

**ХАРАКТЕРИСТИКА МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА ИНВ-SP11 –
НОВОГО ПРОДУЦЕНТА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ИНВЕРТАЗЫ КАК
ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИНВЕРТНОГО САХАРНОГО СИРОПА
ДЛЯ ПОДКОРМКИ ПЧЕЛ**

Л. И. Сапунова¹, И. О. Тамкович¹, И. Г. Чиж², И. М. Лойко³

¹ – ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси»

г. Минск, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 220141,

г. Минск, ул. Купревича, 2; e-mail: microbio@mbio.bas-net.by;

leonida@mbio.bas-net.by);

² – Белорусский государственный университет

г. Минск, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 220045,

г. Минск, ул. Курчатова, 10; e-mail: irachizh99@gmail.com);

³ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,

г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by)

***Ключевые слова:** мицелиальный гриб, культивирование, инвертаза, биосинтез, свойства, инвертный сироп, углеводная подкормка, пчелы.*

***Аннотация.** Охарактеризованы культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства, получены масс-спектры белков, позволившие идентифицировать изолят мицелиального гриба ИНВ-SP11 как *Aspergillus species*. Определен углеводный состав питательной среды на основе отходов переработки зернобобового сырья для культивирования штамма-продуцента внеклеточной инвертазы. Установлены свойства фермента, определяющие эффективность его использования для получения инвертного сахарного сиропа, востребованного в качестве углеводной подкормки пчел.*

CHARACTERISTICS OF MYCELIAL FUNGUS INV-SP11 – A NEW SOURCE OF EXTRACELLULAR INVERTASE USED IN PRODUCTION OF INVERT SUGAR SYRUP FOR BEES

L. I. Sapunova¹, I. A. Tamkovich¹, I. G. Chyzh², I. M. Loiko³

¹ – Institute of Microbiology, National Academy of Sciences Minsk, Republic of Belarus (Republic of Belarus, Minsk, 220141, 2 Kuprevich str.; e-mail: microbio@mbio.bas-net.by; leonida@mbio.bas-net.by);

² – Belarusian state university Minsk, Republic of Belarus (Republic of Belarus, Minsk, 220045, 10 Kurchatov str.; e-mail: rachizh99@gmail.com);

³ – EI «Grodno state agrarian university» Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova str.; e-mail: ggau@ggau.by)

Key words: filamentous fungus, cultivation, invertase, biosynthesis, properties, invert syrup.

Summary. Cultural-morphological and physiological-biochemical properties were characterized; MALDI-mass spectrometry of cellular proteins was performed, allowing to refer the INV-SP11 fungal isolate to *Aspergillus* species. The carbohydrate composition of the nutrient medium based on leguminous waste was determined for the further cultivation of the strain-producer of extracellular invertase. The catalytic and physicochemical properties of the enzyme governing its efficiency in production of invert sugar syrup were revealed. The product may be marketed as carbohydrate supplement to bee rations.

(Поступила в редакцию 01.06.2022 г.)

Введение. Инвертаза, или β -фруктофуранозидаза (2,1- β -D-фруктофуранозид-фруктогидролаза, КФ 3.2.1.26), катализирует реакцию гидролиза β -D-фруктофуранозидных остатков в β -D-фруктофуранозидах. В случае сахарозы продуктом ферментативной реакции является эквимолярная смесь D-глюкозы и D-фруктозы, известная как инвертный сахар.

Инвертаза благодаря своей гидролитической активности находит широкое применение в пищевой промышленности, прежде всего для получения инвертного сиропа – заменителя сахара. Пока в значительно меньшей мере фермент востребован в технологиях производства косметических и лекарственных средств, нутрицевтиков, биосенсоров для определения сахарозы, а также в кормопроизводстве для повышения перевариваемости сахарозосодержащих ингредиентов кормов [1, 2].

Инвертазы помимо гидролиза β -D-фруктофуранозидов катализируют также реакцию их трансфруктозилирования. При использовании

сахарозы в качестве акцептора фруктозильных остатков происходит синтез фруктоолигосахаридов – 1-кестозы, нистозы и фруктофуранозилнистозы. В отличие от сахарозы эти короткоцепочечные соединения менее сладкие и менее калорийные, что делает их продуктом диабетического питания. Фруктоолигосахариды более высокой степени полимеризации обладают пребиотическим свойством, участвуют в синтезе жирных кислот, регуляции сахарного и липидного обмена, способствуют усвоению минеральных веществ [3-5].

В настоящее время коммерческое производство инвертазы основано на использовании небольшого числа микроорганизмов-продуцентов, хотя свойством синтезировать фермент обладают многие растения, животные, бактерии, дрожжевые и мицелиальные грибы [6]. Это стимулирует проведение исследований, связанных с выделением новых штаммов-продуцентов фермента.

Ранее нами в качестве потенциального продуцента инвертазы был отобран мицелиальный гриб ИНВ-SP11 [7].

Цель работы – характеристика нового штамма ИНВ-SP11 – продуцента инвертазы и оценка ее свойств, определяющих эффективность получения инвертного сахарного сиропа.

Материал и методика исследований. Объектом исследований являлся мицелиальный гриб ИНВ-SP11, который хранится в рабочей коллекции лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси. Исследование его культурально-морфологических и физиолого-биохимических особенностей проводили общепринятыми методами. Масс-спектрометрические характеристики клеточных белков получали с использованием матрично-активированной лазерной десорбции / ионизации с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS).

Токсикологическую экспертизу микробной культуры проводили общепринятыми методами на самках беспородных белых крыс массой 134-140 г в возрасте 1,5 мес. Животных обеих групп содержали на принятом в виварии рационе. Дополнительно крысам опытной группы из поилок в свободном доступе задавали спорово-клеточную суспензию гриба ($5,4 \times 10^9$ КОЕ/мл), приготовленную с использованием физиологического раствора. Крысы контрольной группы получали физиологический раствор. Длительность эксперимента – 14 дней. Ежедневно учитывали количество потребляемой суспензии микробной культуры в расчете на 1 крысу, а также оценивали внешний вид, поведение, потребление корма, анализировали динамику массы тела. По окончании эксперимента у животных отбирали кровь для проведения гематологических и биохимических исследований.

Глубинное культивирование гриба ИНВ-SP11 выполняли в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на шейкере-инкубаторе WIS-10R (180-200 об./мин) при 24-26 °С в течение 24-96 ч, в зависимости от цели эксперимента.

Питательная среда базового состава для глубинного культивирования микроорганизма включала (в %): сахарозу – 2,00; пептон – 1,00; дрожжевой экстракт – 1,00; NH_4NO_3 – 0,86; KH_2PO_4 – 0,10; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; NaCl – 0,50; исходный pH 5,0.

При исследовании микробного синтеза инвертазы в зависимости от источников углеводного и азотного питания дорогостоящие компоненты в составе базовой среды заменяли отходами переработки растительного сырья. Вместо дрожжевого экстракта и пептона использовали кукурузный экстракт (0,5 %), вместо сахарозы – пшеничные отруби, хлопчатниковый шрот, соевый шрот, пивную дробину, овсяные хлопья или пшеничные отруби (1,0 %).

Питательную среду инокулировали водной суспензией спор и мицелия гриба (4 об.%), выращенного на сусло-агаре при температуре 24-26 °С в течение 5-7 сут. В начале, а затем через каждые 24 ч культивирования асептически отбирали пробы культуральной жидкости для проведения аналитических исследований.

Биомассу гриба от культуральной жидкости отделяли центрифугированием (10 000 g, 5 мин). В бесклеточной культуральной жидкости определяли величину pH потенциометрически, содержание редуцирующих сахаров – с 3',5'-динитросалициловой кислотой [8].

Активность инвертазы определяли фотометрическим методом, основанным на детектировании продуктов реакции 3',5'-ДНС с редуцирующими сахарами, образующимися в результате ферментативного гидролиза сахарозы. За единицу активности принимали количество инвертазы, в результате действия которой на сахарозу в течение 1 мин при 30 °С и pH 4,7 высвобождается 1 мкмоль восстанавливающих сахаров в расчете на глюкозу. Активность фермента выражали в условных единицах в 1 мл бесклеточной культуральной жидкости (ед./мл).

Влияние концентрации водородных ионов на активность инвертазы исследовали при 30 °С в диапазоне pH 3,0-7,0, температуры – при pH 5,5 в диапазоне 20-70 °С.

Термостабильность инвертазы оценивали по ее остаточной активности, определяемой после 15, 30, 45 и 60 мин ее инкубации в 0,05 М ацетатном буфере (pH 5,5) при 40, 50 и 60 °С.

Константу Михаэлиса (K_m) фермента рассчитывали методом двойных обратных величин в системе координат Лайнуивера-Берка.

При статистической обработке использовали программу из пакета Microsoft Windows. Экспериментальные данные достоверно различались, если доверительные интервалы их средних арифметических для уровня вероятности $P < 0,05$ не перекрывались.

Результаты исследований и их обсуждение. Среди природных микроорганизмов, растущих на сахарозосодержащих субстратах, нами в качестве потенциального продуцента инвертазы был отобран изолят мицелиального гриба ИНВ-SP11 [7]. На основании культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков (рисунок 1), MALDI-масс-спектров клеточных белков, полученных в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии НАН Беларуси, гриб ИНВ-SP11 отнесен к роду *Aspergillus*.



Рисунок 1 – Рост мицелиального гриба ИНВ-SP11 на агаризованных средах Чапека (а) и Сабуро (б)

Проведенные токсиколого-гигиенические испытания штамма *Aspergillus sp.* ИНВ-SP11 свидетельствуют о его безвредности для лабораторных животных и возможности безопасного использования в качестве продуцента инвертазы.

Как правило, синтез инвертазы у микроорганизмов носит индуцированный характер, а его эффективность зависит от концентрации сахарозы в среде культивирования. Согласно полученным данным, максимум образования внеклеточной инвертазы (6,86 ед./мл) грибом *Aspergillus sp.* ИНВ-SP11 отмечался в среде с 2 % сахарозы на 96 ч роста (рисунок 2). Повышение концентрации дисахарида в среде до 3-4 % приводит к более выраженному угнетению продукции фермента, чем снижение его содержания до 1 %.

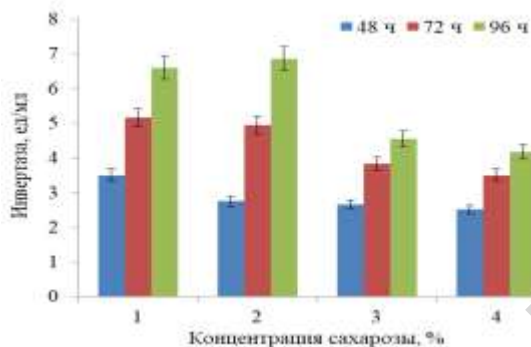
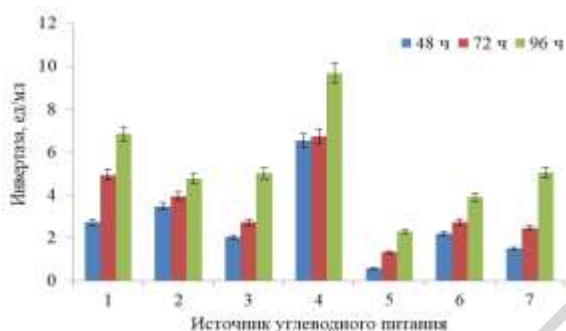


Рисунок 2 – Зависимость синтеза инвертазы *Aspergillus sp.* ИНВ-SP11 от содержания сахарозы в среде

Изучение возможности замены сахарозы агропромышленными отходами показало, что максимальный уровень продукции внеклеточного фермента (9,7 ед./мл) наблюдался в среде с соевым шротом на 4 сут роста *Aspergillus sp.* ИНВ-SP11 (рисунок 3). При этом уже на 2 и 3 сут уровень образования инвертазы грибом достигал соответственно 6,56 и 6,73 ед./мл, что сопоставимо с показателем его инвертазной активности на 4 сут (6,86 ед./мл) роста в среде с сахарозой.

Анализ синтеза инвертазы в зависимости от количества соевого шрота указывает на максимум (9,83 ед./мл) ее накопления на 4 сут культивирования *Aspergillus sp.* ИНВ-SP11 в среде с 5 % исследуемого субстрата (таблица). Пониженное на 12,5 и 10,4 % образование фермента грибом наблюдалось в средах соответственно с 4,0 и 7,5 % соевого шрота, на 27,7 и 24,7 % в средах с его содержанием 2 и 10 %. Минимальным уровнем образования инвертазы (3,47 ед./мл) характеризовался гриб, растущий в питательной среде с 1 % исследуемого субстрата.



1 – сахароза, 2 – пшеничные отруби, 3 – хлопчатниковый шрот, 4 – соевый шрот, 5 – пивная дробина, 6 – овсяные хлопья, 7 – овсяные хлопья + пшеничные отруби

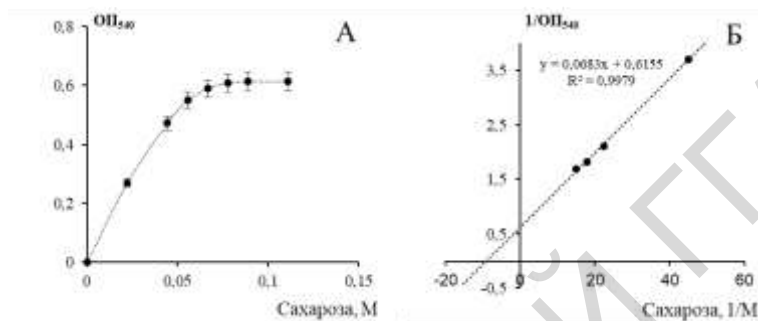
Рисунок 3 – Синтез инвертазы *Aspergillus sp.* ИНВ-SP11 в средах различного состава

Таблица – Зависимость синтеза инвертазы грибом *Aspergillus sp.* ИНВ-SP11 от количества соевого шрота

Соевый шрот, %	Длительность культивирования, ч	pH конечный	Концентрация глюкозы, мг/мл	Концентрация белка, мг/мл	Инвертаза, ед./мл
1	48	6,67 ± 0,30	0,17 ± 0,009	0,19 ± 0,010	2,80 ± 0,140
	72	7,03 ± 0,21	0,18 ± 0,009	0,22 ± 0,011	3,26 ± 0,163
	96	7,14 ± 0,30	0,18 ± 0,009	0,26 ± 0,013	3,47 ± 0,174
2	48	6,80 ± 0,31	0,18 ± 0,009	0,25 ± 0,013	5,02 ± 0,251
	72	7,20 ± 0,26	0,20 ± 0,010	0,29 ± 0,015	6,38 ± 0,319
	96	7,31 ± 0,29	0,24 ± 0,012	0,31 ± 0,016	7,11 ± 0,356
3	48	6,82 ± 0,30	0,24 ± 0,012	0,31 ± 0,016	6,30 ± 0,315
	72	7,40 ± 0,26	0,29 ± 0,015	0,37 ± 0,019	7,30 ± 0,365
	96	7,45 ± 0,31	0,33 ± 0,017	0,38 ± 0,019	7,64 ± 0,382
4	48	6,74 ± 0,31	0,35 ± 0,018	0,37 ± 0,019	6,81 ± 0,341
	72	7,40 ± 0,31	0,36 ± 0,018	0,42 ± 0,021	8,11 ± 0,406
	96	7,49 ± 0,29	0,39 ± 0,020	0,43 ± 0,022	8,60 ± 0,430
5	48	6,96 ± 0,25	0,42 ± 0,021	0,40 ± 0,020	7,74 ± 0,387
	72	7,40 ± 0,29	0,45 ± 0,023	0,47 ± 0,024	8,97 ± 0,449
	96	7,56 ± 0,31	0,51 ± 0,026	0,48 ± 0,024	9,83 ± 0,492
7,5	72	7,39 ± 0,29	0,17 ± 0,009	0,55 ± 0,028	8,29 ± 0,415
	96	7,80 ± 0,32	0,56 ± 0,028	0,55 ± 0,028	8,90 ± 0,445
10	72	6,60 ± 0,30	0,17 ± 0,009	0,47 ± 0,024	7,74 ± 0,387
	96	7,40 ± 0,29	0,48 ± 0,024	0,49 ± 0,025	7,40 ± 0,370

Известно, что эффективность использования ферментов определяется их свойствами [6]. В результате выполненных нами исследований установлено, что максимум скорости гидролиза сахарозы инверта-

зой *Aspergillus sp.* ИНВ-SP11 отмечается при концентрации субстрата в среде 85 мМ (рисунок 4А), а расчетная величина константы Михаэлиса фермента к субстрату составляет 42 мМ (рисунок 4Б).



А – координаты Михаэлиса-Ментен; Б – координаты Лайнуивера-Берка
Рисунок 4 – Зависимость активности инвертазы *Aspergillus sp.* ИНВ-SP11 от концентрации сахарозы

Оптимумы действия фермента имеют ярко выраженные максимумы при температуре 50 °С и рН 5,5 (рисунок 5).

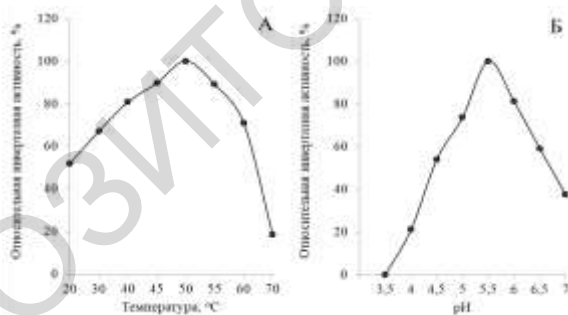


Рисунок 5 – Влияние температуры (А) и рН (Б) на активность инвертазы гриба *Aspergillus sp.* ИНВ-SP11

При оптимальном значении рН и температурах 45 и 55 °С активность фермента составляет около 90 % от максимальной величины, при 60 и 70 °С – около 70 и 20 % соответственно (рисунок 5А). Следует подчеркнуть, что инвертаза исследуемого гриба проявляет более 50 % своей максимальной активности при 20 °С, что позволяет использовать фермент для получения инвертного сиропа для подкормки пчел в условиях пасеки.

Активность инвертазы не обнаруживается в очень кислой среде – при pH 3,5 и менее (рисунок 5Б). Сродство фермента к субстрату при pH 4,0 и pH 4,5 понижено на 80 и 46 % по сравнению с максимальным показателем, который отмечается при pH 5,5. Около 75 и 20 % от максимальной активности инвертазы проявляется соответственно при pH 5,0 и pH 6,0, до 38 % – при pH 7,0. Фермент сохраняет около 90 % активности при 60 °С и pH 5,5 в течение не менее 60 мин.

Заключение. Изолят ИНВ-SP11, идентифицированный как *Aspergillus species*, растет в средах с отходами переработки растительного сырья и продуцирует внеклеточную инвертазу с высоким сродством к сахарозе, активностью и стабильностью в широком диапазоне pH и температуры. Это позволяет использовать штамм в качестве штамма-продуцента при разработке технологии производства ферментного препарата для получения инвертного сахарного сиропа, востребованного в пчеловодстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wei, C. P. Structural properties, production, and commercialization of invertase / C. P. Wei, N. V. R. Aizi, D. J. Nur // *Sains Malaysiana*. – 2019. – Vol. 48, № 3. – P. 523-531.
2. Fructosyltransferases and Invertases: Useful Enzymes in the Food and Feed Industries / L. E. Toledo [et al.] // *Enzymes in Food Biotechnology*. – Elsevier Inc., 2019. – Chapter. 26 – P. 451-469.
3. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications / A. L. Dominguez [et al.] // *Food and Bioprocess Technology*. – 2014. – Vol. 7, № 2. – P. 324-337.
4. A review on invertase: Its potentials and applications / H. Manoochehri [et al.] // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – Vol. 25. – P. 793-797.
5. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry / M. C. R. Mano [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 102, № 1. – P. 17-37.
6. Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties / H. Nadeem [et al.] // *Process Biochemistry*. – 2015. – Vol. 50, № 8. – P. 1202-1210.
7. Тамкович, И. О. Скрининг синтезирующих инвертазу мицелиальных грибов / И. О. Тамкович, Л. И. Сапунова, И. Г. Чиж // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси; редкол.: Э. И. Коломиец [и др.]*. – Минск: Беларуская навука, 2021. – Т. 13. – С. 130-143.
8. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / G. L. Miller // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol. 31. – P. 426-428.