

УДК 663.15

НОВЫЙ КОМПЛЕКСНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ С ПОВЫШЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗЫ

© 2023 г. Е. В. Костылева^{1, *}, А. С. Середа¹, И. А. Великорецкая¹,
Н. В. Цурикова¹, И. А. Шашков², Е. А. Рубцова², А. П. Сеницын^{2, 3}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии (ВНИИПБТ) – филиал ФГБУН “Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии”, Москва, 111033 Россия

²Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ekostyleva@list.ru

Поступила в редакцию 16.01.2023 г.

После доработки 15.02.2023 г.

Принята к публикации 20.02.2023 г.

С целью получения комплексного препарата протеолитического действия для производства белковых гидролизатов методами селекции и мутагенеза создан штамм *Aspergillus oryzae*-Co-28 с повышенной активностью лейцинаминопептидазы (LAP) при высокой активности сопутствующих эндопептидаз – оризина и аспергиллопепсина. Культивированием нового продуцента в лабораторных ферментерах на двух видах питательных сред получены концентрированные ферментные препараты (ФП) Протооризин-1 и Протооризин-2 с LAP-активностью около 1000 ед/г и разным уровнем ферментативной активности сопутствующих протеаз. Приведена сравнительная характеристика биохимических свойств и компонентного состава новых ФП с коммерческим препаратом Flavourzyme[®] 1000L (Novozymes, Дания). По лейцинаминопептидазной активности ФП, полученные на основе нового штамма, не уступали коммерческому препарату. Уровень активности сопутствующих эндопротеаз в новых препаратах многократно превышал соответствующие показатели ФП Flavourzyme[®] 1000L. Сбалансированный состав протеолитического комплекса ФП Протооризин позволил успешно заменить действие двух коммерческих препаратов: Alcalase[®] (Novozymes) и Flavourzyme[®] 1000L – при гидролизе соевого белка.

Ключевые слова: *Aspergillus oryzae*, мутагенез, ферментный препарат, лейцинаминопептидаза, соевый белок, гидролиз

DOI: 10.56304/S0234275823020060

Для применения в пищевой промышленности белковые гидролизаты должны соответствовать определенным требованиям и прежде всего обладать удовлетворительными органолептическими характеристиками и высокой питательной ценностью. Для получения таких гидролизатов белковые субстраты обрабатывают ферментными препаратами (ФП) сериновых протеаз, обеспечивающими быстрое расщепление различных животных и растительных белков до олигопептидов, в сочетании с ФП грибных экзопептидаз. Последние осуществляют более глубокий гидролиз и формируют требуемые органолептические, физико-хими-

ческие, а при необходимости и биоактивные свойства. Так, комбинированную обработку препаратом бактериальной сериновой протеазы – Alcalase[®] (Novozymes, Дания) – и ФП Flavourzyme[®] 1000L (Novozymes) в качестве источника грибных экзопептидаз успешно применяют при получении гидролизатов соевого, арахисового белка, рыбных отходов и др. [1–3]. Flavourzyme[®] 1000L – наиболее известный и широко используемый в пищевой промышленности препарат грибных пептидаз – показал высокую эффективность при получении гидролизатов из различных видов вторичного сырья птицеперерабатывающей промышленности [4], при обработке пшеничного глютена, люпина, рапса и т.д. [5]. ФП Flavourzyme[®] 1000L получают на основе мицелиального гриба *Aspergillus oryzae* (ATCC 42149/R1B 40, США). Протеолитический комплекс Flavourzyme[®] 1000L включает три эндо-

Список сокращений: КЖ – культуральная жидкость; ПА – протеолитическая активность; ФП – ферментный препарат; LAP (leucine aminopeptidase) – лейцинаминопептидаза; LAP-активность – лейцинаминопептидазная активность.

пептидазы: две нейтральные (NP1 и NP2) и сериновую протеазу оризин (ALP1), – две лейцинаминопептидазы (LAP1 и LAP2) и две дипептидилпептидазы (DPP4 и DPP5). Ключевой компонент Flavourzyme® 1000L – лейцинаминопептидазы (LAP; КФ 3.4.11.1), по активности которых дозируют препарат в технологических процессах. Около 90% лейцинаминопептидазной активности (LAP-активности) Flavourzyme® 1000L относится к LAP1 [5].

Известно, что некоторые штаммы *A. oryzae* (*A. oryzae* 107, *A. oryzae* 45-П1-15), синтезируют широкий спектр эндо- и экзопептидаз, в том числе проявляют LAP-активность [6, 7]. Однако LAP не рассматривается как целевой фермент и уровень ее активности недостаточен для получения препаратов экзопептидаз. Так, мицелиальный гриб *A. oryzae* 107 (ВКПМ F-929; ГНУ “Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии”, Россия), заявленный авторами штамма как продуцент активных в кислой и слабокислой области pH протеаз, синтезирует внеклеточную LAP [7, 8], но для получения ФП, сопоставимого по LAP-активности с препаратом Flavourzyme® 1000L, необходимо повысить способность этого штамма к продукции LAP.

Целью исследования было повышение уровня LAP-активности штамма *A. oryzae* 107 и получение на его основе ФП со сбалансированным компонентным составом, не уступающего мировым аналогам по эффективности при получении белковых гидролизатов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы

В работе использовали коммерческие ФП: Alcalase® и Flavourzyme® 1000L (Novozymes). Гидролизаты получали из изолята соевого белка с массовой долей белка 92% на сухое вещество (%Nx6.25), определенной методом Кьельдаля.

В качестве белков-маркеров использовали коммерческий набор с молекулярными массами в диапазоне 14.4–116 кДа (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве субстратов для определения активности ферментов использовали казеинат натрия, гемоглобин и *L*-лейцин-4-нитроанилид (Sigma, США).

Штамм микроорганизма

Объектом исследования был штамм *A. oryzae* 107 ВКПМ F-929 – продуцент кислых и слабокислых протеаз [8]. Для получения посевного материала использовали среду сусло–агар (%): солодовое сусло 7°Б – 98.0, агар-агар – 2.0, pH 6.2. Штамм выращивали на агаризованной среде в течение 7 сут при 30°С и 7 сут при 22°С. Споровый

посевной материал на агаризованной среде хранили при температуре 5°С не более 3 месяцев.

Условия селекции и мутагенеза

Для получения спорных суспензий споры смывали с агаризованной среды 0.1%-ным раствором Tween-80 и пропускали через стеклянный фильтр S2 ПОР100 (SIMAX, Чехия). Для ультрафиолетового (УФ) облучения использовали спорные суспензии с титром 10^3 клеток/см³. Гамма-облучению подвергали спорные суспензии с титром 10^6 клеток/см³. Титр устанавливали с использованием стерильной дистиллированной воды.

Мутагенез спор штамма *A. oryzae* 107 проводили, используя методы, разработанные ранее для штаммов рода *Aspergillus* [9]. УФ-облучение проводили в камере УФК-3 (“Касимовский приборный завод”, Россия) при длине волны 254 нм и мощности излучения 30 Вт. Для гамма-мутагенеза использовали установку камерного типа ГУТ-200М (НИЦ “Курчатовский институт”, Россия) с радиоактивным источником кобальт-60. Гамма-облучение проводили при 20–22°С в течение 6 ч.

При проведении селекции для рассева спор продуцента использовали среду Чапека следующего состава, %: NaNO₃ – 0.91, KCl – 0.05, MgSO₄·7H₂O – 0.05, KН₂РO₄ – 0.1, агар-агар – 2.0, – добавляя в качестве индукторов синтеза протеаз 1% желатина говяжьего пищевого, казеината натрия, обезжиренного сухого молока или мясного пептона (все препараты российских производителей). В качестве ограничителя роста добавляли Triton X-100 в конечной концентрации 0.1% к массе среды. Для рассева облученных спорных суспензий использовали среду Чапека с 1% казеината натрия к массе среды.

Глубинное культивирование в колбах

Продуцент выращивали на термостатируемых качалках (250 об./мин) при $31 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 120 ч в колбах объемом 750 см³ с 50 см³ ферментационной среды. В качестве исходной использовали следующую среду, %: ячменная мука – 3.0, пшеничные отруби – 3.0, KН₂РO₄ – 1.5, pH 5.7 ± 0.2 . Среды засеивали 2 см³ суспензии спорного посевного материала с титром 10^6 спор/см³. Биомассу культуры отделяли центрифугированием при 10750 g в течение 5 мин. Культуральную жидкость (КЖ) использовали для определения активности целевых ферментов.

Ферментация в лабораторных ферментерах и получение образца сухого ФП

Глубинное культивирование полученного в результате проведенных исследований мутантного

штамма *A. oryzae*-Co-28 проводили в лабораторных ферментерах КФ 104/3 (ООО “Проинтех”, Россия) с геометрическим объемом 3 л и рабочим объемом 1.35 л, оснащенных системами автоматического регулирования pH, pO_2 , температуры, барботерами для подачи воздуха и двухъярусной мешалкой. Инокуляты для засева ферментеров получали культивированием гриба в качалочных колбах (250 об./мин) при 30°C в течение 24 ч на средах, аналогичных ферментационным, но без пеногасителя. Доза засева ферментеров инокулятом – 10%. Ферментацию проводили в течение 120 ч на двух средах. Среда № 1, %: ячменная мука – 4, пшеничные отруби – 5, KH_2PO_4 – 1, пеногаситель Пропинол – 0.1, pH среды естественный – 5.0–6.5. Среда № 2, %: обезжиренная соевая мука – 1, пшеничные отруби – 5, KH_2PO_4 – 0.5, пеногаситель Пропинол – 0.1, водопроводная вода, pH среды естественный – 5.8–7.5. Ферментацию проводили при 30°C, при аэрации 1 объем воздуха на 1 объем среды в мин, поддерживая pO_2 выше 30% за счет скорости перемешивания.

Биомассу глубинной культуры отделяли центрифугированием на центрифуге Beckman Coulter J6-MI (Beckman, США) при 6500 об./мин в течение 30 мин. Супернатант КЖ высушивали с помощью лабораторной распылительной сушилки марки Mini Spray Dryer B-290 (Buchi Labortechnik AG, Швейцария).

Активность протеолитических ферментов

Активность протеаз определяли по методике, разработанной Sigma-Aldrich [10], с небольшими модификациями. Так, активность щелочной сериновой протеазы определяли при pH 10.0 и 37°C, используя в качестве субстрата казеинат натрия; общую протеолитическую активность – при pH 7.2 и 37°C с казеинатом натрия в качестве субстрата; активность кислой протеазы – при pH 4.7 и 37°C с гемоглобином в качестве субстрата.

За единицу протеолитической активности принимали количество фермента, которое за 1 мин при 37°C катализирует переход в не осаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние такого количества соответствующего субстрата, которое содержит 1 мкмоль тирозина.

LAP-активность определяли по методике, разработанной Sigma-Aldrich® и основанной на действии аминопептидазы на субстрат *L*-лейцин-4-нитроанилид (с высвобождением *n*-нитроанилина, окрашенного в желтый цвет) при температуре 37°C и pH 7.2. За единицу LAP-активности принимали такое количество фермента, которое гидролизует 1.0 ммоль *L*-лейцин-4-нитроанилида до *L*-лейцина и *n*-нитроанилина за 1 мин (<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/>

[documents/356/218/l6007enz.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/356/218/l6007enz.pdf)). Содержание растворимого белка определяли по методу Лоури.

В гидролизатах соевого изолята определяли содержание общего белка по методу Кьельдаля и выход свободных аминокислот нингидриновым методом. Результаты получали не менее чем в трех повторах.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофорез в денатурирующих условиях проводили в 12%-ном ПААГ в 25 мМ трис-глициновом буфере, pH 8.3, с 0.1% SDS на приборе Mini PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, США). Гель окрашивали Coomassie G-250 (Amresco, США). В качестве маркеров молекулярной массы использовали коммерческий набор (Thermo Fisher Scientific), в состав которого входят следующие белки: β -галактозидаза (116.0 кДа), бычий сывороточный альбумин (66.2 кДа), овальбумин (45.0 кДа), лактатдегидрогеназа (35.0 кДа), REase Bsp981 *Escherichia coli* (25.0 кДа), β -лактоглобулин (18.4 кДа), лизоцим (14.4 кДа).

Масс-спектрометрический анализ

Анализ проводили в ЦКП “Промышленной биотехнологии” ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН (Москва, Россия) на масс-спектрометре UltraflexXtreme (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Исследуемый белок вырезали из полиакриламидного геля, обрабатывали трипсином, гидролизат анализировали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Обработку полученных данных проводили с использованием программы Bruker Data Analysis (Bruker Corporation, США). Для поиска исследуемого фермента по масс-спектрам в базах данных NCBI и SWISS-PROT использовали программу Peptide Mass Fingerprint (Matrix Science Inc., США).

Гидролиз изолята соевого белка

Гидролиз проводили в течение 3 ч при температуре 50°C при pH 6.0–6.2 в водной суспензии изолята соевого белка при концентрации субстрата 10% и постоянном перемешивании 1100 об./мин. Коммерческий ФП Flavozyme 1000L и лабораторные образцы ФП: Протооризин-1 и Протооризин-2, – полученные на основе мутантного штамма *A. oryzae*-Co-28, дозировали по LAP-активности из расчета 20 ед/г сырья. ФП Alcalase® вносили в количестве 1.5% к массе субстрата. После гидролиза ферменты инактивировали при 95°C в течение 10 мин. Полученные гидролизаты центрифугировали при 10 750 g в течение 5 мин, осадок высушивали до постоянной влажности и определяли содержание общего белка и выход свободных аминокислот. Контрольный вариант

Таблица 1. Результаты селекции *A. oryzae* 107 на средах с индукторами протеаз
Table 1. Results of *A. oryzae* 107 selection using agar media with proteases inducers

Индуктор	Содержание +-вариантов ^a , %	Максимальная активность целевых ферментов, ед/мл			
		LAP	ПА ^b		
			pH 4.7	pH 7.2	pH 10.0
Контроль (общая популяция на среде СА ^c)	—	6.7 ± 0.3	10.1 ± 0.5	4.8 ± 0.2	4.2 ± 0.2
Желатин	8	8.4 ± 0.3	10.3 ± 0.5	4.7 ± 0.2	4.0 ± 0.1
Пептон	14	10.7 ± 0.5	10.2 ± 0.4	7.0 ± 0.3	6.3 ± 0.3
Казеинат натрия	27	11.8 ± 0.5	11.2 ± 0.6	7.2 ± 0.3	6.5 ± 0.3
Сухое молоко	18	11.3 ± 0.5	11.0 ± 0.4	7.5 ± 0.3	6.8 ± 0.3

Примечание: Здесь и далее: ^a клоны с увеличением LAP-активности более чем на 10% относительно общей популяции (в % к общему числу протестированных клонов, отобранных на определенной селективной среде); ^b протеолитическая активность; ^c среда сусло–агар.

Note: Here and below: ^a clones with an increase in LAP activity by more than 10% relative to the total population (in % of the total number of tested clones selected on each selective medium); ^b proteolytic activity; ^c wort agar–agar.

инкубировали в аналогичных условиях (3 ч, 50°C, 1100 об./мин) без внесения ФП. Эффективность гидролиза соевого изолята оценивали по исчезновению белковых полос с молекулярной массой выше 10 кДа при анализе электрофоретической подвижности в SDS-ПААГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Повышение уровня LAP-активности штамма A. oryzae 107 с помощью селекции и мутагенеза

Синтез внеклеточных грибных аминокатализаторов может регулироваться катаболитной репрессией или другими факторами, влияющими на синтез протеолитических ферментов на уровне транскрипции и посттранскрипционных модификаций при участии других протеаз [11]. Известно, что способность грибов рода *Aspergillus* к синтезу LAP часто коррелирует с общей протеолитической активностью [12]. В связи с этим на первом этапе исследований споровые суспензии *A. oryzae* 107 рассевали на селективные агаризованные среды с добавлением 1% индукторов протеаз: желатина, пептона, казеината натрия, обезжиренного сухого молока, — которые служили также источниками углерода. Основным критерием для отбора селективных штаммов была LAP-активность при глубинном культивировании в колбах. Продукт, помимо синтеза кислых и слабодиссоцируемых протеаз, проявлял протеолитическую активность в щелочной среде, что указывало на присутствие сериновой протеазы — предположительно оризина. Кроме того, сериновая протеаза из *A. oryzae* была ранее нами использована для трансформации штамма *Penicillium canescens*

RN3-11-7 (*niaD*⁻), что позволило получить продуцент сериновой протеазы и гемицеллюлаз — штамм *P. canescens* Alc_Aor cl. 25 [13]. По литературным данным, штаммы *A. oryzae* продуцируют также нейтральные протеазы [5, 14], поэтому для получения продуцента протеолитического комплекса, эффективного при глубоком гидролизе различных белоксодержащих субстратов, в клонках с максимальной LAP-активностью контролировали и общую протеолитическую активность при pH 4.7, 7.2 и 10.0.

Активные варианты продуцента отбирали по скорости роста колоний, морфологическим признакам, интенсивности спорообразования. Использование непрозрачных агаризованных сред с казеинатом натрия и сухим молоком позволило рассматривать в качестве критерия отбора активных клонов диаметр зоны гидролиза белкового субстрата. На среде с сухим молоком регистрировали наибольшее разнообразие морфологических вариантов культуры, однако казеинат натрия обеспечил более четкую корреляцию морфологических характеристик колоний с продуктивностью отобранных клонов. Колонии пересевали на среду Чапека с казеинатом натрия для накопления посевного материала. После второго пассажа активность клонов проверяли при глубинном культивировании в колбах.

В результате нескольких последовательных этапов рассева на среде с казеинатом натрия был отобран вариант *A. oryzae* 21-154, у которого по сравнению с общей популяцией штамма LAP-активность была выше на 76%, протеолитическая

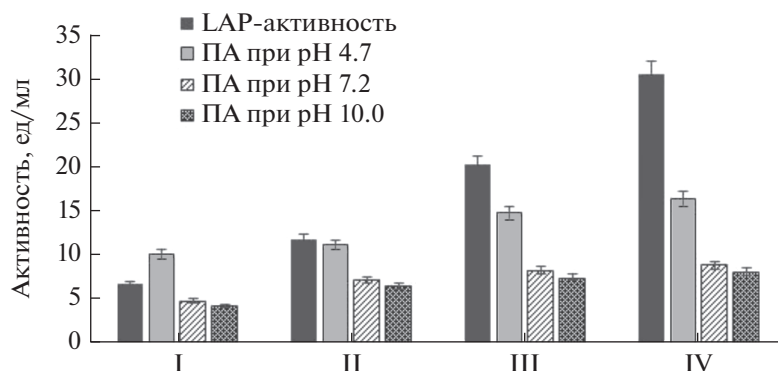


Рис. 1. Увеличение продуктивности штамма *A. oryzae* на различных этапах селекции. I – исходный штамм *A. oryzae* 107, II – селектант *A. oryzae* 21-154, III – УФ-мутант *A. oryzae*-83-21, IV – штамм *A. oryzae*-Co-28, полученный с помощью γ -мутационеза.

Fig. 1. Increase in *A. oryzae* productivity at different stages of selection. I – original *A. oryzae* 107 strain, II – *A. oryzae* 21-154 selectant, III – *A. oryzae*-83-21 UV mutant, IV – *A. oryzae*-Co-28 strain obtained by γ -mutagenesis.

активность в кислой среде – на 10%, в нейтральной – на 35%, в щелочной – на 55% (табл. 1).

Второй этап исследований включал УФ-мутационез штамма *A. oryzae* 21-154. В соответствии с ранее разработанной схемой [9], суспензию спор *A. oryzae* 21-154 облучали в непрерывном режиме для определения экспозиции, обеспечивающей максимальное снижение выживаемости спор продуцента и отбор наиболее продуктивных клонов. Далее при выбранной экспозиции проводили УФ-мутационез в дробном режиме.

УФ-мутационез в непрерывном режиме обеспечил снижение выживаемости спор продуцента до 1.1–4.9% (табл. 2). Минимальное количество спор сохраняло жизнеспособность при 4.5 мин облучения, далее выживаемость увеличивалась, что можно объяснить включением процесса фоторепарации [9]. При повторном УФ-облучении культура (штамм *A. oryzae*-83, мутант первого поколения) была более устойчива к действию мутагена по сравнению с исходным штаммом *A. oryzae* 21-154. Применение дробного УФ-мутационеза позволило снизить выживаемость *A. oryzae*-83 до 0.7–2.4%. В результате двух сеансов УФ-мутационеза LAP-активность штамма *A. oryzae* 21-154 была увеличена на 72%, кислой протеазы – на 30%, нейтральной и щелочной протеаз – на 15%.

Далее споровые суспензии УФ-мутанта второго поколения, штамм *A. oryzae*-83-21, подвергали воздействию различных доз γ -излучения. Наиболее эффективный мутагенез вызывали дозы 1250–1750 Гр, при которых выживаемость спор составила 0.003–0.02% (табл. 3). Последовательное облучение дозами 1500 и 1750 Гр позволило отобрать штамм *A. oryzae*-Co-28, LAP-активность которого была на 50% выше, чем у *A. oryzae*-83-21, при сохранении высокого уровня экспрессии сопутствующих протеаз.

Установлено, что на каждом этапе мутагенеза и селекции значительно увеличивалась LAP-активность, а также общая протеолитическая активность при pH 4.7, 7.2 и 10.0 (рис. 1). В результате мутагенеза штамма *A. oryzae* 107 с использованием УФ и γ -облучения был получен штамм *A. oryzae*-Co-28 с повышенной в 4.5 раза активностью LAP, на 62% активностью кислой протеазы и почти в 2 раза нейтральной и сериновой протеаз.

На электрофореграмме КЖ исходного штамма (рис. 2) присутствовали две четкие полосы белков, соответствующие, согласно данным масс-спектрометрии, α -амилазе А *A. oryzae* ATCC 42149/RIB 40 (AMY3, 51.4 кДа) и аспергиллопепсину О *A. oryzae* ATCC 42149/RIB 40 (PEPA, 36 кДа). На электрофореграммах КЖ *A. oryzae*-Co-28, помимо α -амилазы и аспергиллопепсина, появились дополнительные полосы, соответствующие лейцинаминопептидазе А *A. oryzae* ATCC 42149/RIB 40 (LAPA, 40 кДа) и предшественнику щелочной протеазы-1 *A. oryzae* ATCC 42149/RIB 40 (ALP1, 29 кДа).

Глубинное культивирование мутантного штамма *A. oryzae*-Co-28 в колбах и лабораторных ферментерах

Проведен подбор условий культивирования мутантного штамма для максимальной реализации его потенциала биосинтеза протеолитических ферментов, прежде всего LAP. Продукт выращивали на средах, содержащих в качестве основных компонентов различные количества ячменной, соевой, кукурузной, овсяной муки, солодовых ростков, пшеничных отрубей. Для синтеза LAP наиболее благоприятными оказались среды на основе ячменной и соевой муки.

На основании результатов экспериментов по подбору компонентов ферментационных сред в колбах, для культивирования мутантного штамма

Таблица 2. Влияние режимов УФ-облучения на выживаемость спор и продуктивность штамма по целевым ферментам
Table 2. Effect of UV irradiation regimes on strain spores survival and productivity for target enzymes

Исходный штамм	Режим, мин	Выживаемость, %	Содержание +-вариантов, %	Огобранный вариант	Максимальная активность целевых ферментов, ед/мл			
					LAP			
					рН 4.7	рН 7.2	рН 10.0	
Непрерывный мутагенез								
<i>A. oryzae</i> 21-154	3.0	2.6	8	<i>A. oryzae</i> -83	13.7 ± 0.5	11.8 ± 0.5	7.5 ± 0.3	6.8 ± 0.3
	4.0	1.5	12		13.5 ± 0.4	12.2 ± 0.3	7.0 ± 0.3	6.5 ± 0.2
	4.5	1.1	14		15.1 ± 0.5	13.1 ± 0.3	8.1 ± 0.3	7.5 ± 0.3
	5.0	2.7	10		14.0 ± 0.4	12.5 ± 0.3	7.6 ± 0.3	7.2 ± 0.3
	5.5	2.5	12		13.9 ± 0.3	13.0 ± 0.4	7.0 ± 0.2	6.4 ± 0.3
	6.0	4.9	7		14.9 ± 0.5	11.5 ± 0.3	7.4 ± 0.3	7.1 ± 0.3
Дробный мутагенез								
<i>A. oryzae</i> -83	4.5	6.0	5	<i>A. oryzae</i> -83-21	15.7 ± 0.4	13.9 ± 0.4	8.1 ± 0.3	7.2 ± 0.3
	2 × 4.5	2.4	11		20.3 ± 0.5	14.8 ± 0.3	8.3 ± 0.3	7.5 ± 0.3
	3 × 4.5	0.7	8		19.2 ± 0.5	14.5 ± 0.3	7.7 ± 0.3	6.5 ± 0.3

Таблица 3. Влияние дозы γ -облучения на выживаемость спор и продуктивность штамма по целевым ферментам
Table 3. Effect of γ -irradiation dose on strain spores survival and productivity for target enzymes

Исходный штамм	Доза облучения, Гр	Выживаемость, %	Содержание +-вариантов, %	Отобранный вариант	Максимальная активность целевых ферментов, ед/мл			
					LAP	ПА	рН	
I сеанс								
<i>A. oryzae</i> -83-21	750	1.100	12	<i>A. oryzae</i> -62	23.6 ± 0.4	15.3 ± 0.3	8.6 ± 0.3	7.8 ± 0.3
	1000	0.300	11		25.5 ± 0.5	16.1 ± 0.4	8.3 ± 0.3	7.5 ± 0.2
	1250	0.020	14		26.4 ± 0.5	15.8 ± 0.3	8.9 ± 0.3	7.9 ± 0.3
	1500	0.010	21		27.1 ± 0.4	16.2 ± 0.4	8.7 ± 0.3	7.8 ± 0.3
	1750	0.003	12		26.0 ± 0.5	16.0 ± 0.4	8.6 ± 0.3	7.6 ± 0.2
	2000	0	—		—	—	—	—
II сеанс								
<i>A. oryzae</i> -62	1500	0.030	8	<i>A. oryzae</i> -Co-28	30.1 ± 0.4	16.2 ± 0.4	8.2 ± 0.3	7.5 ± 0.3
	1750	0.030	7		30.6 ± 0.5	16.4 ± 0.5	8.9 ± 0.3	8.1 ± 0.3
	2000	0.017	3		29.8 ± 0.5	16.3 ± 0.4	9.0 ± 0.3	8.2 ± 0.3

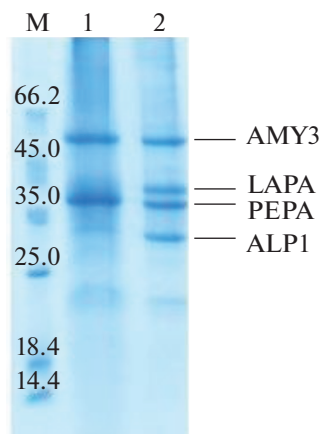


Рис. 2. Электрофореграмма белков культуральной жидкости исходного штамма *A. oryzae* 107 (1) и мутантного *A. oryzae*-Co-28 (2). М – маркеры молекулярных масс белков (Thermo Fisher Scientific); AMY3 – α -амилаза А; PEPA – аспергиллопепсин О; LAPA – лейцинаминопептидаза А; ALP1 – предшественник щелочной протеазы-1.

Fig. 2. Electrophoregram of the proteins in the culture liquid of original strain *A. oryzae* 107 (1), and mutant strain *A. oryzae*-Co-28 (2). М – protein molecular mass markers (Thermo Fisher Scientific, USA); AMY3 – α -amylase А; PEPA – aspergillopepsin O; LAPA – leucine aminopeptidase А; ALP1 – alkaline protease-1 precursor.

в лабораторных ферментерах были выбраны две среды:

Среда № 1: ячменная мука – 4%, пшеничные отруби – 5%, K_2HPO_4 – 1.0%.

Среда № 2: обезжиренная соевая мука – 1%, пшеничные отруби – 5%; K_2HPO_4 – 0.5%.

Из результатов, представленных на рис. 3., можно сделать вывод о возможности масштабирования процесса глубинного культивирования мутантного штамма *A. oryzae*-Co-28. Максимальная активность LAP наблюдалась на 120 ч роста и составила около 40 ед/мл на обоих вариантах ферментационных сред. Активность сопутствующих ферментов (кислой и щелочной протеаз) бы-

ла выше соответственно в 2.5 и 1.5 раза на среде с ячменной мукой, чем с соевой мукой.

Компонентный состав и основные характеристики образцов ФП “Протооризин”

Из КЖ мутантного штамма *A. oryzae*-Co-28 методом распылительной сушки были получены образцы концентрированного комплексного препарата Протооризин, предназначенного для глубокого гидролиза белка. Определены основные характеристики ФП Протооризин-1 и Протооризин-2, полученных при ферментации *A. oryzae*-Co-28 соответственно на среде № 1 (с ячменной мукой) и среде № 2 (с соевой мукой), в сравнении

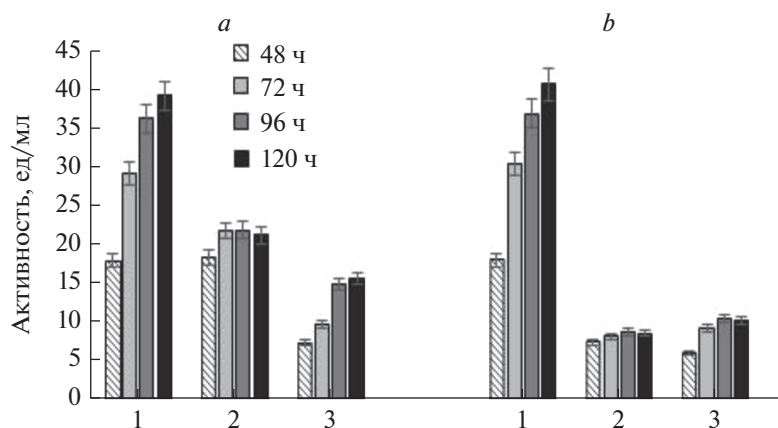


Рис. 3. Активность LAP (1), кислой протеазы (2), щелочной протеазы (3) при культивировании *A. oryzae*-Co-28 в лабораторных ферментерах: *a* – на среде № 1 (с ячменной мукой), *b* – на среде № 2 (с соевой мукой).

Fig. 3. Activity of LAP (1), acid protease (2), and alkaline protease (3) during cultivation of *A. oryzae*-Co-28 in laboratory fermenters: *a* – medium 1 (with barley flour), *b* – medium 2 (with soy flour).

Таблица 4. Характеристики Протооризина-1, Протооризина-2 и Flavourzyme® 1000L
Table 4. Protoorizin-1, Protoorizin-2 and Flavourzyme® 1000L characteristics

ФП	Белок, мг/г	LAP, ед/г	ПА, ед/г		
			pH 4.7	pH 7.2	pH 10.0
Протооризин-1	370 ± 15	1007 ± 28	818 ± 25	541 ± 22	480 ± 18
Протооризин-2	330 ± 15	1075 ± 30	463 ± 20	422 ± 18	370 ± 10
Flavourzyme® 1000L	80 ± 5	1000 ± 50	18 ± 1	18 ± 1	4.2 ± 0.2

с коммерческим ФП – Flavourzyme® 1000L (Novozymes, Дания).

По результатам, приведенным в табл. 4 и на рис. 4, можно говорить о том, что состав ферментационной среды существенно влиял на содержание в ФП сопутствующих протеаз, прежде всего аспергиллопепсина, активность которого на среде с ячменной мукой почти в 2 раза выше, чем на среде с соевой мукой. В то же время уровень активности LAP был практически одинаков в обоих ФП и сравним с коммерческим препаратом Flavourzyme® 1000L, широко применяемым при получении белковых гидролизатов пищевого и лечебно-профилактического назначения. Активность сопутствующих протеаз в ФП Протооризин-1 и Протооризин-2 в среднем была в 25–50 раз выше, чем в коммерческом аналоге, что позволяет рассматривать ФП на основе *A. oryzae*-Со-28 как комплексные препараты протеаз эндо- и экзодействия.

Среди мажорных белков в составе Протооризина-1 и Протооризина-2 отсутствовали нейтральные протеазы, но значимым компонентом протеолитического комплекса была кислая протеаза – аспергиллопепсин (PEPA). По данным М. Mezg и др. [5], в состав Flavourzyme® 1000L входят две нейтральные протеазы, но отсутствует аспергиллопепсин. В то же время Протооризин-1 и Протооризин-2 проявляют достаточно высокую протеолитическую активность в нейтральном диапазоне pH, возможно, за счет суммарного действия кислой и сериновой протеаз.

Соевый белок характеризуется сбалансированным аминокислотным составом и служит сырьем для получения гидролизатов пищевого, кормового и лечебно-профилактического назначения. В то же время основные белки сои: глицинин и β-конглицинин (~70% от всех белков сои) – обладают сильным иммуногенным действием и устойчивы к термообработке. Эффективным способом устранения антипитательных свойств соевых белков и повышения их пищевой ценности считается ферментативный гидролиз до низкомолекулярных пептидов [15, 16]. Для глубокого гидролиза соевого белка при получении пищевых гидролизатов в мировой практике наиболее ши-

роко используют сочетание двух ФП: бактериальной сериновой протеазы Alcalase® и Flavourzyme®. Alcalase® быстро гидролизует белки до пептидов, снижая иммуногенность основных белков сои и повышая выход растворимого белка. Flavourzyme® повышает эффективность гидролиза, увеличивая выход свободных аминокислот и формируя удовлетворительные органолептические свойства гидролизатов, главным образом за счет устранения горечи пептидов, образовавшихся при действии препарата Alcalase® [1, 15, 16].

При гидролизе изолята соевого белка в качестве эталонной комбинации ФП, обеспечивающей наибольшую степень гидролиза, использовали сочетание Alcalase® в дозировке 1.5% к массе субстрата с Flavourzyme® 1000L в дозе 20 ед LAP/г субстрата. Предполагая, что присутствие в ФП на основе *A. oryzae*-Со-28 сериновой и аспаргатной эндопротеаз достаточно для моделирования действия препарата Alcalase®, в опытных вариантах мы использовали только Протооризин-1 и Протоори-

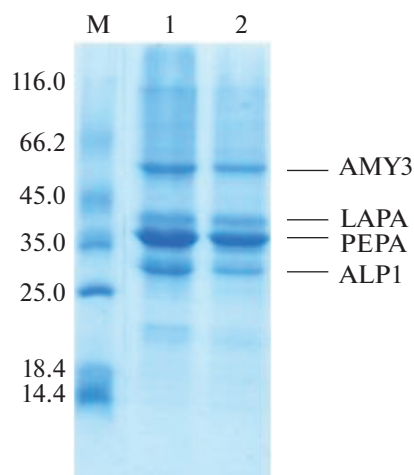


Рис. 4. Электрофореграмма белков, входящих в состав Протооризина-1 (1) и Протооризина-2 (2). Условные обозначения и ссылки см. в подписи к рис. 2.
Fig. 4. Electrophoregram of the protein composition of the Protoorizin-1 (1) and Protoorizin-2 (2). For symbols and references, see the legend to fig. 2.

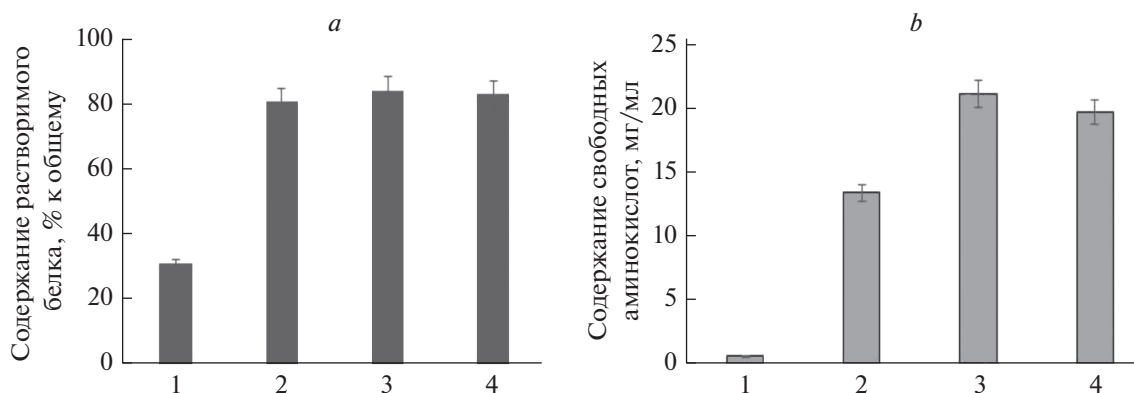


Рис. 5. Анализ эффективности гидролиза соевого белка под действием коммерческих и разработанных ферментных препаратов. Содержание растворимого белка (а) и свободных аминокислот (б) в изоляте соевого белка, не обработанном ФП (1), обработанном ФП Alcalase® + Flavourzyme® 1000L (2), Протооризин-1 (3), Протооризин-2 (4).

Fig. 5. Analysis of the efficiency of soy protein hydrolysis under the action of commercial and developed enzyme preparations. Content of soluble protein (a) and free amino acids (b) in untreated soy protein isolate (1), and in soy protein isolate processed with Alcalase® + Flavourzyme® 1000L (2); Protoorizin-1 (3); Protoorizin-2 (4).

зин-2, дозируя их по LAR-активности: 20 ед/г субстрата. Эффективность гидролиза оценивали методом Кьельдаля, по выходу свободных аминокислот и растворимого белка, определяемого по разнице между содержанием общего белка в навеске субстрата и в нерастворимом осадке (рис. 5). Эффективность гидролиза соевого белка также оценивали по исчезновению на электрофореграммах белковых полос с молекулярной массой выше 10 кДа (рис. 6).

На основании этих данных можно сделать вывод, что ФП Протооризин-1 и Протооризин-2, полученные нами на основе нового мутантного штамма *A. oryzae*-Co-28, гидролизуют соевый белок не менее эффективно, чем коммерческие ФП – Alcalase® и Flavourzyme® 1000L. Действие сбалансированного комплекса эндо- и экзопептидаз ФП на основе *A. oryzae*-Co-28 позволило получить более высокий выход растворимого белка и свободных аминокислот, чем комбинация Alca-

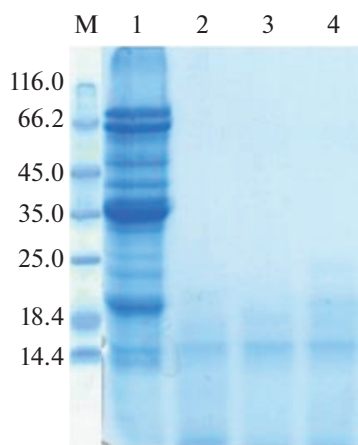


Рис. 6. Электрофореграмма ферментативных гидролизатов соевого белка. На дорожки нанесены: М – маркеры молекулярной массы; соевый изолят, не обработанный ФП (1); обработанный ФП Alcalase® + Flavourzyme® 1000L (2), Протооризин-1 (3), Протооризин-2 (4).

Fig. 6. Electrophoregram of enzymatic hydrolysates of soy protein. The tracks marked are: M – molecular weight markers; untreated soy protein isolate (1), and soy protein isolate processed with Alcalase® + Flavourzyme® 1000L (2), Protoorizin-1 (3), Protoorizin-2 (4).

lase® + Flavourzyme® 1000L. ФП Протооризин-1 и Протооризин-2 эффективно гидролизуют основные белки сои. На электрофореграмме гидролизатов, полученных после 3-часовой ферментативной обработки, детектировали слабую полосу с молекулярной массой около 15 кДа, соответствующую промежуточным продуктам расщепления трудногидролизуемой основной субъединицы глицинина [16].

Таким образом, с помощью селекции и мутагенеза под действием УФ- и γ -излучения получен штамм *A. oryzae*-Co-28 – продуцент сбалансированного комплекса протеолитических ферментов с повышенной лейцинаминопептидазной активностью. Ферментные препараты Протооризин-1 и Протооризин-2, полученные на основе штамма *Aspergillus oryzae*-Co-28, с высокой эффективностью гидролизуют основные белки сои.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Научно-исследовательская работа по подготовке рукописи проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2022–2024 гг. (тема № FGMF-2022-0006) с использованием научного оборудования ЦКП “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ma Y.S., Wang L.T., Sun X.H., Ma B.C., Zhang J.W., Gao F.Q., Liu C.L. Study on hydrolysis conditions of flavourzyme in soybean polypeptide alcalase hydrolysate. *Adv. Mat. Res.*, 2013, 652–654, 435–438. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.652-654.435>
2. Chung T.W., Wang M.Y. Analysis of enzymatic hydrolysis process of protein by experimental design method. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2019, 289(1), 012001. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/289/1/012001>
3. Anh T.L.Q., Hoa N.T.Q., Nguyen P.D.T., Thanh H.V., Nguyen P.B., Anh L.T.H., Dao D.T.A. Soybean protein extraction by Alcalase and Flavourzyme, combining thermal pretreatment for enteral feeding product. *Catalysts*, 2020, 10(8), 829. <https://doi.org/10.3390/catal10080829>
4. Lindberg D., Kristoffersen K.A., de Vogel-van den Bosch H., Wubshet S.G., Böcker U., Rieder A., Fricke E., Afseth N.K. Effects of poultry raw material variation and choice of protease on protein hydrolysate quality. *Process Biochem.*, 2021, 110, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.07.014>
5. Merz M., Eisele T., Berends P., Appel D., Rabe S., Blank I., Stressler T., Fischer L. Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63(23), 5682–5693. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01665>
6. Серба Е.М., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Римарева Л.В., Оверченко М.Б. Влияние химического мутагенеза на физиологические характеристики и продуктивность микромицета *Aspergillus oryzae*. *Микология и фитопатология*, 2018, 52(1), 49–54.
7. Соколова Е.Н., Шариков А.Ю., Юраскина Т.В., Серба Е.М. Протеолиз белковых компонентов растительного сырья с высоким аллергенным потенциалом. *Вестник КрасГАУ*, 2022, 10, 207–214. <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2022-10-207-214>
8. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Морозова К.А., Сидницын А.П. Штамм гриба *Aspergillus oryzae* – продуцент кислых и слабокислых протеаз. Патент РФ 2315098 С1, опубл. 20.01.2008. <https://patents.google.com/patent/RU2315098C1/ru>
9. Kostyleva E.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Burtseva E.I., Veselkina T.N., Nefedova L.I., Sharikov A.Yu., Tsurikova N.V., Lobanov N.S., Sinityn A.P. Development of schemes of induced mutagenesis for improving the productivity of *Aspergillus* strains producing amyolytic enzymes. *Microbiology*, 2017, 86, 493–502. <https://doi.org/10.1134/S0026261717040087>
10. Cupp-Enyard C. Sigma’s non-specific protease activity assay – casein as a substrate. *J. Vis. Exp.*, 2008, 19, 899. <https://doi.org/10.3791/899>
11. van Wijk-Basten D.E.J.W. Aminopeptidase from *Aspergillus niger*. *Ph.D. Thesis*, Wageningen University, The Netherlands, 2004. <https://edepot.wur.nl/121507>.
12. Lim J., Choi Y.H., Hurh B.S., Lee I. Strain improvement of *Aspergillus sojae* for increased l-leucine aminopeptidase and protease production. *Food Sci. Biotechnol.*, 2018, 28(1), 121–128. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0427-9>
13. Великорецкая И.А., Середина А.С., Костылева Е.В., Цурикова Н.В., Неведова Л.И., Веселкина Т.Н., Рожкова А.М., Сидницын А.П. Получение рекомбинантного штамма – продуцента грибной сериновой протеазы и комплекса карбогидраз. *Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов*. Под ред. В.А. Полякова, Л.В. Римаревой, Москва, ВНИИПБТ, 2016, 17–25. https://elibrary.ru/download/elibrary_26060148_32227761.pdf.
14. Budak S.O., Zhou M., Brouwer C., Wiebenga A., Benoit I., Di Falco M., Tsang A., de Vries R.P. A genomic survey of proteases in *Aspergilli*. *BMC Genomics*, 2014, 15(1), 523. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-523>
15. Meinschmidt P., Sussmann D., Schweiggert-Weisz U., Eisner P. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Sci. Nutr.*, 2015, 4(1), 11–23. <https://doi.org/10.1002/fsn3.253>
16. Fischer M. Limiting factors for the enzymatic accessibility of soybean protein. *Ph.D. Thesis*, Wageningen University, The Netherlands, 2006. <https://edepot.wur.nl/121850>

New Complex Enzyme Preparation with Increased Activity of Leucine Aminopeptidase

E. V. Kostyleva^{a, #}, A. S. Sereda^a, I. A. Velikoretskaya^a, N. V. Tsurikova^a,
I. A. Shashkov^b, E. A. Rubtsova^b, and A. P. Sinitsyn^{b, c}

^aAll-Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology, Branch
of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, 111033 Russia

^bFundamentals of Biotechnology Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^cFaculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

[#]e-mail: ekostyleva@list.ru

Abstract—In order to obtain a complex proteolytic preparation effective in the production of protein hydrolysates, we have selected the mutant *Aspergillus oryzae*-Co-28 strain with an increased activity of leucine aminopeptidase (LAP) and a high activity of concomitant endopeptidases, oryzin and aspergillopepsin. After cultivation of *A. oryzae*-Co-28 in laboratory fermenters on two culture media, concentrated enzyme preparations (EPs) Protooryzin-1 and Protooryzin-2 were obtained with a leucine aminopeptidase activity of about 1000 U/g and different levels of activity of concomitant proteases. The biochemical properties and composition of the new preparations were compared with those of the commercial EP Flavourzyme[®] 1000L (Novozymes, Denmark). EPs obtained were not inferior to the commercial preparation in terms of leucine aminopeptidase activity, and the total proteolytic activity of the new preparations was many times higher than that of Flavourzyme[®] 1000L. The balanced composition of the Protooryzin proteolytic complex provided the successful replacement of two commercial preparations, Alcalase[®] and Flavourzyme[®] 1000L, in the hydrolysis of soy protein isolate.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, mutagenesis, enzyme preparation, leucine aminopeptidase, soy protein, hydrolysis