

## Биосинтез фитазы микромицетом *Aspergillus niger* при ферментации гидролизатов кукурузного крахмала в лабораторных условиях

**Н.М. Муста Оглы**<sup>1</sup>, nargul\_m@mail.ru  
 д-р техн. наук **Н.Ю. Шарова**<sup>1,2</sup>, natalya\_sharova1@mail.ru  
**Т.В. Выборнова**<sup>2</sup>, vybornova.t@inbox.ru

<sup>1</sup>Университет ИТМО  
 191002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

<sup>2</sup>ВНИИ пищевых добавок – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН  
 191014, Россия, Санкт-Петербург, Литейный пр. 55

Исследовали биосинтез фитазы при культивировании промышленного штамма микромицета-кислотообразователя *Aspergillus niger* Л-4 на гидролизатах кукурузного крахмала с различной степенью гидролиза в лабораторных условиях. Объектами изучения являлись мицелиальная масса продуцента *Aspergillus niger* Л-4 и нативные растворы, полученные при ферментации гидролизатов кукурузного крахмала (ГОСТ 32159-2013) со степенью гидролиза, характеризуемой  $DE = 20,9 \pm 1,5\%$  и  $DE = 31,8 \pm 2,1\%$ . Ферментативную активность определяли согласно ГОСТ 31487-2012. Содержание белковых веществ определяли методом Лоури. В сравнении с ранее полученными результатами исследований крахмалсодержащего сырья – гидролизата помола зерна ржи, внутриклеточная (интрацеллюлярная) фитазная активность на пятые сутки ферментации при культивировании продуцента в условиях шейкера-инкубатора Multitron была в 10 раз выше и составила  $1,2 \pm 0,1$  ед/г. Внеклеточная (экстрацеллюлярная) фитазная активность в конце биотехнологического процесса находилась на уровне  $6,8 \pm 0,5$  ед/см<sup>3</sup>, что в 18 раз больше по сравнению с гидролизатом помола зерна ржи. Повышенная как внутри-, так и внеклеточная фитазная активности достигнуты при проведении биотехнологического процесса в лабораторном ферментаторе Biostat®Cplus – С20-3МО и составили соответственно  $5,3 \pm 0,3$  ед/г мицелия и  $12,1 \pm 1,1$  ед/см<sup>3</sup> нативного раствора. Доказано, что наиболее предпочтительным субстратом для биосинтеза фитазы грибом-кислотообразователем *Aspergillus niger* Л-4 является гидролизат кукурузного крахмала с декстрозным эквивалентом (ДЕ), равным  $31,8 \pm 2,1\%$ . Продуктивный биосинтез фитазы приходится на логарифмическую фазу роста микромицета, а активная экскреция фермента – на стационарную фазу его развития. Для увеличения уровня фитазной активности целесообразно проводить биотехнологический процесс в ферментаторе, обеспечивающий интенсивное воздухообеспечение.

**Ключевые слова:** внутримолекулярные трансферазы; лимонная кислота; фитазная активность; гидролизат крахмала; *Aspergillus niger*; мицелий; нативные растворы.

DOI: 10.17586/2310-1164-2020-10-1-91-98

## Phytase biosynthesis with *Aspergillus niger* micromycete during laboratory starch fermentation of corn starch hydrolysates

**Nargul M. Musta Ogly**<sup>1</sup>, nargul\_m@mail.ru  
 D. Sc. **Natalya Yu. Sharova**<sup>1,2</sup>, natalya\_sharova1@mail.ru  
**Tatyana V. Vybornova**<sup>2</sup>, vybornova.t@inbox.ru

<sup>1</sup> ITMO University  
 9, Lomonosov str., St. Petersburg, 191002, Russia

<sup>2</sup>All-Russian Scientific Research Institute of Food Additives –  
 Branch of the Federal Scientific Center named after V.M. Gorbatova, RAS  
 55, Liteiny ave., St. Petersburg, 191014, Russia

The aim of this work was to investigate the phytase biosynthesis during cultivation of an industrial strain of *Aspergillus niger* L-4 micromycetic acid-forming agent on corn starch hydrolysates with various degrees of hydrolysis in laboratory conditions. Objects of study – the mycelial mass of the *Aspergillus niger* L-4 producer and native solutions obtained by fermentation of corn starch hydrolysates (State Standard 32159-2013) with a degree of hydrolysis characterized by  $DE = 20.9 \pm 1.5\%$  and  $DE = 31.8 \pm 2.1\%$ . Enzymatic activity was determined according to State Standard 31487-2012. The content of protein substances was determined by the Lowry method. Compared with the previously obtained results of studies of starch-containing raw materials – rye grain grinding hydrolyzate, intracellular (intracellular) phytase activity on the fifth day of fermentation when the producer was cultured under the conditions of the Multitron shaker-incubator was 10 times higher and amounted

to  $1.2 \pm 0.1$  u/g. Extracellular (extracellular) phytase activity at the end of the biotechnological process was at the level of  $6.8 \pm 0.5$  units/cm<sup>3</sup>, which is 18 times more than the rye grain grinding hydrolyzate. Increased both intra- and extracellular phytase activity were achieved during the biotechnological process in the Biostat®Cplus–C20-3MO laboratory fermenter and amounted to  $5.3 \pm 0.3$  units/g of mycelium and  $12.1 \pm 1.1$  units/cm<sup>3</sup> of native solution respectively. It has been proved that the most preferred substrate for the phytase biosynthesis by *Aspergillus niger* L-4 fungus-acid former is corn starch hydrolyzate with a dextrose equivalent (DE) of  $31.8 \pm 2.1\%$ . Productive phytase biosynthesis occurs in the logarithmic phase of micromycete growth, and active excretion of the enzyme occurs in the stationary phase of its development. To increase the level of phytase activity it is advisable to carry out a biotechnological process in a fermenter that provides intensive air supply.

**Keywords:** intermolecular transferases; citric acid; phytase activity; starch hydrolysate; *Aspergillus niger*; mycelium; native solutions.

## Введение

В последние годы фитазы привлекают внимание в качестве технологического вспомогательного средства при переработке и производстве пищевых продуктов. Снижение содержания фитата в пище в результате действия фитаз способствует повышению биодоступности минеральных веществ.

До настоящего времени фитазы в основном, если не исключительно, использовались в качестве кормовой добавки для животных в рационах, главным образом для свиней и птицы, и в некоторой степени для рыб. Первые коммерческие фитазы были выпущены на рынок в 1991 году. Между тем, объем рынка находится в диапазоне 150 млн евро [1].

Существует также большой потенциал для использования фитаз в переработке и производстве продуктов питания для человека, но до сих пор ни один фитазный продукт для соответствующего применения в пищевой промышленности не попал на рынок. Исследования в этой области направлены на улучшение питательной ценности растительных продуктов, а также на техническое совершенствование обработки пищевых продуктов. Усиленное питание фитатсодержащими продуктами приводит к значительному снижению абсорбции минеральных веществ в рационе [2], а дефосфорилирование фитата во время обработки пищевых продуктов приводит к образованию только частично фосфорилированных сложных эфиров миоинозитолфосфата с меньшей способностью ухудшать всасывание в кишечнике минеральных веществ в рационе. Кроме того, существуют убедительные доказательства того, что фитат-белковые взаимодействия негативно влияют на перевариваемость белка *in vitro*, и степень этого эффекта зависит от источника белка. Было показано [3], что индивидуальные двойные эфиры миоинозитолфосфата имеют несколько важных физиологических функций у человека. Таким образом, фитазы могут найти применение в пищевой промышленности для производства функциональных пищевых продуктов [4], если такие биохимически активные эфиры миоинозитолфосфата смогут генерироваться фитазами и всасываться в пищеварительном тракте человека. Сообщалось о технических усовершенствованиях, связанных с добавлением фитаз в процессе обработки пищевых продуктов, в том числе о запрещении при изготовлении хлеба, производстве изолятов растительных белков, измельчении кукурузы во влажном состоянии и фракционировании зерновых отрубей [5].

Фитазы [миоинозитол (1,2,3,4,5,6) гексакисфосфатфосфогидролазы] были обнаружены в растениях, микроорганизмах и тканях животных [6]. Префикс «гексакис» (в отличие от «гекса») означает, что фосфатные группы не связаны друг с другом. Они представляют собой подгруппу фосфатаз, которые способны инициировать поэтапное дефосфорилирование фитата [миоинозитол (1,2,3,4,5,6) гексакисфосфат], наиболее распространенного инозитолфосфата в природе. Эта классификация не зависит от их функции *in vivo*, которая обычно остается неизвестной [7].

Ранее проведенные во ВНИИ пищевых добавок (ВНИИПД) исследования показали, что штамм *Aspergillus niger* Л-4 – продуцент лимонной кислоты синтезирует фитазу при ферментации углеводсодержащих сред.

Цель данной работы – исследовать биосинтез фитазы при культивировании промышленного штамма *Aspergillus niger* Л-4 на гидролизатах кукурузного крахмала с различной степенью гидролиза в лабораторных условиях.

## Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись мицелиальная масса продуцента *Aspergillus niger* Л-4 и нативные растворы, полученные при ферментации гидролизатов кукурузного крахмала (ГОСТ 32159-2013) со степенью гидролиза, характеризуемой  $DE = 20,9 \pm 1,5\%$  и  $DE = 31,8 \pm 2,1\%$ .

Для гидролиза кукурузного крахмала использовали ферментный препарат Амилоsubтилин Г3х (ПО «Сиббиофарм», Россия) с амилолитической активностью 850 ед/г (ГОСТ 23635-90).

Состав питательной среды для получения посевного материала, г/дм<sup>3</sup>: сахароза – 50, меласса – 17; нитрат аммония – 2,5; сульфат магния семиводный – 0,25; фосфат калия однозамещенный – 0,16; рН – 6,5, согласно [8].

Состав ферментационной среды, г/дм<sup>3</sup>: углеводный источник – 150; нитрат аммония – 2,5; сульфат магния семиводный – 0,25; фосфат калия однозамещенный – 0,16; рН 6,5.

Ферментацию осуществляли в качалочных колбах вместимостью 750 см<sup>3</sup> периодическим способом с применением технологии концентрированных сред в шейкере-инкубаторе Multitron (INFORS, Швейцария) и в ферментаторе Biostat®Cplus–C20-3MO (Sartorius, Германия) при следующих режимах:

- получение посевного материала – температура ( $32 \pm 1$ )°С. Длительность процесса – 48 ч.
- ферментация – температура ( $32 \pm 2$ )°С. Длительность процесса – 120 ч. Количество посевного материала для процесса ферментации составляло 15% от объема ферментационной среды.

Гидролизат кукурузного крахмала для ферментации готовили следующим образом: навеску крахмала смешивали с водопроводной водой (гидромодуль 1:3) и добавляли ферментный препарат Амилоsubтилин в количестве 1 ед/г крахмала в пересчете на сухие вещества. Ферментный препарат предварительно растворяли в 20 см<sup>3</sup> воды. Суспензию крахмала и ферментного препарата нагревали до температуры от 80 до 85°С и выдерживали при этой температуре в течение 1 ч постоянно перемешивая. В гидролизате определяли количество сахаров по сахариметру и содержание сухих веществ по рефрактометру. По окончании ферментации биомассу микромицета отделяли на воронке Бюхнера. В биомассе и в нативном растворе определяли фитазную активность (ФА) методом, основанным на определении содержания неорганических фосфатов, образующихся в результате действия фермента на субстрат, согласно ГОСТ 31487-2012.

Содержание белковых веществ определяли методом Лоури.

Полученные опытные данные обрабатывали на практике с помощью методик математической статистики, а также пакета программ Microsoft Office.

## Результаты и обсуждение

Ранее проведенные исследования показали, что значительное накопление фитазы экскретируется из клетки на первых стадиях развития гриба *Aspergillus niger* Л-4 при культивировании на различных углеводсодержащих средах [9–10]. Литературный обзор показывает, что в работах других авторов различные продуценты фитазы также обладают способностью к биосинтезу внеклеточной (экстрацеллюлярной) фитазы [11–14]. В исследованиях [15–17] приведены данные о биосинтезе и накоплении фитазы в клетке (интрацеллюлярная).

На рисунках 1 и 2 представлены экспериментальные данные, полученные в результате исследования внутри- и внеклеточной фитазной активности при культивировании штамма *Aspergillus niger* Л-4 на гидролизатах крахмала с  $DE = 20,9 \pm 1,5\%$  и  $DE = 31,8 \pm 2,1\%$  в шейкере-инкубаторе.

Характер динамики внутри- и внеклеточной фитазы различается. Внутри клетки активность фермента увеличивалась в течение трех суток процесса ферментации гидролизата крахмала с  $DE = 20,9 \pm 1,5\%$ . Но ближе к концу процесса (на четвертые и пятые сутки) ФА снижается. На первые сутки ФА была равна  $0,4 \pm 0,1$  ед/г, к середине биотехнологического процесса ФА была равна  $1,9 \pm 0,2$  ед/г, на четвертые сутки –  $1,3 \pm 0,1$  ед/г, а к концу процесса ферментации снизилась до  $0,65 \pm 0,07$  ед/г. По-видимому, синтезированная фитаза к окончанию процесса экскретируется из клетки, чем и объясняется более высокая экстрацеллюлярная ФА.

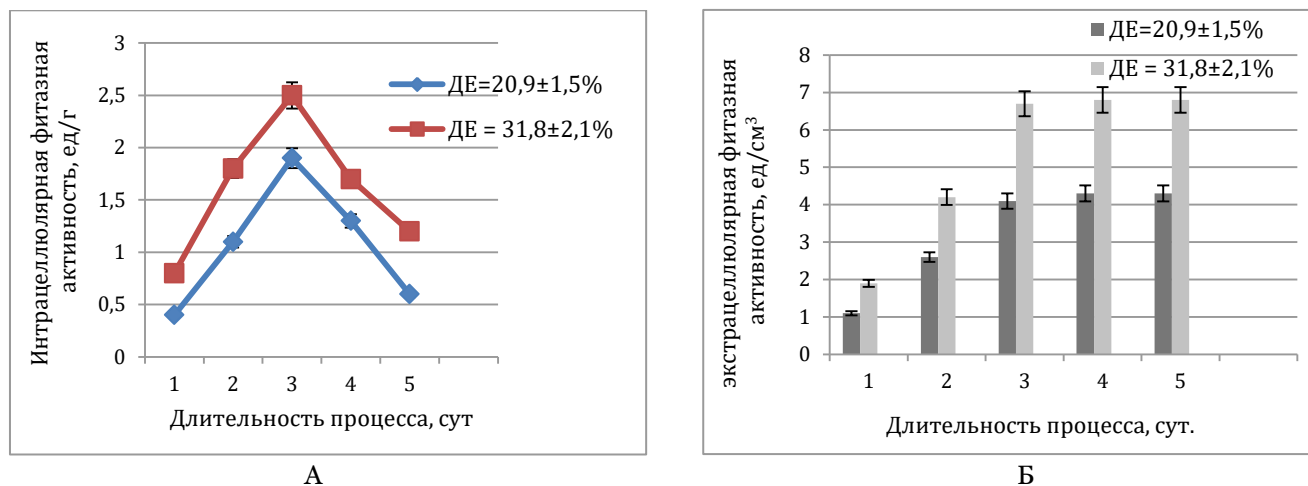


Рисунок 1 – Динамика активности фитазы при культивировании штамма *Aspergillus niger* Л-4 на гидролизатах крахмала с ДЕ = 20,9 ± 1,5% и ДЕ = 31,8 ± 2,1% в шейкере Multitron (INFORS, Швейцария):

А – интрацеллюлярная активность, ед/г мицелия; Б – экстрацеллюлярная активность, ед/см³

Figure 1. Dynamics of phytase activity during cultivation of *Aspergillus niger* L-4 strain on starch hydrolysates with DE = 20.9 ± 1.5% and DE = 31.8 ± 2.1% in a Multitron shaker (INFORS, Switzerland):

A – intracellular activity, units/g of mycelium; B – extracellular activity, units/cm³.

В работе [18] авторы исследовали способность дрожжевого штамма *Candida melibiosica* 2491 синтезировать фитазу и обнаружили, что данный штамм является продуцентом внутриклеточной фитазы. Кроме того, там же было исследовано влияние различных параметров при культивировании дрожжевого штамма в качалочных колбах и биореакторе на биосинтез фитазы, среди которых изучалось и влияние аэрации. Авторы отмечают, что изменение скорости перемешивания от 300 до 600 мин<sup>-1</sup> существенно не влияло на развитие клетки, но для биосинтеза фермента это был важный фактор. Образование дрожжевой биомассы усиливалось за счет увеличения степени аэрации. При понижении скорости перемешивания как накопленная биомасса, так и активность ферментов были в два раза ниже максимальных значений.

Результаты проведенных исследований показали, что ФА в нативных растворах (экстрацеллюлярная фитазная активность) до третьих суток биотехнологического процесса включительно, также как и внутри клетки, возрастала. Результаты работ других авторов тоже показывают увеличение ФА с увеличением времени ферментации [14, 19, 21]. На третьи сутки ФА вне клетки была более чем в 2 раза больше, чем в тот же период внутри клетки (4,1 ± 0,1 ед/см³ против 1,9 ± 0,2 ед/г). Четвертые и пятые сутки характеризуются одинаковым уровнем ФА. В указанный период времени прирост ФА был максимальным.

Для гидролизата крахмала с ДЕ = 31,8 ± 2,1% характер кривых, описывающих динамику изменения ФА внутри и вне клетки, аналогичен динамике изменения ФА в мицелии и нативном растворе для гидролизата крахмала с ДЕ = 20,9 ± 1,5%. Повышенная продуктивность биосинтеза фитазы обусловлена, возможно, более глубокой степенью гидролиза, а следовательно, и более высоким содержанием простых сахаров (глюкоза, мальтоза), которые потребляются продуцентом для накопления биомассы, формирования ферментной системы и активизации ферментативных процессов (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание углеводов в гидролизатах крахмала

Table 1. The carbohydrate content of starch hydrolysates

Степень гидролиза крахмала	Доля углеводов в сумме сахаров в гидролизатах, %		
	глюкоза	мальтоза	декстрины
ДЕ = 20,9 ± 1,5%	3,1 ± 0,2	19,8 ± 1,6	77,1 ± 7,1
ДЕ = 31,8 ± 2,1%	4,4 ± 0,4	27,4 ± 2,1	68,2 ± 6,1

Штамм *Aspergillus niger* Л-4 является промышленным продуцентом лимонной кислоты и поэтому важно отметить, что с третьих по пятые сутки наблюдается активный синтез органических кислот. В начале ферментации (24–48 ч) рН составил 2,66 и снижался до 1,72 в конце процесса ферментации. То, что на четвертые и пятые сутки прирост ферментативной активности приостанавливается и перестает увеличиваться, может быть объяснено тем, что возможно основной метаболит – лимонная кислота –

подавляет ФА. Ранее авторы [20] установили подобное явление ингибирования лимонной кислотой активности амилолитических ферментов, синтезируемых *Aspergillus niger* Л-4. Авторы работы [21] провели модельный эксперимент по изучению влияния состава ферментационной среды, в которую были внесены различные добавки, одна из которых – лимонная кислота (0,1%) как отдельный компонент-добавка и в комбинации с экстрактом дрожжей и Твин-80, на биосинтез фермента. В результате выявлено сильное ингибирующее действие лимонной кислоты в концентрации 0,1% на биосинтез фитазы штамма *T. lanuginosus* IMI 096218. Активность была почти на 90% ниже контрольной.

Приостановление роста ФА также может быть вызвано действием ингибитора фитазы белкового типа, содержащегося в злаковых культурах (в данной работе это не исследовалось). Так в работе [22] авторы впервые сообщают, что зерновые компоненты ячменя, риса, пшеницы и кукурузы могут ингибировать активность фитазы *Aspergillus ficuum*. Ингибирование фитазы зависело от количества зернового субстрата в питательной среде и значительно варьировало в зависимости от вида злаковой культуры. После выделения ингибитора из зерен ячменя с помощью Superdex G200 был идентифицирован белок с молекулярной массой 30–35 кДа. Тестирование очищенного ингибитора фитазы вместе с фитазой *A. ficuum* и специфическими ингибиторами протеазы пепстатином А, Е64, ЭДТА и ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид) выявило, что пепстатин А приостанавливает ингибирование фитазы. Авторы указывает на то, что наблюдаемое ингибирование фитазы *A. ficuum* экстрактами зерновых культур обусловлено действием протеаз по типу аспарагиновой протеиназы.

Концентрация белка в исследуемых нативных растворах при ферментации гидролизата крахмала с ДЕ = 20,9 ± 1,5% была на уровне (4,1 ± 0,3) мг/см<sup>3</sup> на первые сутки и падала до (1,2 ± 0,1) мг/см<sup>3</sup> к концу процесса ферментации. При ферментации гидролизата крахмала с ДЕ = 31,8 ± 2,1% динамика накопления экстрацеллюлярного белка имеет аналогичный характер. Причиной снижения уровня экстрацеллюлярного белка, начиная с четвертых суток, предположительно, могут быть протеиназы. Подобный факт был установлен в работе [23]. Удельная ФА при культивировании штамма-микробиота на гидролизатах с ДЕ = 20,9 ± 1,5% и ДЕ = 31,8 ± 2,1% повышалась.

Однако содержание белка в биомассе на протяжении всего процесса ферментации исследуемых гидролизатов крахмала повышается.

На рисунке 2 представлена динамика изменения фитазной активности при ферментации гидролизатов с ДЕ = 20,9 ± 1,5% и ДЕ = 31,8 ± 2,1% в ферментаторе.

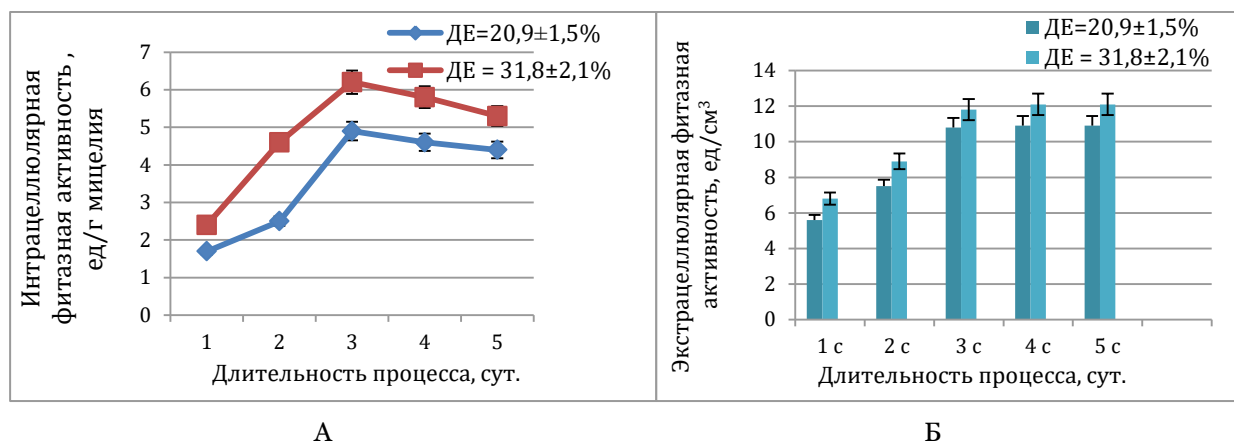


Рисунок 2 – Динамика активности фитазы при культивировании продуцента лимонной кислоты – штамма *Aspergillus niger* Л-4 на гидролизатах крахмала с ДЕ = 20,9 ± 1,5% и ДЕ = 31,8 ± 2,1% в ферментаторе Biostat®Cplus – С20-3МО:

А – интрацеллюлярная активность, ед/г мицелия; Б – экстрацеллюлярная активность, ед/см<sup>3</sup>

Figure 2. Dynamics of phytase activity during cultivation of citric acid producer - *Aspergillus niger* L-4 strain on starch hydrolysates with DE = 20.9 ± 1.5% and DE = 31.8 ± 2.1% in the Biostat®Cplus fermenter – C20-3MO:

A – intracellular activity, units/g of mycelium; B – extracellular activity, units/cm<sup>3</sup>

Сравнительные данные по содержанию белка и других показателей процесса ферментации в шейкере-инкубаторе и в ферментаторе Biostat®Cplus – С20-3МО указаны в таблице 2.

Таблица 2. Показатели процесса ферментации гидролизатов крахмала (конец процесса, 120 ч)  
 Table 2. Indicators of the fermentation process of starch hydrolysates (end of the process, 120 hours)

Условия культивирования	ДЕ гидролизата крахмала, %	Показатели процесса ферментации						
		рН	содержание белка		активность фитазы			
			в мицелии, мг/г мицелия	в нативном растворе, мг/см <sup>3</sup>	интрацеллюлярная		экстрацеллюлярная	
					ед/г мицелия	удельная, ед/мг белка	ед/см <sup>3</sup> нативного раствора	удельная, ед/мг белка
Шейкер-инкубатор Multitron	20,9 ± 1,5	1,72	4,5 ± 0,3	1,2 ± 0,1	0,65 ± 0,07	0,13 ± 0,01	4,3 ± 0,3	3,6 ± 0,3
	31,8 ± 2,1	1,75	6,1 ± 0,5	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,21 ± 0,02	6,8 ± 0,5	6,2 ± 0,2
Ферментатор Biostat®Cplus – С20-ЗМО	20,9 ± 1,5	1,75	5,1 ± 0,4	2,4 ± 0,2	4,4 ± 0,3	0,86 ± 0,09	10,9 ± 1,2	4,4 ± 0,3
	31,8 ± 2,1	2,05	6,6 ± 0,7	2,9 ± 0,3	5,3 ± 0,3	0,82 ± 0,08	12,1 ± 1,1	4,2 ± 0,2

Динамика изменения уровня ФА, определенной в биомассе, полученной при культивировании штамма аспергилла на гидролизате крахмала с ДЕ = 20,9 ± 1,5% в ферментаторе, аналогична динамике изменения фитазной активности, определенной в биомассе при ферментации того же гидролизата в шейкере-инкубаторе. В биотехнологическом процессе в условиях ферментатора активный рост ФА также наблюдался на протяжении 3 суток. Уровень фитазы в мицелии и нативном растворе при проведении процесса в ферментаторе превосходил уровень активности фермента при культивировании штамма аспергилла в шейкере-инкубаторе в 2,3–4,3 раза. Значительная разница определена для первых и последних суток биотехнологического процесса. Однако в отличие от уровня интрацеллюлярной фитазной активности, полученной в условиях шейкера-инкубатора, уровень активности фитазы, выявленной в условиях ферментатора, снижается незначительно – на 0,5 ед. Возможно, это связано с различными условиями аэрации. Так в работе [24] авторами было изучено влияние аэрации на биосинтез фермента *Aspergillus niger* St-6. Подачу воздуха в ферментатор осуществляли с различными скоростями (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 дм<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>·мин). При интенсивности аэрации 0,6 дм<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>·мин выявлено максимальное накопление фермента (7560 ед/л/мин). Однако, при повышении воздухообмена (1,0 дм<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>·мин) накопление фермента значительно снижалось.

Экстрацеллюлярная фитазная активность при ферментации среды в ферментаторе, как показали исследования, также активно растет в течение трех суток, далее рост ФА практически полностью прекращается. Следует отметить, что в данный период также происходит активное кислотонакопление, с чем может быть связано ингибирование активности фитазы. Данное явление подтверждалось в работе [21] для фитазы другого штамма и в работе [20] для амилолитических ферментов, синтезируемых *Aspergillus niger*.

Отличие в количестве синтезируемого фермента, оцениваемое по его биокаталитической активности, при различных условиях культивирования (шейкер-инкубатор, ферментатор), скорее всего, объясняется уровнем воздухообмена в процессе культивирования штамма. Авторы работы [25] также отмечают увеличение продуктивности биосинтеза фитазы штаммом *Pseudomonas aeruginosa* p6 с повышением уровня аэрации.

Авторы работы [26] исследовали биосинтез фитазы штаммом *Aspergillus ficuum* PTCC 5288 при культивировании в лабораторном ферментаторе (The Majer Science-F1-S-3L, Тайвань) вместимостью 3 дм<sup>3</sup> с рабочим объемом 1 дм<sup>3</sup>. Они также отмечают значительное влияние скорости аэрации на продуцирование фитазы в силу того, что штаммы грибов рода *Aspergillus* являются аэробными.

Исследователи [27] также сообщают о том, что продуцирование фитазы штаммом *Aspergillus niger* FS3 в биореакторе колонного типа повышается в результате принудительной подачи воздуха.

### Заключение

В биомассе, полученной при ферментации гидролизата кукурузного крахмала с ДЕ = 20,9 ± 1,5% и с ДЕ = 31,8 ± 2,1% как в качалочных колбах, так и в лабораторном ферментаторе, активность фитазы возрастала в течение трех суток и далее фермент экскретировался из клетки. Гидролизат кукурузного

крахмала с декстрозным эквивалентом (ДЕ), равным  $31,8 \pm 2,1\%$ , является наиболее предпочтительным для биосинтеза фитазы грибом-кислотообразователем *Aspergillus niger* Л-4.

Показатели биотехнологического процесса, полученные при культивировании штамма *Aspergillus niger* Л-4 в ферментаторе, превышают таковые в качалочных колбах.

Прирост ФА в нативном растворе наблюдался в течение первых трех суток процесса и далее приостанавливался, возможно, вследствие ингибирующего действия лимонной кислоты, так как к окончанию процесса ферментации штамм активно продуцирует основной метаболит – лимонную кислоту.

Причиной снижения содержания экстрацеллюлярного белка, предположительно, может быть синтез протеиназ.

Поскольку механизмы и факторы, регулирующие биосинтез фитазной активности микромицетов, представлены различными исследователями сравнительно ограниченно, то требуется их дальнейшее изучение. Полученные экспериментальные данные являются предпосылкой для разработки технологии получения ферментного препарата, обладающего фитазной активностью, и технологического вспомогательного средства на его основе.

### References

1. Haefner S., Knietsch A., Scholten E., Braun J., Lohscheidt M., Zelder O. Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, V. 68, pp. 588–597.
2. Konietzny U., Greiner R. *Phytic acid: nutritional impact*. In Caballero B., Trugo L., Finglas P. (Eds.) *Encyclopedia of food science and nutrition*. Elsevier, London, UK, 2003, pp. 4555–4563.
3. Shears S.B. The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, V. 1436, pp. 49–67.
4. Greiner R., Larsson A.M., Carlsson N.G., Muzquiz M., Burbano C., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Goyoaga C. Enzymatic phytate degradation – a possibility to design functional foods? *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2002, V. 11, pp. 50–54.
5. Caransa A., Simell M., Lehmuusaari M., Vaara M., Vaara T. A novel enzyme application in corn wet milling. *Starch*. 1988, V. 40, pp. 409–411.
6. Konietzny U., Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science & Technology*. 2002, V. 37, pp. 791–812.
7. Chu H.M., Guo R.T., Lin T.W., Chou C.C., Shr H.L., Lai H.L., Tang T.Y., Cheng K.J., Selinger B.L., Wang A.H.J. Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure*. 2004, V. 12, pp. 2015–2024.
8. Sharova N.Yu. Development of the scientific foundations of new technologies for food additives and ingredients using starch-containing raw materials. *Extended abstract of candidate's thesis*. St. Petersburg, 2013, 233 p. (In Russian).
9. Musta Ogly N., Sharova N.Yu., Yushkauskajte A.R. *Aspergillus niger* micromycet phytase – a potential food microingredient. *University News. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018, V. 8, no. 1(24), pp. 82–91 (In Russian).
10. Musta Ogly N., Sharova N.Yu., Vy`bornova T.V. Biosynthesis of mushroom phytase chrome mycelium – *Aspergillus niger* acid-forming agent on starch hydrodisate. *Technology and Merchandising of the Innovative Foodstuff*. 2019, no. 1(54), pp. 23–26 (In Russian).
11. Gautam P., Sabu A., Pandey A., Szakacs G., Soccol C.R. Microbial production of extra-cellular phytase using polystyreneas inert solid support. *Bioresource Technology*. 2002, V. 83, pp. 229–233.
12. Rocky-Salimi K., Hashemi M., Safari M., Mousivand M. A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B.S.46. *Journal of Advanced Research*. 2016, V. 7, pp. 381–390.
13. Greiner R., Gomes da Silva L., Couri S. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009, V. 40, pp. 795–807.
14. Sandhya A., Sridevi A., Suvarnalatha Devi P. and Narasimha G. Production and optimization of phytase by *Aspergillus niger*. *Scholars Research Library. Der Pharmacia Lettre*. 2015, V. 7(12), pp. 148–153.
15. Gargova S., Sariyska M. Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatase. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, V. 32, pp. 231–235.
16. Awad G.E., Helal M.M., Danial, E.N., Esawy M.A. Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid state fermentation by using Box–Behnken design. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2014, V. 21(1), pp. 81–88.
17. Nahas E. Control of acid phosphatases expression from *Aspergillus niger* by soil characteristics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2015, V. 58, pp. 658–666.

18. Georgiev D., Gotcheva V., Angelov A., Slavchev A., Gargova St. Phytase production by *Candida melibiosica* 2491 alkalophylic strain. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2013, V. 25, pp. 342–348.
19. Dae-Hee L., Sun-Uk Ch., Yong-Il H. Culture conditions and characterizations of a new phytase-producing fungal isolate, *Aspergillus sp.* L117. *Mycobiology*. 2005, V. 33(4), pp. 223–229.
20. Sharova N.Yu. The production of an amylase inhibitor during the fermentation of starch hydrolysates with an acid-forming strain of *Aspergillus niger* L-4. *Herald of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2013, no. 3, pp. 45–47 (In Russian).
21. Bujna E., Rezessy-Szabó J.M., Nguyen D.V., Nguyen D.Q. Production and some properties of extracellular phytase from *Thermomyces lanuginosus* IMI 096218 on rice flour as substrate. *Mycosphere*. 2016, V. 7, Is. 10, pp. 1576–1587.
22. Bekalu Z.E., Madsen C.K., Dionisio G., Brinch-Pedersen H. *Aspergillus ficuum* phytase activity is inhibited by cereal grain components. *PLoS ONE*. 2017, V. 12(5):e0176838.
23. Sharova N.Yu., Nikiforova T.A. Regulation of the biosynthesis of citric acid during the bioconversion of starch hydrolysates with *Aspergillus niger* mold. *Journal of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2007, no. 6, pp. 19–21. (In Russian).
24. Tahir A., Mateen B., Saeed S., Uslu H. Studies on the production of commercially important phytase from *Aspergillus niger* st-6 isolated from decaying organic soil. *Micologia Aplicada International*. 2010, V. 22(2), pp. 51–57.
25. Sasirekha B., Bedashree T., Champa K.L. Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. *Pelagia Research Library European Journal of Experimental Biology*. 2012, V. 2(1), pp. 95–104.
26. Badamchi M., Hamidi-Esfahani Z., Abbasi S. Comparison of phytase production by *Aspergillus Ficum* under submerged and solid state fermentation conditions. *Focusing on Modern Food Industry (FMFI)*, 2013, V. 2 Is. 3, pp. 129–137.
27. Spier M.R., Woiciechowski A.L., Letti L.A., et al. Monitoring fermentation parameters during phytase production in column-type bioreactor using a new data acquisition system. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2010, V. 33(9), pp. 1033–1041.

Статья поступила в редакцию 30.01.2020