

УСЛОВИЯ БИОСИНТЕЗА КИСЛЫХ ПРОТЕАЗ У *ASPERGILLUS FLAVUS*

А.Х. Сафарова*

Университет Одлар Юрду, Баку, Азербайджан

ACID PROTEASES BIOSYNTHESIS CONDITIONS IN *ASPERGILLUS FLAVUS*

A.Kh. Safarova (University of Odlar Yurdu, Baku, Azerbaijan)

Резюме. Данная работа посвящена изучению условий биосинтеза кислых (pH 2,5 и pH 5,5) протеаз у плесневого гриба *Aspergillus flavus* BDU-44. Показано, что активный биосинтез протеаз происходит в экспоненциальной фазе роста и максимальная активность наблюдается на третьи сутки культивирования. Оптимальная температура (35°C) биосинтеза протеаз не совпадает с оптимальной температурой (30°C) роста гриба. Кислые протеазы гриба синтезируются конститутивно и из углеводов высокая активность наблюдается в присутствии сахарозы. Оптимальными источниками азота для биосинтеза кислых протеаз является пептон и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Abstract. This work is devoted to studying the conditions for the biosynthesis of acidic (pH 2.5 and pH 5.5) proteases in the mold fungus *Aspergillus flavus* BDU-44. It has been shown that active protease biosynthesis occurs in the exponential growth phase and maximum activity is observed on the third day of cultivation. The optimal temperature (35°C) of protease biosynthesis does not coincide with the optimal temperature (30°C) of fungal growth. Acidic proteases of the fungus are synthesized constitutively and high activity is observed in the presence of sucrose. The optimal nitrogen sources for the biosynthesis of acidic proteases are peptone and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Ключевые слова: протеазы, *Aspergillus flavus*, биосинтез, источники углерода и азота.

Keywords: proteases, *Aspergillus flavus*, biosynthesis, carbon and nitrogen sources.

* А.Х. Сафарова, Университет Одлар Юрду, ул. К. Рахимова, 3, AZ1072, Баку, Азербайджан

Received: 25 April 2020;

Accepted: 30 July 2020;

Published: 23 August 2020.

1. Введение

Протеазы (протеиназы или пептидазы) являются важными промышленными ферментами, так как 60% ферментов применяемых в народном хозяйстве является протеазами. Эти ферменты составляют 40% ферментов мирового рынка (Singh *et al.*, 2016; Ali & Muhammad, 2017). Протеазы широко применяют в практической жизни, из которых 8% составляют животного и 4% растительного происхождения (Milala, *et al.*, 2016). Следовательно, основная часть промышленных протеаз получают из микроорганизмов (грибов и бактерий). Микроорганизмы продуцируют все три типа протеаз: кислую, нейтральную и щелочную протеазы. Протеазы грибов более устойчивы и эффективно действуют в широких пределах кислотности (pH 4-8), в то время как бактериальные протеазы, за небольшими исключениями, наиболее эффективно в более узкой зоне (pH 7-8) кислотности (Kumar *et al.*, 2016). Кислые протеазы грибов применяются в производстве приправ, белковых гидролизатов, соевых соусов, мучных изделий, для очищения

пива и фруктовых соков (Yin *et al.*, 2013). Следовательно, поиск новых продуцентов протеолитических ферментов грибов и изучение условий биосинтеза прежде всего имеет большое практическое значение.

Многие исследования посвящены изучению биосинтеза протеаз *Aspergillus flavus* (Muthulakshmi *et al.*, 2011), *A. niger* (Paranthaman *et al.*, 2009), *A. oryzae* (Karthie *et al.*, 2014), *Penicillium chrysogenum*, *P. griseoreseum* (Hag *et al.*, 2004; 2006) и других плесневых грибов (Ellaiah *et al.*, 2002; Chandrasekuran *et al.*, 2015).

В предыдущих работах нами была исследована протеолитическая активность плесневых грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium*, выделенных из почв Азербайджана (Ganbarov *et al.*, 2018; Safarova *et al.*, 2018).

Целью настоящей работы является изучение условий биосинтеза кислых протеаз плесневого гриба *Aspergillus flavus* BDU-44.

2. Материалы и методы

В качестве объекта использовали штамм плесневого гриба *Aspergillus flavus* BDU-44, который отобран как активный продуцент протеолитических ферментов (Ganbarov *et al.*, 2018).

Для получения посевного материала грибы выращивали в жидкой среде сусло (5 Баллинг) при 30°C в течение 72 часов на качалке 180 об/мин. Полученный посевной материал в качестве 3% по объему переносили в среду следующего состава (%): сахароза – 3,0; пептон – 1,0 (неорганические источники азота – 0,3% по азоту); NaCl – 0,2; MgSO₄ – 0,5; KН₂PO₄ – 0,05 и инкубировали при 30°C в течение 2-х суток. Затем биомассу отделяли центрифугированием и надосадочную жидкость использовали в качестве ферментного раствора.

Активность кислых (pH 2,5 и pH 5,5) протеиназ определяли по методу Ансона в модификации (Grachova *et al.*, 1982). В качестве субстрата фермента использовали 2%-ный раствор натриевой соли казеина (казеинат натрия). 2 г казеината натрия растворяли в 100 мл буферного раствора с соответствующим pH. В качестве буферного раствора использовали 0,5 М натрий ацетат (ацетатный буфер). Приготовленный раствор субстрата разливали по 2 мл в пробирки и помещали в водяной термостат (ультратермостат) при 37°C на 10 мин. Через 10 мин в пробирки добавляли по 2 мл культуральной жидкости (в качестве ферментного раствора) и оставляли на гидролиз 10 мин. Затем в пробирки добавляли 0,3 М раствор трихлоруксусной кислоты для осаждения негидролизующей части казеината натрия и фильтровали реакцию смесь. После этого добавляли (одновременно перемешивая) 5 мл 0,5 М раствора карбоната натрия и 1 мл раствора реактива Фолина. Через 20 мин определяли оптическую плотность спектрофотометрически (UV-vis SPECORD 250 plus) при длине волны 660 нм. Количество тирозина (продукта гидролиза) определяли по калибровочной кривой. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое за 1 мин при 37°C превращает казеинат натрия в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние в количестве (0,181 мг), соответствующем 1 мкмоль тирозина (продукта реакции) и выражали в мкмоль/мин/мг белка (eg/мг белка).

Содержание белка при измерении активности фермента определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм (Whitaker & Granum, 1980).

Все опыты проводили в 4-х повторностях и статистически обрабатывали

(Plokhinskiy, 1998).

3. Результаты и обсуждения

Изучение биосинтеза кислых протеаз (рН 2,5 и рН5,5) в динамике роста гриба *Aspergillus flavus* BDU-44 показало, что активный синтез обоих ферментов происходит после 24-х часов и продолжается до 72-х часов инкубации, что соответствует экспоненциальной фазе роста. Максимальная удельная активность наблюдалась через 72 часа инкубации. После 72-х часов инкубации (в стационарной фазе роста) скорость синтеза ферментов постепенно понижалась (Рис. 1). Динамика биосинтеза обеих протеаз существенно не отличалась друг от друга.

Следует отметить, что максимальная активность протеаз исследуемого штамма *Aspergillus flavus* BDU-44 проявляется через 72 часа инкубации, что не совпадает с литературными данными, в которых активность протеаз гриба *Aspergillus flavus* максимально проявляется через 168 часов инкубации (Muhuiakshmi *et al.*, 2011). Также показано, что плесневые грибы такие как: *Aspergillus niger* наибольшую активность проявляет через 48 часов (Milala *et al.*, 2016), а *Penicillium griseoroseum* – через 72 часа инкубации (Hag *et al.*, 2004). Отсюда следует, что интенсивность биосинтеза протеаз зависит как от вида, так и от штамма плесневых грибов.

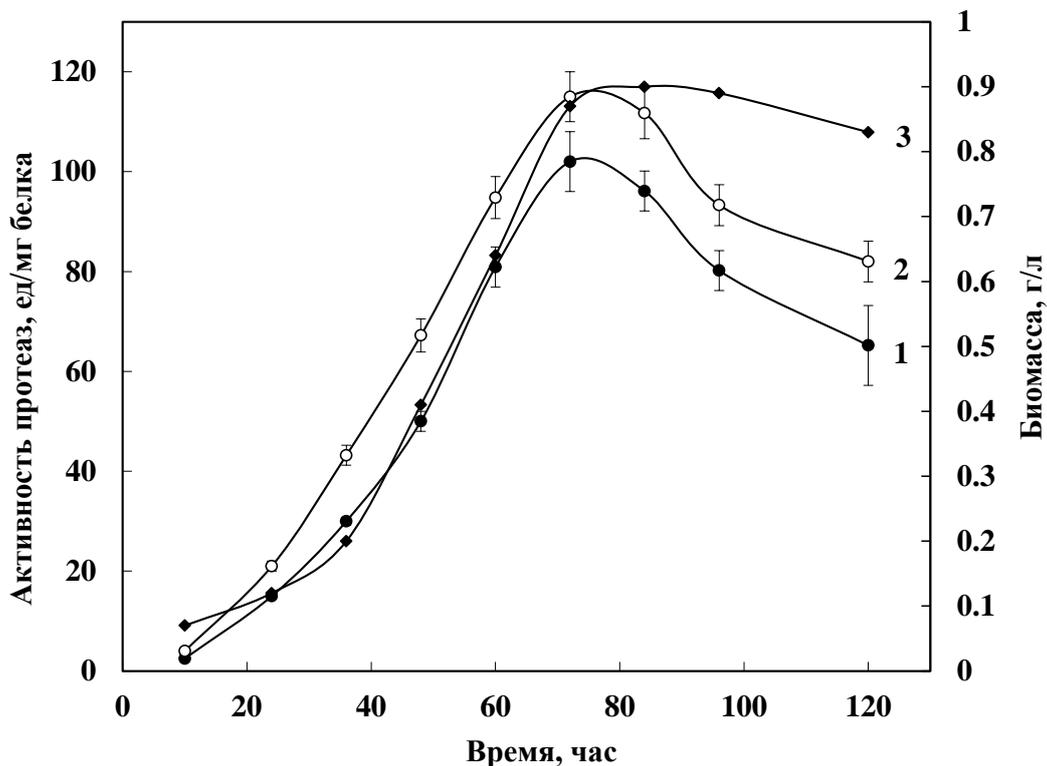


Рис. 1. Динамика биосинтеза кислых протеаз и роста гриба *Aspergillus flavus* BDU-44
1-протеаза рН 2.5; 2-протеаза рН 5.5; 3-рост гриба

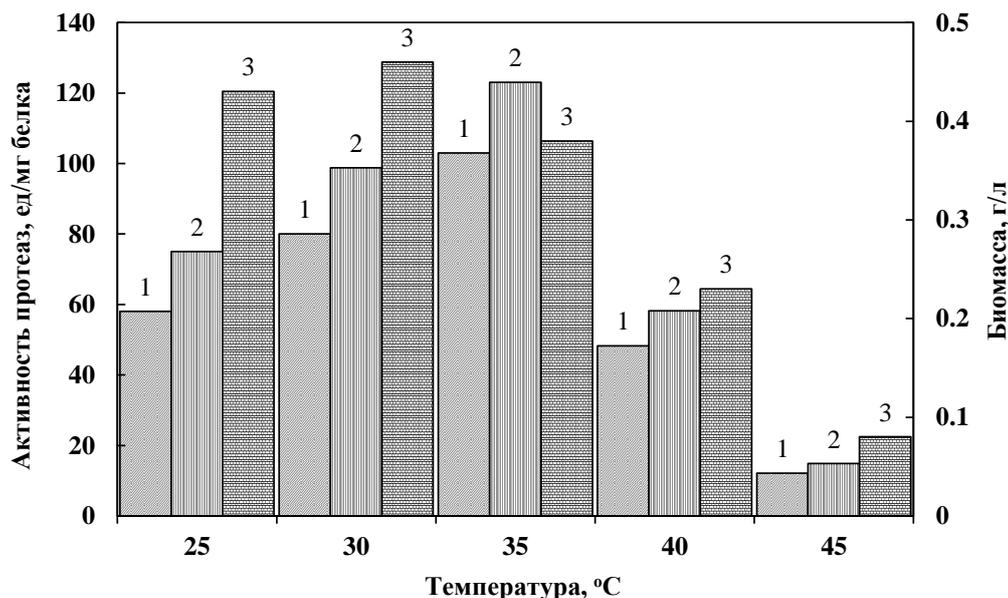


Рис. 2. Влияние температуры на биосинтез кислых протеаз у *Aspergillus flavus* BDU-44
1-протеаза рН 2.5; 2-протеаза рН 5.5; 3-рост гриба

Изучение влияния температуры культивирования гриба на биосинтез показало, что наибольшая активность обеих протеаз наблюдается при 35°C, хотя температура оптимального роста гриба является 30°C (Рис.2). Так, удельная активность кислых протеаз при 35°C было 1,3 раза больше, чем при 30°C. Следовательно, оптимальная температура синтеза протеаз не совпадает с оптимальной температурой роста гриба.

Полученные нами результаты по оптимальной температуре синтеза протеаз не совпадают с литературными данными, где показано, что оптимальной температурой синтеза протеаз у *Aspergillus flavus* является 30°C (Muthulakshmi *et al.*, 2011; Chandrasekuran *et al.*, 2015). Однако, гриб *Aspergillus niger* максимальную протеазную активность проявлял при 35°C (Chandrasekuran *et al.*, 2015), а другой штамм гриба *A. niger* наибольшую активность протеаз показал при 40°C (Milala *et al.*, 2016). Плесневый гриб *Penicillium griseoroseum* высокую активность протеаз проявлял при 30°C (Hag *et al.*, 2004). Следовательно, оптимальная температура для синтеза протеаз может меняться в зависимости от штамма и вида гриба.

При использовании сахаров в качестве источников углерода и энергии, высокую активность кислых протеаз проявлялась в присутствии сахарозы, глюкозы и мальтозы. Однако, наибольшая активность наблюдалась на среде с сахарозой. Так, в присутствии сахарозы активность кислых протеаз была 1,7-1,8; 2,1 и 1,7-1,9 раза больше по сравнению с ксилозой, арабинозой и крахмалом, соответственно (Рис. 3). Хотя Милала и др. (Milala *et al.*, 2016) считают, что глюкоза является лучшим источником углерода для синтеза протеаз.

Следует отметить, что биосинтез кислых протеаз обнаружен в присутствии всех ростовых субстратов, что вероятно говорит о конститутивном синтезе ферментов. Желатин и казеин, как субстраты фермента (возможные индукторы) показали наибольшую активность и увеличивали биосинтез протеаз лишь в несколько раз, по сравнению с углеводами. Так, активность кислых протеаз при

росте культуры на желатине в 1,3-3,0 раза, а при росте на казеине – в 1,4-3,4 раза была больше, чем при росте на углеводах. Такое увеличение активности протеаз в присутствии возможных индукторов тоже свидетельствует о конститутивном синтезе ферментов.

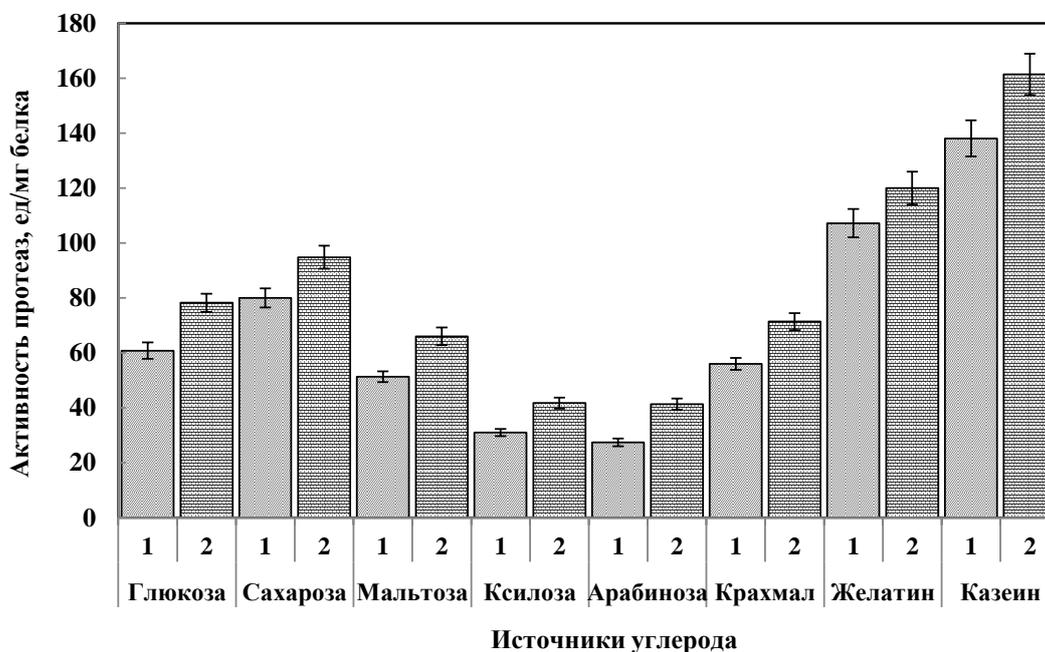


Рис. 3. Влияние источников углерода на биосинтез кислых протеаз у *Aspergillus flavus* BDU-44: 1-протеаза pH 2.5; 2-протеаза pH 5.5

Изучение влияния источников азота на биосинтез кислых протеаз показало, что все использованные органические источники азота вызывали активный синтез протеаз. Наибольшая активность наблюдалась на пептоне, где активность протеаз была 1,2-1,4 и 1,6 раза больше чем на аспарагине и мочеvine, соответственно (Рис. 4). Из неорганических источников азота высокая активность наблюдалась на $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Однако наивысшая активность проявлялась при $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Так, активность на $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ была 2,0-3,3; 2,2-3,1; и 1,1-1,2 раза больше по сравнению с NaNO_3 , NH_4NO_3 и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, соответственно.

Исследованный штамм гриба *Aspergillus flavus* BDU-44 лучше потреблял аммонийные соли азота, что отличает его от известного штамма гриба *Aspergillus flavus*, у которого оптимальным источником азота для синтеза протеаз являлся KNO_3 (Muthulakshmi *et al.*, 2011).

Таким образом, изучение условий биосинтеза кислых (pH 2,5 и pH 5,5) протеаз у *Aspergillus flavus* BDU-44 показало, что активный синтез ферментов происходит в экспоненциальной фазе роста и максимальная активность наблюдается на третьи сутки культивирования. Оптимальная температура (35°C) биосинтеза кислых протеаз не совпадает с оптимальной температурой (30°C) роста гриба. Биосинтез кислых протеаз у гриба *A. flavus* BDU-44 происходит конститутивно и из углеводов высокая активность наблюдается в присутствии сахарозы. Биосинтез протеаз происходит как при органических, так и при неорганических источниках азота. Наибольшая активность протеаз наблюдалась на среде с пептоном и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

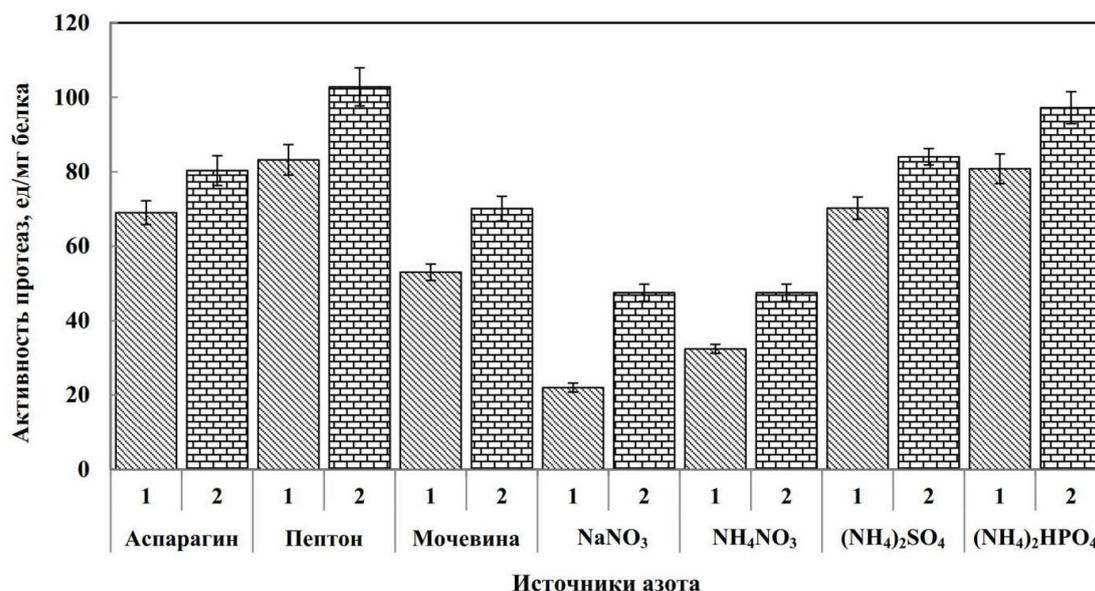


Рис. 4. Влияние источников азота на биосинтез кислых протеаз у *Aspergillus flavus* BDU-44: 1-протеаза pH 2.5; 2-протеаза pH 5.5

Литература

- Ali, S., Muhammad, Y. (2015). Industrial application of microbial proteases. *European Jour. Pharmaceutical and Medical Research*, 4(6), 623-629.
- Chandrasekuran, S., Kumersan, S., Manavalan, M. (2015). Production and optimization of protease by filamentous fungus isolated from Paddy soil in Thiravaruz district Tamilnatu. *Jour.Applid Biology and Biotechnology*, 3(6), 66-69.
- Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., Srinivasulu, B. (2002). Opyimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated. *Aspergillus sp.* *Process Biochem.*, 38, 615-620.
- Ganbarov, K.G., Safarova, A.K., Shafieva, S.M. (2018). Proteolytic activity of fungi of the genus *Aspergillus* isolated from soils of Azerbaijan. *Bulletin of the Ufa Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 3(1), 80-84.
- Gracheva, I.M., Grachev, Y.M., & Mosichev, M.S. (1982). *Laboratory Practicum in Enzyme Preparations Technology*. Light Food Industry, Moscow, 57-62.
- Hag, I., Mukhtar, H., Ali, Z., Riaz, N. (2004). Protease biosynthesis by mutant strain of *Penicillium griseoroseum* and chees formation. *Pakistan Jour. Biological Sciences*, 7(9), 1473-1476.
- Hag, I., Mukhtar, H., Umber, H. (2006). Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. *Jour. Agricul. Social.Sciences*, 2(1), 23-25.
- Karthie, J., Saraj, Y., Naveen, M., Pramod, T., Siddalingshwara, K. (2014). Characterization of *Aspergillus oryzae* protease through submerged fermentation. *Intern. Jour. Curr. Microbial. Appl. Sci.*, 3(5), 1023-1028.
- Kumar, N., Devi, S., Nair, A. (2016). A review on microbial proteases. *Intern. Jour. Advanced Research*, 4(7), 2048-2053.
- Milala, M., Jatau, I., Abdulrahman, A. (2016). Production and optimization of protease from *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis* using response surface methodology. *IOSR Jour. Biotech. Biochemistry*, 2(7), 01-07.
- Muthulakshmi, C., Gomathi, D., Kumar, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Uma, Ch. (2011). Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under

- solid state fermentation. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(3), 137-148.
- Paranthaman, R., Alagusundaram, K., Indhumethi, J. (2009). Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger*. *World Jour. Agr. Scien.*, 5(3), 308-312.
- Plakhinsky, N.A. *Biometrics*. Moscow, 1998, 150.
- Safarova, A.X., Shafiyeva, SM, Agayeva, N.A. Ganbarov, X.Q. (2018). Proteolytic activity of genus fungi *Penicillium*. *Scientific work of the Institute of Microbiology of ANAS*, 16(1), 48-53.
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P. (2016). Microbial Proteases in commercial Application. *Jour. Pharmaceut. Chemical and Biological Sciences*, 4(3), 365-374.
- Whitaker, J., Granum, P. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Analytical Biochemistry*, 109, 156-159.
- Yin, L., Chou, Yu., Jiang, Sh. (2013). Purification and characterization of acidic protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118. *Journal of Marine Science and Technology*, 21(1), 105-110.