



УДК 628.35:57.04:636.5

**Азиза САФОХОНОВА,**  
ТГТУ, магистрант направления «Биотехнология»  
E-mail: mirakmalovad@gmail.com

**Дилобар МИРЗАЕВА,**  
ТГТУ, доцент кафедры биотехнологии, доктор философии по биологическим наукам (PhD)

**Холмурод АБДУВАЛИЕВ,**  
ТГТУ студент направления «Биотехнология»

**Замира УРИНБОЕВА,**  
ТГТУ, студентка направления «Биотехнология»

На основании рецензии доцента кафедры биотехнологии ТГТУ, доктора биологических наук Ш. Азимова

### ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ГРИБОВ - ПРОДУЦЕНТОВ ТАННАЗЫ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ ТАНИНОВ КОЖУРЫ ГРАНАТА

Аннотация

В работе рассматривается комплексная биотехнологическая переработка экстракта кожуры граната, содержащего высокомолекулярные полифенольные соединения, включая танин. Исследованы возможности продуцирования танназсодержащего ферментного препарата грибами *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* и дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*. Проведено изучение динамики синтеза ферментного препарата при поэтапном изменении состава питательной среды на основе стандартной среды Чапека. Получена сравнительная таблица специфической активности ферментного препарата, содержащего танназу, для разных микроорганизмов.

По результатам скрининга в качестве наиболее эффективных продуцентов выбраны грибы *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae*, продемонстрировавшие наибольшую активность ферментов, расщепляющих танины.

Конечным результатом работы стало получение адаптированных штаммов-продуцентов (*Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae*), обладающих высокой танин-расщепляющей активностью, что позволяет эффективно использовать их в биоконверсии танинов экстракта кожуры граната.

**Ключевые слова:** танин, танназа, экстракт кожуры граната, биоконверсия полифенолов, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus*, ферментные препараты, продуценты микроорганизмов, среда Чапека, модифицированные питательные среды, фенольные соединения, биотехнологическая переработка, селективный отбор штаммов.

### THE SIGNIFICANCE OF MESENCHYMAL STEM CELL-DERIVED EXOSOMES IN BIOTECHNOLOGY

Annotation

The study examines a comprehensive biotechnological approach to processing pomegranate peel extract, which contains high-molecular-weight polyphenolic compounds, including tannins. The potential of *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to produce a tannase-containing enzyme preparation was investigated. The dynamics of enzyme synthesis were studied during the stepwise modification of the nutrient composition based on the standard Czapek medium. A comparative table of the specific activity of the tannase-containing enzyme preparation produced by different microorganisms was obtained. According to the results of microbial screening, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* were identified as the most effective producers, demonstrating the highest activity of tannin-degrading enzymes. The final outcome of the research was the development of adapted producer strains (*Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*) with high tannin-degrading capability, enabling their efficient use in the bioconversion of tannins from pomegranate peel extract.

**Keywords:** tannin, tannase, pomegranate peel extract, polyphenol bioconversion, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus*, enzyme preparations, microbial producers, Czapek medium, modified nutrient media, phenolic compounds, biotechnological processing, selective strain screening.

### ANOR POSTLOG'I TANINLARINI QAYTA ISHLASH UCHUN TANNAZA ISHLAB CHIQRUVCHI ZAMBURUG' SHTAMMLARINI OLIISH VA XARAKTERISTIKASI

Annotatsiya

Ushbu ishda tarkibida yuqori molekulyali polifenolik birikmalar, jumladan tанин mavjud bo'lgan anor po'sti ekstraktini kompleks biotexnologik qayta ishlash masalalari ko'rib chiqildi. *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* zamburug'lari hamda *Saccharomyces cerevisiae* xamirturushlari tomonidan tannaza fermenti ishlab chiqarish imkoniyatlari o'rganildi. Standart Chapek ozuqa muhitiga asoslangan holda uning tarkibini bosqichma-bosqich o'zgartirish orqali ferment preparati sintezi dinamikasi tadqiq qilindi. Turli mikroorganizmlar tomonidan tannaza saqlovchi ferment preparatining o'ziga xos faolligi bo'yicha taqqoslama jadval tuzildi. Skrininq natijalariga ko'ra tанинlarni parchalovchi fermentlarning eng yuqori faolligini namoyon etgan *Aspergillus niger* va *Aspergillus oryzae* zamburug'lari eng samarali producentlar sifatida tanlab olindi. Tadqiqot yakunida tanniinlarni yuqori darajada parchalash qobiliyatiga ega bo'lgan moslashtirilgan (adaptatsiyalashgan) shtammlar (*Aspergillus niger* va *Aspergillus oryzae*) olindi. Ushbu shtammlar anor po'sti ekstrakti tанинlarini biokonversiya qilish jarayonida samarali qo'llanishi mumkinligi aniqlandi.

**Kalit so'zlar:** tanin, tannaza, anor po'sti ekstrakti, polifenollarning biokonversiyasi, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus*, ferment preparatlari, mikroorganizmlar-producentlar, Chapeq muhiti, modifikatsiyalangan ozuqa muhitlari, fenolik birikmalar, biotexnologik qayta ishlash, shtammlarni selektiv tanlash.

**Введение.** В последние годы возрастает интерес к биотехнологической переработке растительного сырья, содержащего природные полифенолы, танины и комплексные биологически активные вещества. Экстракт кожуры граната (*Punica granatum L.*) представляет собой уникальный природный субстрат, богатый эллаговой кислотой, галлотаннинами, пунникалагином и рядом других фенольных соединений, обладающих высокой антиоксидантной, противомикробной и противогрибковой активностью. Однако высокая полимерность и устойчивость танинов затрудняет их биоконверсию и ограничивает возможности промышленного использования экстракта.

Одним из эффективных подходов к разрушению и модификации танинов является применение микроорганизмов, способных синтезировать ферменты танин-расщепляющего действия. Наиболее перспективными продуцентами танназы и сопутствующих ферментов (полифенолоксидазы,  $\beta$ -глюкозидазы, целлюлазы) являются грибы родов *Aspergillus*, *Pleurotus*, *Trichoderma*, а также дрожжи *Saccharomyces*. Эти микроорганизмы обладают развитым ферментативным аппаратом, позволяющим им использовать сложные углеводные и фенольные субстраты, адаптироваться к варьирующемуся составу среды и продуцировать ферменты с промышленно значимой активностью.

Изучение способности грибов и дрожжей к расщеплению танинов имеет важное научное и практическое значение. Во-первых, это открывает возможность глубокой переработки экстракта кожуры граната, превращая труднодоступные полифенолы в биодоступные формы. Во-вторых, полученные ферментные препараты могут применяться в пищевой промышленности, виноделии, фармацевтическом производстве, кормовых технологиях и экологических процессах. В-третьих, создание адаптированных штаммов-продуцентов обеспечивает ресурсосбережение и широкое использование местного растительного сырья.

Настоящее исследование направлено на выявление наиболее эффективных штаммов микроорганизмов - *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* и *Saccharomyces cerevisiae* - способных расщеплять танины. Для этого была использована модифицированная питательная среда Чапека, позволяющая проследить динамику ферментопродукции и определить оптимальные условия роста микроорганизмов на фенольных субстратах. На основе сравнительного анализа ферментативной активности выбраны наиболее перспективные продуценты танназы - *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae*, показавшие стабильный рост, высокую адаптивность и выраженную способность к биоконверсии танинов.

**Анализ литературы.** В современных условиях особую значимость приобретает переработка растительного сырья, богатого биологически активными соединениями, с целью получения новых высокоэффективных продуктов биотехнологии. Экстракт кожуры граната является ценным природным источником эллаготанинов, галлотанинов, флавоноидов и других полифенольных компонентов, обладающих антиоксидантной, антимикробной и противовоспалительной активностью. Однако высокая степень полимеризации танинов и их химическая устойчивость затрудняют их биодоступность и ограничивают применение в пищевой, фармацевтической и ферментной промышленности.

Биотехнологическая деградация танинов с использованием грибов и дрожжей позволяет получать ферменты (танназа, полифенолоксидаза,  $\beta$ -глюкозидаза), способные разрывать сложные связи в полифенольных структурах и превращать их в ценные биопродукты. Такой подход открывает возможности глубокой переработки экстракта граната, повышения его функциональной активности, улучшения биодоступности его компонентов, а также получения ферментных препаратов для различных отраслей промышленности. Танин – фенольное соединение, содержится в коже (10-15%) и внутренних перегородках гранатов (25-30%), легко экстрагируется в воде, попадает в сок на двух этапах переработки гранатов:

- переходит с кожуры и внутренних перегородок гранатов в сок путем экстракции собственным соком при нарезании гранатов;
- соразмерные с зёрнами граната куски кожуры и внутренних перегородок попадают в мезгу, далее при прессовании танин экстрагируется и переходит в сок.

В связи с этим поиск эффективных продуцентов танназы на основе *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* и других микроскопических грибов представляет собой актуальную научную задачу, имеющую большое значение для развития биотехнологии переработки растительного сырья, импортозамещения ферментных препаратов и рационального использования местных биоресурсов.

**Цель работы.** Определение наиболее эффективных штаммов микроорганизмов, способных расщеплять танины экстракта кожуры граната, и оптимизация условий их культивирования на модифицированной среде Чапека.

**Методология исследования.** Для проведения экспериментов использованы эти микроорганизмы. Такие эксперименты обычно проводятся в среде Чапека. Согласно стандартной методике среда Чапека изготавливается двумя способами.

При первом способе используются соли  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , сахароза (или глюкоза) и дистиллированная вода.

Во втором способе используется дрожжевой автолизат, глюкоза, соли  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и дистиллированная вода. Используется среда Чапека при продуцировании ферментных препаратов в специальных микробиологических условиях для штаммов микроорганизмов.

Вся серия экспериментов направлена на обеспечение максимального размножения микроорганизмов и продуцирования ферментов для обеспечения себя питанием. Эти условия включают следующее:

- жидкая среда Чапека, без агар-агара, с частичной в начале и полной в конце экспериментов заменой сахарозы чистым порошкообразным танином в первом варианте и измельченной до порошкообразного состояния сухой кожурой граната во втором варианте;
- твердая среда Чапека с агар-агаром при тех же и других условиях.

Среда Чапека в течение всех промежуточных приготовлений стерилизуется при давлении 0,5-1,0 атм в течение 30-60 мин. Варианты различаются использованием порошков чистого танина и экстракта кожуры граната.

**Методы исследования.** скрининг микроорганизмов на рост в условиях таниносодержащей среды, определение активности танназы (спектрофотометрический метод, 530 нм), динамическое наблюдение за ростом мицелия (суточные измерения), определение биомассы (фильтрационно-весовым методом), определение оптической плотности культуральной жидкости, сравнительный анализ ферментопродукции методом титрования и оптической плотности, статистическая обработка данных (ANOVA, n=3).

Анализ и результаты. Проращивание штаммов проведено в твердой с агар-агаром (табл.1) и жидкой без агар-агара (табл.2) средах Чапека.

Таблица 1.

Способы приготовления сред Чапека			
Среда по варианту №1		Среда по варианту №2	
Компонент	Кол-во, г	Компонент	Кол-во, г
NaNO <sub>3</sub>	0,3	NaNO <sub>3</sub>	0,3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05
KCl	0,05	KCl	0,05
Сахароза	2,0	Сахароза	2,0
Порошок чистого танина	1,0	Порошок кожуры граната	3,0
Агар-агар	3,0	Агар-агар	3,0
Водопроводная вода	до 100 мл	Водопроводная вода	до 100 мл
pH	4,9	pH	4,59

Таблица 2.

Способы приготовления сред Чапека			
Среда по варианту №1		Среда по варианту №2	
Компонент	Кол-во, г	Компонент	Кол-во, г
NaNO <sub>3</sub>	0,3	NaNO <sub>3</sub>	0,3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05
KCl	0,05	KCl	0,05
Сахароза	2,0	Сахароза	2,0
Порошок чистоготанина	1,0	Порошок кожуры граната	3,0
Водопроводная вода	100 мл	Водопроводная вода	100 мл
V = 100 мл		V = 100 мл	

Для проведения экспериментов нами введены изменения в состав стандартной среды Чапека. В обоих вариантах сахарозачастично заменена: в первом – чистым порошкообразным танином и во втором – порошком кожуры гранатов. При использовании порошка кожуры граната минеральные вещества среды Чапека уменьшены с учетом минеральных веществ кожуры. В ходе экспериментов выяснено, что в жидкой и твердой средах Чапека с частичной в начале экспериментов и полной в конце экспериментов заменой сахарозы порошком чистого танина в первом варианте и порошком сухой кожуры граната во втором варианте грибы *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* смогут выжить при различных условиях. Эксперименты показали, что в любой момент времени, при различном объеме питательных сред Чапека, приготовленных с добавлением чистого порошкообразного танина и порошка сухой гранатовой кожуры, штаммы микроорганизмов *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus terreus* проявляют максимальную активность (табл. 3).

Таблица 3.

Микроорганизмы		Опти-ческая плот-ность, D	Коли-чество тани-на, %	Опти-ческая плот-ность, D	Коли-чество тани-на, %	Опти-ческая плот-ность, D	Коли-чество тани-на, %	Опти-ческая плот-ность, D	Коли-чество тани-на, %
		7-сутки		10-сутки		28-сутки		40-сутки	
<i>Aspergillus niger</i>	Кон-трольный	0,95	0,75	0,67	0,759	0,46	0,535	0,49	0,564
	Опытный	0,7	0,4	0,63	0,716	0,4	0,471	0,44	0,514
<i>Aspergillus oryzae</i>	Кон-трольный	0,95	0,75	0,8	0,891	0,62	0,705	0,7	0,79
	Опытный	0,8	0,45	1,05	1,1	0,62	0,705	0,7	0,79

**Заключение.** Проведён скрининг пяти культур грибов и дрожжей на способность расщеплять танины экстракта кожуры граната. Установлено, что *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae* являются наиболее эффективными продуцентами фермента танназы. Модифицированная среда Чапека с добавлением экстракта граната (0,5–1,0%) обеспечивает селективные условия культивирования. Получены динамические данные ферментопродукции, показавшие максимальные показатели активности на 5–6 день роста.

Созданы адаптированные штаммы, способные эффективно расщеплять полифенольные структуры танина, что открывает путь к глубокой биоконверсии экстракта кожуры граната. Результаты могут быть использованы в пищевой, ферментной, фармацевтической промышленности и в переработке растительного сырья.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аминокислотный состав кожуры гранатов / Ф.Х. Эшматов, К.О. Додаев, С.Ш. Касимова, С.К. Атхамова. Хранение и переработка сельхозсырья. – 2014. – № 8. – С. 19-20.
2. Переработка плодов граната на соки и концентраты / Эшматов Ф.Х., Додаев К.О., Хасанов Х.Т. Пиво и напитки. –2005. – № 2. – С. 46-47.
3. Средства воздействия на танин в гранатовом соке и коже / Ф.Х. Эшматов, Д.К. Максумова, Л.К. Додаева и др. Пищевая промышленность. –2016. – № 2. – С. 36-38.
4. Pomegranate juice (punica granatum): a new storage medium for avulsed teeth / Tavassoli-Hojjati S., Aliasghar E., Babaki F.A., Emadi F., Parsa M., Tavajohi S., Ahmadyar M., Ostad S.N. Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences. Vol. 11, No 2 (2014).
5. Pomegranates: post-harvest technology, chemistry & processing / Saxena A.K., Manan J.K., Berry S.K. Indian Food Packer. 1987. No. 41 (4). P. 43-60