

А.А. Кулаипбекова*, А.Ч. Каташева, А.Ж. Жеңісова, Ә.У. Байбекова

Алматы технологиялық университеті, Қазақстан
*Хат-хабарларға арналған автор: ak04erke22@gmail.com

Aspergillus niger L-4 штамымен ашыту кезінде инвертаза биосинтезін зерттеу

Азық-түлік өнімдерінде ферменттерді немесе микроорганизмдерді пайдалану ұзақ уақыт бойы жалғасатын процесс. Технологияның жетістіктерімен қолданудың кең ауқымымен ерекшеліктері бар жаңа ферменттер жасалды және жаңа қолданбалар әлі де зерттелуде. Бактериялар, ашытқылар және микромицеттер сияқты микроорганизмдер және олардың ферменттері тағамдық препараттарда дәммен құрылымын жақсарту үшін кеңінен қолданылады және олар өнеркәсіпке экономикалық пайда әкеледі. Микробтық ферменттердің өндірісі қарапайымдылық, үнемділік және тұрақтылық сияқты артықшылықтарға ие. Ферменттерді зерттеу ерекше қызығушылық тудырады, өйткені ферменттік препараттар әртүрлі салаларда, ауыл шаруашылығында, медицинада және гендік инженерияда кеңінен пайдаланылады. Биокатализатор ретінде микробтық текті ферменттер процесті бейорганикалық катализаторларға қарағанда жоғары жылдамдықпен жүреді. Мақалада лимон қышқылын өндіруші *Aspergillus niger* L-4 микромицет штамының ұнтақталған қарабидай дәнінің гидролизатынан тұратын коректі кортада өсіргенде инвертаза ферментін синтездеу қабілеті талқыланады. Инвертаза биосинтезін зерттеу негізінде ұнтақталған қара бидай дәнін гидролиздеудің ең қолайлы және үнемді нұсқасы ферментті препараттардың дозаларын қолдану екені анықталды: Целловиридин — 4 ед/г, Амилоубтилин — 2 ед/г және β-глюканаза — 3 ед/г. Бұл жағдайларда еритін көмірсулардың мөлшері (%) құрады: DU — 43,7 ± 3,4, глюкоза — 16,8 ± 1,3, мальтоза — 76,8 ± 3,8, декстриндер — 6,4 ± 0,5 және қышқылдың мөлшері β-глюканаза жоқ нұсқаға қарағанда жоғары.

Кілт сөздер: биосинтез, фермент, инвертаза, лимон қышқылы, қара бидай дәнін ұнтақтау, *Aspergillus niger*, ашыту, микромицеттер.

Kipicne

Қазіргі уақытта инвертаза ферменті ТМД елдерінде өндірілмейді. Қазақстан нарығы бұл ферменттің едәуір бөлігін шетелден сатып алады [1–5]. Әдеби деректерге сәйкес инвертазаның өнеркәсіптік препараттарын өндіру үшін *Aspergillus* және *Renicilla* ашытқы штамдары шетелде қолданылады [6–10]. Демек, лимон қышқылын өндіруші *Aspergillus niger* микромицетін пайдалану отандық өндірушілердің мүмкіндіктерін кеңейтеді деген қорытынды жасауға болады [11–13].

Бұл зерттеу жұмысының мақсаты ұнтақталған қара бидай дәнінің гидролизатын *Aspergillus niger* L-4 штамымен ашыту кезінде инвертаза биосинтезін зерттеу болып табылады.

Осы мақсатқа жету үшін келесі міндеттер қойылды:

- ферменттік препараттардың қасиеттерімен танысу;
- қара бидай дәнін ұнтақтау құрамын және оның соңғы өнімге әсерін зерттеу;
- гидролизаттағы глюкозаның, мальтозаның және декстриндердің мөлшерін талдау;
- инвертаза биосинтезін зерттеудегі ғылыми бағытты таңдауды негіздеу.

Зерттеу нысандарымен әдістері

Зерттеу нысаны ретінде көмірсутекті шикізатты лимон қышқылына ашыту үшін БТҚҒЗИ ФМБҒМ-те шығарылған *Aspergillus niger* L-4 микромицетті штамы болды [14–17].

Тартылған қара бидай дәнінің гидролизаты келесідей дайындалды. Алдымен қара бидай дәнін ұнтақтау ағынды сумен (гидромодуль қатынасы 1:3) араласып, сіңіру үшін бір күнге қалдырылды. Қара бидай дәнін ұнтақтаудағы көмірсутекті құрамдас бөліктерді аспергиллге қолжетімді түрге, атап айтқанда моно- және дисахаридтерге айналдыру үшін қара бидай дәнін ұнтақтау целлюлолитикалық, амилолитикалық және глюканаза ферменттерінің препараттарын қолдану арқылы гидролиздендірілді. Алдымен целлюлолитикалық әсер ететін ферменттік препарат — целловиридин және β-глюканаза (екінші тәжірибе үшін) қосылды, бұрын 20 см³ тазартылған суда сұйылтылған және үнемі араластыра отырып, су моншасында 50–55 °С температурада 1 сағат ұсталды. Содан кейін алдын ала 20 см³ дистилденген суда сұйылтылған амилолитикалық әсері бар препарат — амилоубтилин қосылды және температурасы 80–85 °С дейін жеткізіліп, үнемі араластыра отырып, су моншасында 1 сағат ұсталды [18].

Лимон қышқылының өндірушісі — Fungi патшалығына, Neomycota қосалқы патшалығына, Ascomycota бөліміне, Euascomycotina бөлімшесіне, Plectomycetes класына жататын *Aspergillus niger* саңырауқұлағы болып табылады. Бұл жұмыста *Aspergillus niger* L-4 саңырауқұлақ штамы қолданылды [19–22].

Микробиологиялық синтез үшін субстрат ретінде қара бидай дәнін ұнтақтау арқылы дайындалған гидролизат пайдаланылды. ГОСТ 16990–2017 сәйкес Омбы ауданының стандартты сапалы қара бидай дәндерін қолданды. Азот көзі ретінде аммоний нитраты зерттелді (ГОСТ 29302–92).

Гидролизаттардың көмірсулар құрамы Смирнов анықтаған Зихерд-Блейер әдісімен анықталды (1-кесте).

К е с т е 1

Қара бидай дәнін ұнтақтау гидролизаттарының құрамы

Нұсқалар	Декстроза эквиваленті ДЕ, %	Гидролизаттардағы қант сомасындағы көмірсулардың үлесі, %		
		глюкоза	мальтоза	декстриндер
I нұсқа (Целловиридин — 2 б/г, Амилосубтилин — 1 б/г)	36,6±1,4	10,3±0,4	33,9±1,3	55,6±2,2
II нұсқа (Целловиридин — 4 б/г, Амилосубтилин — 2 б/г)	71,8 ± 2,8	5,3 ± 0,2	52,1 ± 2	42,6 ± 1,7
III нұсқа (Целловиридин — 6 б/г, Амилосубтилин — 3 б/г)	66 ± 3	4,3 ± 0,1	47,5 ± 1,9	48,2 ± 1,9
2 β-глюканаза ферментін қосумен тәжірибе				
I нұсқа (Целловиридин — 4 б/г, Амилосубтилин — 2 б/г)	36,6±1,4	5,3 ± 0,2	52,1 ± 2	42,6 ± 1,7
II нұсқа (Целловиридин — 4 б/г, Амилосубтилин — 2 б/г және β-глюканаза — 3 б/г)	43,7±1,7	16,8±0,6	76,8±3,1	6,4±0,2
III нұсқа (Целловиридин — 4 б/г, Амилосубтилин — 2 б/г және β-глюканаза — 6 б/г)	57,8±2,3	13,2±0,5	39,6±1,4	47,2±1,8

Бірінші тәжірибеде 1 нұсқа үшін ферменттік препараттар дозасы: целловиридин — 2 бірлік/г және амилосубтилин — 1 бірлік/г құрайды. 2 нұсқа үшін ферменттік препараттар: целловиридин — 4 бірлік/г және амилосубтилин — 2 бірлік/г құрайды. 3 нұсқа үшін ферменттік препараттар: целловиридин — 6 бірлік/г және амилосубтилин — 3 бірлік/г құрайды.

Екінші тәжірибеде ферменттік препараттар дозасы 1 нұсқасы үшін: целловиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г құрайды. 2 нұсқа үшін ферменттік препараттар дозасы: целловиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г және β-глюканаза — 3 ед/г құрайды. 3 нұсқа үшін ферменттік препараттар дозасы: целловиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин-2 бірлік/г және β — глюканаза-6 бірлік/г. Дайын ерітіндіні салқындатып, рефрактометрден құрғақ заттардың құрамы қаралды.

Алынған зерттеу нәтижелері

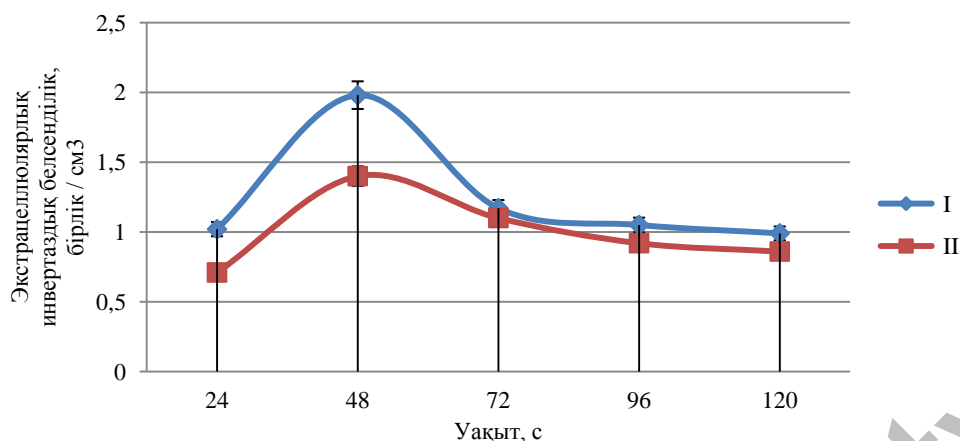
Ашыту Multitron (INFORS, Швейцария) шейкер-инкубатор жағдайында сыйымдылығы 750 см³ болатын шайқағыш колбаларда мицелийді алу сатысында — 32 °С температурасында минутына 230 айналым, ашыту сатысында — 32 °С температурасында минутына 230 айналым жасалды.

Бірінші суретте қара бидай дәнін ұнтақтау гидролизаттарында *Aspergillus niger* Л-4 штамының экстрацеллюлярлық инвертазалық белсенділігінің өсіру уақытына тәуелділігі көрсетілген.

Графиктен *Aspergillus niger* L-4 штамын өсіру кезінде ашыту процесінің 2-ші тәулікте нативті ерітіндідегі инвертаза белсенділігінің максимумына қол жеткізілетінін көруге болады. Бірінші нұсқада инвертаза белсенділігі — 1,9 бірлік/см³ нативті ерітіндіні, ал екінші нұсқада — 1,4 бірлік/см³ нативті ерітіндіні құрайды. 120 сағатқа қарай (ашыту процесінің соңында) инвертаза белсенділігі төмендейді.

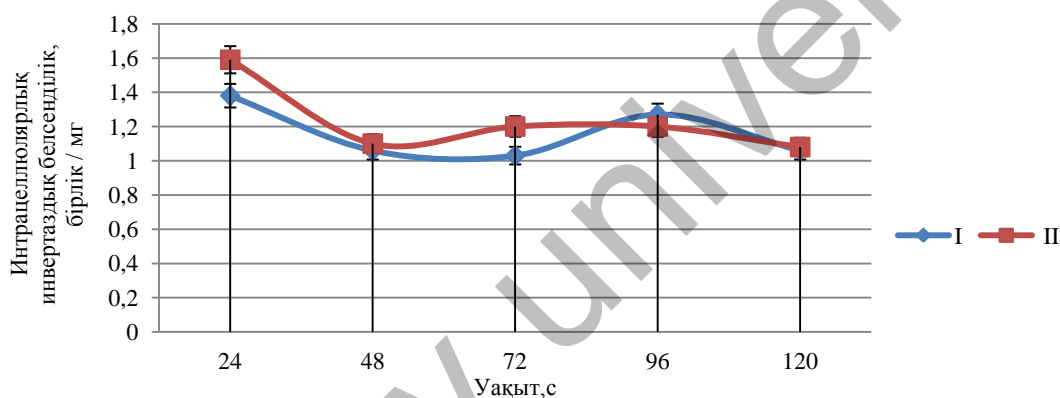
Екінші суретте қара бидай дәнін ұнтақтау гидролизаттарында *Aspergillus niger* Л-4 штамының интрацеллюлярлық инвертазалық белсенділігінің өсіру уақытына тәуелділігі көрсетілген.

Графиктен *Aspergillus niger* L-4 штамын өсіру кезінде ашыту процесінің 1-ші тәулікте мицелиядағы инвертаза белсенділігінің максимумына қол жеткізілетінін көруге болады. Бірінші нұсқада инвертаза белсенділігі — 1,38 бірлік/мг мицелиалды массаны, ал екінші нұсқада — 1,6 бірлік/мг мицелиалды массаны құрайды. 120 сағатқа қарай (ашыту процесінің соңында) инвертаза белсенділігі төмендейді.



1-нұсқа — целловиридин — 1 бірлік/г және амилосубтилин — 0,5 бірлік/г;
2-нұсқа — целловиридин — 2 бірлік/г және амилосубтилин-1 бірлік/г

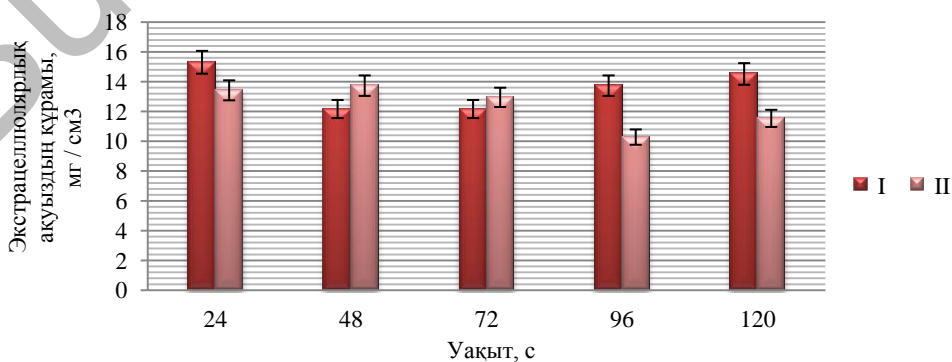
Сурет 1. Қара бидай дәнін ұнтақтау гидролизатында *Aspergillus niger* Л-4 штамын өсіру кезіндегі экстрацеллюлярлық инвертазалық белсенділік динамикасы



1-нұсқа — целловиридин — 1 бірлік/г және амилосубтилин — 0,5 бірлік/г;
2-нұсқа — целловиридин-2 бірлік/г және амилосубтилин-1 бірлік/г

Сурет 2. Қара бидай дәнін ұнтақтау гидролизатында *Aspergillus niger* Л-4 штамын өсіру кезіндегі интрацеллюлярлық инвертазалық белсенділік динамикасы

Барлық ферменттердің ақуыз сипатына сүйене отырып, культуралды сұйықтықтың ақуыз компоненттерінің жалпы санын анықтау үшін Лоури әдісі қолданылды. *Aspergillus niger* микромицетінің нативті ерітіндісіндегі ақуыз мөлшерін анықтау нәтижелері 3-суретте көрсетілген.

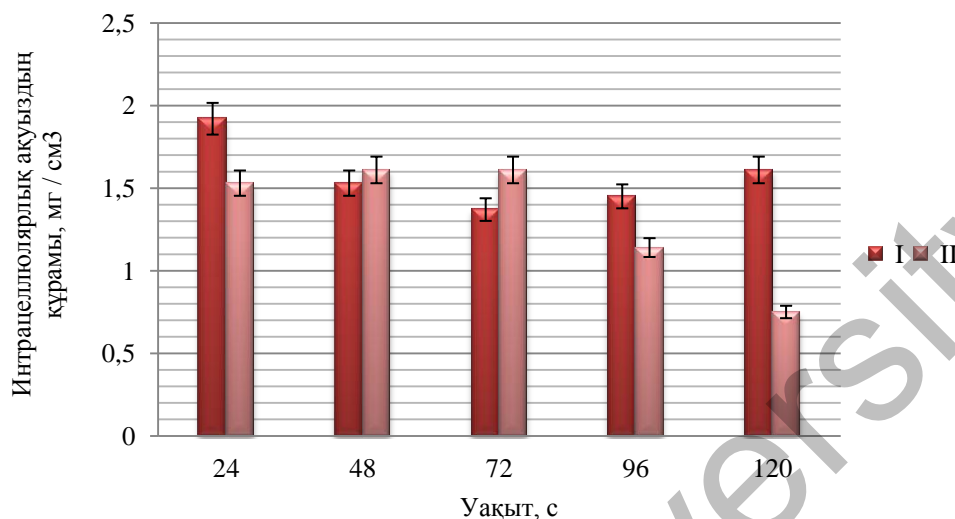


1-нұсқа — целловиридин — 1 бірлік/г және амилосубтилин — 0,5 бірлік/г;
2-нұсқа — целловиридин — 2 бірлік/г және амилосубтилин — 1 бірлік/г

Сурет 3. Нативті ерітіндідегі ақуыз мөлшерін анықтау

Кесте бойынша бірінші нұсқадағы экстрацеллюлярлы ақуыз мөлшері бірінші тәулікте (24 сағат) $15,3 \pm 1,1$ бірлік/см³ деңгейіне көтерілгенін көруге болады. Ал екінші нұсқада ол 2 тәулікке $13,7 \pm 0,7$ бірлік/см³ деңгейіне көтеріледі, содан кейін біртіндеп $10,3 \pm 0,5$ бірлік/ см³ дейін төмендейді.

Aspergillus niger микромицет мицелийіндегі ақуыз мөлшерін анықтау нәтижелері 4-суретте көрсетілген.



1-нұсқа — целловиридин — 1 ед/г және амилосубтилин — 0,5 бірлік/г;
2-нұсқа — целловиридин — 2 ед/г және амилосубтилин — 1 ед/г

Сурет 4. Мицелийдағы ақуыз мөлшерін анықтау

Бірінші нұсқадағы интрацеллюлярлы ақуыздың мөлшері 1 тәулікте (24 сағат) $1,9 \pm 0,1$ бірлік/мг мицелий деңгейіне дейін, екінші нұсқада 2 тәулікте (48 сағ) $1,6 \pm 0,1$ бірлік/мг деңгейіне дейін көтеріледі, содан кейін бесінші тәулікте $0,7 \pm 0,1$ бірлік/мг мицелий деңгейіне дейін төмендейді.

Кесте 2

Инвертаза биосинтезіне қоректік ортадағы ферменттік препараттар дозасының әсері (120 сағат)

Ферменттердің дозалары		1 нұсқа	2 нұсқа
Инвертаза белсенділігі*	Интрацеллюлярлық, ед/мг	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
	Σ, ед	3417 ± 170	3948 ± 197
	Экстрацеллюлярлық, ед/см ³	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,04$
	Σ, ед	$103,9 \pm 5,2$	$86 \pm 4,3$
Ақуызмөлшері*	Мицелиалды массада	$1,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,03$
	Σ, мг	$5,2 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,1$
	Нативті ерітіндіде	$14,5 \pm 0,7$	$11,5 \pm 0,6$
	Σ, мг	1525 ± 76	1154 ± 57
Қышқыл мөлшері Σ, г		$2,4 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$

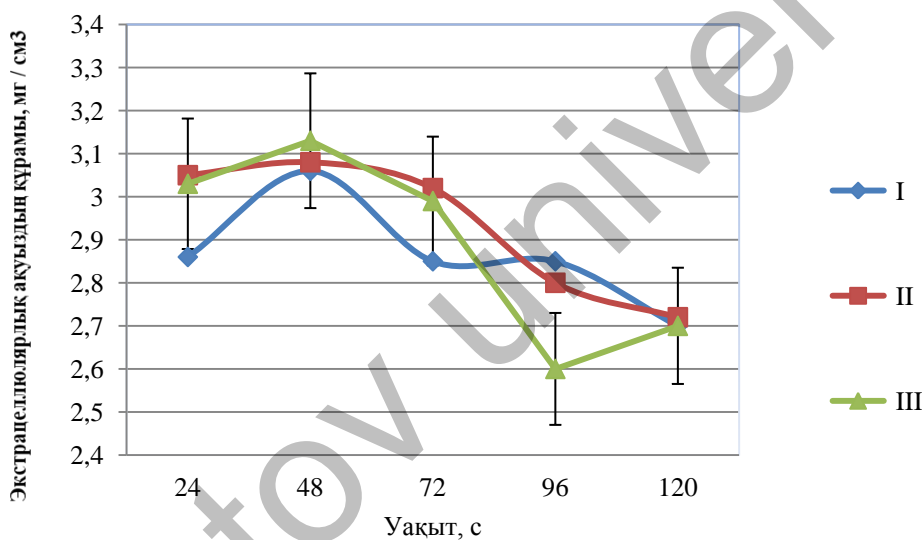
* — қатты заттарға қайта есептеу (ылғалдылығы 10 %)

Салыстыру үшін біз ферменттік препараттардың әртүрлі дозаларының 3 нұсқасымен екінші тәжірибе жасадық. 1-ші нұсқада ферменттік препараттардың дозасы: целловиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г, 2-ші нұсқада ферменттік препараттардың дозасы: целловиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г және β-глюканаза — 3 бірлік/г, 3-ші нұсқа үшін ферменттік препараттардың дозасы: целловиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г, 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г және β-глюканаза — 6 ед/г құрайды. Дайын ерітінді салқындатылып, рефрактометрдегі құрғақ заттардың құрамы қаралды. Гидролизаттардың көмірсулар құрамы Смирнов анықтаған Зихерд-Блейер әдісімен анықталды (3-кесте). Аспергиллдер сахароза мен оның гидролиз өнімдері (глюкоза, фруктоза) бар көмірсулар құрамындағы күрделі ортада өсіру кезінде инвертаза тиімді синтезделетіні белгілі.

Қара бидай дәнін ұнтақтау гидролизаттарының құрамы (автоклапта залалсыздандыруға дейін және одан кейін)

Декстроза эквиваленті DU, %	Гидролизаттардағы қант мөлшеріндегі көмірсулардың үлесі, %		
	глюкоза	мальтоза	декстриндер
Автоклаптауға дейін			
60,5±3,6	6,7±0,4	47,1±2,3	46,3±3,7
62±4,3	13,1±0,6	83,6±4,2	3,3±0,2
50±3	9,5±0,3	47,1±2,8	43,4±2,2
Автоклапта залалсыздандырудан кейін			
36,6±2,2	10,3±0,7	33,9±2,1	55,6±3,3
43,7±3,4	16,8±1,3	76,8±3,8	6,4±0,5
57,8±2,8	13,2±0,6	39,6±1,9	47,2±2,4

Бесінші суретте *Aspergillus niger* L-4 штамының жасушадан тыс инвертаза белсенділігінің өсіру уақытына қара бидай дәнін ұнтақтау гидролизаттарына тәуелділігінің графигі келтірілген.



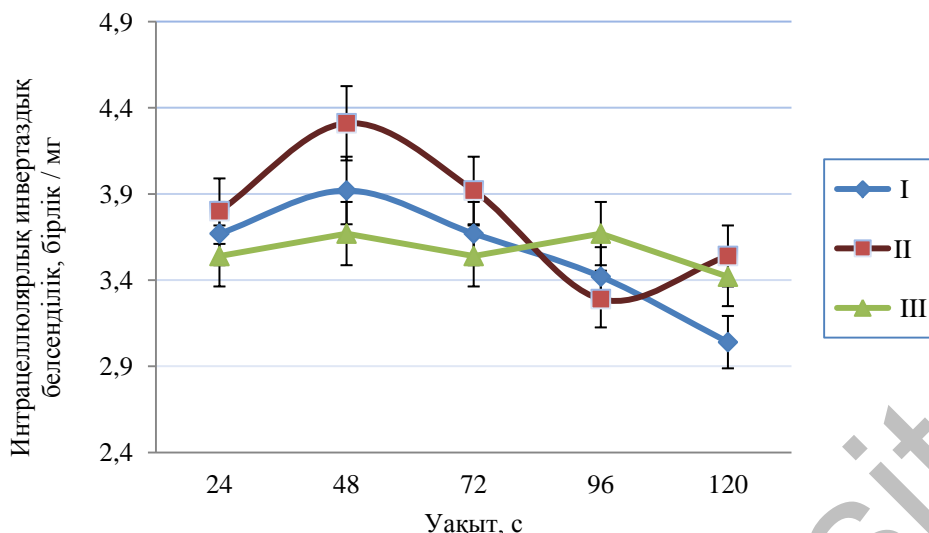
1-нұсқа үшін ферменттік препараттардың дозалары: целловиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г; 2-нұсқа үшін ферменттік препараттардың дозалары: целловиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г және β-глюканаза — 3 бірлік/г; 3-нұсқа үшін ферменттік препараттардың дозалары: целловиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г және β-глюканаза — 6 бірлік/г

Сурет 5. Ұсақталған қара бидай дәнінің гидролизатында *Aspergillus niger* L-4 штамын өсіру кезіндегі жасушадан тыс инвертаза белсенділігінің динамикасы

Графиктен *Aspergillus niger* L-4 штамын өсіру кезінде нативті ерітіндідегі инвертазаның максималды белсенділігіне ашыту процесінің 2-ші күні қол жеткізілетінін көруге болады. Бірінші нұсқада инвертаза белсенділігі 3,1 бірлік/см³ нативті ерітінді, ал екінші нұсқада 3,2 бірлік/см³ нативті ерітінді, үшінші нұсқада инвертаза белсенділігі 3,2 бірлік/см³.

Алтыншы суретте *Aspergillus niger* L-4 штамының жасушаішілік инвертаза белсенділігінің өсіру уақытына қара бидай дәнін ұнтақтау гидролизаттарына тәуелділігінің графигі келтірілген.

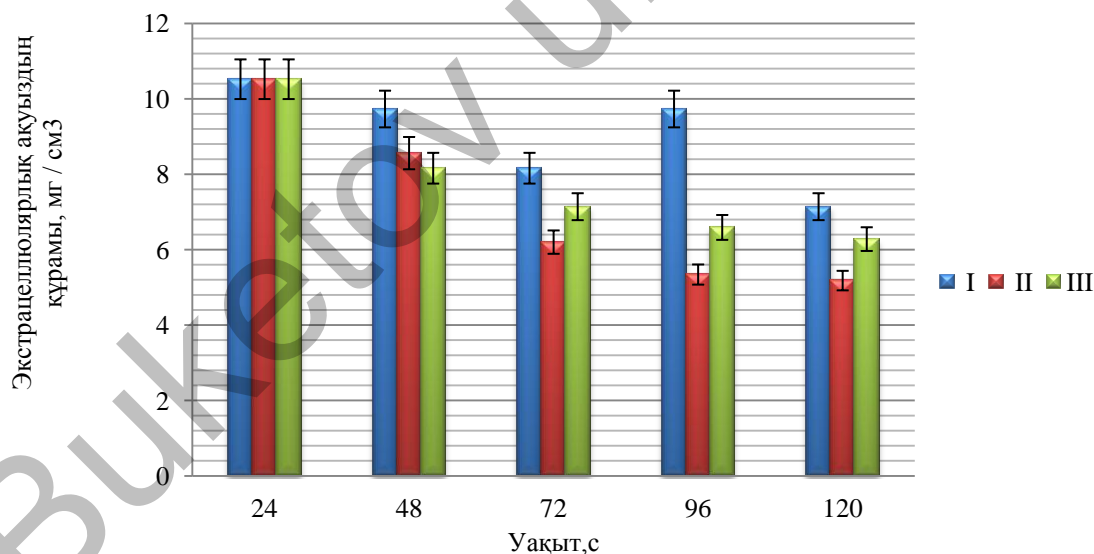
Графиктен *Aspergillus niger* L-4 штамын өсіру кезінде мицелийдағы инвертазаның максималды белсенділігіне ашыту процесінің 2-ші күні қол жеткізілетінін көруге болады. Бірінші нұсқада инвертаза белсенділігі мицелий массасының 3,9 бірлік /мг, ал екінші нұсқада мицелий массасының 4,3 бірлік /мг, ал үшінші нұсқада инвертаза белсенділігі 3,7 бірлік /мг құрайды.



1-нұсқа үшін ферменттік препараттардың дозасы: целовиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г болды; 2-нұсқа үшін ферменттік препараттардың дозалары: целовиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г және β-глюканаза — 3 бірлік/г; 3-нұсқа үшін ферменттік препараттардың дозалары: целовиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г және β-глюканаза — 6 бірлік/г

Сурет 6. Қара бидай дәнінің гидролизатында *Aspergillus niger* L-4 штамын өсіру кезінде жасушаішілік инвертаза белсенділігінің динамикасы

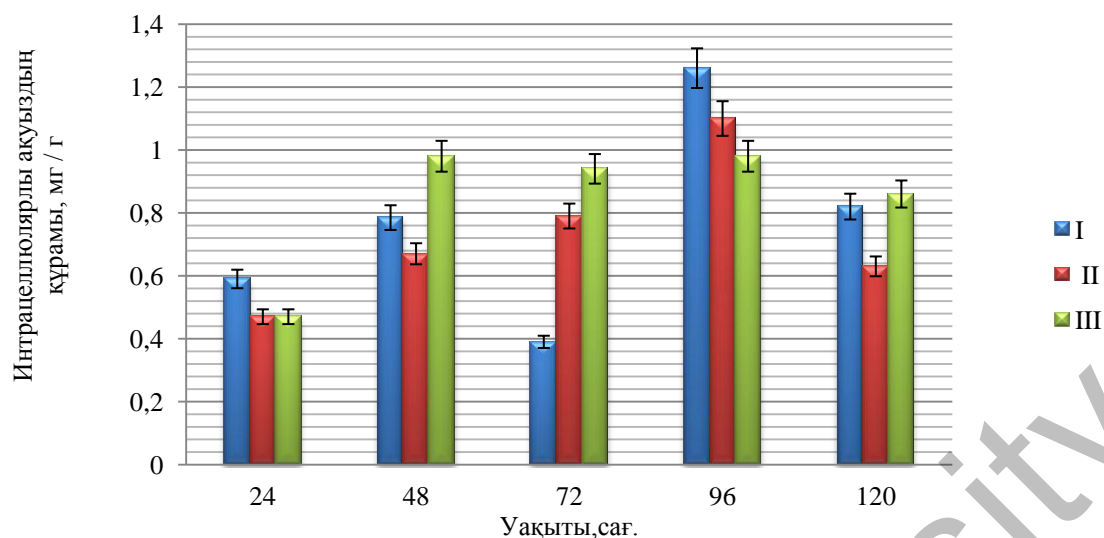
Aspergillus niger микромицетінің нативті ерітіндісіндегі ақуыз мөлшерін анықтау нәтижелері 7-суретте көрсетілген.



Сурет 7. Нативті ерітіндідегі ақуыз мөлшерін анықтау

Нативті ерітіндіде (жасушадан тыс ақуыз) ақуыз мөлшері барлық үш нұсқада ((10,5 ± 0,6) мг/см³) алғашқы 24 сағат ішінде артады. Продукцентті өсірудің 48 сағатынан бастап нативті ерітіндідегі ақуыз мөлшері азаяды, бұл протеиназалардың әсерінен болуы мүмкін (белоктар гидролизденеді).

Aspergillus niger микромицетінің мицелийіндегі ақуыз мөлшерін анықтау нәтижелері 8-суретте көрсетілген.



Сурет 8. Мицелийдағы ақуыз мөлшерін анықтау

1-варианттағы жасушаішілік ақуыздың мөлшері 4-ші күні (96 сағат) мицелийдің $1,3 \pm 0,1$ бірлік/мг деңгейіне дейін, сонымен қатар екінші нұсқада 4-ші күні (96 сағат) $1,1$ деңгейіне дейін артады. $1,0 \pm 0,1$ бірлік/мг. Ал 3-нұсқада белоктың максималды жинақталуы 4-ші күні (96 сағат) $0,9 \pm 0,1$ бірлік/мг құрады.

Кесте 4

Қоректік ортадағы фермент препараттарының дозасының инвертаза биосинтезіне әсері (120 сағат)

Ферменттердің дозалары		1 нұсқа	2 нұсқа	3 нұсқа
Инвертаза белсенділігі*	Интрацеллюлярлық ед/мг	3,1	3,5	3,4
	Σ, ед	11066	11965	12791
	Экстрацеллюлярлық ед/см ³	2,8	2,7	2,8
	Σ, ед	273,2	292,4	311,4
Құрамындағы ақуыз*	Мицелиалды массада	0,8	0,6	0,9
	Σ, мг	2,9	2,1	3,2
	Нативті ерітіндіде	7,1	5,2	6,3
	Σ, мг	707	557	703
Қышқыл мөлшері Σ, г			3,5	2,6
*-құрғақ затқа айналуы (ылғалдылығы 10 %)				

Қорытынды

Жинақталған ақпараттық зерттеулер негізінде *Aspergillus niger* дақылымен синтезделген инвертаза ТМД елдерінде тапшы технологиялық көмекші ретінде сұранысқа ие екендігі анықталды;

Инвертаза биосинтезін зерттеу бойынша жүргізілген жұмыстардың нәтижесінде ұнтақталған кара бидай дәнін гидролиздеудің ең қолайлы және үнемді нұсқасы ферменттік препараттардың дозаларын қолдану болып табылатыны анықталды: целловиридин — 4 бірлік/г, амилосубтилин — 2 бірлік/г және β-глюканаза — 3 бірлік/г. Бұл жағдайларда еритін көмірсулардың мөлшері (%) құрады: DU — $43,7 \pm 3,4$, глюкоза — $16,8 \pm 1,3$, мальтоза — $76,8 \pm 3,8$, декстриндер — $6,4 \pm 0,5$ және қышқылдың мөлшері β жоқ нұсқаға қарағанда жоғары -глюканаза. Нәтижелі ерітіндідегі және мицелийдегі инвертаза белсенділігін бағалау нәтижелеріне сүйене отырып, мицелийдегі инвертаза мөлшері жоғары деген қорытынды жасауға болады. Сондықтан мицелийден инвертазаны бөліп алу әдісін жасаған жөн. Зерттеу жұмысы «Бүкілресейлік тағамдық қоспаларды ғылыми-зерттеу институты» Федералдық мемлекеттік бюджеттік ғылыми мекемесінде (БТҚҒЗИ ФМБҒМ) жасалынды.

Әдебиеттер тізімі

- 1 Kumar V. Anna food / V. Kumar, R. Vijayakumar, S. Jagannathan, P. Srinivasan, K. Assalam Khan, K. Suganya // Sci Techn. — 2011. — P. 12–174.
- 2 Soccol C.R. Glucoamylase / C.R. Soccol, P.J. Rojan, A.K. Pate, A.L. Woiciechowski, L. P.C. Vandenberghe, A. Pandey // Enzyme technology. — Asiatech Publishers Inc., 2005. — P. 221–38.
- 3 Кулаипбекова А.А. Гидролиз помола зерна ржи ферментными препаратами: сб. тез. докл. Конгресса молодых ученых / А.А. Кулаипбекова, А.А. Принцев, Н.Ю. Шарова. — СПб., 2019. — С. 198.
- 4 Ramírez-Escudero M. Structural analysis of β -Fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* Reveals Unique Features and the Crucial Role of N-Glycosylation in Oligomerization and Activity / M. Ramírez-Escudero, M. Gimeno-Pérez, B. González, D. Linde, Z. Merdzo, M. Fernández-Lobato, J. Sanz-Aparicio // Biol. Chem. — 2016. — Vol. 291 (13). — P. 6843–6857.
- 5 Kulshrestha S. Invertase and its applications — A brief review / S. Kulshrestha, P. Tyagi, V. Sindhi, K.S. Yadavilli // Journal of Pharmacy Research. — 2013. — Vol. 7 (9). — P. 792–797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.07.014>
- 6 Chibbar R.N. Carbohydrate Metabolism / R.N. Chibbar, S. Ganeshan, M. Baga, R.L. Khandelwal // Encyclopedia of Grain Science. — Oxford: Elsevier Academic Press, 2004. — Vol. 1. — P. 168–179. <https://doi.org/10.1016/BO-12-765490-9/00029X>
- 7 Мещерякова О.Л. Сравнительная характеристика свойств свободной и иммобилизованной β -фруктофуранозидазы / О.Л. Мещерякова, О.С. Корнеева, Г.П. Шуваева // Современные проблемы науки и образования. — 2012. — № 2. — С. 356.
- 8 Ch, A.I.R. Production of Invertase by *Aspergillus niger* Under Solid State Fermentation Using Orange Fruit Peel as Substrate / A.I.R. Ch, K. Pulipati, A. Jetti // Adv Crop Sci Tech. — 2016. — Vol. 247 (4). — P. 247.
- 9 Kaur N. Production, optimization and characterization of extracellular invertase by *Actinomycete* strain / N. Kaur, A.D. Sharma // J. Sci. Ind. Res. — 2005. — Vol. 64 (7). — P. 515–519.
- 10 Скиба Е.А. Технология производства дрожжей: учеб. пос. / Е.А. Скиба. — Бийск: Изд-во Алтай. гос. техн. ун-та, 2010. — 121 с.
- 11 Римарева Л.В. Теоретические и практические основы биотехнологии дрожжей: учеб. пос. / Л.В. Римарева. — М.: ДеЛи принт, 2010. — 256 с.
- 12 Грачева И.М. Биотехнология биологически активных веществ: учеб. пос. / И.М. Грачева. — М.: Элевар, 2006. — 453 с.
- 13 Braaksma M. The effect of environmental conditions on extracellular protease activity in controlled fermentations of *Aspergillus niger* / M. Braaksma, A.K. Smilde // Microbiology. — 2009. — Vol. 155 (10). — P. 3430–3439. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031062-0>
- 14 Reilly M.C. Approaches to understanding protein hyper secretion in fungi / M.C. Reilly, J.K. Magnusin, S.E. Baker // Fungal Biology Reviews. — 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.002>
- 15 Apelblat A. Citric acid / A. Apelblat. — Cham: Springer International Publishing Switzerland, 2015. — 110 p.
- 16 Adham N.Z. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium / N.Z. Adham // Bioresour Technol. — 2002. — Vol. 84 (1). — P. 97–100. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00007-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00007-X)
- 17 Ahmed S.A. Mitochondrial activity during citric acid production by *Aspergillus niger* / S.A. Ahmed, J.E. Smith, J.A. Anderson // Trans. Br. Mycol. Soc. — 1972. — Vol. 59. — P. 51–61.
- 18 Max B. Biotechnological production of citric acid / B. Max, J.M. Salgado, N. Rodriguez // Braz. J. Microbiol. — 2010. — Vol. 41 (4). — P. 862–875.
- 19 Thauer R.K. Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria / R.K. Thauer // Eur J Biochem. — 1988. — Vol. 176 (3). — P. 497–508.
- 20 Schulze T. Industrial biotechnology. Opportunities for the grain processing industry / T. Schulze. — M: Graintek, 2011. — 260 p.
- 21 Verwimp T. Rye Constituents and Their Impact on Rye Processing / T. Verwimp, C.M. Courtin, J.A. Delcour // Food Biochemistry and Food Processing. — 2012. — P. 654–672. <https://doi.org/10.1002/9780470277577.ch25>
- 22 Takis A. Cansfield Isolation, partial characterization, and antinutritional activity of a factor (pentosans) in rye grain / A. Takis, R.M. Ronald, E. Peter // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 1981. — Vol. 29 (6). — P. 1240–1247.

А.А. Кулаипбекова, А.Ч. Каташева, А.Ж. Женисова, А.У. Байбекова

Исследование биосинтеза инвертазы при ферментации штаммом *Aspergillus niger* L-4

Использование ферментов или микроорганизмов в пищевых продуктах — это давний процесс. С развитием технологий были разработаны новые ферменты с широким диапазоном использования и спецификой, а новые области применения все еще изучаются. Микроорганизмы, такие как бактерии, дрожжи и микромицеты и их ферменты, широко используются в пищевых препаратах для улучшения вкуса и текстуры, и они обеспечивают экономические выгоды для промышленности. Производство

микробных ферментов обладает такими преимуществами, как простота, экономичность и стабильность. Изучение ферментов представляет особый интерес, так как ферментные препараты находят широкое применение в различных отраслях промышленности, в сельском хозяйстве, медицине, генной инженерии. Ферменты микробного происхождения, такие как биокатализаторы ускоряют процесс со скоростью на порядок выше, чем неорганические катализаторы. В статье рассмотрена способность штамма микромицета *Aspergillus niger* Л-4 — продуцента лимонной кислоты к синтезу фермента — инвертазы при культивировании на питательной среде, состоящей из гидролизата помола зерна ржи. На основании исследования биосинтеза инвертазы установлено, что наиболее предпочтительным и экономически выгодным вариантом гидролиза помола зерна ржи является использование дозировок ферментных препаратов: Целловиридин — 4 ед/г, Амилосубтилин — 2 ед/г и β -глюканаза — 3 ед/г. В этих условиях содержание растворимых углеводов составило (%): ДЕ — $43,7 \pm 3,4$, глюкоза — $16,8 \pm 1,3$, мальтоза — $76,8 \pm 3,8$, декстрины — $6,4 \pm 0,5$ и количество кислоты выше чем в варианта без β -глюканазы.

Ключевые слова: биосинтез, фермент, инвертаза, лимонная кислота, помол зерна ржи, *Aspergillus niger*, ферментация, микромицеты.

A.A. Kulaipbekova, A.Ch. Katasheva, A.Zh. Znenisova, A.U. Baibekova

Study of invertase biosynthesis during fermentation by strain *Aspergillus niger* L-4

The use of enzymes or microorganisms in food products is a long-standing process. With the development of technology, new enzymes have been developed with a wide range of uses and specifics, and a new field of applications is still being studied. Microorganisms such as bacteria, yeast, and micromycetes and their enzymes are widely used in food preparations to improve taste and texture; they provide economic benefits for industry. The production of microbial enzymes has such advantages as simplicity, cost-effectiveness, and stability. The study of enzymes is of particular interest since enzyme preparations are widely used in various industries: agriculture, medicine, and genetic engineering. Enzymes of microbial origin as biocatalysts accelerate the process at a rate and order of magnitude higher than inorganic catalysts. This article examines the ability of the strain of micromycete *Aspergillus niger* L-4 — producer of citric acid to synthesize the enzyme invertase when cultured on a nutrient medium consisting of hydrolysate of rye grain grinding. Based on the study of invertase biosynthesis, it was found that the most preferable and cost-effective option for hydrolysis of rye grain grinding is the use of dosages of enzyme preparations: celloviridin — 4 units/g, amylosubtilin — 2 units/g and β -glucanase — 3 ed/g. Under these conditions, the content of soluble carbohydrates was (%): DE — 43.7 ± 3.4 , glucose — 16.8 ± 1.3 , maltose — 76.8 ± 3.8 , dextrans — 6.4 ± 0.5 and the amount of acid is higher than in the variant without beta-glucanase.

Keywords: biosynthesis, enzyme, invertase, citric acid, rye grain grinding, *Aspergillus niger*, fermentation, micromycetes.

References

- 1 Kumar, V., Vijayakumar, R., Jagannathan, S., Srinivasan, P., Assalam Khan, K., & Suganya, K. (2011). Anna food. *Sci Techn.*, 12–174.
- 2 Soccol, C.R., Rojan, P.J., Pate, A.K., Woiciechowski, A.L., Vandenberghe, L.P.C., & Pandey, A. (2005). *Glucoamylase*. Enzyme technology. Asiatech Publishers Inc., 221–38.
- 3 Kulaipbekova, A.A., Printsev, A.A., & Sharova, N.Yu. (2019). Gidroliz pomola zerna rzhi fermentnymi preparatami: *sbornik tezisev dokladov Kongressa molodykh uchenykh* [Rye grain milling hydrolysis with enzyme preparations].— *Collection of abstracts from the Congress of Young Scientists*. Saint Petersburg, 198 [in Russian].
- 4 Ramirez-Escudero, M., Gimeno-Pérez, M., González, B., Linde, D., Merdzo, Z., Fernández-Lobato, M., & Sanz-Aparicio, J. (2016). Structural analysis of β -Fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* Reveals Unique Features and the Crucial Role of N-Glycosylation in Oligomerization and Activity. *Biol. Chem.*, 291 (13); 6843–6857.
- 5 Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V., & Yadavilli, K.S. (2013). Invertase and its applications — A brief review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9); 792–797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.07.014>
- 6 Chibbar, R.N., Ganeshan, S., Baga, M., & Khandelwal, R.L. (2004). *Carbohydrate Metabolism*. *Encyclopedia of Grain Science*. Oxford: Elsevier Academic Press, 1; 168–179. <https://doi.org/10.1016/BO-12-765490-9/00029X>
- 7 Meshcheriakova, O.L., Korneeva, O.S., & Shuvaeva, G.P. (2012). Sravnitelnaia kharakteristika svoistv svobodnoi i immobilizovannoi β -fruktofuranozidazy [Comparison of properties of free and immobilized β -Fructofuranosidase]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniia — Modern problems of science and education*, 2, 356 [in Russian].
- 8 Ch, A.I.R., Pulipati, K., & Jetti, A. (2016). Production of Invertase by *Aspergillus niger* Under Solid State Fermentation Using Orange Fruit Peel as Substrate. *Adv Crop Sci Tech.*, 247 (4); 247.

- 9 Kaur, N., & Sharma, A.D. (2005). Production, optimization and characterization of extracellular invertase by *Actinomyces* strain. *J. Sci. Ind. Res.*, 64(7), 515–519.
- 10 Skiba, E.A. (2010). *Tekhnologiya proizvodstva drozhzhei: uchebnoe posobie [Technology of yeast production: tutorial]*. Biisk: Izdatelstvo Altaiskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta [in Russian].
- 11 Rimareva, L.V. (2010). *Teoreticheskie i prakticheskie osnovy biotekhnologii drozhzhei: uchebnoe posobie [Theoretical and practical foundations of yeast biotechnology. Tutorial]*. Moscow: DeLi print [in Russian].
- 12 Gracheva, I.M. (2006). *Biotekhnologiya biologicheskii aktivnykh veshchestv: uchebnoe posobie [Biotechnology of biological active compounds. Tutorial]*. Moscow: Elevar [in Russian].
- 13 Braaksma, M., & Smilde, A.K. (2009). The effect of environmental conditions on extracellular protease activity in controlled fermentations of *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 155 (10); 3430–3439. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031062-0>
- 14 Reilly, M.C., Magnusin, J.K., & Baker, S.E. (2016). Approaches to understanding protein hyper secretion in fungi. *Fungal Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.002>
- 15 Apelblat, A. (2015). *Citric acid*. Cham: Springer International Publishing Switzerland.
- 16 Adham, N.Z. (2002). Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. *Bioresource Technology*, 84(1), 97–100. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(02\)00007-x](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(02)00007-x)
- 17 Ahmed, S.A., Smith, J.E., & Anderson, J.A. (1972). Mitochondrial activity during citric acid production by *Aspergillus niger*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 59; 51–61.
- 18 Max, B., Salgado, J.M., & Rodriguez, N. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Braz. J. Microbiol.*, 41 (4); 862–875.
- 19 Thauer, R.K. (1988). Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria. *Eur J Biochem.*, 176 (3); 497–508.
- 20 Schulze, T. (2011). *Industrial biotechnology. Opportunities for the grain processing industry*. Moscow: Graittek.
- 21 Verwimp, T., Courtin, C.M., & Delcour, J.A. (2012). Rye Constituents and Their Impact on Rye Processing. *Food Biochemistry and Food Processing*, 654–672. <https://doi.org/10.1002/9780470277577.ch25>
- 22 Takis, A., Ronald, R.M., & Peter, E. (1981). Cansfield Isolation, partial characterization, and antinutritional activity of a factor (pentosans) in rye grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29 (6); 1240–1247.