

РОЛЬ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ В БИОСИНТЕЗЕ КОМПЛЕКСА ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ МИКРОМИЦЕТОМ *ASPERGILLUS ORYZAE* ШТАММ 55**Володина Елена Владимировна**

магистрант 1 курса обучения, Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, РФ, г. Санкт-Петербург

Топкова Оксана Владимировна

научный руководитель, канд. биол. наук, доц., Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, РФ, Санкт-Петербург

Пищеварение – это единая цепь процессов, которые осуществляются благодаря тесным взаимосвязям между деятельностью различных отделов пищеварительного тракта. При нарушении деятельности одного из отделов происходит нарушение функций и других отделов пищеварительной системы. Важную роль в пищеварении играют ферменты-гидролазы, каждый из которых имеет свое назначение. Так, протеазы участвуют в расщеплении белков до аминокислот, амилазы расщепляют поли- и олигосахариды до моносахаридов (глюкоза), липазы – жиры и липиды до моноглицеридов и жирных кислот. Одной из главных причин желудочно-кишечных заболеваний является дефицит вышеуказанных ферментов в организме человека. Например, на сегодняшний день не всегда удается подобрать правильную заместительную ферментную терапию больным с тяжелыми формами панкреатической недостаточности.

Важной нерешенной проблемой при создании лечебных препаратов, содержащих протеолитические ферменты, является тот факт, что большинство известных протеаз не устойчивы в кислой области, то есть при попадании в желудок они теряют свою активность. Этого недостатка лишена кислая протеаза – фермент, максимальная стабильность и каталитическая активность которого достигается именно в кислой среде при pH 2,0–5,0. Таким образом, этот фермент не только не разрушается в кислой среде желудка, а наоборот, максимально реализует свою биокаталитическую активность. К настоящему времени кислые протеазы уже используются в качестве активных компонентов во многих ферментных лекарственных препаратах [2; 3].

Способность к синтезу кислой протеазы обнаружена у некоторых бактерий и микромицетов. Например, перспективным продуцентом протеаз (кислых и нейтральных), а также α -амилазы и липазы является мицелиальный гриб *Aspergillus oryzae*, что открыло путь к их биотехнологическому получению.

Целью настоящей работы является изучение влияния азотсодержащих компонентов питательной среды на биосинтез кислой протеазы при глубинном культивировании гриба *Aspergillus oryzae* штамм 55.

Экспериментальная часть

Объектом исследования является микромицет *Aspergillus oryzae* штамм 55.

В экспериментах в качестве контрольной питательной среды (ПС) для культивирования гриба *Aspergillus oryzae* шт. 55 использовалась ПС следующего состава: глюкоза – 3%, крахмал – 3%, кукурузный экстракт – 3%, соевая мука – 2%, аммоний серноокислый – 0,2%, кальция карбонат – 0,3%, pH среды до стерилизации – 6,7–7,0. ПС разливали по 100 мл в колбы Эрленмейера

(объемом 750 мл) и стерилизовали в автоклаве в течение 40 минут при 1,8 атм.

Культивирование продуцента с целью биосинтеза комплекса ферментов проводили на качалочной машине ($200\text{--}220\text{ мин}^{-1}$) при температуре $27\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 72 часов.

Содержание кислой и нейтральной протеаз по окончании процесса ферментации определяли модифицированным методом Ансона, с использованием в качестве субстрата гемоглобина для кислой протеазы и 1% раствора казеина для нейтральных протеаз, для определения α -амилазы использовали методики согласно ГОСТ Р 54330-2011. Оптическую плотность растворов определяли с помощью спектрофотометра (ПЭ – 5400ви) [1].

Для изучения влияния различных источников азотного питания в составе питательной среды на биосинтез ферментов кислой протеазы и α -амилазы была произведена замена соевой муки на ее гидролизаты, а также вводили в исходную ПС мочевины в концентрациях 0,1%, 0,5% и 1,0% и такие минеральные источники азота, как нитрат натрия, нитрат аммония, гидрофосфат аммония и дигидрофосфат аммония в концентрациях 0,1%, 0,5% и 1,0%.

Результаты и их обсуждение

Известно, что повышения уровня биосинтеза ферментов можно достичь не только традиционными методами селекции или активно развивающимися в последние годы методами генетической инженерии микроорганизмов-продуцентов, но и за счет разнообразных способов получения посевного материала для глубинного культивирования, подбора состава питательных сред и продолжительности культивирования.

Важными компонентами питательных сред являются азот и углерод. Азот является одним из важнейших компонентов питания, поскольку необходим для биосинтеза белков и нуклеиновых кислот микробной клеткой. Для выбора условий культивирования необходимо также оптимизировать соотношение азота и углерода в составе питательных сред с тем, чтобы предотвратить снижение биосинтеза целевого продукта. При глубинном культивировании мицелиальных грибов источниками азота в питательной среде могут быть азот органических соединений и минеральные соли: соли азотной кислоты и аммонийные соли. В качестве органических источников азота применяются соевая мука, гидролизаты дрожжей и различные белки: казеин, желатин, бычий сывороточный альбумин и другие. Ранее было показано, что стимулирующий эффект на биосинтез протеаз может достигаться при введении в состав среды белков или продуктов их частичного гидролиза.

Полученные нами результаты показали, что замена соевой муки на ее гидролизаты не привела к увеличению биосинтеза кислой протеазы по сравнению с контрольными значениями, в то же время синтез α -амилазы снижается примерно в пять раз. Таким образом, можно сделать вывод, что гидролизаты соевой муки не оказывают стимулирующего действия на синтез комплекса ферментов грибом *Aspergillus oryzae* шт. 55, поэтому представляет интерес исследование воздействия гидролизатов других белковых веществ.

Внесение в питательную среду нитрата натрия в концентрациях 0,1%, 0,5%; нитрата аммония в концентрациях от 0,1% до 1% и мочевины в концентрации 0,1% также не способствовало биосинтезу комплекса ферментов. Кроме того, использование мочевины в качестве источника азота в концентрациях 0,5% и 1% ингибировало рост культуры.

Следует отметить, что нитрат натрия в концентрации 1,0% оказал стимулирующий эффект на биосинтез α -амилазы, увеличив активность фермента на $10\pm 5\%$, однако негативно влиял на биосинтез кислой протеазы (активность кислой протеазы снизилась на $30\pm 5\%$).

Введение в состав питательных сред минеральных солей гидрофосфатов аммония в концентрации 0,5% и 1% сопровождалось увеличением синтеза кислой протеазы на $20\pm 5\%$ и $90\pm 5\%$ соответственно. Биосинтез α -амилазы в этих вариантах увеличивался на $87\pm 5\%$ при содержании $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в ПС 0,5% и оставался на уровне контроля при наличии в ПС 1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Соль дигидрофосфат аммония в концентрации 0,5% способствовала увеличению активности кислой протеазы на $75\pm 5\%$ по сравнению с контрольными условиями, но при этом активность α -амилазы резко снизилась.

Вывод

- Наличие в среде культивирования солей гидрофосфата аммония в концентрации 0,5% и 1% и дигидрофосфата аммония в концентрации 0,5% увеличило ферментативную активность кислой протеазы на 20 ± 5 , 90 ± 5 и $75\pm 5\%$ соответственно. При этом наличие в среде соли гидрофосфата аммония в концентрации 0,5% способствует увеличению активности α -амилазы на $85\pm 5\%$. Увеличение содержания гидрофосфата аммония до 1% и дигидрофосфата аммония в концентрации 0,5% снижают биосинтез кислой протеазы. Другие источники азота: гидролизаты соевой муки, мочевины, нитрат натрия и нитрат аммония, – не способствовали биосинтезу комплекса ферментов грибом *Aspergillus oryzae* шт.55.
- Внесение солей дигидрофосфатов аммония в концентрации 0,5 и 1% и гидрофосфатов в концентрации 0,5% в составе среды культивирования с пониженным содержанием соевой муки увеличивает ферментативную активность кислой протеазы на $17\pm 5\%$, $42\pm 5\%$ и $20\pm 5\%$ соответственно, однако, биосинтез α -амилазы при этом резко снижается.

Список литературы:

1. Биссвангер Х. Практическая энзимология. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. 328 с.
2. Грачева И.М., А.Ю. Кривова. Технология ферментных препаратов. – М.: Элевар, 2010. 512 с.
3. Кучма И. Ю. Ферментные препараты в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта // Провизор. 2009. Вып. 7. Режим доступа к журн. URL: http://www.provisor.com.ua/archive/2009/N07/fplsgk_079.php?part_code=62&art_code=7148.
4. Способ получения комплекса амилалитических и протеолитических ферментов: пат. 2054479 Российская Федерация: МПК С12N9/14, С12N9/30, С12N9/58 / Е.М. Дембровская, О.С. Кузнецова, Е.П. Яковлева, О.Ф. Лукницкая, И.А. Зобнина, А.А. Селезнева, Н.Г.Артемьева, О.С. Синявина; Всесоюзный научно-исследовательский технологический институт антибиотиков и ферментов медицинского назначения. – № 93007647/13 заявл. 08.02.1993, опубл. 20.02.1996.