

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет
имени К.И.Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

Нурмаханова Жадыра Сәдібекқызы

Изучение биотехнологии фитазы с использованием штамма *Aspergillus niger*

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Специальность 6В05101– «Биотехнология»

Алматы 2023

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет
имени К.И.Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

ДОПУЩЕНА К ЗАЩИТЕ
Заведующий кафедрой «Химическая и
биохимическая инженерия»
доктор Ph.D.
А.А. Амитова
2023 г.



ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

На тему: «Изучение биотехнологии фитазы с использованием штамма
Aspergillus niger»

по специальности 6B05101 – Биотехнология

Выполнила

Нурмаханова Жадыра Сәдібекқызы

Рецензент

кандидат биологических наук,

асс. профессор

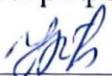
 Лесова Ж.Т.

«dd» 05 2023 г.

Научный руководитель,

кандидат с.-х. наук,

асс. профессор

 Каташева А.Ч.

«dd» 05 2023 г.

Алматы 2023

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет
имени К.И.Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

6B05101 - Биотехнология

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой
«Химическая и
биохимическая инженерия»
доктор Ph.D.
А.А. Амитова
2023 г.



ЗАДАНИЕ

на выполнение дипломной работы

Обучающемуся Нурмаханова Жадыра Сәдібекқызы

Тема: Изучение биотехнологии фитазы с использованием штамма *Aspergillus niger*

Утверждена приказом проректора по академическим вопросам № 408 – П/Ө от 23.11.2022 г.

Срок сдачи законченной работы «24» «05» 2023 г.

Исходные данные к дипломной работе:

Краткое содержание дипломной работы:

- а) литературный обзор;*
- б) материалы и методы исследования;*
- в) научные результаты и их анализ;*

Перечень графического материала: *представлены 12 слайдов презентации работы.*

Рекомендуемая основная литература: *из 21 наименований 15 основных и 6 дополнительных.*

ГРАФИК

подготовки дипломной работы

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю и консультантам	Примечание
Литературный обзор	09.01.2022	
Экспериментальная часть	07.02.2023 - 20.04.2023	
Обсуждение результатов	27.04.2023	
Оформление работы	10.05.2023	

Подписи

консультантов и нормконтролера на законченную дипломную работу с указанием относящихся к ним разделов работы

Наименование разделов	Консультанты, И.О.Ф (уч.степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Аналитический обзор литературы	А.Ч. Каташева кандидат с.-х. наук, асс.профессор	09.01.2022	
Объект, материалы и методика исследования	А.Ч. Каташева кандидат с.-х. наук, асс.профессор	07.02.2023 - 20.04.2023	
Результаты исследования	А.Ч. Каташева кандидат с.-х. наук, асс.профессор	27.04.2023	
Нормконтролер	А.Ч. Каташева кандидат с.-х. наук, асс.профессор	10.05.2023	

Научный руководитель



Каташева А.Ч.

Задание принял к исполнению обучающийся



Нурмаханова Ж.С.

Дата

«02» 05 2023 г

АННОТАЦИЯ

Настоящая дипломная работа объемом на 47 страницах печатного текста состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследований, результаты и их обсуждения, выводов и списка использованных источников.

В структуру работы включены 12 рисунков и 7 таблиц. При написании дипломной работы использовано 21 литературных источников.

Ключевые слова: фитаза, фитиновая кислота, биосинтез, штамм *Aspergillus niger*.

Актуальность исследования. В последние годы фитазы, гидролизующие фитаты, соли D-мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексаксидигидрофосфорной кислоты, стали важными в питании человека и животных. В пищевом сырье растительного происхождения снижается содержание свободного фосфора, железа, кальция, магния, меди, натрия, аминокислот за счет образования хелатных комплексов с фитиновой кислотой.

Для пищевой и кормовой промышленности наиболее востребованы кислотоустойчивые и термостабильные ферменты. К ним относятся фитазы, синтезируемые грибами *Aspergillus*, промышленными продуцентами широкого спектра пищевых микроингредиентов.

Цель дипломной работы: изучение биотехнологии фитазы с использованием штамма *Aspergillus niger*. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- исследование влияния метода выращивания штамма на биосинтез фитазы;
- определение влияния концентрации сахара при выращивании штамма на биосинтез фитазы;
- определение влияния температуры выращивания штамма на биосинтез фитазы;
- изучение влияния количества фосфора при выращивании штамма на биосинтез фитазы.

Результат работы. Были исследованы влияния метода выращивания штамма на биосинтез фитазы. Изучены влияния концентрации сахара при выращивании штамма на биосинтез фитазы. Определено влияние температуры выращивания штамма на биосинтез фитазы. Изучены влияния количества фосфора при выращивании штамма на биосинтез фитазы.

АНДАТПА

Дипломдық жұмыс 47 беттік баспа мәтіннен тұратын кіріспеден, әдебиеттерге шолудан, зерттеу материалдары мен әдістерінен, нәтижелер мен оларды талқылаудан, қорытындылардан және пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады.

Дипломдық жұмыстың құрылымы 12-сурет пен 7-кестеден тұрады. Дипломдық жұмысты жазу кезінде 21 әдебиет көздеріне шолу жасалды.

Кілт сөздер: фитаза, фитин қышқылы, биосинтез, *Aspergillus niger* штаммы.

Зерттеудің өзектілігі. Соңғы жылдары фитазаны гидролиздейтін фитаттар, D-мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексаксидигидрофосфор қышқылының тұздары адам мен жануарлардың қоректенуінде маңызды орын алды. Өсімдік тектес тағамдық шикізатта фитин қышқылымен хелаттық кешендердің түзілуіне байланысты бос фосфор, темір, кальций, магний, мыс, натрий, аминқышқылдарының мөлшері азаяды.

Тамақ өнеркәсібі және жем өнеркәсібі үшін қышқылға төзімді және термотұрақты ферменттер ең сұранысқа ие. Оларға *Aspergillus* саңырауқұлақтарымен синтезделген фитазалар, тағамдық микроингредиенттердің кең спектрін өнеркәсіптік өндірушілер жатады.

Дипломдық жұмыстың мақсаты: *Aspergillus niger* штаммының көмегімен фитаза биотехнологиясын зерттеу. Осы мақсатқа жету үшін келесі міндеттер шешілді:

- фитаза биосинтезіне штамм өсіру әдісінің әсерін зерттеу;
- штамм өсіру кезіндегі қант концентрациясының фитаза биосинтезіне әсерін анықтау;
- фитаза биосинтезіне штамм өсіру температурасының әсерін анықтау;
- штамм өсіру кезіндегі фосфор мөлшерінің фитаза биосинтезіне әсерін зерттеу.

Жұмыстың нәтижесі. Штаммды өсіру әдісінің фитаза биосинтезіне әсері, қант концентрациясының фитаза биосинтезіне әсері зерттелді. Штамның өсу температурасының фитаза биосинтезіне әсері анықталды. Штаммды өсіру кезіндегі фосфор мөлшерінің фитаза биосинтезіне әсері зерттелді.

ABSTRACT

This thesis consists of an introduction, literature review, research materials and methods, results and their discussion, conclusions and a list of sources used, on 47 pages of printed text.

The structure of the work includes 12 figures and 7 tables. When writing the thesis, 21 literary sources were used.

Key words: phytase, phytic acid, biosynthesis, *Aspergillus niger* strain.

The relevance of research. In recent years, phytase hydrolyzing phytates, salts of D-myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisdihydrophosphoric acid, have become important in human and animal nutrition. In food raw materials of plant origin, the content of free phosphorus, iron, calcium, magnesium, copper, sodium, amino acids decreases due to the formation of chelate complexes with phytic acid.

For the food and feed industry, acid-resistant and thermostable enzymes are most in demand. These include phytases synthesized by *Aspergillus* fungi, industrial producers of a wide range of food micro-ingredients.

The purpose of the thesis: the study of phytase biotechnology using a strain of *Aspergillus niger*. To achieve this goal, the following tasks were solved:

- study of the influence of the method of growing the strain on the biosynthesis of phytase;
- determination of the effect of sugar concentration during strain cultivation on phytase biosynthesis;
- determination of the effect of strain cultivation temperature on phytase biosynthesis;
- study of the influence of the amount of phosphorus during the cultivation of the strain on the biosynthesis of phytase.

The result of the work. The effects of the strain growing method on phytase biosynthesis were investigated. The effect of sugar concentration during strain cultivation on phytase biosynthesis was studied. The influence of the strain growing temperature on phytase biosynthesis was determined. The influence of the amount of phosphorus during the cultivation of the strain on the biosynthesis of phytase was studied.

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	9
1	ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1	Фитиновая кислота. Антипитательные эффекты фитиновой кислоты	11
1.2	Фитаза. Общая информация. Ферментативные свойства	14
1.3	Среднеферментационные методы биосинтеза фитазы	17
1.4	Синтез ферментов при поверхностном культивировании продуцентов	19
1.5	Влияние качественного состава компонентов питательной среды на биосинтез фитазы	22
1.6	Микромицет <i>Aspergillus niger</i> является продуцентом лимонной кислоты	26
2	ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
2.1	Объекты исследования	29
2.2	Методы исследования	29
3	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
3.1	Подготовка штамма – продуцента для биоферментации	30
3.2	Результаты по определению влияния метода выращивания штамма на биосинтез фитазы	30
3.3	Результаты по определению влияния концентрации сахара при выращивании штамма на биосинтез фитазы	33
3.4	Результаты по определению влияния температуры выращивания штамма на биосинтез фитазы	37
3.5	Эксперименты по определению влияния количества фосфора при выращивании штамма на биосинтез фитазы	41
	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	44
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	46

ВВЕДЕНИЕ

Физиологическая роль фитиновой кислоты в растениях заключается в том, что она является резервом фосфора и энергии. Он содержится в больших количествах в зерновых, масличных и бобовых культурах, при этом фитатный фосфор составляет 60-82% основного компонента общего фосфора. Это вещество широко используется в качестве пищевой добавки благодаря своим антиоксидантным свойствам, и несколько исследований изучали его антиоксидантную активность в мясных продуктах и его защитное действие против окислительного повреждения в эмульсиях, увеличивая срок хранения этих продуктов.

В настоящее время фитиновая кислота в основном используется в качестве депигментирующего средства, действуя посредством ингибирования (хелатированием ионов меди и железа) тирозиназы, а также действует как антиоксидант при отбеливании гиперхромных пятен.

В последние годы фитазы, гидролизующие фитаты, соли D-миоинозитол-1,2,3,4,5,6-гексаксидигидрофосфорной кислоты, стали важными в питании человека и животных. В пищевом сырье растительного происхождения снижается содержание свободного фосфора, железа, кальция, магния, меди, натрия, аминокислот за счет образования хелатных комплексов с фитиновой кислотой.

Для пищевой и кормовой промышленности наиболее востребованы кислотоустойчивые и термостабильные ферменты. К ним относятся фитазы, синтезируемые грибами *Aspergillus*, промышленными продуцентами широкого спектра пищевых микроингредиентов.

Работы Грейнер Р., Гомеш да Силва Л., Кури С., Гаргова С., Сарийска М., Сандхья А., Шридеви А., Нарасимха Г., Бекалу З.Е., Мадсен К.К., Дионисио Г., Бринч-Педерсен Н., и Nahas E. рассматривают вопросы биосинтеза фитазы *Aspergillus niger*.

С момента своего открытия фитиновая кислота была классифицирована как антипитательный компонент злаков и бобовых. Исследования традиционно были сосредоточены на его уникальной структуре, которая дает ему способность связывать минералы, белки и крахмал, а также на вытекающих из этого вредных последствиях. Фитиновая кислота также связана с высоким выделением фосфора животными с однокамерным желудком и возникающими в результате экологическими проблемами загрязнения воды и почвы фосфором. Хотя все эти опасения обоснованы, разработка фитаз предложила решения для преодоления некоторых из этих побочных эффектов. При большем понимании воздействия фитиновой кислоты многие побочные эффекты можно преодолеть. Кроме того, более поздние исследования показали, что те же свойства, которые обозначают фитиновую кислоту как антинутриент, на самом деле могут быть ответственны за широкий спектр преимуществ. Было предложено много новых областей использования фитиновой кислоты, включая

медицинские и промышленные применения. В этом обзоре будет дан общий обзор структуры и функции фитиновой кислоты и фитаз, фитиновой кислоты как компонента пищевых продуктов и кормов для животных, промышленного применения и медицинских свойств, чтобы лучше понять всю систему фитиновой кислоты.

Цель и задачи исследования. Цель работы: изучение биотехнологии фитазы с использованием штамма *Aspergillus niger*. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- исследование влияния метода выращивания штамма на биосинтез фитазы;
- определение влияния концентрации сахара при выращивании штамма на биосинтез фитазы;
- определение влияния температуры выращивания штамма на биосинтез фитазы;
- изучение влияния количества фосфора при выращивании штамма на биосинтез фитазы.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Фитиновая кислота. Антипитательные эффекты фитиновой кислоты

С момента своего открытия фитиновая кислота была классифицирована как антипитательный компонент зерновых и бобовых культур. Исследования традиционно были сосредоточены на его уникальной структуре, которая придает ему способность связывать минералы, белки и крахмал.

Фитиновая кислота была связана с высоким выделением фосфора животными с однокамерным желудком и, как следствие, экологическими проблемами загрязнения фосфором воды и почвы. Хотя все эти опасения справедливы, разработка фитазы предложила решения для преодоления некоторых из этих побочных эффектов. Многие побочные эффекты можно преодолеть, если лучше понять действие фитиновой кислоты. Кроме того, недавние исследования показали, что свойства, которые определяют фитиновую кислоту как антинутриент, могут быть ответственны за широкий спектр преимуществ. Было предложено много новых применений фитиновой кислоты, включая медицинские и промышленные применения.

Фитат или фитиновая кислота (ФК) является основной и вездесущей формой фосфора в зерне, бобовых и масличных культурах. Фитиновая кислота выполняет ряд физиологических функций, а также существенно влияет на функциональные и питательные свойства зерновых, бобовых и масличных культур (и продуктов на их основе, в том числе кормовых), образует комплекс с белками и минеральными веществами [1].

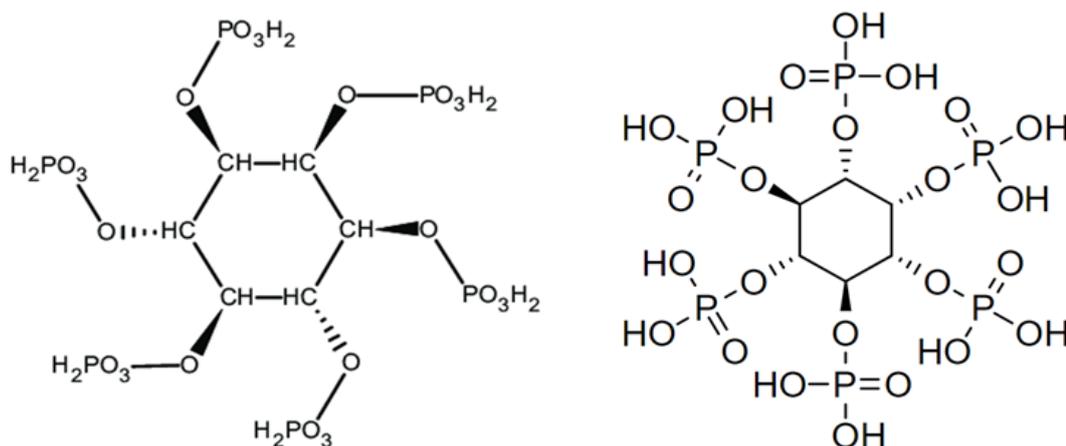


Рисунок 1 – Фитиновая кислота

Правильное химическое название фитиновой кислоты - мио-инозитол 1,2,3,4,5,6-гексакис дигидрофосфат. В 1903 г. Постернак впервые описал фитиновую кислоту, а в 1872 г. она была открыта Пфеффером. Молекулярная формула фитиновой кислоты – $C_6H_{18}O_{24}P_6$, а ее молекулярная масса – 659,86 Дальтон.

Одна треть фосфора в пищевых продуктах находится в форме усвояемого неорганического фосфора, а две трети – в форме органического фитинового фосфора.

Соли фитиновой кислоты относятся к фитатам. Более конкретно, фитат представляет собой смешанную соль калия, магния и кальция фитиновой кислоты, которая присутствует в виде хелата в зерне, бобовых и масличных культурах. Поскольку фитиновая кислота является распространенным в природе соединением, ученые предположили, что некоторые микроорганизмы могут расщеплять ее и использовать гидролизированный фосфор. Это, по-видимому, имеет место для некоторых бактерий, описанных, а теперь и для многих грибов, синтезирующих фитазы. Фитазы присутствуют в очень небольших количествах в желудочно-кишечном тракте некоторых животных с однокамерным желудком, таких как свиньи и домашняя птица, шерстистые животные и рыбы.

В результате непереваренный фитат, попавший в организм этих животных, выбрасывается в окружающую среду, что приводит к эвтрофикации и цветению водорослей в водоемах. Кроме того, животные с однокамерным желудком страдают от проблем с питанием из-за нарушения пищеварения фитатов. Продукты, содержащие фитаты, не рекомендуются детям с дефицитом Ca, Fe, Mg, Zn, например, при анемии или рахите. Фитиновая кислота способна ингибировать активность желудочно-кишечных ферментов, таких как пепсин и трипсин, что приводит к неблагоприятным последствиям в виде тяжести и газообразования в желудке [2].

Конформационные структуры фитиновой кислоты были получены с помощью рентгеноструктурного анализа ^{31}P -ЯМР. Джонсон и Тейт предположили, что фосфат в фитате находится на втором месте в аксиальном положении, тогда как остальные фосфаты находятся в экваториальном положении. Фитат состоит из инозита, который представляет собой соединение гексагидроксициклогексана с шестью связями сложного эфира фосфорной кислоты. Фосфатные группы придают этой молекуле высокий отрицательный заряд и, следовательно, сильную хелатирующую способность, которая снижает биодоступность аминокислот и минералов, таких как Ca^{2+} , Zn^{2+} и Fe^{2+} . Это указывает на то, что фитиновая кислота обладает сильным потенциалом образования сложных многовалентных катионов и положительно заряженных белков, поскольку она существует в виде отрицательно заряженной молекулы в широком диапазоне pH.

Фитиновая кислота является основным источником органического фосфора, который содержится в зрелых семенах в качестве запасных соединений фосфатов, и обычно около 70% запасов фосфатов приходится на фитиновую кислоту.

У злаков и бобовых фитиновая кислота накапливается в алейроновых клетках. У мелких зерен около 90 % фитиновой кислоты в семенах находится в алейроновом слое, а остальные 10 % – в зародыше. У кукурузы, наоборот, 90 %

находится в зародыше и 10 % – в алейроновом слое. Эндосперм зерен пшеницы и риса почти лишен фитата, так как он сконцентрирован в зародыше и алейроновом слоях клеток зерна. Содержание фитатов в злаках колеблется от 0,06% до 2,22%. Среди злаков наибольшее количество фитатов обнаружено в кукурузе (0,83–2,22%) [3].

Почти вся фитиновая кислота существует в виде фитина, смешанной соли (обычно с K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} или Zn^{2+}), которая осаждается в виде кристаллов. Отложение фитиновой кислоты ограничено клетками, которые выживают во время покоящейся фазы развития семян, но также происходит в вегетативных тканях и пыльце. Фитиновая кислота синтезируется из мио-инозитола посредством ряда стадий фосфорилирования. Имеется лишь ограниченная информация о внутриклеточном расположении промежуточных продуктов биосинтеза фитиновой кислоты.

У плесневых грибов *Dictyostelium* анализ лизата выявил цитозольный путь биосинтеза фитиновой кислоты. Другие исследования показали, что в ядре вторичный мио-инозитол-1,4,5-трифосфат может ступенчато фосфорилироваться до фитиновой кислоты. Эффективное удаление фитиновой кислоты может быть достигнуто как ферментативным гидролизом, так и неферментативным расщеплением. В ферментативном пищеварении участвуют ферменты, расщепляющие фитиновую кислоту, выделенную из различных микроорганизмов. Следует отметить, что при гидролизе снижение содержания фитатов в продукте происходит во время обработки пищевых продуктов или отделения богатых фитатами частей семян растений. Разработка технологии производства для оптимизации каталитических свойств фитаз рассматривается как перспективная стратегия эффективного разделения фитатов.

Исследования показали, что фитиновая кислота оказывает сильное антипитательное действие на различных животных с однокамерным желудком. Этот эффект основан на уникальной молекулярной структуре фитиновой кислоты. При полной диссоциации шесть фосфатных групп фитиновой кислоты несут в общей сложности двенадцать отрицательных зарядов. Следовательно, фитиновая кислота обладает сильным потенциалом связывания с образованием сложных одно-, двух- и трехвалентных катионов или их смесей и нерастворимых комплексов с положительно заряженными белками.

Он образует довольно стабильные хелаты почти со всеми нерастворимыми многовалентными катионами в диапазоне рН от 6,0 до 7,0, хотя рН и концентрация катионов сильно влияют на их характеристики растворимости.

Образование нерастворимых фитатно-минеральных комплексов в кишечном тракте препятствует всасыванию минералов. Это снижает биодоступность основных минералов, а фитиновая кислота, по-видимому, является микроэлементом, оказывающим наибольшее влияние на биодоступность цинка. Фитиновая кислота взаимодействует с белками в широком диапазоне рН, образуя фитатно-белковые комплексы в результате

электростатического взаимодействия. При низкокислых значении рН фитиновая кислота имеет сильный отрицательный заряд за счет полной диссоциации фосфатных групп, при рН 6,0-7,0 образуется тройной минерально-белковый комплекс фитиновой кислоты, диссоциирующий при высокой концентрации Na^+ . В таких случаях можно ожидать отрицательного влияния фитиновой кислоты на растворимость белка из-за ионной связи между основными фосфатными группами фитиновой кислоты и протонированными аминокислотными остатками (лизином, гистидином и аргинином).

В кислых условиях фитиновая кислота может прочно связываться с растительными белками, поскольку изоэлектрическая точка растительных белков обычно составляет около 4,0-5,0. В промежуточном диапазоне значений рН (от 6,0 до 8,0) как фитиновая кислота, так и растительные белки имеют суммарный отрицательный заряд. Однако даже в этих условиях может образовываться комплекс между фитиновой кислотой и белками. Возможные механизмы включают прямое связывание протонированных $\alpha\text{-NH}_2$ -концевых групп фитиновой кислоты и $\varepsilon\text{-NH}_2$ -групп остатков лизина и взаимодействие поливалентных катионов [2,3].

Связываясь с растительными белками, фитиновая кислота снижает их растворимость и усвояемость, тем самым снижая их пищевую ценность. Помимо комплексообразования с минералами и белками, фитиновая кислота взаимодействует с такими ферментами, как трипсин, пепсин, α -амилаза и β -галактозидаза, что приводит к снижению активности этих важных пищеварительных ферментов [4].

1.2 Фитаза. Общая информация. Ферментативные свойства

Фитазы представляют собой класс гидролазных ферментов и подкласс фосфатаз (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат-фосфогидролазы), которые гидролитически расщепляют моноэфиры фосфорной кислоты. В реакции гидролиза фитиновой кислоты продуктами реакции являются мио-инозитол и неорганический фосфат, а также хелатные катионы металлов из комплекса с фитиновой кислотой. Позднее были открыты фитазы бактерий и грибов, а также фитазы дрожжей. На сегодняшний день известно большое количество фитаз различного происхождения, и количество ферментов с фитазной активностью постоянно увеличивается.

Благодаря активному обучению производителей препаратов фитазы, а также усилению конкуренции между ними, фитаза почти за 20 лет стала самым продаваемым ферментом на рынке. В течение двадцати лет специалисты хозяйственных предприятий были убеждены, что введение в корма фитазы позволит снизить себестоимость откорма животных за счет сокращения введения дорогостоящих компонентов.

В животноводстве к таким компонентам относятся кормовые фосфаты, а также аминокислоты, белки и другие источники энергии. Анализ изменений в

производстве, свойствах и использовании фитазы показывает, что главным и главным достижением последних 15 лет является то, что сегодня каждому диетологу и зоотехнику известно действие фитазы при отделении фосфора от фитатных комплексов. Не все используют его в кормлении животных и птиц и не ценят его пользы.

Согласно международной номенклатуре ферментов IUPAC-IUBMB, по стереоспецифичности выделяют три типа фитаз: 3-фитазы, 5-фитазы и 4/6-фитазы. Различные типы фитаз инициируют превращение фитиновой кислоты путем гидролиза сложноэфирной связи у разных атомов углерода инозитолового кольца, что приводит к образованию разных изомеров низших инозитолфосфатов. 3-фитазы были выделены из бактерий и микромицетов (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Pseudomonas* и *Klebsiella sp. ASR1*). Для них характерно инициирование гидролиза фитата в положении d-3 остатка фосфата в инозитольном кольце молекулы. 6-фитазы гидролизуют фитат по остатку 6-фосфора (положение d-4 (L-6)); эти фитазы обнаружены в *Escherichia coli*, реснитчатых бактериях *Paramecium*. Конечным продуктом гидролиза 3-фитазы является L-мио-инозитол-2-монофосфат, а 6-фитаза может полностью дефосфорилировать субстрат. Что касается группы 5-фитаз, то к ней относятся ферменты растительного происхождения (*Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa*, *Pisum sativum*).

Фитазы микромицетов обычно называют 3-фитазами, которые являются фитазами гистидиновой кислоты. Особенностью фитаз грибов является гликозилирование молекулы фермента, высокая субстратная специфичность. Например, *A. niger PhyA* имеет достаточно высокое сродство к определенному субстрату - фитату.

По pH-оптимуму каталитической активности фитазы делят на щелочные и кислые; основан на механизме катализа (фосфатазы гистидиновой кислоты, фосфатазы цистеина, β -пропеллерные фитазы, фосфатазы пурпурной кислоты). Большинство микробных фитаз являются фосфатазами гистидиновой кислоты или щелочными фитазами. Но в то же время имеется различие в их каталитических механизмах, стереоспецифических и биохимических свойствах.

В ходе катализа N- и C-концы фермента сближаются и образуют каталитический центр, обеспечивающий двухстадийное отщепление фосфат-ионов. Многие бактерии, грибы *Cladosporium sp.* и так далее. являются производителями GCF. Фосфатазы гистидиновой кислоты кислотоактивны (pH-оптимален в диапазоне 4,0–6,0). В кислой среде фитаты теряют катионы металлов и превращаются в фитиновую кислоту, проявляющую сродство к положительно заряженному каталитическому центру фитазы. Разложение металлов увеличивает активность фитазы. GCF способен к неспецифическому гидролизу эфиров фосфорной кислоты следующих соединений: АТФ, АМФ, фруктозо-1,6-дифосфат и др.

β -пропеллерные фитазы широко распространены в грибах, бактериях, растениях и животных. Ферменты этой группы фитаз получили свое название

благодаря своему пространственному строению: строение этих ферментов напоминает пропеллер с 6 лопастями. β -пропеллерные фитазы представляют собой щелочные фосфатазы и гидролизуют фитат при pH выше 7. Первая щелочная фитаза была обнаружена у *Bacillus licheniformis*. Щелочные β -пропеллерные фитазы обнаружены в пыльце *Typha latifolia* и *Lilium longiflorum* [5].

Синтезирующиеся в клеточном пространстве щелочные фосфатазы обнаружены у почвенных бактерий *B.amyloliquefaciens* и *B.laevolacticus*. Рентгенофазовый анализ щелочных фосфатаз показал, что помимо структуры, характерной для β -пропеллерных фитаз, обнаружены две фосфатные группы, образованные аминокислотами, и сайт связывания 6 ионов Ca^{2+} . Ионы Ca^{2+} выступают в качестве кофактора реакции. Не исключено, что фитазы могут участвовать и в некоторых физиологических реакциях микроорганизмов.

Пурпурные кислые фосфатазы (ПКФ) имеют бактериальное, грибковое, животное и растительное происхождение. Ферменты этого класса фитаз названы по их розовой или фиолетовой окраске в зависимости от присутствия ионов Fe^{3+} , а также другого металла — цинка, железа или марганца — в каталитическом центре. Пурпурные кислые фосфатазы имеют последовательность консервативных аминокислот, которые координируют ионы металлов. Растения содержат множество генов, идентифицированных как гены, кодирующие пурпурные кислые фосфатазы, но не все пурпурные кислые фосфатазы обладают фитазной активностью. Предположительно, эти фитазы также участвуют в обмене фосфатов, инозитола, металлов и выполняют ряд других функций. Обнаружено также участие пурпурных кислых фосфатаз в защите растений от окислительного, термического и солевого стресса, а также пероксидазная активность пурпурных кислых фосфатаз [6].

Цистеиновые фитазы были обнаружены у анаэробных бактерий *Selenomonas ruminantium*, обнаруженных в рубце жвачных животных. Фермент представляет собой мономерный белок с молекулярной массой 46 кДа, оптимумом pH 4,0–5,5 и оптимальной температурой 50–55°C. комплексах белка фитазы SrPhy с ингибитором мио-инозитола гексасульфатом наблюдаются два различных механизма упаковки кристаллов. Ингибитор связывается с белком в «активной» и «ингибирующей» конформациях. Гидролиз фосфатной группы происходил в субстрат-специфическом сайте рядом с SH-группой Cys241. Мутационный анализ подтвердил, что P-петли устойчиво связывают фитат и катализируют его гидролиз [7].

Грибковые фитазы в основном представляют собой внеклеточные ферменты. Внутриклеточные фитазы были обнаружены у *R. Oligosporus*, гриба, используемого для ферментации сои в Юго-Восточной Азии. Ферментированные продукты распространены в Африке. Исследования дрожжей, используемых для брожения, показали их способность расти в жидких и твердых средах с фитатом в качестве единственного источника фосфора. Фитазную активность проявляли также *S. cerevisiae*, *Pichia*

kudriavzevii, *Kluyveromyces marxianus*, *Clavispora lusitaniae*, *Candida glabrata*, *Hanseniaspora guilliermondii*. Наиболее высокая фитазная активность наблюдалась у штаммов *P. kudriavzevii*, а рост на фитатсодержащей среде увеличивал внеклеточную активность фитазного фермента [8].

Бактериальные фитазы также очень распространены. Они характерны для *Raoultella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Citrobacter braakii*, анаэробных бактерий, обитающих в желудках жвачных, - *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*, *Pantoea sp.* *Mitsuokella jalaludinii*. Молочнокислые бактерии проявляют различную фитазную активность, но максимальная активность обнаружена у *Lactobacillus sanfranciscensis*.

Почвенные бактерии с фитазной активностью играют важную роль в выделении фосфора при гидролизе фитатов. В ассимиляции фитатов принимают участие и внутриклеточные бактериальные фитазы, выделенные из ризосферных почв - *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus laevolacticus*. Известны как внеклеточные типы бактериофитаз (например, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*), так и ассоциированные с наружной мембраной (например, *S. ruminantium* и *M. multiacidus*), а также периплазматические типы фитаз.

Наиболее высокая фитазная активность обнаружена в семенах риса и пшеницы (0,41 и 0,67 ед/г), а в семенах проса, сорго и кукурузы активность фитазы была в 2–3 раза ниже. В семенах риса, ячменя, пшеницы и кукурузы авторы идентифицировали ингибитор активности фитазы, идентифицированный как аспарагиновая протеиназа. В течение первой недели прорастания зерна активность активированной фитазы возрастает примерно в 3-16 раз, а затем активность начинает снижаться. Наибольшая фитазная активность была обнаружена в пророщенных зернах риса на 7-е сутки и составила 6,9 ед/мг сухой биомассы. Рост активности фитазы при прорастании зерна сопровождается увеличением содержания общего фосфора. Активность фитазы обнаружена и у лишайников [9].

Активность фитазы в кишечнике человека составляет около 0,00005 - 0,0001 мкмоль Pi/мин (Pi - неорганический фосфор) на мг белка, а у крыс этот показатель уже в 30 раз выше. Хотя фитазы обнаруживаются также в кишечнике кроликов, морских свинок, свиней, телят, а также в крови и печени телят, эти показатели фитазной активности млекопитающих не обеспечивают потребности в фосфоре за счет фитатов.

Фитазы, среди прочего, могут быть использованы для получения менее фосфорилированных форм инозитолфосфатов, которые в настоящее время имеют потенциальное применение в медицине.

1.3 Среднеферментационные методы биосинтеза фитазы

Ферментация широко применяется для получения широкого спектра веществ, необходимых человеку и промышленности. С годами методы ферментации приобрели большое значение благодаря их экономическим и

экологическим преимуществам. Учитывая значение фитазы в комбикормовой и пищевой промышленности, изучено влияние питательных и физических параметров ее продукции на увеличение скорости биосинтеза ферментов. Ферментация является основным методом производства различных ферментов. И грибы, и бактерии обеспечивают бесценный набор ферментов, когда они ферментируют свои субстраты. Для производства фитазы используют как низовое, так и поверхностное брожение с использованием бактерий, грибов и дрожжей.

В промышленности ферменты в основном получают путем глубокого брожения. Схема предполагает выращивание тщательно отобранных микроорганизмов (бактерий и грибов) в закрытых биореакторах с ферментационной средой и высокой концентрацией кислорода. Когда микроорганизмы потребляют питательные вещества, они производят ферменты, необходимые для раствора. В связи с развитием крупномасштабных ферментационных технологий производство микробных ферментов составляет значительную долю в общей продукции биотехнологических и промышленных предприятий. Ферментация проходит в ферментерах объемом до 1000 куб. Распространенными источниками углерода, используемыми при глубоком брожении, являются растворимые углеводы, патока, фруктовые и овощные соки и т. д. Большинство промышленных ферментов выделяются микроорганизмами в ферментационную среду для расщепления источников углерода и азота.

Распространены периодические и непрерывные процессы ферментации. В процессе периодической ферментации стерильные питательные вещества подаются в ферментер в начале и после истощения культуры или роста биомассы. В непрерывном процессе стерильные жидкие питательные вещества подаются в ферментер с той же скоростью, с которой культуральная жидкость выводится из системы. Это позволило добиться стабильного производства. Такие параметры, как температура, значение pH, скорость потребления кислорода и производство углекислого газа, измеряются и контролируются для оптимизации процесса ферментации. Дополнительным преимуществом этого метода является то, что процесс очистки целевых продуктов легче осуществить.

Глубокая ферментация в основном используется для получения вторичных метаболитов, которые необходимо использовать в жидкой форме. Результаты ферментации значительно различаются для каждого субстрата; поэтому очень важно выбрать правильный субстрат. Методы ферментации должны быть оптимизированы для каждого субстрата. В первую очередь это связано с тем, что микроорганизм по-разному реагирует на каждый субстрат. Для каждого субстрата различаются интенсивность использования микроорганизмами различных элементов питания, а также продуктивность биотехнологического процесса.

1.4 Синтез ферментов при поверхностном культивировании продуцентов

При поверхностном брожении культура растет на поверхности сильно увлажненной питательной среды. Мицелий полностью обволакивает твердые частицы субстрата, из которого получает питательные вещества, и достаточно прочно его удерживает. Для обеспечения достаточной аэрации клетки среда должна быть пустой, а слой продуктивной культуры небольшим.

Хотя производственные культуры выращивают в асептических условиях, кюветы и оборудование необходимо стерилизовать перед каждой новой загрузкой [10].

Преимущество поверхностной культуры в том, что конечная концентрация фермента на единицу массы среды высока (при осахаривании крахмала 5 кг поверхностной культуры заменяется 100 кг культуральной жидкости), поверхностная культура легко высыхает, легко легко тиражируется.

Посев мицелия для поверхностного способа делится на три вида:

– культура, выращенная на твердом субстрате;

– споры;

– мицелиальная масса, выращенная методом глубокого брожения.

Полевая культура получается в три этапа. Сначала 1-1,5 г увлажненных стерильных пшеничных отрубей в пробирке засевают музейной культурой производителя и выращивают в термостате до образования обильного спорообразования. Второй этап аналогичен, но уже в колбах, третий – в больших сосудах со средой 500 г.

Основой питательной среды являются пшеничные отруби, являющиеся источником важных для питания и роста веществ. Пшеничные отруби также способны создавать желаемую структуру хорошо аэрируемой среды. В среду с отрубями вносят свекловичный жом, соевый шрот, крахмал, растительные остатки для повышения ферментативной активности. Среду стерилизуют острым паром при перемешивании (температура 105-140 °С, время 60-90 мин). Затем культуральную среду инокулируют и помещают равномерным слоем в стерильные кюветы и помещают в ростовые камеры. Продолжительность процесса выращивания составляет 36-48 часов.

Рост происходит в три этапа, примерно в одно и то же время. На начальном этапе конидии набухают и прорастают (при температуре не ниже 28°С), затем начинает расти мицелий в виде серовато-белого пуха (так как выделяющееся тепло необходимо отводить) и образуются конидии. Хорошая аэрация и поддержание оптимальной влажности (55-70%) важны для хорошего роста и развития культуры [11].

Культура, выращенная в неподвижном слое, представляет собой лепешку из набухших частиц среды с густо разросшимся мицелием. Массу измельчают до гранул размером 5-5 мм. Производитель высушивает культуру до влажности 10-12% при температуре не выше 40°С, не более 30 минут. В некоторых

отраслях (кожевенная и спиртовая промышленность) препарат применяют в нерафинированном виде. А в пищу и особенно в медицине используются только высокоочищенные ферменты и ферментные препараты.

Схема очистки следующая:

- освобождение от нерастворимых веществ;
- освобождение от сопутствующих растворимых веществ;
- фракционирование (хроматографическими методами).

Экстракция необходима для выделения фермента из поверхностной культуры (обычно экстрагентом является вода). В это время в раствор поступают сахара, продукты гидролиза пектина и клетчатки. Процесс выделения и очистки завершают сушкой ферментного препарата. После высушивания влажность препарата не должна превышать 6-8%, в таком виде препарат может храниться в закрытой упаковке в течение одного года, сохраняя свою активность.

Стандартизация ферментного препарата заключается в доведении активности фермента до нормы, отвечающей требованиям ГОСТ. Для этого используются нейтральные наполнители – крахмал, лактоза и др.

Принимая во внимание большие возможности использования ферментных препаратов в различных областях и в сельском хозяйстве, медицине, можно сделать вывод о необходимости расширения исследований микробных ферментов в этой области с целью оптимизации технологии и получения высокоактивных стабильных препаратов.

Фитазы могут быть получены из нескольких источников. Однако существует коммерческая связь между производством кормов для животных и производством фитаз из микробных источников. Эти отношения в основном основаны на поиске наиболее экономичной технологии производства. Как обсуждалось в предыдущих двух разделах, существует два основных типа ферментации: поверхностная и глубокая.

Оба метода широко используются для получения фитазы. Тип штамма, условия культивирования, природа и доступность питательных веществ являются важными факторами, влияющими на продуктивность и выбор того или иного метода [11].

Традиционно для производства кормовых ферментов используют мицелиальные грибы, синтезирующие фитазы. Несколько исследований показали, что биосинтез фитазы мицелиальных грибов связан с ростом грибов.

Пирт определил пять основных условий для роста микроорганизмов. К ним относятся источник энергии, питательные вещества, которые обеспечивают необходимые элементы для синтеза биомассы и благоприятные физико-химические условия. Изучены физические параметры фермента фитазы, требования к компонентному составу питательной среды и их влияние на биосинтез фитазы при глубоком и поверхностном брожении.

Наиболее важными физическими параметрами, существенно влияющими на рост микроорганизмов и синтез метаболитов, являются рН, температура,

скорость перемешивания, возраст инокулята, количество вносимого инокулята и др. Все микроорганизмы, продуцирующие фитазу, являются мезофилами. кроме некоторых термофильных грибов *Talaromyces thermophilus*, *Sporotrichum thermophile*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Myceliophthora thermophila* и *C. albidus* AL, *C. laurentii* AL27, *C. vishniacii* AL4), а также *Rhodotorula minuta* AL1, *Leucosporidium skotii* AL6 и *Pseudozyma Antarctica* AL114 [12].

Температура ферментации для оптимального синтеза фитазы из грибов в погруженных условиях обычно составляет 30°C. Исследования биосинтеза путем поверхностного брожения с использованием различных штаммов *Aspergillus* также проводились при 30 °С.

Некоторые исследования были проведены при 27°C для продуктивного синтеза фитазы в условиях глубокой и поверхностной ферментации. Сано и др. обнаружили, что *Arxula adenivorans* активно синтезирует фитазу при 28°C. Максимальный уровень биосинтеза фитазы зарегистрирован при 28°C как для грибных, так и для дрожжевых культур. В некоторых исследованиях о биосинтезе фитазы различными микробными продуцентами в диапазоне температур от 35° до 37°C методами глубокой и поверхностной ферментации.

Так, температура синтеза фитазы многими микроорганизмами составляет от 25°C до 37°C. Значение pH среды также влияет на синтез ферментов. Оптимальный pH для синтеза фитазы у большинства бактерий и мицелиальных грибов составляет от 5,0 до 7,0. Имеются редкие исследования о биосинтезе фитазы при щелочном pH. Авад и др. (2011) исследовали о максимальном уровне синтеза фитазы из культуры *Penicillium funiculosum* NRC467 при pH 8,0 [13].

Также сообщалось, что первый редкий штамм щелочных дрожжей, *Candida melibiosica* 2491, продуцировал максимальные уровни внутриклеточных ферментов при pH 8,5. Авад и др. (2014) исследовали влияние pH на синтез фитазы *Penicillium purpurogenum* GE1. Результаты работы показали, что сдвиг pH в щелочную сторону приводит к увеличению продуктивности биосинтеза ферментов. Максимальный уровень биосинтеза фитазы достигался при pH 8,0, после чего наблюдалось постепенное снижение уровня биосинтеза фитазы.

Отдельные исследования биосинтеза фитазы культурами грибов проводились при pH 5,0. Исследования по достижению продуктивного биосинтеза фитазы проводили на *Aspergillus ficuum* NRRL 3135, *Arxula adenivorans*, *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Mucor indicus* MTCC], *Aspergillus* MTCC 6336NC639s при значении pH 5,5. Условия аэрации и скорость перемешивания среды важны для равномерного распределения компонентов среды, микробных клеток и кислорода. Продукцию фитазы у *Schwanniomyces castellii* проводили непрерывно в ферментере при скорости потока воздуха 1 об/мин и перемешивании со скоростью 600 об/мин. Продукцию фитазы грибами *A. niger*, *A. ficuum* NRRL 3135 и *A. terreus* проводили при скорости

перемешивания 270 об/мин. Фитаза из *Bacillus sp.* Скорость перемешивания DS11 составляет 230 об/мин.

1.5 Влияние качественного состава компонентов питательной среды на биосинтез фитазы

Состав питательной среды должен быть оптимизирован для максимального образования продукта с использованием наиболее экономичного подхода. Для улучшения результатов необходимо сделать ферментную систему максимально эффективной. На биосинтез фитазы влияют компоненты окружающей среды, в частности химический состав различных ингредиентов, выбор источников углерода и азота, в частности фосфора. Источник углерода и оптимальная концентрация являются важными факторами биосинтеза фитазы. Поскольку глюкоза считается идеальным субстратом для биосинтеза фитазы, в ряде исследований изучалось влияние глюкозы на продукцию фитазы нитчатыми грибами при глубинном методе и в условиях поверхностной ферментации. Для грибов простые сахара, такие как глюкоза и сахароза, при использовании в качестве единственных источников углерода способствуют образованию мицелия и сильному подавлению синтеза фитазы, наблюдаемому в *Aspergillus niger* NRRL 3135.

Глюкоза также была признана лучшим источником углерода для многих бактерий и дрожжей для их роста и биосинтеза фитазы. Глюкоза в концентрации 1% *Lactobacillus amylovorus* и *Enterobacter sp.* был оптимальным субстратом для биосинтеза фитазы. Глюкозу в концентрации 2% использовали для выращивания *Bacillus subtilis*. Было также исследовано влияние других источников углерода. Среди различных изученных источников углерода глюкоза обеспечивала самый высокий уровень фитазы, синтезируемой термофильным грибом *Sporotrichum*, по сравнению с другими источниками углерода. Увеличение концентрации глюкозы до 5% приводило к резкому снижению биосинтеза ферментов. В качестве основных источников углерода использовали глюкозу или глюкозные сиропы. Глюкоза привела к снижению стоимости сырья более чем на 80% по сравнению с процессом с использованием глицерина. Кроме того, в среде была получена особенно высокая концентрация активного фермента (до 13,5 г/дм³), а на долю фитазы приходилось более 97% общего накопленного белка.

Thyagarajan и *Namasivayam* (2010) оценили влияние различных источников углерода (фруктозы, мальтозы, лактозы и сахарозы) на биосинтез фитазы *A. niger*. Среди различных использованных источников углерода фруктоза и сахароза сохраняли максимальную фитазную активность (33,33 ед/см³) наряду со стандартной средой. Такие данные были получены при культивировании *A. niger* [14].

Было обнаружено, что галактоза в концентрации 1% является подходящим источником углерода для продукции фитазы *Schwanniomyces*

castellii. Биосинтез фитазы *Arxula adenivorans* и *Saccharomyces cerevisiae* штамма СУ увеличивался в несколько раз при использовании в качестве источника углерода галактозы по сравнению с глюкозой. Напротив, галактоза ингибировала биосинтез фитазы *Pichia anomala*, тогда как глюкоза (4%) способствовала максимальному уровню биосинтеза фермента. Некоторые исследователи считают, что сахароза является лучшим источником углерода для биосинтеза фитазы штаммами *Cryptococcus laurentii* AL27 и *A. niger* ST-6 [15].

В дополнение к глюкозе крахмал также используется в качестве источника углерода в жидкой среде брожения. Являясь полисахаридом, крахмал постепенно усваивается микроорганизмами в процессе синтеза метаболитов. Штаммы грибов *A. niger*, продуцирующие внеклеточную фитазу, особенно штаммы 89 и 92, продуцировали высокие титры фитазы при культивировании в среде кукурузного крахмала с глюкозой. Также кукурузный крахмал обрабатывают *Aspergillus sp.* Сообщалось, что многие штаммы используются для биосинтеза фитазы. *A. niger* и *A. niger* 307 и других мицелиальных грибов, таких как *Mucor racemosus* и *Sporotrichum thermophilum* [16].

Декстрин, полученный частичным гидролизом крахмала, использовали для синтеза фитазы штаммом *A. niger* NCIM 563 (224 МЕ/мг) в модифицированной ферментационной среде. Максимальный уровень фитазы у *A. niger* ATCC 9142 и *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 и *A. niger* 307. Ebune et al (1995) выращивали *A. ficuum* на рапсовой муке в качестве субстрата для биосинтеза ферментов. Дополнение рапсового шрота семенами рапса и глюкозой (5,2%) повышало уровень синтезируемой фитазы. Однако некоторые виды кукурузной муки вызывали диффузный рост мицелия и высокую ферментативную продуктивность. Эти исследователи также подтвердили, что биосинтез фитазы увеличивался, когда чистый кукурузный крахмал выращивали на синтетической среде с повышенным соотношением углерод/фосфор (С/Р) при низком уровне фосфатов. Пшеничные отруби (6%) были перспективным источником углерода для биосинтеза фитазы *Bacillus sp. DS11*, а *Pseudomonas sp.* выращенные на мио-инозите (0,2 %), как единственный источник углерода, продуцируют фитазу. Наиболее высокий уровень фитазы *Klebsiella aerogenes* наблюдался при ферментации среды, содержащей в качестве единственного источника углерода фитат натрия (2 %) [7].

Сарлин и Филипп (2013) изучили четыре различные среды (M1, M2, M3 и M4), приготовленные путем добавления таких субстратов, как глюкоза, сахароза, рисовая вода и патока, в качестве источников углерода для биосинтеза фитазы четырьмя штаммами морских дрожжей: *Fenneropenaeus indicus*. Патока была наиболее предпочтительным источником углерода с пептоном (0,75%), дрожжевым экстрактом (0,5%) и MgSO₄ (0,25%) и поддерживала максимальный рост четырех протестированных штаммов

дрожжей. Источник азота в культуральной среде является еще одним важным параметром питания, влияющим на рост ферментов и биосинтез.

Достаточное поступление азота является необходимым условием быстрого роста микроорганизма на начальной и конечной стадиях его развития. Органическая форма азота, такая как пептон, широко используется для биосинтеза фитазы. В культуральную среду для *Aerobacter aerogenes* и *Klebsiella oxytoca* добавляли пептон (1%) и дрожжевой экстракт (1%) в качестве источника азота. Дрожжевой экстракт (1%) и пептон (1%) также оказались лучшими источниками азота для биосинтеза фитазы *Arxula adenivorans*. Максимальный уровень фитазы, синтезируемой штаммом *Rhizopus oligosporus* при глубокой ферментации, составляет 39 единиц/мл при использовании 0,5% пептона [8].

Экстракт солода также используется в качестве источника азота, что позволяет повысить активность фитазы, продуцируемой *Bacillus subtilis* MJA. Повышение биосинтеза ферментов (46 ед/дм³) штамма *Pichia anomala* наблюдалось при замене пептона экстрактом говядины и использовании биопептона в качестве источника азота в производственной среде, содержащей нитрат аммония и сульфат аммония. оптимальный уровень биосинтеза ферментов наблюдался у штамма *Aspergillus niger*. Статистические исследования по оптимизации концентрации компонентов среды (глюкозы и экстракта говядины) методом поверхностного отклика позволили повысить продуктивность биосинтеза фитазы *P. anomala*. В качестве источника азота для биосинтеза фитазы штаммом *B. subtilis* использовали гидролизат казеина (1%) и минеральную соль (NH₄)₂SO₄ (0,1%). Ries и Macedo (2011) изучали различные концентрации мочевины (0%, 0,15% и 0,3%), чтобы определить концентрацию, которая способствует биосинтезу фитазы в *S. cerevisiae*, и наблюдали самую высокую фитазную активность (0,41 ЕД/см³) при концентрации мочевины 0,15%.

Pseudomonas sp. для биосинтеза фитазы. неорганический источник азота (сульфат аммония (0,1%)) *Schwanniomyces castellii*, *Enterobacter sp.* используется при выращивании. Биосинтез фитазы штаммами *Bacillus sp.* Было обнаружено, что DS11, *Aspergillus niger van Teighem* и *Aspergillus niger St-6* максимальны при использовании нитрата аммония в качестве источника азота [1,9].

Самый высокий уровень фитазы при использовании сульфата аммония в качестве источника азота наблюдался у *Saccharomyces cerevisiae* и штамма *Kodamaea ohmeri* BG3. Штаммы *Aspergillus* способны использовать широкий спектр азотсодержащих соединений в качестве единственных источников азота, таких как аммиак, нитраты, нитриты, пурины, амиды и многие аминокислоты. Свекольная или тростниковая патока, сухая сыворотка, соевая мука и дрожжевой экстракт также используются в качестве богатого азотом промышленного сырья.

Рамачандран и др. некоторые неорганические источники азота, такие как сульфат аммония и нитрат натрия, при поверхностной ферментации *Rhizopus sp.* показали, что он ингибирует биосинтез фитазы [2].

Однако нитрат аммония и дрожжевой экстракт оказали положительное влияние на биосинтез фитазы. В исследовании Васильева и его соавторы оптимизировали среду для *A. niger* при поверхностном культивировании и подтвердили, что концентрированный раствор кукурузы в качестве источника азота значительно увеличивает биосинтез фитазы [11].

Помимо источников углерода и азота, некоторым микроорганизмам для роста и синтеза ферментов требуются дополнительные микроэлементы и витамины. Имеются данные о том, что добавление микроэлементов повышало уровень фитазы, синтезируемой *Pichia anomala*, *Aspergillus niger FS3* и *Bacillus subtilis* [12].

На синтез фитазы штамма *A. niger* NCIM 563 в культуральных средах влияло количество неорганического фосфата в сельскохозяйственных остатках при глубоком брожении (от 2,8 до 8 мг/г). Напротив, сельскохозяйственные остатки, содержащие 4 мг/г неорганического фосфата, индуцировали синтез фитазы. Нитчатые грибы по-разному предпочитают твердые субстраты, такие как пшеничные отруби, чечевица, овес, кукуруза и бальзам. Было обнаружено, что твердые субстраты с высоким содержанием фитатов и низким содержанием неорганических фосфатов (Pi) являются подходящими субстратами для поверхностной ферментации.

Пшеничные отруби являются одним из наиболее широко используемых субстратов при обработке почвы и содержат большое количество фосфора. Пшеничные отруби также использовались при глубокой ферментации для создания сложной жидкой среды [5,6].

Было замечено, что присутствие пшеничных отрубей в качестве медленно высвобождаемого источника фосфата может повлиять на характер роста *Aspergillus*. Низкая растворимость фитата в пшеничных отрубях приводит к контролируемому высвобождению субстрата, который, как считается, непосредственно регулирует количество фосфата в среде и, таким образом, выработку фермента. Это также было подтверждено Papagianni et al., добавление пшеничных отрубей в среду индуцировало накопление мицелиальных форм и улучшало рост и продукцию фитазы штаммом *Aspergillus niger* [3].

В качестве источника фосфора при культивировании *Schwanniomyces castellii* использовали только фитат натрия (0,06%). Регуляторный эффект высокого уровня фосфора на синтез фитазы подтвержден многими исследователями. Добавление поверхностно-активных веществ приводит к образованию более мелких частиц в жидкой среде.

Повышенная грануляция увеличивает внеклеточный синтез фермента, что приводит к более высокому выходу фитазы. Кроме того, сурфактант увеличивает проницаемость клеточной стенки/клеточной мембраны, что может

быть причиной повышенной скорости секреции метаболитов клетками в среде ферментации. Когда *A. niger* NRRL 3135 использовал простой сахар, такой как глюкоза или фруктоза, в качестве единственного источника углерода для биосинтеза фитазы, образовывались большие мицелиальные шарики, а выход фермента был низким.

Рост на среде с ПАВ (олеат натрия 0,5%) был редким, а выход *phyA* был в 4,7 раза выше, чем в контроле. Поверхностно-активные вещества, такие как Твин-20, -40 и -80, влияют на биосинтез метаболитов. Среди них Твин-80 (0,1%) способствовал увеличению продукции фитазы культурами *Aspergillus carbonarius*, *Thermoascus aurantiacus* (TUB F 43), *Sporotrichum thermophilum*, *Penicillium purpurogenum* GE1, *Klebsiella pneumonia* SCTb2 соответственно. Кроме того, Tween-80 поддерживал рост, но фитазная активность не была обнаружена в культуральной жидкости *Pseudomonas aeruginosa* P6. Наоборот, биосинтез фитазы штамма *Pichia anomala* ингибировался в присутствии Tween-80 [7,12].

При культивировании *Aspergillus carbonarius* скорость роста, продуктивность биосинтеза фитазы и восстановление фитиновой кислоты в рапсовом шроте поверхностным способом были выше в присутствии Na-олеата. Аналогично Твин-80 и олеат натрия повышали скорость биосинтеза фитазы и гидролиза фитиновой кислоты по сравнению с контролем, в то время как Тритон X-100 отрицательно влиял на эти процессы. Количество, фаза развития культур (споровая или вегетативная) и возраст инокуляции являются одними из основных факторов, определяющих устойчивость процесса ферментации и их клеточную морфологию. Несколько исследований по оптимизации процесса биосинтеза фитазы были сосредоточены на эффективности инокулята как для процессов глубокой, так и для поверхностной ферментации. Для синтеза метаболитов конечный инокулят для ферментационной среды должен иметь достаточный рост, что обычно означает, что биомасса должна составлять около 10% от биомассы, выращенной в промышленном ферментере. Кришна и Нокес (2001a) показали, что возраст и время ферментации жидкого инокулята существенно влияют на процесс ферментации для синтеза фитазы [9].

1.6 Микромицет *Aspergillus niger* является продуцентом лимонной кислоты.

Aspergillus niger - широко распространенный в природе микромицет (плесени), относящийся к грибам высшего порядка (эумицеты), классу аскомицетов (*Ascomycetes*) или карманным грибам. *Aspergillus niger* развивается в виде мицелия. Разные виды микромицетов размножаются по-разному. В большинстве случаев размножение и распространение бесполое, либо с помощью эндоспор (спорангиев), либо экзоспор (конидий) в плодовых телах. *Aspergillus niger* - микромицет, продуцирующий конидии.

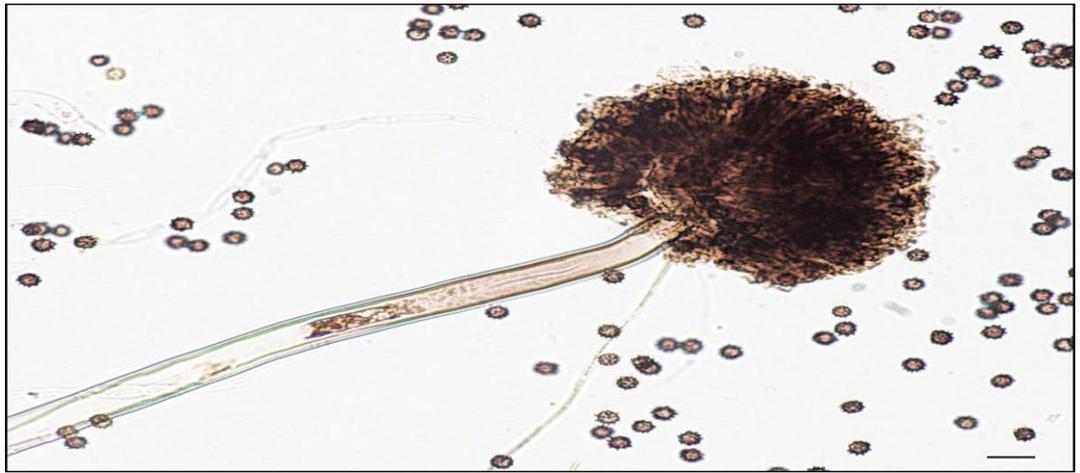


Рисунок 2 – *Aspergillus niger* под микроскопом

Условием интенсивного ацидогенеза является массоперенос молекулярного кислорода (аэрация и перемешивание ферментируемого субстрата).

Микромицет *Aspergillus niger* демонстрирует гибкость и устойчивость к микробному метаболизму. В биосистемах искусственного культивирования небольшим изменением состава питательного субстрата или небольшим изменением режима культивирования можно добиться высокой селективности в биосинтезе промышленно важных продуктов.

Аспергиллы обычно богаты белками. Мицелий содержит до 55% белка. Например, мицелий *Aspergillus awamori*, продуцирующий амилолитические ферменты, содержит от 40 до 48% белков в зависимости от возраста [17].

Среди различных производителей индийские специалисты отобрали наиболее активный *Aspergillus niger* как обладатель наибольшей целлюлозолитической активности. Исследователи из Японии смогли запатентовать штамм *Aspergillus niger* как продуцент глюкоамилазы — фермента, гидролизующего связи D-глюкозы в молекуле крахмала. Это лишь малая часть промышленных штаммов аспергилл, используемых на практике в области ферментной промышленности [18].

Благодаря высокой активности внеклеточных ферментов *Aspergillus niger* известен как один из самых активных биодеструкторов природных полимеров.

Но аспергиллы играют еще более важную экологическую роль. По данным М. Барбье, около 10% различных пищевых продуктов человека непригодны к употреблению из-за повреждения микромицетами. Эти грибы (*Aspergillus giganteus*, *A. Restrictus* и др.) в ряде случаев могут продуцировать микотоксины (афлотаксин, альфа-сарциновые белковые вещества и др.), в результате чего защищают зону нагула от консументов (животных, потребляющих эти фиды продукции) и, как следствие, выступают в роли химических ценорегуляторов, определяя, какая часть ассимилированной

автотрофами энергии в итоге пройдет по пастбищному каналу использования, а какая по детритному (растение сапрофитная трофическая цепь).

В этом контексте способность микромицетов накапливать органические кислоты (в том числе лимонную), антибиотики можно рассматривать как клеточный кометаболизм, подавляющий конкурентов за ресурсы, подобно некоторым насекомым (например, муравьям, бабочкам), продуцирующим алломоны (защитные агенты). в виде органических кислот (уксусной, муравьиной, пропионовой, изовалериановой и др.) [19].

Aspergillus niger характеризуется следующими физиологическими особенностями:

1. Толерантность к большому количеству сахара. Многие промышленные мутанты *Aspergillus niger* растут даже при концентрации сахара 14-20% и более.

2. Тенденции термотолерантности. Для мутантов *Aspergillus niger* оптимальная температура для увеличения биомассы обычно составляет 33-35 °С, что способствует наблюдаемым ферментативным реакциям клеточного метаболизма.

3. Устойчивость к кислотности открытого субстрата. Продукент сохраняет жизнеспособность и синтезирует лимонную кислоту при рН 0,8-1,2. В таких случаях практически полностью прекращается рост биомассы, а также полностью или частично подавляется активность ряда ферментов, метаболизирующих лимонную кислоту.

4. При культивировании нет необходимости нейтрализовать ферментированный субстрат, но при возникновении такой необходимости (например, для создания благоприятных условий) это можно сделать натриевой или калиевой щелочью.

5. Избыточный синтез лимонной кислоты *Aspergillus niger* осуществляется при ограничении роста биомассы и удалении источников минерального питания от избыточного питательного субстрата углеводного питания (сахароза, глюкоза). Для усиления биосинтеза лимонной кислоты в условиях промышленного возделывания на практике часто применяют ростостимулирующие добавки, ингибиторы ферментов, метаболизирующих лимонную кислоту. К таким ингибиторам относятся фторацетат, динитрофенол и другие химические вещества [20,21].

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования были выбраны мицелиальная масса и нативные выделенные растворы, которые были получены при выращивании штамма *Aspergillus niger* (штамм ATCC 16404, в петлях Culti-Loops, фирмы Thermo Fisher Scientific) глубинным и поверхностным методом.

Питательные среды

Питательная среда для получения посевного материала: сахароза 50 г, меласса 17 г, нитрат аммония 2,5 г, сульфат магния семиводный 0,25 г, фосфат калия однозамещенный 0,16 г, значение рН среды 6,5. Условия проращивания 30⁰С, скорость перемешивания 230 об/мин.

Питательная среда для ферментации: сахар белый (по ГОСТ 33222-2015) 150 г, аммоний азотнокислый 2,5, магний сернокислый семиводный 0,25, калий фосфорнокислый однозамещенный 0,48, значение рН среды 6,5.

Ферментацию проводили глубинным и поверхностным способами в качалочных колбах вместимостью 750 см³ в шейкере-инкубаторе Biosan 20/60 (Biosan, РФ) и в термостате ТС 1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, РФ).

2.2 Методы исследования

Метод определения фитазной активности

Фитазную активность (ФА) определяли по ГОСТ 31487-2012, который основан на количественном определении содержания неорганических фосфатов (PO₄⁻), образующихся в результате действия фермента фитазы на субстрат - фитат натрия (натриевую соль фитиновой кислоты) при определенных стандартных условиях, путем их связывания молибдатом натрия и восстановлением двуххлористым оловом с образованием окрашенного в синий цвет комплекса - молибденовой сини. За единицу фитазной активности принимают то количество фермента, которое катализирует гидролиз фитата натрия с образованием 1 мкмоль неорганического фосфата за одну минуту в стандартных условиях. Условия гидролиза: температура – 37⁰С, значение рН 5,5, продолжительность гидролиза – 15 мин. При определении внутриклеточной активности фитазы применяли мицелиальную массу штамма *Aspergillus niger* и при определении внеклеточной активности использовали нативную жидкость, выделенную при биосинтезе.

Метод определения лимонной кислоты

Количество синтезированной лимонной кислоты определяли титриметрическим методом. Точную навеску раствора помещают в коническую колбу 100 мл, прибавляют 50 мл воды, перемешивают. Далее титруют 1 н раствором едкого натрия в присутствии индикатора фенолфталеина.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Подготовка штамма – продуцента для биоферментации

Для проведения экспериментов применяли *Aspergillus niger* (штамм ATCC 16404, в петлях Culti-Loops, фирмы Thermo Fisher Scientific). Проращивали штамм в термостате ТС 1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, РФ) шейкере инкубаторе Biosan 20/60 (Biosan, РФ) при глубинным способом культивирования.

Для получения посевного материала использовали среды: для получения посевного материала, для ферментации.

В состав питательной среды для получения посевного материала входило: сахара 50 г, меласса 17 г, нитрат аммония 2,5 г, сульфат магния семиводный 0,25 г, фосфат калия однозамещенный 0,16 г, рН среды 6,5. Условия проращивания 30⁰С, скорость перемешивания 230 об/мин.



Рисунок 3 – Процесс активации штамма *Aspergillus niger*

В состав питательной среды для ферментации: сахар белый 150 г, аммоний азотнокислый 2,5, магний сернокислый семиводный 0,25, калий фосфорнокислый однозамещенный 0,48, рН среды 6,5.

3.2 Результаты по определению влияния метода выращивания штамма на биосинтез фитазы

При получении лимонной кислоты в промышленных условиях, используют различные методы, в том числе используют поверхностное

культивирование грибов, погруженное культивирование или еще называют глубинным способом.

Поверхностный метод культивирования предусматривает использование стерильной питательной среды, которая содержит сахарозу.

В данной работе проведены исследования по определению способности штамма продуцировать фитазу при различных условиях.

Культивирование штамма *Aspergillus niger* поверхностным способом, проводили на твердой питательной среде.

В состав питательной среды для поверхностного культивирования входит: сахар белый 150 г, аммоний азотнокислый 2,5, магний сернокислый семиводный 0,25, калий фосфорнокислый однозамещенный 0,48, рН среды 6,5.

Вид мицелий проросшие на поверхности твердой питательной среды показаны на рисунке 4.

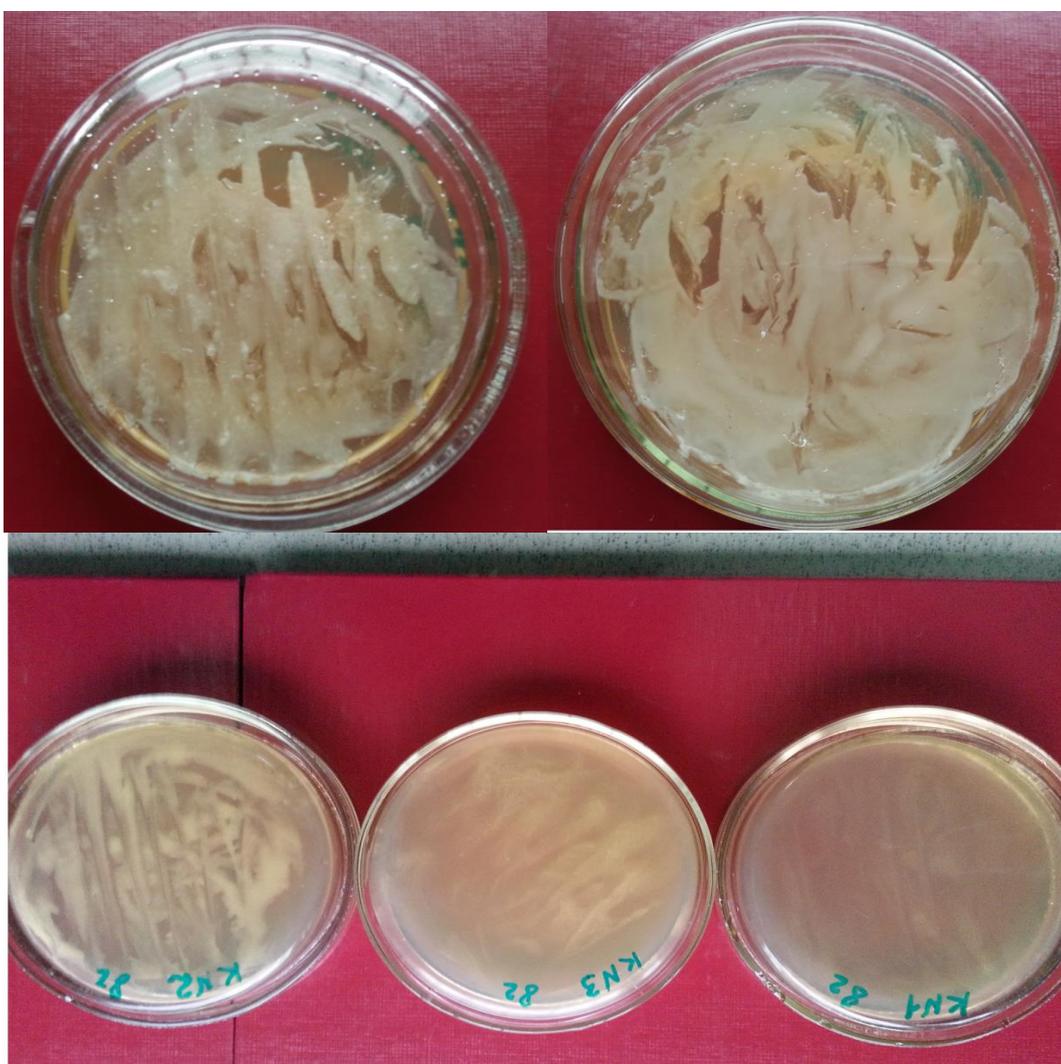


Рисунок 4 – Внешний вид штамма *Aspergillus niger* проросших на поверхности питательной среды

После прорастания трех суток рН среды снижался до 2,0, так как ионы аммония высвобождаются из питательной среды. Далее на поверхности появлялись желтоватый пигменты, что показывает аккумуляцию оксалата в мицелии. После появлялась жидкость над поверхностью мицелий. Опущенность колоний было низкой, воздушные колоний слабо развитые. Колонии были с окраской желто-бежевых тонов.

Выращивание штаммов проводили в термостате ТС 1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, РФ), температура поддерживалась около 28-30⁰С



Рисунок 5 – Проращивание штамма *Aspergillus niger* в термостате

Так же для сравнения влияния методов культивирования, при эксперименте был использован глубинный метод культивирования штаммов или называемый погруженное культивирование, который характеризуется более высокой продуктивностью, чем первый процесс.

Выращивание штаммов *Aspergillus niger* для глубинного культивирования проводили в шейкере инкубаторе Biosan 20/60 (Biosan, РФ). Состав среды был таким же как при поверхностном культивировании, но без добавления агара.



Рисунок 6 – Процесс биоферментации *Aspergillus niger* в шейкере инкубаторе

Сравнительные данные по выделению штаммом фитазы при различных видах культивирования показаны в таблице 1 и рисунке 7.

Таблица 1 – Показатели процесса биоферментации культуры *Aspergillus niger* 72 ч

Условия культивирования	Показатели активности фитазы	
	Внутриклеточная, ед/г	Внеклеточная, ед/дм ³
Термостат ТС 1/80	0,1	0,5
Шейкер инкубатор Biosan 20/60	0,9	1,2



Рисунок 7 – Сравнительная диаграмма влияния методов культивирования на ферментацию штамма *Aspergillus niger*

При сравнении двух методов биоферментирования штамма *Aspergillus niger* было определено, что при глубинном ферментировании штамма биосинтез фитазы был интенсивнее, чем при поверхностном методе культивирования. Внутриклеточная активность фитазы было в 9 раз выше при глубинном методе, а внеклеточная активность в 2,4 раза.

Полученные данные соответствуют данным многих авторов [11], которые изучали биоферментацию.

3.3 Результаты по определению влияния концентрации сахара при выращивании штамма на биосинтез фитазы

Точный подбор веществ в среде не отвлекающих биосинтез на другие продукты, это условие для обеспечения высокого выхода целевых вторичных метаболитов. Для производства лимонной кислоты биоферментацией штамма *Aspergillus niger*. Для производства лимонной кислоты требуется высокая концентрация сахара (140-240 г/л). При более низких концентрациях накапливается больше щавелевой кислоты и меньше лимонной кислоты.

Aspergillus niger не использует сахарозу, но часть ее разлагается во время стерилизации. Штаммы в составе имеют внеклеточную, связанную с мицелием инвертазу, которая активируется в кислых условиях ферментации и катализирующую быстрый гидролиз сахарозы.

В качестве источников углерода применяют сахарную или тростниковую мелассу, сахарозу, картофельный крахмал, гидролизаты крахмала, глюкозный сироп.

Известно, что штамм *Aspergillus niger* продуцирует наибольшее количество лимонной кислоты при ферментации в среде, содержащей сахарозу. Поэтому необходимо было изучить эффективность использования среды содержащий сахарозу для биосинтеза фитазы для различных сред с добавлением белого сахара.

Результаты проведенных исследований приведены в таблицах 2 и 3, так же на графиках (рис.8 и 9).

Для определения влияния концентрации сахарозы на изменение внутриклеточной фитазной активности при биоферментации культуры использовали односуточные штаммы *Aspergillus niger*.

Таблица 2 – Влияние концентрации сахарозы на изменение внутриклеточной фитазной активности (ед/г) при биоферментации культуры *Aspergillus niger*

Концентрация сахарозы, г/дм ³	Время биоферментации культуры <i>Aspergillus niger</i> , ч			
	24	48	72	96
50	0,1	0,12	0,12	0,11
100	0,15	0,17	0,19	0,16
150	0,25	0,87	0,91	0,93
200	0,21	0,93	0,75	0,52
250	0,23	0,95	0,76	0,43

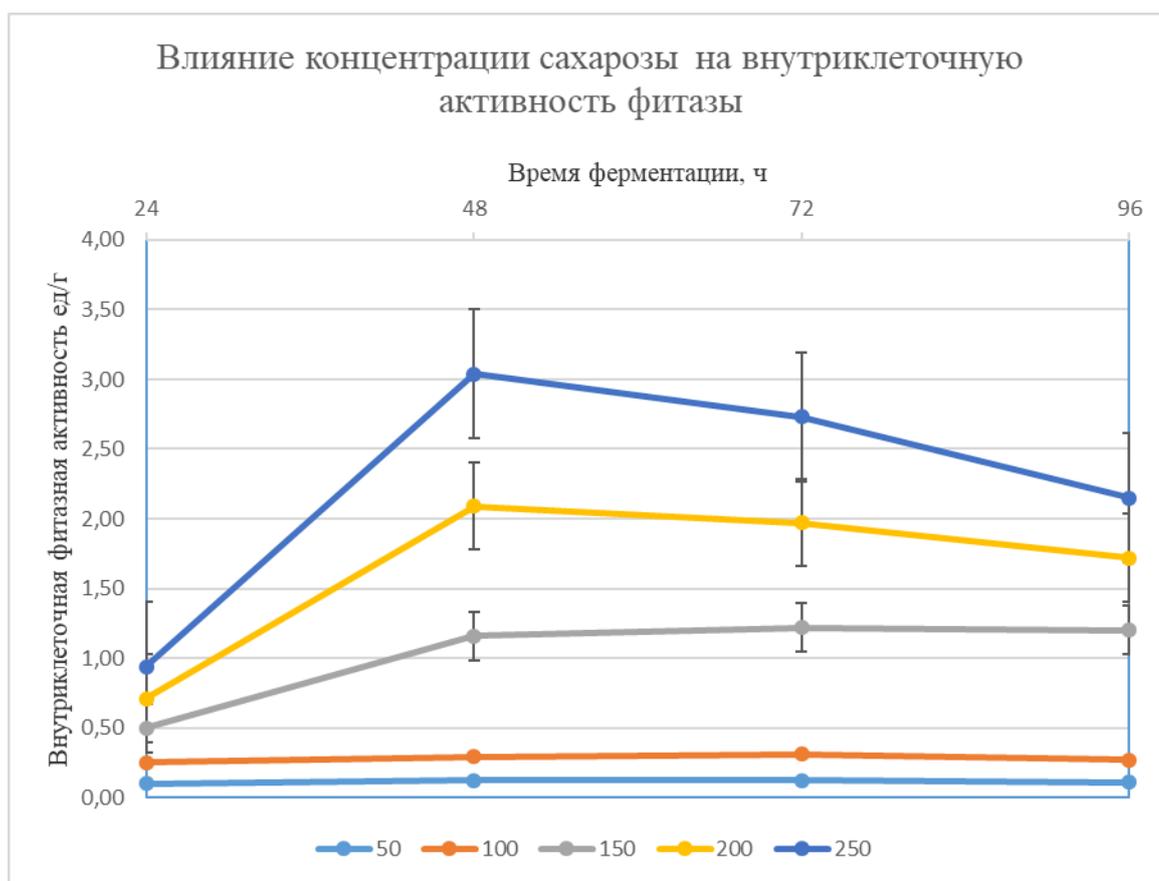


Рисунок 8 – Зависимость внутриклеточной активности фитазы от концентрации сахарозы и времени культивирования продуцента *Aspergillus niger*

Из результатов исследований видно, что по сравнению с другими концентрациями при 150 г/дм³ сахарозы достигается максимальная внутриклеточную активность фитазы, до 0,91 ед/г на 72 ч, 0,93 ед/г на 96 ч.

При концентрации сахарозы 200 г/дм³ максимальную внутриклеточную ферментную активность показывает на на 48 ч 0,93 ед/г, далее идет резкое снижение на 20 % на 72 ч и на 40% на 96 ч, соответственно на 0,75 и 0,52 ед/г.

При концентрации сахарозы 250 г/дм³ внутриклеточная ферментная активность проявлялась на 48 ч, соответствовало 0,95 ед/г. Далее на 72 и 96 ч фитазная активность штамма *Aspergillus niger* резко уменьшалось. На 72 ч активность уменьшена на 20 %, а на 96 ч на 55 % по сравнению с 48 ч ферментацией.

Таблица 3 – Влияние концентрации сахарозы на изменение внеклеточной фитазной активности (ед/дм³) при биоферментации культуры *Aspergillus niger*

Концентрация сахарозы, г/дм ³	Время выращивания культуры, ч			
	24	48	72	96
50	0,1	0,12	0,12	0,11
100	0,15	0,17	0,19	0,16
150	0,45	0,98	1,22	1,24
200	0,57	1,25	0,97	0,93
250	0,71	1,36	1,01	0,91

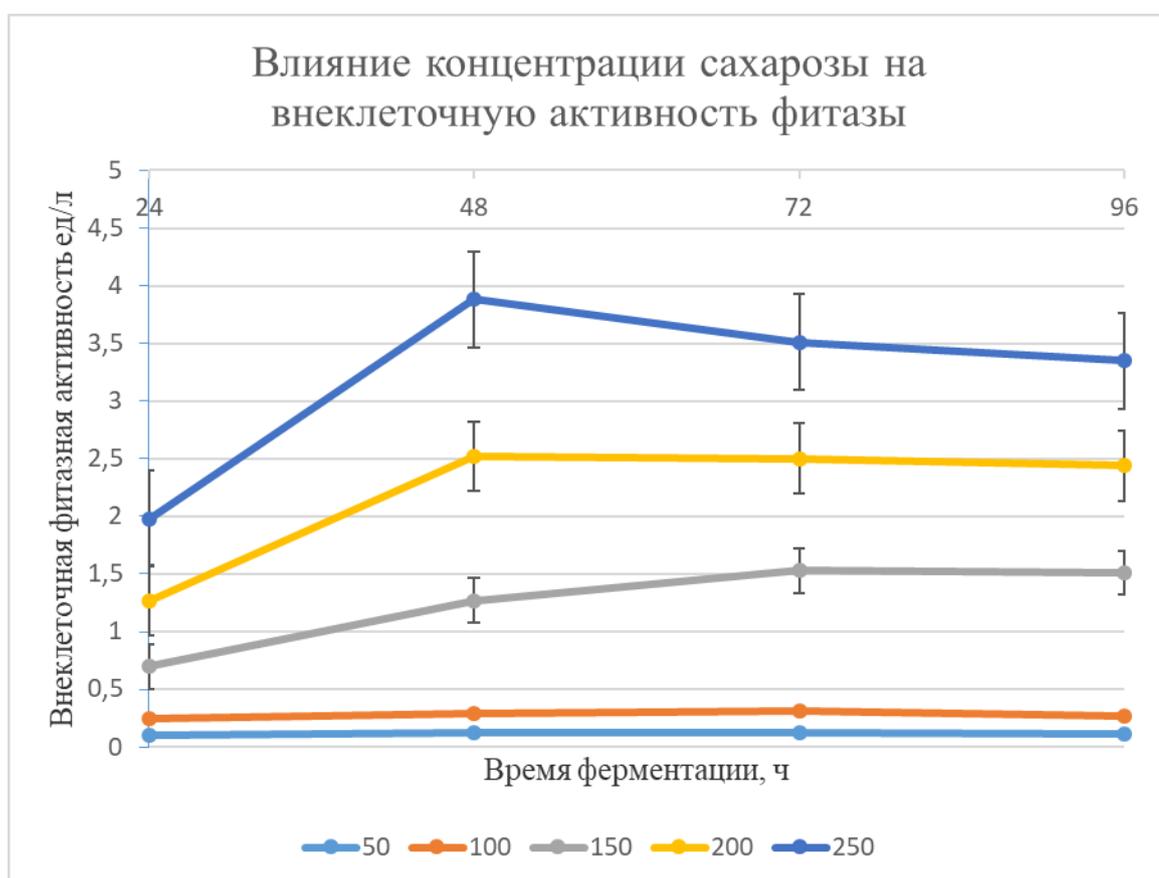


Рисунок 9 – Зависимость внеклеточной активности фитазы от концентрации сахарозы и времени культивирования продуцента *Aspergillus niger*

Из результатов видно, что внеклеточная фитазная активность штамма *Aspergillus niger* в основном увеличивается в процессе ферментации. На 72 ч и 96 ч в основном увеличивалось или оставалось в примерно на одинаковом уровне.

При концентрации сахара 50 г/дм³ особых изменений не наблюдалось. При концентрации 100 г/дм³ тоже изменения были на не значительном уровне.

При концентрации сахарозы 150 г/дм³ после ферментации 24 ч внеклеточная активность штамма составляло 0,45 ед/дм³, далее по истечению времени концентрация увеличивалась. На 48 ч ферментации возрасло в 2 раза, на 72 ч – 2,7 раз, на 96 ч – 2,75 раз. Это соответствовало 0,98; 1,22; 1,24 ед/дм³ внеклеточной активности фитазы.

Это подтверждает работы авторов [17,18], то что штамм *Aspergillus niger* в основном проявляет максимальную активность фермента при ферментации сахарозы.

3.4 Результаты по определению влияния температуры выращивания штамма на биосинтез фитазы

Если синтез вещества связана с ростом микроорганизма, то основной путь увеличения продуктивности направляется на достижение высокой удельной скорости роста. Поэтому важно знать какие факторы влияют на скорость роста штаммов продуцентов. В природных условиях микроорганизмы ограничены питательными факторами: С, N, Р, поэтому возникали формы микроорганизмов, которые растут максимально при ограниченных возможностях.

Если синтез продуктов не связан непосредственно с ростом культуры, то для получения большего выхода продукта культуру длительное время поддерживают в состоянии разобщенного роста.

Микроорганизмы осуществляют сверхпродукцию метаболитов в том случае, когда создаются особые окружающие условия. То есть это осуществляется для решения физиологических проблем микроорганизмов.

Температурный фактор оказывает влияние на максимальную скорость роста, макромолекулярный состав и уровни клеточных метаболитов. Сверхпродукция метаболитов также определяется температурой. Скорость роста медленно увеличивается с увеличением температуры по достижению максимальной скорости роста.

При температуре превышающей максимальную, скорость роста быстро снижается при дальнейшем увеличении температуры. температура оказывает влияние на эффективность конвекции субстрата в клеточную массу.

Все параметры влияющие на рост и метаболизм продуцентов важно знать для оптимизации процесса, когда нужно максимизировать скорость роста или выхода биомассы.

Важность установления оптимальной для данного процесса температуры обусловлена еще и тем, что в любом промышленном процессе ферментеры разогреваются в результате микробного метаболизма, а охлаждение требует больших затрат.

Температурный режим оказывает влияние также на выбор организмом того или иного метаболического пути.

Как известно штамм *Aspergillus niger* является продуцентом лимонной кислоты, продуцирует гидролитические ферменты при ферментации в средах с содержанием углеводов. В качестве субстрата для ферментации употребляет сахарозу. В виду этого в качестве субстрата для ферментации фитазы применяли питательную среду с сахарозой. Количество сахара добавляемой в питательную среду для стимуляции фитазы обосновано авторами [13], которые изучали стимулирующие характеристики для данного вида штамма, где обосновано концентрация сахара в пределах количества 150 г/л. Также при выполнении экспериментов по определению количества сахара на биосинтез фитазы подтвердили данную концентрацию.

В таблице 000 представлены результаты и на рисунке 000 представлена зависимость внутриклеточной фитазной активности от температуры выращивания штаммов при ферментации на питательных средах с содержанием сахарозы.

Таблица 4 – Влияние температурного режима на изменение внутриклеточной фитазной активности (ед/г) при биоферментации культуры *Aspergillus niger*

Температура инкубации культуры, °С	Время выращивания культуры, ч			
	24	48	72	96
37	1,31	2,74	2,96	2,81
30	0,90	1,35	1,72	1,53
24	0,22	0,83	0,91	0,93

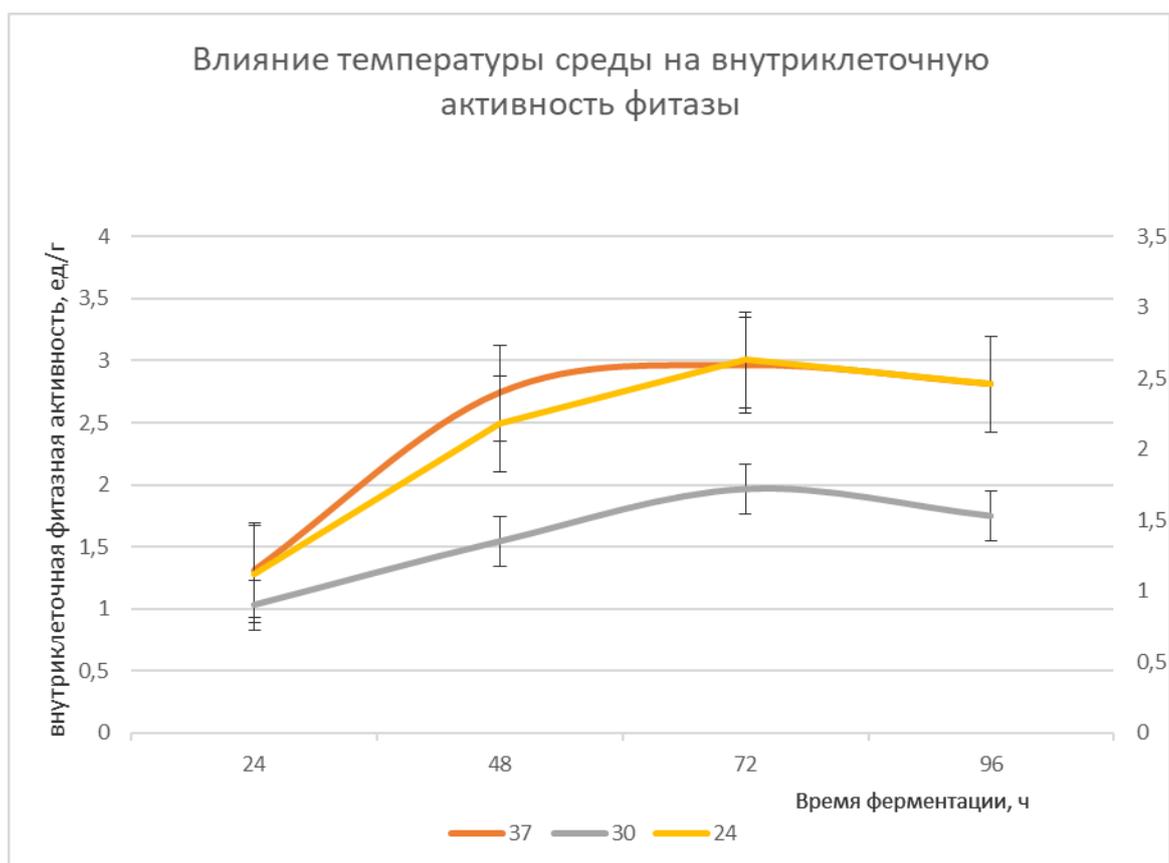


Рисунок 10 – График зависимость внутриклеточной активности ферментации фитазы от температуры выращивания штамма *Aspergillus niger*

Из графиков видно, что при температуре $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, фитазная активность увеличивается в течении 72 ч до 0,91 ед/г, далее эта концентрация сохраняется примерно на том же уровне до 96 ч ферментации.

При температуре $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, фитазная активность также увеличивается в течении 72 ч до 1,72 ед/г, далее активность снижается на до 96 ч ферментации.

Согласно полученным результатам, уровень фитазной активности наблюдается при температуре $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. Активность ферментации фитазы проявлялась в течении трех суток, затем снижалось.

Во всех случаях тенденция роста активности наблюдалось на протяжении трех суток, затем снижалось.

Таким образом, наиболее приемлемой температурой роста внутриклеточной активности фитазы для штамма *Aspergillus niger* считается $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Повышенный уровень внутриклеточной фитазной активности для штамма *Aspergillus niger* установлено опытным путем при условиях ферментации в течении 72 ч, $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Далее изучали зависимость внеклеточной фитазной активности от температуры выращивания штаммов при ферментации на питательных средах с

содержанием сахарозы. В таблице 000 и на рисунке 000 представлены результаты исследования.

Таблица 5 – Влияние температуры среды на изменение внеклеточной фитазной активности (ед/дм³) при биоферментации культуры *Aspergillus niger*

Температура инкубации культуры, °С	Время выращивания культуры, ч			
	24	48	72	96
37	1,42	2,89	3,27	2,98
30	1,21	1,87	2,15	2,15
24	0,45	0,98	1,22	1,24



Рисунок 11 – График зависимость внеклеточной активности ферментации фитазы от температуры выращивания штамма *Aspergillus niger*

Из полученных результатов видно, что в случае определения внеклеточной активности температура влияет стимулирующее, то есть с

увеличением температуры активность выделения фитазы вне клетки возрастает.

При температурном режиме $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ наблюдается рост концентрации фитазы в среде. Так через 24 ч обнаружено $0,45 \text{ ед/дм}^3$ фитазы, на 48 ч ферментации концентрация возрасла до $0,98 \text{ ед/г}$. На третье и четвертые сутки активность фитазы показывало приблизительно одинаковый уровень, $1,22$ и $1,24 \text{ ед/дм}^3$.

При повышении температуры ферментации до $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, так же наблюдалось динамика роста активности внеклеточной активности фитазы. По сравнению с штаммом при росте в режиме $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ на первые сутки активность была выше на $2,7$ раз, соответственно $1,21 \text{ ед/дм}^3$. Далее наблюдалась динамика роста внеклеточной активности фитазы до 72 ч ферментации. На четвертые сутки изменений не наблюдалось по сравнению с 72 ч ферментацией, активность была на уровне $2,15 \text{ ед/дм}^3$.

Рост внеклеточной фитазной активности наблюдали и при повышении температуры до $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. в первые же сутки активность возросла до 3 раз по сравнению с режимом ферментации при $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. На 48 ч ферментации возрасло до $2,89 \text{ ед/дм}^3$, на 72 ч – до $3,27 \text{ ед/дм}^3$, а на 96 ч наблюдается снижение до $2,98 \text{ ед/дм}^3$.

Исходя из результатов проведенных экспериментов, подтверждается теория о том что низкие температуры снижают транспорт и диффузию солей через биологические мембраны и чаще снижают энзиматическую активность. Более высокие температуры стимулируют продукцию метаболитов как ферменты.

3.5 Эксперименты по определению влияния количества фосфора при выращивании штамма на биосинтез фитазы

Известно, что фосфор требуется для микроорганизмов для роста и развития в среде, также применяется для регуляции метаболических процессов того или иного продуцента. Количество фосфора, определяет переход продуцента из трофофазы в продуцирующую мидиофазу, может ингибировать ферменты, может работать как переключатель метаболизма, может ограничивать индукцию вторичных метаболитов. Получают в промышленных условиях штаммов мутантов, которые позволяют получать более высокую концентрацию метаболитов.

В качестве соли для определения влияния фосфора на фитазную активность штамма *Aspergillus niger* был выбран K_2HPO_4 , так как является источником фосфора по технологиям получения лимонной кислоты другими авторами [15]. Концентрацию фосфора брали в промежутках $0,15$; $0,30$ и $0,45 \text{ г/дм}^3$. Исследовали влияние количества вносимой концентрации K_2HPO_4 на биосинтез фитазы, результаты приведены в таблице 6 и рисунке 12.

Таблица 6 – Влияние концентрации K_2HPO_4 на биосинтез фитазы

Концентрация K_2HPO_4 , г/дм ³	Фитазная активность	
	внутриклеточная, ед/г	внеклеточная, ед/дм ³
0,15	1,63	2,85
0,30	1,27	1,75
0,45	0,47	1,21

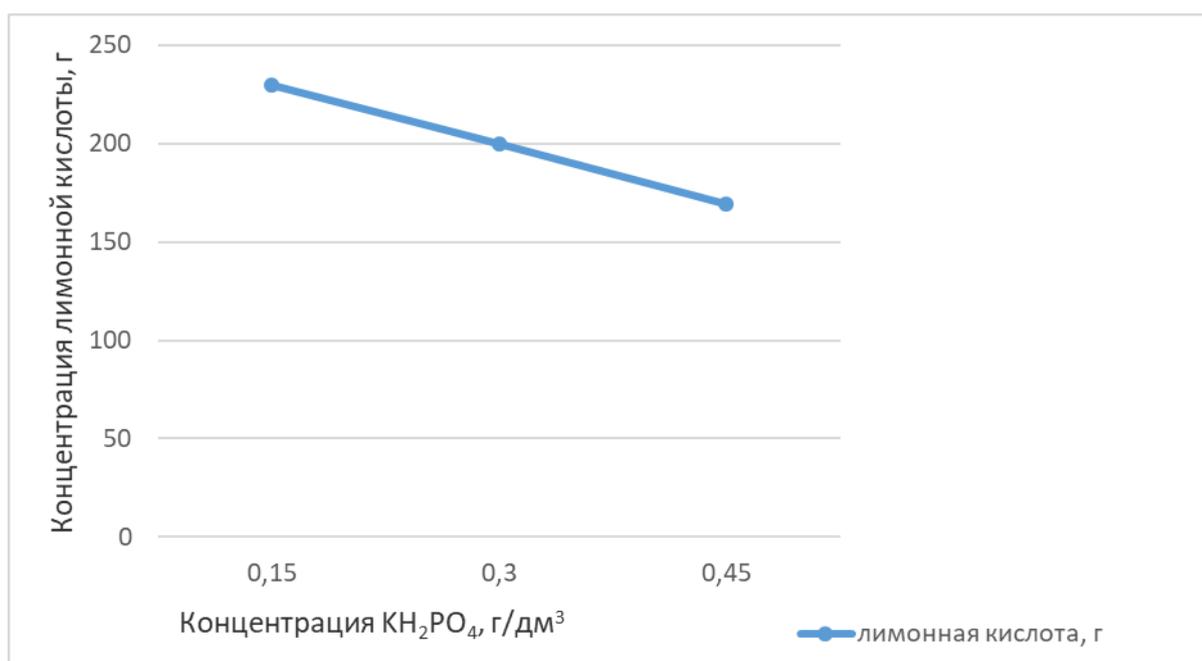


Рисунок 12 – График влияние концентрации K_2HPO_4 на количество лимонной кислоты

Таблица 7 – Результаты исследования биоферментации лимонной кислоты в зависимости от концентрации источника фосфора

Концентрация K_2HPO_4 , г/дм ³	Количество лимонной кислоты, г
0,15	230
0,30	200
0,45	169

Согласно полученным данным рост в среде источника фосфора стимулировало рост мицелий штамма *Aspergillus niger*, но заметно задерживало выделение ферментов. Чем была выше концентрация K_2HPO_4 в питательной среде, тем был ниже биосинтез фитазы как внутри, так и вне клетки штамма.

А низкие концентрации $\text{KН}_2\text{PО}_4$ в питательной среде задерживали рост мицелий штамма. Но активировало концентрацию фитазы в клетке и стимулировало выделение фитазы в питательную среду.

При концентрации фосфора $0,15 \text{ г/дм}^3$ внутриклеточная фитазная активность была на уровне $1,63 \text{ ед/г}$, далее при увеличении дозы до $0,3 \text{ г/дм}^3$ уменьшилось до $1,27 \text{ ед/г}$. При увеличении концентрации фосфора, еще снизилось активность фитазы до $0,47 \text{ ед/г}$.

Концентрация фосфора ингибирующее повлияло и на внеклеточную активность фермента. При концентрации фосфора $0,15 \text{ г/дм}^3$ активность была $2,85 \text{ ед/дм}^3$; $0,30 \text{ г/дм}^3$ уменьшилось до $1,75 \text{ ед/дм}^3$ и при $0,45 \text{ г/дм}^3$ уменьшилось до $1,21 \text{ ед/дм}^3$.

При ферментации выход лимонной кислоты тоже снижалось при повышении концентрации $\text{KН}_2\text{PО}_4$.

Результаты показывают, концентрация $\text{KН}_2\text{PО}_4$ в питательной среде в количестве $0,15 \text{ г/дм}^3$ благоприятно влияет на стимуляцию биосинтеза фитазы и увеличению количества лимонной кислоты.

ВЫВОДЫ

Согласно цели и поставленных задач, было изучено биосинтез фитазы штаммом *Aspergillus niger*.

Были исследованы влияния метода выращивания штамма на биосинтез фитазы. В результате при сравнении двух методов биоферментирования штамма *Aspergillus niger* было определено, что при глубинном ферментировании штамма биосинтез фитазы был интенсивнее, чем при поверхностном методе культивирования. Внутриклеточная активность фитазы было в 9 раз выше при глубинном методе, а внеклеточная активность в 2,4 раза.

Изучены влияния концентрации сахара при выращивании штамма на биосинтез фитазы. По сравнению с другими концентрациями при 150 г/дм³ сахарозы достигается максимальная внутриклеточную активность фитазы, до 0,91 ед/г на 72 ч, 0,93 ед/г на 96 ч. При концентрации сахарозы 150 г/дм³ после ферментации 24 ч внеклеточная активность штамма составляло 0,45 ед/дм³, далее по истечению времени концентрация увеличивалась. На 48 ч ферментации возрасло в 2 раза, на 72 ч – 2,7 раз, на 96 ч – 2,75 раз. Это соответствовало 0,98; 1,22; 1,24 ед/дм³ внеклеточной активности фитазы. Выбрана концентрация сахарозы 150 г/дм³ для интенсивного выхода фитазы.

Определено влияние температуры выращивания штамма на биосинтез фитазы. Активность ферментации фитазы проявлялась в течении трех суток, затем снижалось. Повышенный уровень внутриклеточной фитазной активности для штамма *Aspergillus niger* установлено опытным путем при условиях ферментации в течении 72 ч, 37±2⁰С. Рост внеклеточной фитазной активности наблюдали и при повышении температуры до 37±2⁰С. Выявлено, что высокие температуры стимулируют продукцию метаболитов как ферменты.

Изучены влияния количества фосфора при выращивании штамма на биосинтез фитазы. Результаты показали, концентрация КН₂РО₄ в питательной среде в количестве 0,15 г/дм³ благоприятно влияет на стимуляцию биосинтеза фитазы и увеличению количества лимонной кислоты.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ФК – фитиновая кислота

Са – кальций

Fe – железо

Mg – магний

Zn – цинк

pH – активная кислотность

ПКФ – пурпурные кислые фосфатазы

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ТГ – термогравиметрия

ПТГ – производная термогравиметрия

ИАС – инфракрасная абсорбционная спектроскопия

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Молчанова Е. Н., Линник К. А. Фитиновая кислота в зерновых и зернобобовых: вред или польза //Сборник материалов всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Прогрессивные технологии в индустрии питания»(28 апреля 2016 г.)//ФГБОУ ВПО «МГУПП». - 172 с. – 2016. – С. 94.
- 2 Гаскарова О. В. Перспективы использования фитиновой кислоты как биологически-активной добавки растительного происхождения в косметических средствах //Проектная культура и качество жизни. – 2018. – №. 10. – С. 47-52.
- 3 Макаренко Н. В. и др. Кинетика сорбции ионов тяжелых металлов сорбентом из отходов производства риса //Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2015. – №. 4 (182). – С. 94-99.
- 4 Мухаметзянова А. Д., Ахметова А. И., Шарипова М. Р. Микроорганизмы как продуценты фитаз //Микробиология. – 2012. – Т. 81. – №. 3. – С. 291-291.
- 5 Балабан, Н.П. Структурные особенности и механизм катализа β -прополерных фитаз бацилл // Н.П. Балабан, А.Д Сулейманова, Л.Р. Валеева, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Биохимия – 2016. - № 8. – С. 1011–1020.
- 6 Землянухина, О. А. Модификация метода Вэйда для количественного определения содержания фитина в эндосперме ореха / О. А. Землянухина, В. Н. Вепринцев, В. Н. Калаев, Ф. Р. Х. Аль-Хачами, Е. А. Калаева, В. А. Славский // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация – 2018. - № 3. – С. 163-169.
- 7 Муста Оглы, Н. Фитаза микромицета *Aspergillus niger* Л-4 – потенциальный пищевой микроингредиент / Н. Муста Оглы, Н.Ю. Шарова, А.Р. Юшкаускайте // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология - 2018. - Т. 8. - № 1(24). - С. 82–91.
- 8 Мухаметзянова, А.Д. Выделение, очистка и свойства фитат-гидролизующего фермента *P. agglomerans* / А.Д. Мухаметзянова, И.И. Маренова, М.Р. Шарипова // Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века» - 2012. – С. 618.
- 9 Невский, А.А. Применение ферментных препаратов с фитазной активностью при производстве хлебобулочных изделий / А.А. Невский, Г.Ф. Дремучева, М.В. Стрельникова, О.А. Сеницына // Кондитерское и хлебопекарное производство – 2016. - № 11-12. – С. 22-24.
- 10 Сулейманова, А. Д. Оптимизация определения фитазной активности бактериальных штаммов / А. Д. Сулейманова, А. А. Тойменцева, Е. О. Михайлова, М. Р. Шарипова // Вестник Казанского технологического университета - 2013. - №20. - С.188-190.
- 11 Manzhieva B. S., Sharova N. Y. Researching of features byosynthesis beta-glucans in the micelial mass *Aspergillus niger* and in non-conditional cereal grains

//Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies. – 2019. – Т. 81. – №. 2. – С. 218-222.

12 Муста О.Н.М., Шарова Н.Ю. Phytate Ghydrolysing activity of strain the *Aspergillus niger* L-4 micromycete strain //Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология, 2020. – Т.10. – №2. – С. 232-239.

13 Li K., Yang X., Dong X., Cao H., Zhuang S., Gu X. Easy regulation of chitosan-based hydrogel microstructure with citric acid as an efficient buffer //Carbohydrate Polymers, 2023. – Vol. 00. – P.120258.

14 Rajendiran, T. Influence of carbon source on phytase production by *Aspergillus niger* / Rajendiran Thyagarajan & Karthick Raja Namasivayam, Selvaraj // International journal of biological technology, 2010. - № 1. – P. 78-80.

15 Ramachandran, S. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates / S. Ramachandran, K. Roopesh, K.M. Nampoothiri, G. Szakacs & A. Pandey // Process Biochemistry, 2005. - № 40. – P. 1749-1754.

16 Borges R., Giroto A.S., Klaic R., Wypych F., Ribeiro C. Mechanochemical synthesis of eco-friendly fertilizer from eggshell (calcite) and KH_2PO_4 //Advanced Powder Technology, 2021. – Vol. 32. – №11. – P. 4070-4077.

17 Шарова Н. Ю. Синтез инвертазы штаммами микромицета *Aspergillus niger* продуцентами лимонной кислоты //Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – №. 1 (16). – С. 60-67.

18 Шарова Н. Ю., Сафронова В. И. Генетическая паспортизация штамма *Aspergillus niger* Л-4-промышленного продуцента лимонной кислоты с помощью геномного AFLP-фингерпринтинга //Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – №. 2. – С. 204-212.

19 Принцева А. А., Черенова П. А., Шарова Н. Ю. Выделение и свойства инвертазы, синтезируемой продуцентом лимонной кислоты-микромицетом *aspergillus niger* //Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке. – 2017. – С. 341-343.

20 Черенова П. А. Исследование свойств инвертазы, синтезируемой микромицетом-*ASPERGILLUS NIGER* продуцентом лимонной кислоты и ее применение в пищевых технологиях: магистерская диссертация: 19.04. 04. – 2017.

21 Выборнова Т. В., Корнев А. А. Исследование влияния электропорации на сохранение жизнеспособности микромицета *Aspergillus niger*-продуцента лимонной кислоты //Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Т. 7. – №. 3 (22). – С. 54-59.

РЕЦЕНЗИЯ

НА ДИПЛОМНУЮ РАБОТУ
НҰРМАХАНОВОЙ ЖАДЫРЫ СӘДІБЕКҚЫЗЫ
студента СӘТБАЕВ УНИВЕРСИТЕТ
специальности В070100 – «Биотехнология»

На тему: «Изучение биотехнологии фитазы с использованием штамма»

Выполнено:

- а) графическая часть на ___ листах.
- б) пояснительная записка на ___ страницах.

ЗАМЕЧАНИЯ К РАБОТЕ

В последние годы фитазы, гидролизующие фитаты, соли D-мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексаксидигидрофосфорной кислоты, стали важными в питании человека и животных. Обычно встречающаяся в растительном материале, фитаза является одним из многих ферментов, необходимых для процесса пищеварения. Она разрушает и повышает питательные качества зерна, бобовых, семян и кукурузы.

Обогащение рациона микробной фитазой делает более доступными фосфор, кальций, цинк и медь, улучшает переваримость продуктов. Эффективность использования микробной фитазы зависит от дозы, соотношения в рационе кальция и фосфора (Са:Р), обеспеченности витамином D3, состава рациона, возраста.

Дипломная работа Нурмахановой Ж.С. представляет собой законченное исследование, состоящее из следующих ключевых разделов: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования и заключение.

В обзоре литературы были рассмотрены материалы о пользе фитазы и ее биологические свойства, биотехнологические методы получения.

В разделе результаты исследования проведены эксперименты по изучению влияния различных факторов на биосинтез фитазы при получении фитазы биотехнологическим путем: исследованы влияния метода выращивания штамма, изучены влияния концентрации сахара при выращивании штамма, определено влияние температуры выращивания штамма, изучены влияния количества фосфора при выращивании штамма.

Однако в исследовательской части дипломной работы были отмечены некоторые недостатки: в работе были указаны не все сокращения; в тексте допущены орфографические и технические ошибки. Эти недостатки не могут снизить значимость проведенных исследований и общую ценность работы.

Дипломная работа соответствует требованиям государственного стандарта, направлению и профилю профессиональной подготовки студента.

Данная работа имеет практическую значимость, что вследствие может быть использована в пищевой отрасли.

Оценка работы

Дипломная работа соответствует предъявляемым требованиям и заслуживает оценки «отлично», Нурмаханова Жадыра Сәдібекқызы достойна степени бакалавра по специальности В070100 – «Биотехнология»

Рецензент
к.б.н., асс.профессор АТУ,
факультет «Пищевых технологий»
кафедра «Пищевая биотехнология»



Лесова Ж.Т.

Отзыв руководителя

на дипломную работу Нурмахановой Ж.С.

студенки кафедры ХиБИ

специальность: Биотехнология

«Изучение биотехнологии фитазы с использованием штамма»

Основные замечания по дипломной работе и характеристика студента

Дипломная работа Нурмахановой Ж.С. посвящена решению проблем получения фитазы биотехнологическим путем с применением штамма *Aspergillus niger*.

Были исследованы влияния метода выращивания штамма на биосинтез фитазы. В результате при сравнении двух методов биоферментирования штамма *Aspergillus niger* было определено, что при глубинном ферментировании штамма биосинтез фитазы был интенсивнее, чем при поверхностном методе культивирования. Внутриклеточная активность фитазы было в 9 раз выше при глубинном методе, а внеклеточная активность в 2,4 раза.

Изучены влияния концентрации сахара при выращивании штамма на биосинтез фитазы. По сравнению с другими концентрациями при 150 г/дм³ сахарозы достигается максимальная внутриклеточную активность фитазы, до 0,91 ед/г на 72 ч, 0,93 ед/г на 96 ч. При концентрации сахарозы 150 г/дм³ после ферментации 24 ч внеклеточная активность штамма составляло 0,45 ед/дм³, далее по истечению времени концентрация увеличивалась. На 48 ч ферментации возросло в 2 раза, на 72 ч – 2,7 раз, на 96 ч – 2,75 раз. Это соответствовало 0,98; 1,22; 1,24 ед/дм³ внеклеточной активности фитазы. Выбрана концентрация сахарозы 150 г/дм³ для интенсивного выхода фитазы.

Определено влияние температуры выращивания штамма на биосинтез фитазы. Активность ферментации фитазы проявлялась в течении трех суток, затем снижалось. Повышенный уровень внутриклеточной фитазной активности для штамма *Aspergillus niger* установлено опытным путем при условиях ферментации в течении 72 ч, 37±2°С. Рост внеклеточной фитазной активности наблюдали и при повышении температуры до 37±2°С. Выявлено, что высокие температуры стимулируют продукцию метаболитов как ферменты.

Изучены влияния количества фосфора при выращивании штамма на биосинтез фитазы. Результаты показали, концентрация КН₂РО₄ в питательной среде в количестве 0,15 г/дм³ благоприятно влияет на стимуляцию биосинтеза фитазы и увеличению количества лимонной кислоты.

При проведении исследований Нурмаханова Жадыра зарекомендовала себя с положительной стороны, показала хорошие теоретические знания и практические навыки по биотехнологии.

Оценка дипломной работы

Дипломная работа Нурмахановой Ж.С. написана логически, последовательно, чётко и ясно. Выполненная работа в полной мере отвечает поставленной цели и является законченным исследованием.

Работа оценена на «отлично» и рекомендована к защите.

Руководитель: к.е-х.н. асс.профессор АТУ



Каташева А.Ч.



Метаданные

Название

Изучение биотехнологии фитазы с использованием штамма Aspergillus niger.doc

Автор

Нұрмаханова Жадыра Сәдібекқызы

Научный руководитель / Эксперт

Алма Каташева

Подразделение

ИГИНГД

Список возможных попыток манипуляций с текстом

В этом разделе вы найдете информацию, касающуюся текстовых искажений. Эти искажения в тексте могут говорить о ВОЗМОЖНЫХ манипуляциях в тексте. Искажения в тексте могут носить преднамеренный характер, но чаще, характер технических ошибок при конвертации документа и его сохранении, поэтому мы рекомендуем вам подходить к анализу этого модуля со всей долей ответственности. В случае возникновения вопросов, просим обращаться в нашу службу поддержки.

Замена букв		6
Интервалы		0
Микропробелы		9
Белые знаки		0
Парафразы (SmartMarks)		23

Объем найденных подоби

Обратите внимание! Высокие значения коэффициентов не означают плагиат. Отчет должен быть проанализирован экспертом.

**25**

Длина фразы для коэффициента подобия 2

**10616**

Количество слов

**82439**

Количество символов

Подобия по списку источников

Посмотрите список и проанализируйте, в особенности, те фрагменты, которые превышают КП №2 (выделенные жирным шрифтом). Используйте ссылку «Обозначить фрагмент» и обратите внимание на то, являются ли выделенные фрагменты повторяющимися короткими фразами, азбросанными в документе (совпадающие сходства), многочисленными короткими фразами расположенные рядом друг с другом (парафразирование) или обширными фрагментами без указания источника ("криптоцитаты").

10 самых длинных фраз

Цвет текста

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	https://docplayer.ru/57336611-Almaty-tehnologiyalshch-universitet-almatinskiy-tehnologicheskiv-universitet-almaty-technological-university.htm	29	0.27 %
2	https://docplayer.ru/57336611-Almaty-tehnologiyalshch-universitet-almatinskiy-tehnologicheskiv-universitet-almaty-technological-university.htm	26	0.24 %
3	https://knowledge.allbest.ru/biology/2c0b65635a2bc68a5d53b88421216c27_0.htm	23	0.22 %

4	https://ronl.org/referaty/biologiya/296366/	20	0,19%
5	https://ronl.org/referaty/biologiya/296366/	20	0.19 %
6	https://ronl.org/referaty/biologiya/296366/	20	0.19 %
7	https://ronl.org/referaty/biologiya/296366/	18	0.17 %
8	https://knowledge.allbest.ru/biology/2c0b65635a2bc68a5d53b88421216c27_0.html	17	0.16 %
9	https://ronl.org/referaty/biologiya/296366/	7	0.07 %
10	https://knowledge.allbest.ru/biology/2c0b65635a2bc68a5d53b88421216c27_0.html	7	0.07 %

из базы данных RefBooks (0.00 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из домашней базы данных (0.00 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из программы обмена базами данных (0.00 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из интернета (1.82 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	ИСТОЧНИК URL	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	https://ronl.org/referaty/biologiya/296366/	91 (6)	0.86 %
2	https://docplayer.ru/57336611-Almaty-tehnologiyalshch-universitet-almatinskiy-tehnologicheskij-universitet-almaty-technological-university.html	55 (2)	0.52 %
3	https://knowledge.allbest.ru/biology/2c0b65635a2bc68a5d53b88421216c27_0.html	47 (3)	0.44 %

Список принятых фрагментов (нет принятых фрагментов)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	СОДЕРЖАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	------------	---