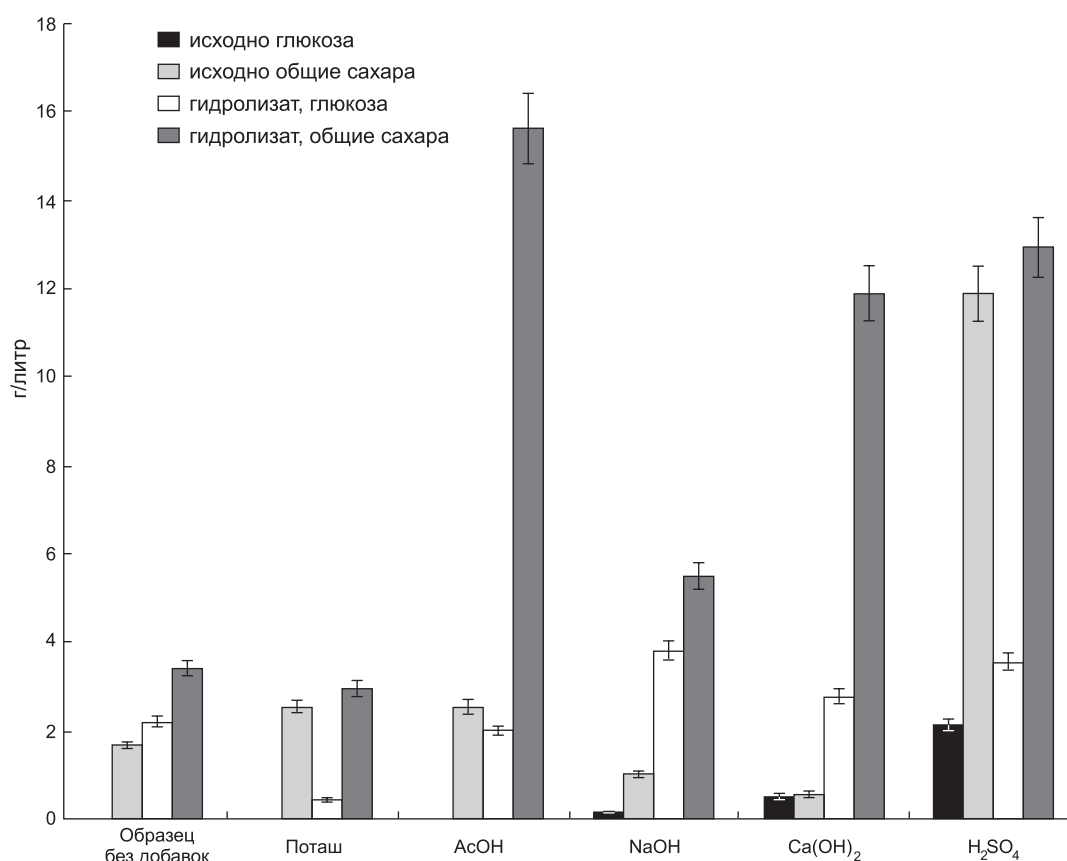


Рис. 3. Концентрация глюкозы и общих восстанавливающих сахаров в образцах биомассы до и после ферментативного гидролиза.

Образец без добавок – суспензия измельченной биомассы в воде, поташ – суспензия измельченной с поташем биомассы в воде, AcOH – обработка уксусной кислотой, NaOH , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и H_2SO_4 – обработки соответствующими реагентами. Для образцов: без добавок, поташ и AcOH – исходные значения по глюкозе не определяли.

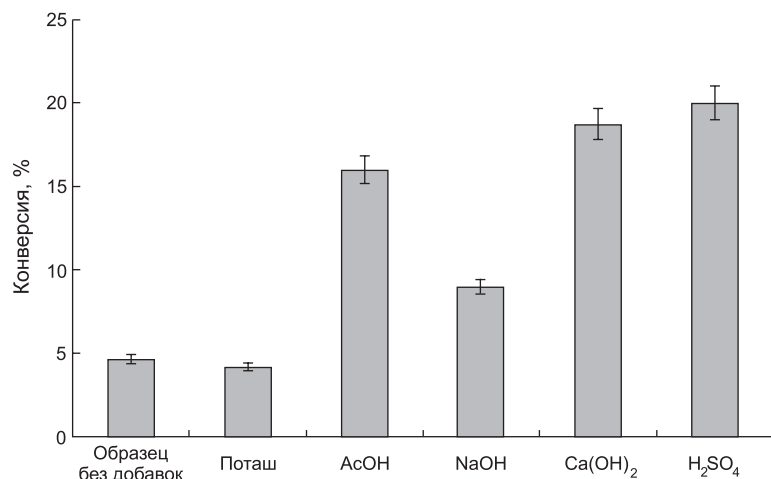


Рис. 4. Конверсия биомассы в общие восстанавливающие сахара после механической, химической и последующей ферментативной обработок.

В результате механической, химической и последующей ферментативной обработок конверсия биомассы в общие восстанавливающие сахара составляет от 4 до 20 % (рис. 4).

Расчет степени конверсии биомассы в сахара проводили с учетом соотношения жидкой и твердой фаз в реакционных смесях. В пересчете на 70 % полисахаридов в составе биомассы и пропорцию Ж/Т получаем предельно возможную концентрацию полисахаридов 64 г/л в случае Ж/Т = 10 и 99 г/литр в случае Ж/Т = 6. Для различных видов помола полученные 3 г/л общих восстанавливающих сахаров составляют 4,7 %-ю конверсию биомассы от теоретически возможного значения. Для уксусной кислоты полученные 16 г/л общих восстанавливающих сахаров составляют 16 %-ю конверсию биомассы от теоретически возможного значения. Для Ca(OH)₂ полученные 12 г/л составляют 18,75 % от теоретически возможного значения.

Таким образом, в результате механической, химической и последующей ферментативной обработок конверсия биомассы в общие восстанавливающие сахара составляет 16–18 % от теоретически возможного значения. Наилучший результат получен при использовании помола с последующей обработкой гидроксидом кальция.

Показано, что общее содержание полисахаридов в биомассе мискантуса составляет 70 %, а лигнина – более 20 %. Мискантус может служить перспективным источником возобновляемого сырья для получения сахаросодержащих сиропов, широко востребованных для биотехнологических нужд и получения лигнина. Улуч-

шение ферментативного гидролиза биомассы до предельно возможного и разработка методов выделения лигнина позволят перерабатывать биомассу мискантуса более чем на 90 %.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК 14.512.11.0072 от 19.04.2013 г.) в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 гг.»

ЛИТЕРАТУРА

- Зверева Г.К. Структурная организация мезофилла листовых пластинок злаков увлажненных местообитаний // Электрон. журн. Ботан. сада-института ДВО РАН. 2010. Т. 5. Р. 51–54.
- Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Экология, 1991.
- Открытый иллюстрированный атлас сосудистых растений России и сопредельных стран <http://www.plantarium.ru/page/view/item/41884.html>
- Шумный В.К., Колчанов Н.А., Сакович Г.В. и др. Поиск возобновляемых источников целлюлозы для многоцелевого использования // Вестн. ВОГиС. 2010а. Т. 14. № 3. С. 569–578
- Шумный В.К., Вепрев С.Г., Нечипоренко Н.Н. и др. Новая форма мискантуса китайского (Веерника китайского *Miscanthus sinensis* Anders.) как перспективный источник целлюлозосодержащего сырья // Вестн. ВОГиС. 2010б. Т. 14. № 1. С. 122–126.
- Canilha L., Chandel A.K., dos Santos Milessi T.S. *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation // J. Biomed Biotechnol. 2012.

989572. Published online 2012 November 26. doi: 10.1155/2012/989572
- Dashtban M., Schraft H., Qin W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives // *Int. J. Biol. Sci.* 2009. V. 5. No. 6. P. 578–595.
- Dohleman F.G., Long S.P. More productive than maize in the midwest: how does *Miscanthus* do it? // *Plant. Physiol.* 2009. V. 150. No. 4. P. 2104–2115.
- Hodkinson T.R., Chase M.W., Lledó M.D. *et al.* Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL-intron and trnL-F intergenic spacers // *J. Plant Res.* 2002b. V. 115. No. 5. P. 381–392.
- Hodkinson T.R., Chase M.W., Takahashi C. *et al.* The use of dna sequencing (ITS and trnL-F), AFLP, and fluorescent in situ hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae) // *Amer. J. Bot.* 2002a. V. 89. No. 2. P. 279–286. doi: 10.3732/ajb.89.2.279.
- Jönsson L.J., Alriksson B., Nilvebrant N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification // *Biotechnol. Biofuels.* 2013. V. 6. Issue 1. P. 16. Published online 2013 doi: 10.1186/1754-6834-6-16
- Silva J.P.A., Carneiro L.M., Roberto I.C. Treatment of rice straw hemicellulosic hydrolysates with advanced oxidative processes: a new and promising detoxification method to improve the bioconversion process // *Biotechnol. Biofuels.* 2013. 6: 23. Published online 2013 February 15. doi: 10.1186/1754-6834-6-23
- Sun Q., Lin Q., Yi Z-L. *et al.* A taxonomic revision of *Miscanthus* s.l. (Poaceae) from China // *Bot. J. Linn. Soc.* 2010. V. 164. P. 178–220.

THE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF THE NEW CROP, MISCANTHUS CV. SORANOVSKII

**N.M. Slynko, T.N. Goryachkovskaya, S.V. Shekhovtsov, S.V. Bannikova, N.V. Burmakina,
K.V. Starostin, A.S. Rozanov, N.N. Nechiporenko, S.G. Veprev, V.K. Shumny,
N.A. Kolchanov, S.E. Peltek**

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: peltek@bionet.nsc.ru

Summary

Miscanthus cv. Soranovskii was registered as a state breeding achievement in 2013. On the base of phenotyping and DNA sequencing, the new crop was identified as *Miscanthus sacchariflorus*. The development of methods for converting its biomass to sugar-containing substrate for biotechnological use is in progress. Effects of mechanical and chemical treatments combined with enzymatic hydrolysis on sugar production from *Miscanthus* biomass have been studied. The best procedure includes grinding to ~100 µm particles followed by treatment with calcium hydroxide. Enzymatic hydrolysis of such materials yields substrates containing 10 to 15 g/L reducing sugars.

Key words: cellulose materials, *Miscanthus*, enzymatic hydrolysis, biomass, genotyping.