

ПРОДУКЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ β -ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER* ФФ В-4

И.О. Тамкович¹, О.Д. Левчук¹, Л.И. Сапунова¹, А.С. Мозоль²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

²Белорусский государственный университет, Минск

Аннотация. Исследована динамика синтеза внеклеточной β -фруктофуранозидазы *Aspergillus niger* ФФ-В4 в среде со специфическим субстратом. Охарактеризованы каталитические свойства ферментного белка. Штамм *A. niger* ФФ-В4 – потенциальный продуцент коммерчески востребованного биокатализатора для пищевой промышленности.

Ключевые слова: β -фруктофуранозидаза, физиолого-биохимическая характеристика штамма, свойства фермента, применение, пищевая промышленность.

Введение. β -фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26), известная также как инвертаза, катализирует реакцию гидролиза сахарозы с образованием эквивалентных количеств глюкозы и фруктозы. Смесь этих углеводов называют инвертным сахаром, широко используемым в качестве подсластителя и антикристаллизационного средства в пищевой промышленности [1, 2].

Ранее нами получены 4 изолята мицелиальных грибов, растущих в средах с высоким содержанием сахарозы и синтезирующих β -фруктофуранозидазу внеклеточной локализации. Из них изолят ФФ-В4, выделявшийся максимальной продукцией фермента, отобран в качестве возможного продуцента коммерчески востребованного биокатализатора [3].

Материалы и методы. Цель настоящей работы – исследование динамики синтеза β -фруктофуранозидазы *Aspergillus niger* ФФ-В4 в среде со специфическим субстратом и предварительная характеристика каталитических свойств ферментного белка.

Установлено, что на агаризованной среде Сабуро изолят ФФ-В4 образует пушистые колонии правильной округлой формы, диаметром 7,5–8,0 см, слабо выпуклые, радиально-складчатые. Цвет колоний сначала белый, со временем приобретающий оливково-коричневый цвет. На агаре Чапека с сахарозой (10 %) колонии пушистые, размером 3,5–4,0 см, слабо выпуклые, неправильной формы, изначально белые, а затем, по мере образования спор, приобретающие оливково-коричневый цвет (рисунок 1).

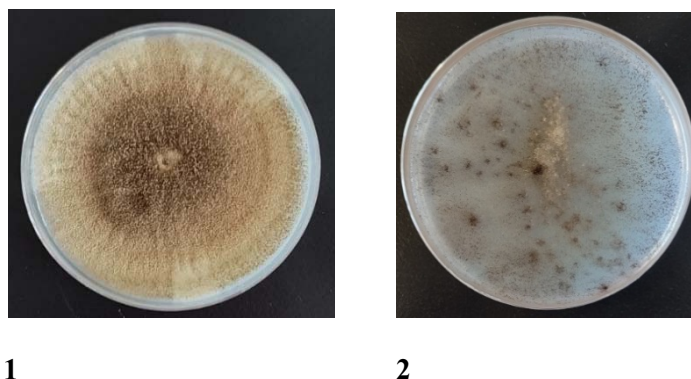


Рисунок 1. – Изолят ФФ-В4 на среде Сабуро (1) и агаре Чапека с 10% сахарозой (2)

На основании физиолого-биохимических признаков, а также спектральных характеристик белков, полученных с использованием матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS), изолят ФФ-В4 идентифицирован как *Aspergillus niger* (далее *A. niger* ФФ-В4) и депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номером БИМ-F-863 Д.

Согласно заключению о ветеринарно-токсикологических исследованиях штамм *Aspergillus niger* ФФ-В4 является непатогенным, нетоксичным и нетоксигенным.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты, полученные в динамике синтеза β -фруктофуранозидазы *A. niger* ФФ-В4 в условиях глубинного культивирования в среде со свекловичной мелассой, приведены в таблице. Как видно, максимальная продукция фермента (45,4–47,2 ед/мл) и его удельная активность (156,6–143,0 ед/мг белка) отмечались на 5–6 сут роста гриба.

Таблица – Синтез β -фруктофуранозидазы *A. niger* ФФ-В4 в условиях глубинного культивирования

Длительность культивирования, сут	рН	Белок, мг/мл	В-Фруктофуранозидаза:	
			ед/мл	ед/мг белка
1	5,0 \pm 0,25	0,13 \pm 0,007	1,2 \pm 0,06	9,2 \pm 0,41
2	4,9 \pm 0,25	0,17 \pm 0,009	2,7 \pm 0,14	15,9 \pm 0,67
3	5,2 \pm 0,26	0,24 \pm 0,012	5,3 \pm 0,27	22,1 \pm 0,99
4	5,3 \pm 0,27	0,26 \pm 0,013	15,3 \pm 0,77	58,9 \pm 1,85
5	5,8 \pm 0,29	0,29 \pm 0,015	45,4 \pm 2,27	156,6 \pm 6,58
6	5,7 \pm 0,29	0,33 \pm 0,017	47,2 \pm 2,36	143,0 \pm 6,87

Для получения частично очищенной β -фруктофуранозидазы *A. niger* ФФ-В4 выращивали глубинным способом в питательной среде с мелассой в колбах объемом 2 л с 1 л среды при температуре 26 $^{\circ}$ С в течение 5-6 сут. Биомассу *A. niger* ФФ-В4 отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 10000 g в течение 10 минут. Из сконцентрированного бесклеточного фильтрата культуральной жидкости выделяли ферментный белок методом осаждения этанолом (80 %). Осадок промывали этиловым спиртом (80 %), растворяли в дистиллированной воде и использовали для исследования свойств β -фруктофуранозидазы.

Определены рН и термооптимум действия β -фруктофуранозидазы *A. niger* ФФ-В4. Как видно из представленных на рисунке 2 данных, фермент гидролизует специфический субстрат в широком диапазоне активной кислотности среды. С максимальной скоростью β -фруктофуранозидаза инвертирует сахарозу при рН 4,2–5,0, а при рН 3,0 проявляет около 28,3% своей максимальной активности и 8,0 % – при рН 7,8.

Температурный оптимум действия β -фруктофуранозидазы *A. niger* ФФ-В4 отмечается при 60 $^{\circ}$ С. При понижении температуры до 30 и 25 $^{\circ}$ С активность фермента снижается соответственно на 70,2 и 74,9 % от установленного максимума. В диапазоне сверхоптимальных температур β -фруктофуранозидаза *A. niger* ФФ-В4 резко теряет каталитическую активность и при 80 $^{\circ}$ С практически не активна.

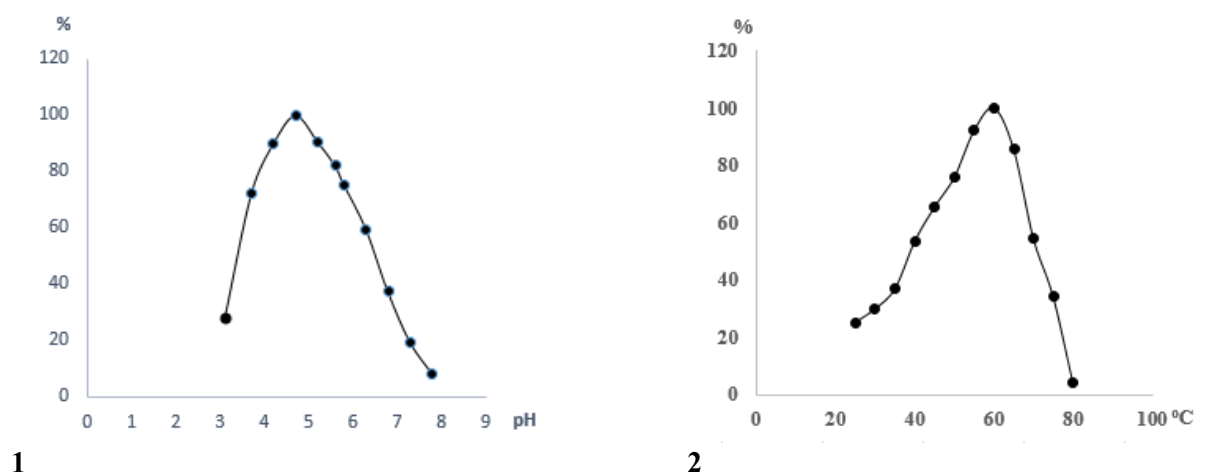


Рисунок 2. – Влияние рН (1) и температуры (2) на активность β -фруктофуранозидазы *A. niger* ФФ-В4

Определены также термо- и рН-стабильность β -фруктофуранозидазы *A. niger* ФФ-В4. Установлено, что при температуре 55 $^{\circ}$ С и рН 4,7 фермент стабилен в течение 2 ч (рисунок 3). При 60 $^{\circ}$ С и рН 4,7 активность фермента снижается на 30,4 % после 60 мин инкубации, а через 120 мин – на

96,2 %, тогда как при 65°C в тех же условиях кислотности резкое падение активности β -фруктофуранозидазы происходит в течение 15 мин: остаточная активность составляет всего 20,4 %.

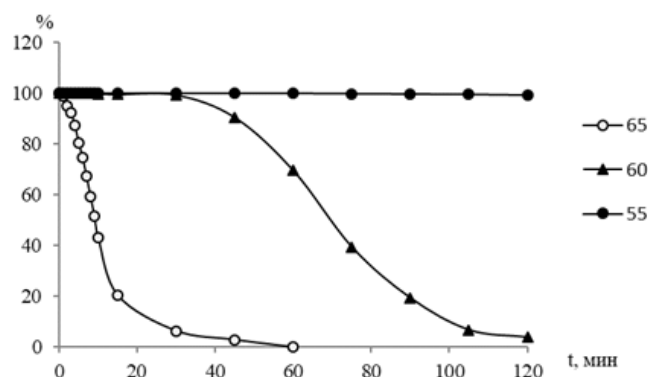


Рисунок 3. – Термостабильность β -фруктофуранозидазы при 55, 60, 65 °C *A. niger* ФФ-В4

Как видно из рисунка 4, в течение 1 ч инкубации в ацетатном буфере (pH 4,2) при 60 °C активность β -фруктофуранозидазы *A. niger* ФФ-В4 постепенно снижается и составляет 76,5 % от исходной величины. В течение исследованного времени и в названных температурных условиях фермент стабилен при pH 4,7–5,0 C, а при pH 6,0 активность β -фруктофуранозидазы резко снижается и составляет всего 50,8% от начальной величины.

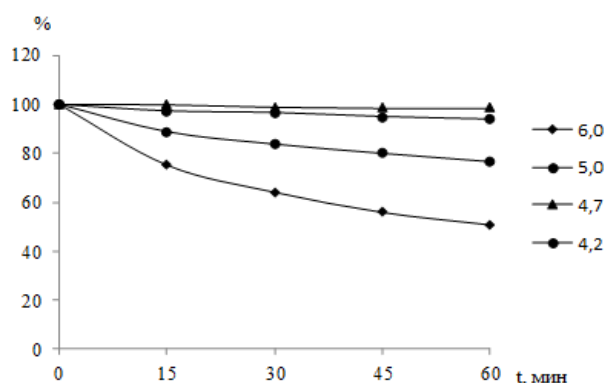


Рисунок 4. – pH-стабильность β -фруктофуранозидазы *A. Niger* ФФ-В4

Заключение. Таким образом, синтез грибом *A. Niger* ФФ-В4 внеклеточной β -фруктофуранозидазы с высокой удельной активностью, а также стабильность фермента в условиях, предполагающих его использование для получения инвертных сахарных сиропов, позволяют предлагать новый штамм *A. Niger* ФФ-В4 в качестве основы для разработки технологии получения импортозамещающего биокатализатора для пищевой промышленности.

Список использованных источников

1. Fructosyltransferases and Invertases: Useful Enzymes in the Food and Feed Industries / L. E. Toledo, D. Martinez, E.R. Cruz, L. Rivera-Intriago // Enzymes in Food Biotechnology. – Elsevier Inc., 2019. – Chapter 26. – P. 451–469. – DOI: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00026-8.
2. A review on invertase: Its potentials and applications / H. Manoochehri, N.F. Hosseini, M. Saidijam, M. Taheri // Biocat. Agric. Biotechnol. – 2020. – Vol. 25. – P.793–797. – DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101599.
3. Тамкович И.О., Лобанок А.Г., Сапунова Л.И. Синтез внеклеточной β -фруктофуранозидазы представителями родов *Bacillus*, *Saccharomyces* и *Aspergillus* // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: матер. XIV Междунар. науч. конф., Минск, 2–7 июня 2025 г. / орг. ком.: А.А. Шепшелев (пред.) [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2025. – С. 172–173.