

R.K. Blieva<sup>1</sup>, A.K. Kalieva<sup>2</sup>,  
Zh.B. Suleimenova<sup>1</sup>, A.S. Zhakipbekova<sup>1</sup>, I.E. Tapenbayeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>RPE Co “Antigen”, Almaty, Kazakhstan;

<sup>2</sup>Aktobe Regional State University named after K. Zhubanov, Kazakhstan.

E-mail: [raubil@mail.ru](mailto:raubil@mail.ru)

## SCREENING OF *ASPERGILLUS FUNGI* FOR EXTRA CELLULAR PROTEASE AND COLLAGENASE PRODUCTION

**Abstract.** Protease and collagenase are the most important enzymes used for the processing of meat raw materials. In the meat industry, proteolytic enzymes are used to accelerate the maturation of meat and increase its yield. The use of enzyme preparations in meat processing makes it possible to rationally use meat raw materials, intensify technological processes, improve quality and expand the range of products. Collagenase, unlike protease, acts on those connective proteins of meat raw materials that determine its stiffness, breaking down hard-hydrolyzable and non-digestible collagen. The aim of this study was selection of strains of industrially valuable micromycetes from the collection of micromycetes that have the ability to synthesize extracellular protease and collagenase and create a fungal association. A comparative characterization of 7 strains of micromycetes of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* - potential producers of protease and collagenase enzymes, was carried out. *A. awamori* 16 and *A. awamori* 22 showed the highest clearance zones and was used for further studies. The clearance zones of casein of *A. awamori* 16 on day 5 were 22.8 mm, and collagen 20.8 mm, while the clearance zones of casein of *A. awamori* 22 were 20.1 mm, and collagen - 19.1 mm.

**Keywords:** *Aspergillus*, enzymes, protease, collagenase.

**Introduction.** Nowadays, the meat processing industry is developing new recipes and technologies using secondary meat and other food raw materials containing a sufficient amount of proteins, fats, vitamins and trace elements. In this regard, it is of great interest to use enzymes that allow the rational use of protein resources, increase the biological value of meat dishes by increasing the proportion of collagen proteolysis products – the fibrillar protein that forms the basis of connective tissue [1-3]. The use of enzyme preparations positively affects the tenderness, juiciness, nutritional value of meat raw materials, the formation of the required level of water-binding and adhesive ability, improves its organoleptic characteristics due to the targeted effect of enzymatic complexes on the components of muscle tissue [4-6].

The use of enzyme preparations in the production of meat products makes it possible to rationally use raw meat, to intensify technological processes, improve quality and expand the range of products. Of greatest interest for the processing of raw meat are the enzymes protease and collagenase. Recently, a search for microorganisms capable of intensive synthesis of these enzymes has been actively conducted. The producers of these enzymes were found among *Actinomycesrimosus*, *Streptomyces griseus*, *Actinomycesfradiae*, etc. [7-10]. The proteolytic enzymes of bacteria of the genus *Bacillus* were studied. [11, 12]. Despite the fact that among microorganisms producing protease and collagenase bacteria, fungi, yeast and actinomycetes are noted, micromycetes have recently become widespread due to the ease of their cultivation and high productivity. The preparations from micromycetes of the genus *Aspergillus*, *Penicillium*, and others are successfully used [13-15].

In this regard, the selection of active strains of micromycetes – producers of enzymes and the creation based on an associative culture that will have both protease and collagenase activity.

**Materials and Methods.** The objects of research were micromycetes of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* from own collection of microorganisms. The research work was conducted using accepted microbiological and biochemical research methods. The initial cultures were grown on potato – dextrose

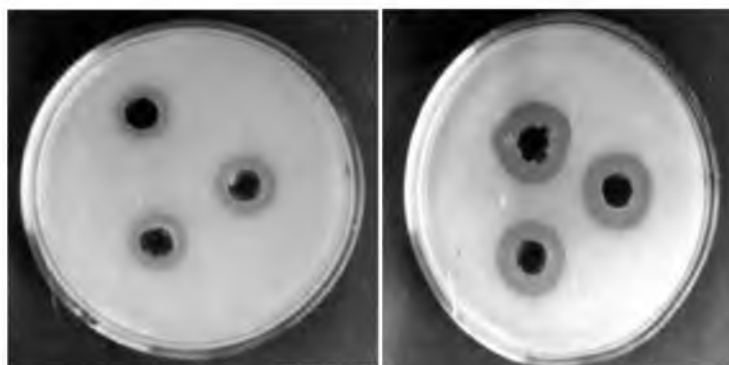
agar for 5 days at a temperature of 30 °C. The primary selection of the culture according to the level of protease formation was carried out by a qualitative method by measuring the diameter of the clarification (hydrolysis) zones of the substrate by the cultures under study for 3-5 days of incubation (in mm) at 30 °C. Skim milk with agar was used as a substrate [16].

The primary selection of producers of collagen-cleaving enzymes was carried out in Petri dishes on Chapek-Doks medium containing purified collagen as a substrate [17]. The ability of the culture to hydrolyze the substrate was evaluated by the size of the zones of substrate hydrolysis on the 5th day of growth.

Proteolytic activity (PA) was determined according to GOST 20264.2-88 [18]. The amount of enzyme that catalyzes the hydrolysis of 1 g of protein in 30 minutes under standard conditions to products not precipitated with trichloroacetic acid was taken as a unit of proteolytic activity.

Collagenase activity was determined in the culture fluid filtrates using the method based on spectrophotometric determination of free amino acids formed during collagen hydrolysis using the ninhydrin reagent [19]. A collagen suspension was obtained by incubating the substrate in a buffer solution at 37 °C for 1 day. A buffer was prepared at pH 7.4, which contained Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.76 g/L), NaCl (8.8 g/L) in 1L of distilled water in the presence of 0.2 μM CaCl<sub>2</sub>. In order to determine collagenase activity, 1 ml of a collagen suspension was poured into a 1 ml experimental sample and the mixture was incubated at 37 °C for 18 h, after which 1 ml was taken from the incubation mixture and 2 ml of ninhydrin reagent (fresh prepared 2% ninhydrin in acetone) were added to it. It was held for 20 minutes at 100 °C, the volume of each sample was adjusted to 10 ml with distilled water, and the optical density was measured on a spectrophotometer at 600 nm.

**Results and Discussion.** A search for protease and collagenase producers was carried out among microscopic fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*, known as potential producers of the studied enzymes. For this purpose, a comparative characterization of 7 strains from our own collection of microorganisms was carried out – *Aspergillus awamori* 16, *Aspergillus awamori* 22, *Aspergillus awamori* 21/96, *Aspergillus oryzae* 3-9-15, *Aspergillus niger* P, *Aspergillus foetidus* and *Penicillium chrysogenum* 241. The substrate was evaluated by the size of the zones of enlightenment on the 5<sup>th</sup> day of growth (picture).



Casein clearing zone assay

The clear zone formation concerns the ability of colonies with confirmed casein hydrolysis, i.e. with the ability to synthesize an enzyme. The larger the hydrolysis zone, the more actively the culture forms an enzyme. The data obtained are presented in table 1.

According to the Table 1, the strains *A. awamori* 16 and *A. awamori* 22 were the most active in the ability to split casein and collagen. The hydrolysis zones of casein *A. awamori* 16 for 5 days were 22.8 mm, and collagen 20.8 mm, while the hydrolysis zones of casein *A. awamori* 22 amounted to 20.1 mm, and collagen – 19.1 mm. The strains of *A. oryzae* 3-9-15 and *A. niger* P, which did not produce substrate cleavage zones, had the least enzymatic activity. In order to determine the activity of protease and collagenase by selected cultures of *A. awamori* 16 and *A. awamori* 22, they were cultured under submerged conditions on a liquid nutrient medium. After 3 days, the activity of extracellular protease and collagenase was determined (table 2).

Table 1 – Selection of the active variant – producer of protease and collagenase

Culture	Diameter of Casein cleavage zones (mm)	Diameter of Collagen cleavage zones (mm)
<i>Aspergillus awamori</i> 16	22,8±1,7	20,8±2,0
<i>Aspergillus awamori</i> 22	20,1±1,3	19,1±1,5
<i>Aspergillus awamori</i> 21/96	16,3±2,0	13,3±1,9
<i>Aspergillus oryzae</i> 3-9-15	0	16,9±1,9
<i>Aspergillus nige</i> rII	0	0
<i>Aspergillus foetidus</i>	11,5±1,4	11,3±1,2
<i>Penicillium chrysogenum</i> 241	11,2±1,7	12,8±1,8
Control	0	0

Table 2 – Enzymatic activity of monocultures and fungal association

Culture	Protease Activity, U/ml	Collagenase activity, U/ml
<i>A. awamori</i> 16	3,4±0,5	4,6±0,8
<i>A. awamori</i> 22	3,0±0,6	4,3±0,7
Association <i>A. awamori</i> 16 and <i>A. awamori</i> 22	4,2±0,6	6,8±0,8

The next stage of the research was the creation of an association of selected strains of *A. awamori* 16 and *A. awamori* 22 – producers of proteolytic and collagen-cleaving enzymes. For this purpose, a joint cultivation of selected producers in a liquid nutrient medium was carried out in deep growth conditions. After 3 days, the activity of extracellular protease and collagenase associative culture was determined. The data obtained are presented in table 2.

According to the data presented in Table 2, the association of micromycetes, consisting of *A. awamori* 16 and *A. awamori* 22 forms proteolytic and collagen degrading enzymes more actively than their monocultures. Thus, the resulting associative culture is the starting point for its further study in order to obtain an active enzyme preparation for the meat processing industry.

**Р.К. Блшева<sup>1</sup>, А.К. Калшева<sup>2</sup>, Ж.Б. Сулейменова<sup>1</sup>,  
А.С. Жакипбекова<sup>1</sup>, И.Е. Тапенбаева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ЖШС «Антиген FOK», Алматы, Қазақстан;

<sup>2</sup>Қ. Жұбанов атындағы Ақтөбе өңірлік мемлекеттік университеті, Қазақстан

#### **ПРОТЕАЗА ЖӘНЕ КОЛЛАГЕНАЗА ПРОДУЦЕНТІ ASPERGILLUS-ТЕКТІ МИКРОМИЦЕТТЕР СКРИНИНГІ**

**Аннотация.** Ет өңдеу өнеркәсібінде қолданылатын ферменттік препараттардың ішінде протеаза мен коллагеназа ет және ет өнімдерінің консистенциясын жақсарту үшін пайдаланылатын негізгі ферменттер тобына жатады. Ет өнеркәсібінде протеолитикалық ферменттер еттің пісін жетілуін жеделдету және оның шығуын арттыру үшін қолданылады. Коллагеназаның протеазадан айырмашылығы – ыдырауы қиын және сіңірілмейтін коллагенді ыдырата отырып, оның қаттылығын анықтайтын ет шикізатының сол дәнекер ақуыздарына әсер етеді. Соңғы уақытта екі немесе одан да көп штамдардан тұратын препараттар жиі қолданылады. Өйткені бір микроорғанизм табиғи шикізатты биодеструкциялау үшін қажетті ферментативтік белсенділіктің барлық спектріне ие бола алмайды. Пайдаланылатын субстраттар спектрі бойынша, ерекшеленетін екі штамды қолдану ет шикізатының, әсіресе, оның төменгі бөлігінің қаттылығын анықтайтын дәнекер тіннің толық бұзылуына әкелуі мүмкін. Консорциумда бірнеше штамдарды бірлесіп пайдалану кезінде, олардың әсері күшейеді. Осыған байланысты, бұл зерттеудің мақсаты – коллекциялық культуралардың ішінен жасушадан тыс протеаза мен коллагеназаны синтездеу қабілетіне ие өнеркәсіптік-құнды микромицет штамдарын іріктеу және олардың негізінде қауымдастырылған культураны құру. Протеаза және коллагеназа ферменттерінің продуценттері – *Aspergillus* және *Penicillium* тектес микромицеттердің 7 штамына салыстырмалы сипаттама жүргізілді. Культураның субстратты гидролиздеу қабілеті 5-тәулікте ағару аймағының көлемі бойынша бағаланды. Ағару аймағы көп болған сайын, культура соғұрлым ферментті белсенді түзеді. Культураны протеазаны түзу деңгейі бойынша бастапқы іріктеу

өсірудің 3-5 тәулігінде 30 °С жағдайында субстратты ағарту аймағының (гидролиз) диаметрін өлшеу арқылы сапалы әдіспен жүргізілді. Субстрат ретінде агаризацияланған майсыздандырылған сүт қолданылды. Коллагенді ыдырататын ферменттердің продуценттерін бастапқы іріктеу Петри табақшасында құрамында субстрат ретінде тазартылған коллагені бар Чапека-Докстың агаризацияланған ортасында жүзеге асырылды. *A. awamori 16* және *A. awamori 22* штамдары ең көп белсенділікке ие болды. *A. awamori 16*-да 5-тәулікте казеин гидролизінің аймақтары – 22,8 мм, ал коллагенде – 20,8 мм болса, ал *A. awamori 22*-де казеин гидролизінің аймақтары – 20,1 мм, ал коллагенде 19,1 мм-ді құрады. Жүргізілген зерттеулердің келесі кезеңі протеолитикалық және коллаген ыдыратушы ферменттердің продуценттерінің іріктелген *A. awamori 16* және *A. awamori 22* штамдарынан ассоциацияны құрумен байланысты. Осыған орай, іріктелген продуценттерді екеуін бірге тереңдетіп өсіру жағдайында сұйық коректік ортада өсіру ісі жүргізілді. *A. awamori 16* және *A. awamori 22*-ден тұратын микромицеттер қауымдастығы оның монокультурасының құрамдас бөлігіне караганда, протеолитикалық және коллагенді ыдырататын ферменттерді белсенді түрде түзетінгі белгілі болды. *A. awamori 22* штамында 3-тәулікте протеазаның белсенділігі – 3,0 б/мл, коллагеназа – 4,3 б/мл, ал *A. awamori 16* штамында протеазаның белсенділігі – 3-тәулікте 3,4 б/мл, коллагеназа – 4,6 б/мл-ді құрады. *A. awamori 16* және *A. awamori 22* қауымдасқан культурада протеазаның белсенділігі 3-тәулікте – 6,8 б/мл, ал коллагеназа – 4,6 б/мл-ді құрады. Бастапқы культура мен алынған қауымдастықтың макро- және микроморфологиясы берілген. Культура өсірудің 3 тәулігінде ақ жиегі бар радиалды қатпарлы қоңыр түсті, ірі колонияларды құрайтыны анықталды. Конидиеносцалары түзу, қалың, тегіс. Конидиеносцалардың жоғарғы бөлігі көтеріңкі және бастарын құрайды. Стеригмалары қысқа цилиндрлік жасушалар тәрізді.

**Кілттік сөздер:** *Aspergillus*, ферменттер, протеаза, коллагеназа.

Р.К. Блиева<sup>1</sup>, А.К. Калиева<sup>2</sup>,  
Ж.Б. Сулейменова<sup>1</sup>, А.С. Жакипбекова<sup>1</sup>, И.Е. Тапенбаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ТОО «НПП Антиген», Алматы, Қазақстан;

<sup>2</sup>Актюбинский региональный государственный университет им. К. Жубанова, Казахстан

#### СКРИНИНГ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *ASPERGILLUS* - ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕАЗЫ И КОЛЛАГЕНАЗЫ

**Аннотация.** Из ферментных препаратов, используемых в мясоперерабатывающей промышленности, протеаза и коллагеназа являются основной группой, используемой для улучшения консистенции мяса и мясopодуkтов. В мясной промышленности протеолитические ферменты применяют для ускорения созревания мяса и повышения его выхода. Коллагеназа в отличие от протеазы действует на те соединительные белки мясного сырья, которые определяют его жесткость, расщепляя трудногидролизуемый и неусвояемый коллаген. В последнее время все чаще используют препараты, состоящие из двух и более штаммов, поскольку один микроорганизм не способен обладать всем спектром ферментативной активности, необходимым для биодеструкции природного сырья. Использование двух штаммов, отличающихся по спектру потребляемых субстратов, может привести к полной деструкции соединительной ткани, определяющую жесткость мясного сырья, особенно ее низкосортной части. При совместном использовании нескольких штаммов в консорциуме их эффект усиливается. В связи с этим, целью настоящего исследования являлся отбор из коллекционных культур промышленно ценных микромицетов штаммов, обладающих способностью синтезировать внеклеточную протеазу и коллагеназу, создание на их основе ассоциативной культуры. Проведена сравнительная характеристика 7 штаммов микромицетов рода *Aspergillus* и *Penicillium* – потенциальных продуцентов ферментов протеазы и коллагеназы. Способность культуры гидролизовать субстрат оценивали по размерам зон просветления на 5 сутки роста. Чем больше зоны гидролиза, тем активнее культура образует фермент. Первичный отбор культуры по уровню образования протеазы проводили качественным методом путем измерения диаметра зон просветления (гидролиза) субстрата исследуемыми культурами на 3-5 сутки инкубации (в мм) при 30°С. В качестве субстрата использовали агаризованное обезжиренное молоко. Первичный отбор продуцентов коллагенрасщепляющих ферментов осуществляли в чашках Петри на агаризованной среде Чапека-Докса, содержащей в качестве субстрата очищенный коллаген. Наибольшей активностью обладали штаммы *A. awamori 16* и *A. awamori 22*. Зоны гидролиза казеина *A. awamori 16* на 5 сутки составили 22,8 мм, а коллагена 20,8 мм, тогда как зоны гидролиза казеина *A. awamori 22* составили 20,1 мм, а коллагена - 19,1 мм. Следующим этапом проводимых исследований явилось создание ассоциации из отобранных штаммов *A. awamori 16* и *A. awamori 22* – продуцентов протеолитических и коллагенрасщепляющих ферментов. Для этой цели было проведено совместное культивирование отобранных продуцентов в жидкой питательной среде в глубинных условиях роста. Установлено, что ассоциация микромицетов, состоящая из *A. awamori 16* и *A. awamori 22*, активнее образует протеолитические и коллагенрасщепляющие ферменты, чем

составляющие ее монокультуры. Так, активность протеазы *A. awamori* 16 на 3 сутки роста составила 3,4 ед/мл, а коллагеназы – 4,6 ед/мл, тогда как активность коллагеназы *A. awamori* 22 на 3 сутки роста составила 3,0 ед/мл, а коллагеназы – 4,3 ед/мл. Активность протеазы ассоциативной культуры *A. awamori* 16 и *A. awamori* 22 на третьи сутки культивирования составила 4,2 ед/мл, а активность коллагеназы – 6,8 ед/мл. Дана макро- и микроморфология исходных культур и полученной ассоциации. Установлено, что на 3 сутки роста культура образует крупные колонии коричневого цвета, радиально складчатые с белым ободком. Конидиеносцы прямые, толстые, имеют гладкую поверхность. Верхняя часть конидиеносца вздутая и образует головки. Стеригмы представляют собой короткие цилиндрические клетки.

**Ключевые слова:** *Aspergillus*, ферменты, протеаза, коллагеназа.

**Information about the authors:**

Blieva Raushan Kazhkenovna, doctor of biological sciences, professor, RPE Co “Antigen”, Almaty, Kazakhstan, <https://orcid.org/0000-0003-3924-2915>;

Kalieva Aigul Kokomanovna, candidate of biological sciences, Aktobe Regional State University named after K. Zhubanov, Kazakhstan, <https://orcid.org/0000-0003-1178-0236>;

Suleimenova Zhanara Begezhanovna, candidate of biological sciences, RPE Co “Antigen”, Almaty, Kazakhstan;

Zhakupbekova Aigerim Sovetbekovna, MSc in Biotechnology, RPE Co “Antigen”, Almaty, Kazakhstan, <https://orcid.org/0000-0002-7927-4738>;

Tapenbayeva Inkar Erkinbekkizi, MSc in Biotechnology, RPE Co “Antigen”, Almaty, Kazakhstan, <https://orcid.org/0000-0003-0672-5849>

**REFERENCES**

- [1] Bekhit A.A., Hopkins D.L., Geesink G., Bekhit A.A., Franks P. Exogenous proteases for meat tenderization // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2014. Vol. 54 (8). P. 1012-1031.
- [2] Wangang Zh., Maheswarappa N.B., Cheorun Jo, Ryoichi S. Technological demands of meat processing – An Asian perspective // Meat Science. 2017. Vol. 132. P. 35-44.
- [3] Sorour B., Nafiseh S. Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment // Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2017. Vol. 39. P. 223-229.
- [4] Warner R.D., McDonnell C.K., Bekhit A.E.D., Claus J. Systematic review of emerging and innovative technologies for meat tenderisation // Meat Science. 2017. Vol. 132. P. 72-89.
- [5] Lana A., Zolla L. Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective // Journal of Proteomics. 2016. Vol. 147. P. 85-97.
- [6] Palka K., Wesierska E. Cooking of meat // Physics and Chemistry Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition). 2014. P. 404-409.
- [7] Suriya J., Bharathiraja S., Manivasagan P., Kim S.K. Enzymes From Rare *Actinobacterial* Strains // Advances in Food and Nutrition Research. 2016. Vol. 79. P. 67-98.
- [8] Ramirez M.S., Marcelo E. Tolmasky Aminoglycoside modifying enzymes // Drug Resistance Updates. 2010. Vol. 13, № 6. P. 151-171.
- [9] Rafieenia, R. Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in *Streptomyces* // Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences. 2013. Vol. 3(3). P. 810-821.
- [10] Smaoui, S., Mathieu, F., Fguira, L., Merlina, G., & Mellouli, L. Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces* sp. TN17 isolated in the soil from an Oasis in Tunisia // Archives of Biological Sciences. 2011. Vol. 63(4). P. 1047-1056.
- [11] Sharma K.M., Kumar R., Panwar S., Kumar A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2017. Vol. 15, № 1. P. 115-126.
- [12] Denise F. Bratcher 129 – *Bacillus* Species (Anthrax) // Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition). 2017. P. 770-773.
- [13] Ferreira C.M., Correia P.C. Collagenase produced from *Aspergillus* sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue // Biomedical Chromatography. 2017. Vol. 31(5). P. 32-35.
- [14] Ida E.L., da Silva R.R., de Oliveira T.B., Souto T.B., Leite J.A., Rodrigues A., Cabral H. Biochemical properties and evaluation of washing performance in commercial detergent compatibility of two collagenolytic serine peptidases secreted by *Aspergillus fischeri* and *Penicillium citrinum* // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2017. Vol. 47(3). P. 282-290.
- [15] Blieva R. K., Suleimenova Zh.B., Zhakupbekova A.S., Kalieva A.K., Saduyeva Zh.K., Rakhmetova Zh.K. Selection of optimal nutrient medium for collagenase biosynthesis by association *Aspergillus awamori* 16 and *Aspergillus awamori* 22 // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. 2019. Vol. 1. № 331. P. 26-31.
- [16] Oyeleke S.B., Egwim E.C., Auta S.H. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigates* strains for extracellular protease enzyme production // Journal of Microbiology and Antimicrobials. 2010. Vol. 2(7). P. 83-87.
- [17] Rippon, J.W., Lorincz, A.L. Collagenase activity of *Streptomyces (Nocardia) maduroe* // Journal of Investigative Dermatology. 1964. Vol. 43. P. 483.
- [18] GOST 20264.2-88. Enzyme preparations. Methods for determining proteolytic activity. "Yes," hesaid. 1989-01-01. M.: ИПК Publishing house of standards, 2005.
- [19] Demina N.S., Lysenko C.B. Collagenolytic activity of *Streptomyces* sp. // Microbiology. 1992. 61, №.4. P. 629-633.