

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ АЗОТА НА ОБРАЗОВАНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ГРИБА *ARTHROBOTRYS COMPACTA**

Аннотация. Приведены данные, характеризующие влияние различных источников азота на накопление биомассы и синтеза протеолитических ферментов (ПА) грибом *A. compacta*. Наиболее высокая ПА получена на среде, содержащей азотно-кислый калий как источник минерального азота. Отмечено увеличение ферментативной активности при добавлении в среду пептона, казеина и гидролизата казеина. При исследовании влияния аминокислот показано, что наибольшую репрессию синтеза протеолитических ферментов вызывают триптофан, орнитин и гистидин.

Ключевые слова: гриб, протеолитические ферменты, источники азота.

Биосинтез протеолитических ферментов микроорганизмами во многом зависит от условий культивирования, в том числе от источников питания. Одним из важнейших компонентов питательной среды являются азотсодержащие соединения. В качестве минеральных источников азота могут быть использованы как нитраты, так и аммонийные соли [1;2;3;4]. Белки и продукты их гидролиза также являются не только органическими источниками азота, но и оказывают стимулирующий или ингибирующий эффект на синтез протеаз [5;6].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния источников азота на рост культуры *A. compacta* и биосинтез протеолитических ферментов.

Исследуемую культуру гриба *A. compacta* выращивали в стационарных условиях в колбах Эрленмейера с объемом среды 50 мл. Температура культивирования 25-28° С. В качестве питательной среды использовали составленную нами среду следующего состава (г/л): сахароза – 20, глицерин – 10 мл, молочная кислота – 0,5 мл, лактат Na – 0,35 мл. Культуральную жидкость отделяли фильтрованием, под вакуумом, через плотный фильтр. Количество биомассы определяли весовым методом, рН культуральной жидкости – потенциометрически. Фибринолитическую активность определяли по методу Аструпа и Мюллерца, казеинолитическую активность – по методу Сгоуриса [7].

В качестве источников азота были использованы как минеральные, так и органические формы азота. Как видно из табл. 1, биосинтез протеаз имел место на всех испытанных источниках минерального азота. Однако уровень образования ферментов был неодинаков: на средах, где единственным источником азота являлся нитрат калия – наблюдался значительный рост культур и высокая ферментативная активность. Среда с нитратом и нитритом натрия, кальция, аммония, аммонийными солями серной и фосфорной кислот в большинстве случаев тормозили синтез протеаз хищных грибов.

* © Намазов Н.Р., Касумова С.Ю., Гасанов Х.А., Мурадов П.З.

Таблица 1

Влияние минеральных источников азота ферментативную активность *A. compacta*

Источники азота 0,1%	Биомасса мг/100 мл	рН среды	Ферментативная активность	
			фибрин. усл.ед/мл	казеин.(КЕ)
Na NO ₃	390	6,0	650	2
Ca (NO ₃) ₂	300	6,2	420	1
KNO ₃	400	6,0	740	1
Na NO ₂	180	5,5	98	2
NH ₄ Cl	400	4,9	205	3
(NH ₄) ₂ SO ₄	314	4,8	170	2
NH ₄ NO ₃	430	5,8	490	5
(NH ₄) ₃ PO ₄	280	5,6	215	3

Поскольку азотнокислый калий способствовал наибольшему выходу ферментов, при подготовке опытов этот источник был принят в качестве контроля.

Изучение влияния различных концентраций (от 0,1 до 0,6%) азотнокислого калия на энзиматическую активность показало, что наиболее эффективным является 0,2% содержание его в среде.

Увеличение содержания азотнокислого калия до 0,6% приводит к незначительному повышению накопления биомассы и увеличению активности ферментов фибринолитического действия, тогда как казеинолитическая активность остается незначительной во всех вариантах. Дальнейшее повышение концентрации снижало ферментативную активность и вело к накоплению азота в среде.

Нами была предпринята попытка интенсифицировать синтез ферментов органическими формами азота: казеином, гидролизатом казеина, желатиной, гемоглобином, пептоном, аминокислотами.

Введение в среду указанных органических соединений азота всегда сопровождалось увеличением роста грибов; усиление протеолитической активности получено только в случае введения в среду пептона, казеина, гидролизата казеина (табл. 2). Повышение ферментативной активности, отмеченное при культивировании *A. compacta* на среде с пептоном, сохранялось при концентрации его до 0,3%. Дальнейшее увеличение концентрации ведет к снижению энзиматической активности. Частичное повышение казеинолитической активности в опыте с внесением казеина и гидролизата казеина, что особенно проявляется на ранних этапах культивирования, связано, по-видимому, с индуцируемым характером фермента.

Таблица 2

Влияние органических источников азота на ферментативную активность *A. compacta*

Источники азота 0,1%	рН культ. жидкости	Биомасса мг/100 мл	Фибрин. акт. усл. ед/мл	Казеин. акт.
пептон	5,8	620	1800	4
желатин	5,2	680	320	2
казеин	6,0	590	430	8
гидролизат каз.	5,6	620	520	6
гемоглобин	5,7	600	220	2
фибриноген	6,2	720	570	3
контроль	5,9	–	1200	1

Добавление в среду фибриногена не оказало влияния на фибринолитическую активность.

Известно, что влияние белкового субстрата на синтез протеаз связано с метаболической репрессией [9].

В связи с этим представлял интерес изучение влияния отдельных аминокислот на ферментативную активность изучаемых культур.

В результате исследований установлено, что отдельные аминокислоты, взятые в качестве единственных источников азота, в различной степени подавляют биосинтез экзопроtease (табл. 3).

Наиболее выраженным репрессивным эффектом обладали триптофан, орнитин, гистидин. Так, фибринолитическая активность на пятые сутки роста гриба составляла 200 усл. ед. мл в опыте с триптофаном и 340 усл. ед. мл – в среде с аргинином.

Таблица 3

Влияние аминокислот на образование протеолитических ферментов *A. compacta*

Аминокислоты, 10 мг.%	Биомасса мг/100 мл	Фибринолитическая активность, усл.ед.мл	Казеинолитическая активность
Аргинин	250	340	0,3
Аспарагин	320	820	0,9
Аланин	300	790	0,35
Аспартаг	180	450	0,7
Лизин	175	600	0,52
Валин	214	765	0,65
Глицин	225	245	0,82
Серин	233	750	0,98
Теонин	206	740	1,5
Лейцин	193	830	1,35
Пролин	187	430	0,2
Глутамин	370	635	0,78
Цистеин	170	218	1,9
Триптофан	150	200	2,8
Метионин	290	459	1,75
Орнитин	205	180	3,2
Гистидин	230	200	2,2
Фенилаланин	217	187	3,8
Контроль	450	900	2,0

Казеинолитическая активность в опытах с этими же аминокислотами составляла от 2,8 КЕ до 2 КЕ соответственно.

Цистин, серин, глицин и треонин в меньшей степени, но также снижали образование протеаз.

Аспарагин и глутаминовая кислота не проявляли репрессирующего действия на биосинтез протеолитических ферментов. Более того, аспарагин способствовал накоплению биомассы.

Следует отметить, что при наличии аминокислот в среде отсутствует ранний максимум ферментативной активности, что связано, вероятно, с отсутствием необходимости в подготовке субстрата. Степень репрессии увеличивается с повышением концентрации аминокислот в среде и снижает ферментативную активность на 30% при концентрации их в среде 30 мг/%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Егоров Н.С., Ландау Н.С. Влияние различных концентраций глицерина и источника азота на биосинтез фибринолитического вещества культурой *Aspergillus oryzae*.// Прикладная биохимия и микробиология, 1965. – Т. 1. – Вып. 5. – С. 487-491.
2. В.Д. Алиева, Л.А. Аравина. Влияние компонентов среды на биосинтез протеолитического фермента грибом *Aspergillus terricola*.// Прикладная биохимия и микробиология, 1973. – Т. IX. – Вып. 4. – С. 365-371.
3. Tremacoldi C. R., Carmona E. C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*.// World. J. Microbiol. and Biotechnol. – 2005. 21. – № 2. – С. 169-172.
4. Tremacoldi C. R., Carmona E. C., Watanabe N.K. Production of extracellular acid proteases by *Aspergillus clavatus*.// World. J. Microbiol. and Biotechnol. – 2004. 21. – № 6. – С. 639-642.
5. Попова Н.В. Влияние состава среды на протеолитическую активность *Aspergillus terricola*. Автореф. канд. дис. – М.: МТИПП, 1968.
6. Калунянц К.А., Стрельникова Л.И., Штейн И.В. Влияние источников углерода, азота, фосфора на синтез протеазы культурой *Bacillus subtilis*// Прикладная биохимия и микробиология, 1979. – Т. XV. – Вып. 1. – С. 57-61.
7. Ландау Н.С., Егоров Н.С. Изучение образования протеаз фибринолитическим действием у *Noctuidia species*, штамм 1. Микробиология, 1971. – Т. 40. – № 5. – С. 829-832.
8. Егоров Н.С. Изучение условий образования ряда антибиотиков и фибринолитических веществ. Автореф. канд. дис. – М.: МГУ, 1965.

P. Muradov, S. Gasimova, Ch. Gasanov

EFFECT OF SOURCES OF NITROGEN ON THE SYNTHESIS OF PROTEOLYTIC ENZYMES BY THE CULTURE *ARTHROBOTRYX COMPACTA*

Abstract. The paper gives on the influence of different sources of nitrogen on the accumulation of biomass and synthesis of proteolytic enzymes by the culture *Arthrobotryx . compacta*. The highest proteolytic activity was obtained on the medium contained kalium nitrate as a nitrogen source. The enzyme activity increased upon an addition of peptone, casein and hydrolyzate of casein. The study of the amino acid effect showed that tryptophan, ornithine and histidine oppressed the protease synthesis to the great extent.

Key words: fungi, proteolytic enzymes, sources of nitrogen.