

ХАРАКТЕРИСТИКА ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КИСЛОЙ ПРОТЕАЗЫ ГРИБА ASPERGILLUS FLAVUS BDU-44

Сафарова Айтен Ханлар кызы

Докторант, Университет Одлар Юрду
ayten.84.safarova@gmail.com

Ганбаров Худаверди Ганбар оглы

Д.б.н., профессор, Бакинский Государственный
Университет
khuda1949@mail.ru

CHARACTERISTICS OF A PARTIALLY PURIFIED ACID PROTEASE OF THE ASPERGILLUS FLAVUS BDU-44

**Safarova Ayten Khanlar
Ganbarov Khudaverdi Ganbar**

Summary. A crude enzyme preparation was obtained from the *Aspergillus flavus* BDU-44 by precipitation with acetone, ethanol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. In all cases, the activity of acidic protease (pH 5.5) was 1.4–1.5 times higher than the activity of neutral and alkaline proteases. Studied the properties of acidic protease. It has been shown that the maximum activity of the acidic protease of the *Aspergillus flavus* BDU-44 is manifested at 60°C and the enzyme retains its activity at 50–60°C for 3 hours. The optimum acidity of the medium for the manifestation of the maximum activity of the enzyme is pH 4.5, and the greatest stability of the enzyme is observed at pH 4.0–5.0.

Keywords: *Aspergillus flavus*, acid protease, temperature and pH optima, thermal and acid resistance.

Аннотация. Из культуральной жидкости *Aspergillus flavus* BDU-44 был получен сырой ферментный препарат путем осаждения с ацетоном, этанолом и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Во всех случаях активность кислой протеазы (pH 5.5) была в 1.4–1.5 раза больше активности нейтральной и щелочной протеаз. Были изучены свойства кислой протеазы. Показано, что максимальная активность кислой протеазы гриба *Aspergillus flavus* BDU-44 проявляется при 60°C и сохраняет свою активность при 50–60°C в течение 3 часов. Оптимальная кислотность среды для проявления максимальной активности фермента является pH 4.5, а наибольшая устойчивость фермента наблюдается при pH 4.0–5.0.

Ключевые слова: *Aspergillus flavus*, кислая протеаза, температурный и pH оптимумы, термоустойчивость и кислотоустойчивость.

Введение

В настоящее время протеолитические ферменты широко применяются в различных отраслях народного хозяйства. Они используются как пищевая добавка для размягчения мяса и получения гидролизатов отходов мясной промышленности (5), как компонент моющих средств для устранения загрязнений белковой природы (16), в качестве компонентов лекарств для предотвращения образования нежелательных белков (10). В этих целях протеазы по-

лучают из микроорганизмов, в частности, грибов рода *Aspergillus*. Протеолитические ферменты изучались, главным образом у *Aspergillus awamori* (15), *A. flavus* (14), *A. fumigatus* (22), *A. nidulans* (6), *A. niger* (8), *A. ochraceus* и *A. terreus* (7; 17).

Ключевым технологическим этапом получения ферментов, в том числе протеаз является их очистка. В практических целях используются как очищенные (индивидуальные), так и частично очищенные (сырые) протеазы (12; 13; 19).

Таблица 1. Активность протеаз гриба *Aspergillus flavus* BDU-44 до и после осаждения из культуральной жидкости

Протеазы	Активность, ед/мг белка			
	До осаждения	После осаждения		
		Ацетоном	Этанолом	C (NH ₄) ₂ SO ₄
Кислая pH 2.5	54 ± 1,2	98 ± 4,2	38 ± 1,6	122 ± 8,2
Кислая pH 5.5	86 ± 3,3	136 ± 5,6	68 ± 2,0	198 ± 9,4
Нейтральная pH 7.2	43 ± 2,1	68 ± 3,2	38 ± 1,5	78 ± 3,3
Щелочная pH 9.5	56 ± 2,4	96 ± 4,3	52 ± 1,1	103 ± 4,5

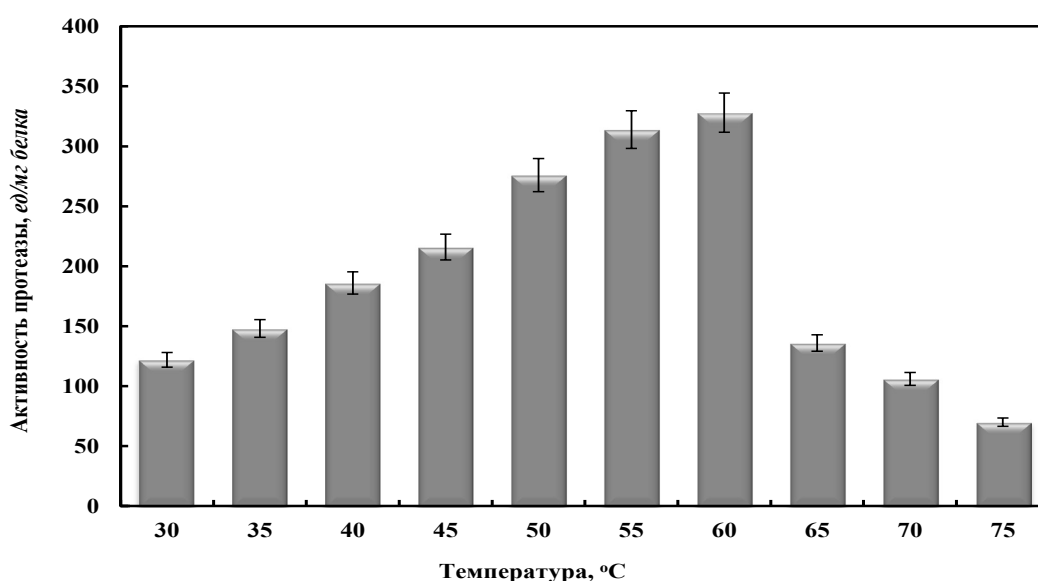


Рис. 1. Влияние температуры на активность кислой протеазы pH5.5

В предыдущих работах нами исследована протеолитическая активность грибов рода *Aspergillus* (1) и изучено условие биосинтеза протеаз у гриба *A. flavus* BDU-44 (4).

Настоящая работа посвящена к изучению характеристики частично очищенной внеклеточной кислой протеазы, полученный из гриба *Aspergillus flavus* BDU-44.

Материалы
и методы

Для получения внеклеточных протеаз гриб *Aspergillus flavus* BDU-44 выращивали на жидкой среде следующего состава (%): сахароза- 3; пептон-0,5; NaCl-0,2; MgSO₄-0,5; KH₂PO₄-0,05 и инкубировали при

30°C в течении 48 часов. Затем биомассу отделяли фильтрованием, а культуральную жидкость центрифугировали при 10000 об/30 мин и надосадочную жидкость (фильтрат) использовали как ферментный раствор.

Частичную очистку (от углеводов и других смесей небелковой природы) протеаз осуществляли путём осаждения из культуральной жидкости. Использовали как органические (ацетон и этанол), так и неорганический ((NH₄)₂SO₄) осадители. Фильтрат (ферментный раствор) смешивали с ацетоном в соотношении 1:3 (v/v) с этанолом в соотношении 1:2 (v/v) и с 90%-ным раствором (NH₄)₂SO₄ в соотношении 1:1 (v/v) при температуре осадителей не более 8°C. Осадок отделяли центрифугированием при 10000 об/30 мин, высушивали при 40–42°C и использовали в качестве ферментного препарата. Препарат растворяли в 0,05 М цитратном буфере

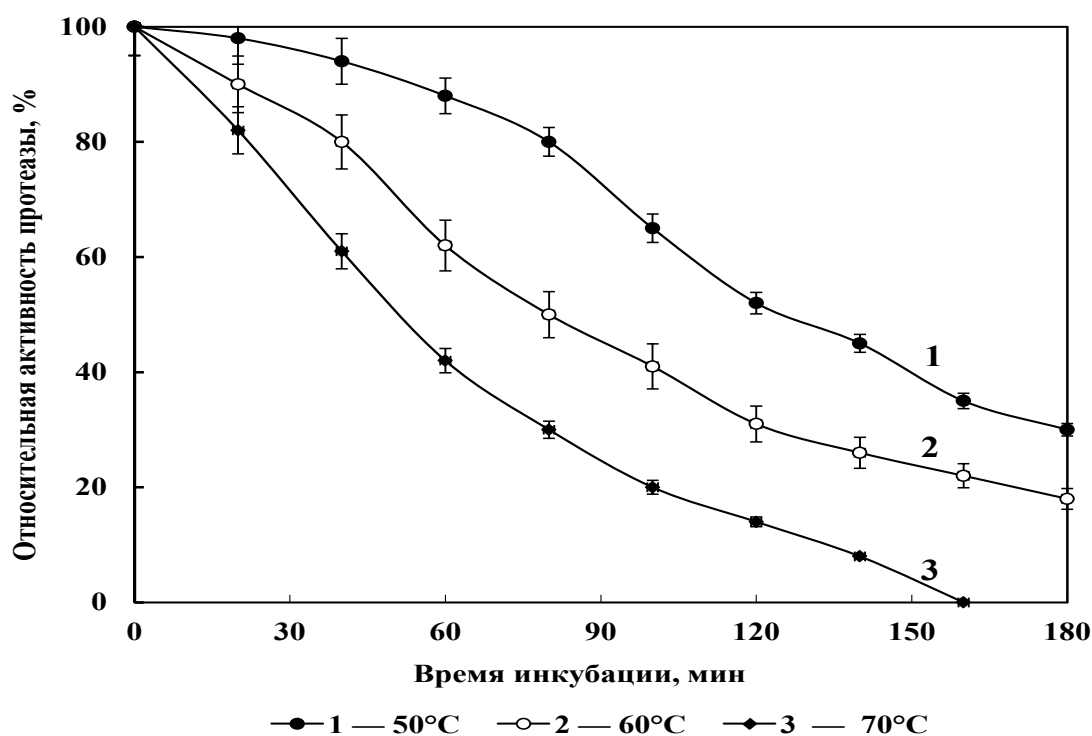


Рис. 2. Термостойкость кислой протеазы

(pH 2,5 и 5,5) и в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,2 и 9,5) содержащем 0,1 М NaCl.

Активность протеаз определяли спектрофотометрически по методу Ансона в модификации (2). В качестве субстрата фермента использовали 2% раствор казеината натрия. Ферментный раствор (1мл) помещали в водяной термостат при 37°C на 10–15 мин. Затем добавляли 1мл раствора субстрата (1%) перемешивали и инкубировали при 30°C на 1 мин. Реакцию останавливали добавлением равного объема 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУК). Контрольный опыт готовили также, только перед внесением раствора субстрата к реакционной смеси добавляли 10%-ный раствор ТХУК. Растворы фильтровали и в фильтрате спектрофотометрически определяли количество неосажденных ТХУК кислотой продукта реакции (тирозина).

За единицу активности принимали такое количество фермента, которое за 1 мин при 37°C превращает казеинат натрия в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние в количестве (0,181мг), соответствующий 1мкмоль тирозина (продукта реакции) и выражали в мкмоль/мин/ мг белка (ед/мг белка).

Содержание белка в культуральной жидкости и растворе фермента определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм (23).

Все опыты проводились в 4-х повторениях и статистически обработаны (3).

Результаты и обсуждение

Для получения частично очищенной протеазы культуральную жидкость гриба *Aspergillus flavus* BDU-44 осаждали различными осадителями и измеряли активность кислых (pH 2.5 и pH 5.5), нейтральной (pH 7.2) и щелочной (pH 9.5) протеаз. Полученные данные представлены в табл. 1. Показано, что активность кислой протеазы pH 5.5 в культуральной жидкости было в 1.6; 2.0 и 1.4 раза больше, соответственно, активности кислой (pH 2.5), нейтральной (pH 7.2) и щелочной (pH 9.5) протеаз.

После осаждения протеаз из культуральной жидкости гриба *A. flavus* BDU-44 ацетоном, активность кислых протеаз pH 2.5 и pH 5.5 увеличилась, в 1.8 и 1.6 раза, а активность нейтральной и щелочной протеаз в 1.5 и 1.7 раза, соответственно.

Осаждение с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ приводило к увеличению активности кислых протеаз в 2.3 раза, а нейтральной и щелочной протеаз в 1.8 раза. Однако, осаждение с этанолом приводило к снижению активности всех протеаз в 1.1–1.4 раза. Следовательно, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ является лучшим осадителем протеаз из культуральной жидкости гриба *Aspergillus flavus* BDU-44.

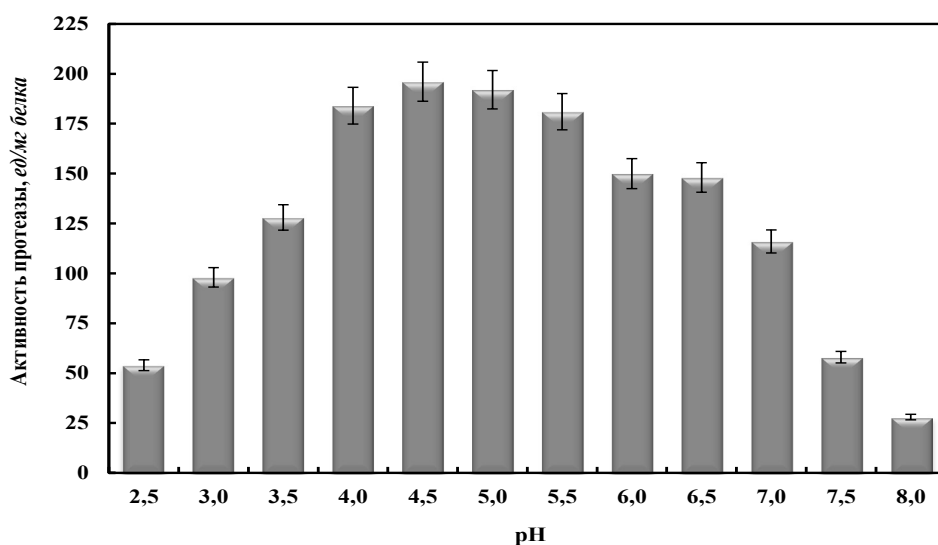


Рис. 3. Влияние кислотности (pH) среды на активность кислой протеазы

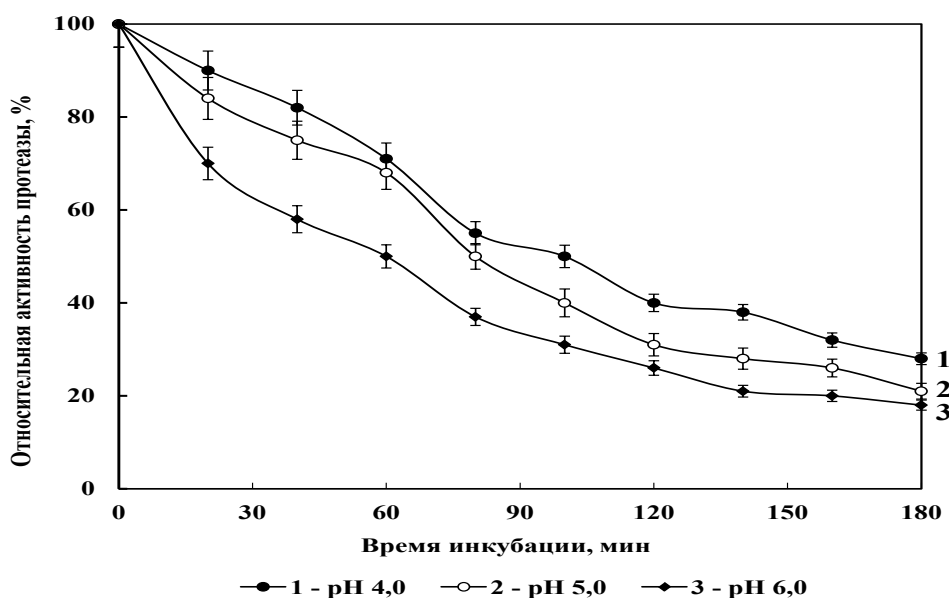


Рис. 4. pH стабильность кислой протеазы

Следует отметить, что во всех случаях активность кислой протеазы pH5.5 была в 1.4–1.5 раза больше активности нейтральной и щелочной протеаз. Поэтому в дальнейших исследованиях изучали свойства кислой протеазы pH5.5.

Изучение влияния температуры на активность кислой протеазы показало, что по мере увеличения температуры до 60°C активность фермента постепенно увеличивается и достигает максимума, после чего наблюдается резкое понижение активности. Высокая ак-

тивность фермента наблюдалась в диапазоне температур 50–60°C, а максимум активности — при 60°C (Рис. 1).

Термоустойчивость фермента изучалась при 50, 60 и 70°C. При 50°C в течение 1 часа активность фермента существенно не изменилась и понижение активности составляло 12%. Тогда как, при 60 и 70°C уменьшение активности составляло 38 и 58%, соответственно. Через 3 часа инкубации при 50 и 60°C сохранилась 30 и 18% активности фермента, соответственно, а при 70°C активность фермента полностью подавлялась (Рис. 2).

Следует отметить, что подобные исследования проводились с кислой протеазой, полученной из различных видов рода *Aspergillus*, у которых оптимальная температура активности фермента была ниже показателей кислой протеазы гриба *Aspergillus flavus* BDU-44. Например, у кислой протеазы гриба *Aspergillus oryzae* MTCC5341 максимальная активность наблюдалась при 45°C, а стабильность сохранялась при 40–55°C (11; 21). Оптимальная температура активности кислой протеазы гриба *A. hennebergii* HX08 была 50°C. Фермент был стабилен в диапазоне температур 30–50°C (9). Кислая протеаза из гриба *A. niger* BCRC32720 сохраняла свою термостабильность при 20–40°C (24), а из грибов *A. niger* 11- при 30–40°C (14), и *A. clavatus*- при 45–55°C (20).

Изучение влияния кислотности среды на активность кислой протеазы гриба *Aspergillus flavus* BDU-44 показало, что высокая активность фермента проявляется в диапазоне pH 4.0–5.5, а максимальная активность — при pH 4.5 (Рис. 3). По мере уменьшения кислотности среды активность фермента постепенно снижается

и при pH 8,0 активность уменьшается в 7 раз, по сравнению с оптимальной (pH4.5).

Наибольшая устойчивость фермента наблюдалась при pH 4.0–5.0. Так, после 3 часов инкубации фермента при pH 4.0; 5.0 и 6.0 активность протеазы понизилась в 3.4; 4.8 и 5.6 раз, соответственно (Рис. 4). Полученные нами данные по оптимальной кислотности и pH стабильности кислой протеазы совпадают с данными кислой протеазы гриба *Aspergillus hennebergii* HX08(9). Однако, кислые протеазы некоторых грибов, например, гриба *A. niger* 11, *A. oryzae* MTCC 5341 (21) и *A. niger* BCRC3372 (24) имели оптимум активности в более кислых условиях (pH 2.5–4.0).

Таким образом, показано, что максимальная активность кислой протеазы гриба *Aspergillus flavus* BDU-44 проявляется при 60°C и фермент сохраняет свою активность при 50–60°C в течение 3 часов. Оптимальная кислотность среды для проявления максимальной активности фермента является pH4.5. Наибольшая устойчивость фермента наблюдается при pH 4.0–5.0.

ЛИТЕРАТУРА

- Calkins C., Sullivan G. Adding enzymes to improve beef tenderness, Beef facts // Product Enhance, 2007, P.1–6. <http://www.beefresureh.org/bactsheetst.aspx>.
- Charles P., Devanathan V., Anbu P., Ponmaswamy M., Kalaichelvan P., Hur B. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* // Basic Microbiol, 2008, 48(5), P. 347–352.
- Chellapandii P. Production and preliminary characterization of alkaline protease from *Aspergillus flavus* and *A. terreus* // Eur. J. Chemistry, 2010, 7(2), P.479–482
- Gananadoss J., Robert R., Jebopriya G. Production of protease from *Aspergillus niger* and *Mucor mucedo* under submerged and solid state fermentation // Int.J. Curr. Res, 2011, 3(10), P. 75–78.
- Kalaskar V., Narayanan K., Subrahmanyam V., Rao V. Partial characterization and therapeutic application of protease from a fungal species // Indian Drugs, 2012, 49(10), P. 42–46
- Mukhtaz H., Haq L. Production of acid protease by *Aspergillus niger* using solid state fermentation // Pakistan J. Zool, 2009, 41(4), P. 253–260.
- Watson D., Feng X., Askew D., Jambunathan K., Kodakala K., Golande A. Specificity profiling of the *Aspergillus fumigatus* proteolytic secretome reveals consensus motifs // PLoS one, 2011, 6(6), P. 1–5.
- Withakker F.R., Granum P.E., An absolute method for protein determination based on differences in absorbance at 235 and 260 nm // Analytical Biochemistry, 1980, 109, P. 156–159.
- Плохинский И.А. Биометрия. Москва. 1998. 150 с.
- Ганбаров Х.Г., Сафарова А.Х., Шафиева С.М. Протеолитическая активность грибов рода *Aspergillus*, выделенных из почв Азербайджана // Известия Уфимского научного центра РАН, 2018, 3(1), С. 80–84
- Дудка И.А., Васеев С.П., Элланская И.А., Ковал Е.З. и др. Методы экспериментальной микологии. Киев: Науково Думка, 1982, 550с
- Сафарова А.Х. Условия биосинтеза кистых протеаз у *Aspergillus flavus* // Advances in Biology and Earth sciences, 2020, 5(2), P.160–166.
- Munawar T., Swamy A., Varadacharyulu N. Production, purification and characterization of alkaline protease from *Aspergillus niger* by using agroindustrial wastes under solid state fermentation // Int.J. Adv.Res, 2014, 2(5), P. 931–938.
- Muthalakshimi C, Gomathi D, Kumar D, Ravikumar G, Kalaiselvi M, Uma C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation // Jourdan J. Biol.Sci, 2011, vol.4, n3, P. 137–148
- Negi S., Gupta S., Banerjee R. Extraction and purification of glucoamylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single-stage aeration // Food Technol.Biotechnol, 2011, 49(1), P. 310–315
- Niyonzima F., More S. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* // Jour. Biotech, 2014. doi:10.1007/s13205-014-0200-6
- Osman M.E., Khatib O., Elsaba J. *Aspergillus terreus* proteases characterization and applications // Jour. Chem. Bio. Rhy. Sci. B. Biological Sci., 2014, 4(3), P. 2333–2346
- Rebecca L., Sharmila S., Das M., Samuel F. Production and analysis of protease from *Aspergillus niger* using fish scales as substrate // Jour. Chem. Pharm. Res., 2012, 4(10), P. 4597–4600

19. Vishwanatha K., Appu Rao A., Annapurina Singh S. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC5341 // *Food Chemistry*, 2009, 114, P. 402–407.
20. Huang Y., Wang Y., Xu Y. Purification and characterization of an acid protease from the *Aspergillus henebergii* HX08 and its potential in traditional fermentation // *Jour. Inst. Brew.*, 2017, 123, P. 432–441.
21. Lee S., Hüang J., Seung M. Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt tolerant acid protease isolated from soybean paste // *Food Sci. Technol.*, 2010, 19, P. 327–334.
22. Yin L., Hsu T., Jiang S. Characterization of acidic protease from *Aspergillus niger* BCRC32720 // *Jour. Agric. Chem.*, 2013, 61, P. 662–666.
23. Si K., Joo Y., Seung H., Sang M. Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK101 salt-tolerant acid-protease isolated from soybean paste // *Food Sci. Biotechnol.*, 2010, 19(2), P. 327–334.
24. Talita A., Sampaio S., Adriana K. Purification and some properties of an extracellular acid protease from *Aspergillus clavatus* // *World Jour. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 27, P. 2491–2497.

© Сафарова Айтэн Ханлар кызы (ayten.84.safarova@gmail.com), Ганбаров Худаверди Ганбар оглы (khuda1949@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Бакинский государственный университет