

SZAKDOLGOZAT

Gingász Anita

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

***Aspergillus* törzsek savas proteáz termelésének vizsgálata
agro-ipari növényi maradványokon**

Szakdolgozat

Gingász Anita

Biomérnök BSc.

Budapest

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: BSc Biomérnöki

Modul neve: Alkalmazott biotechnológiai

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

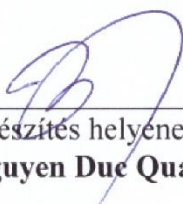
Szakedolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Hallgató: **Gingász Anita**

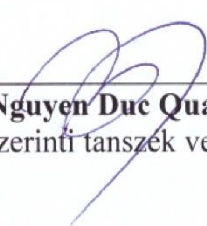
A szakedolgozat címe: *Aspergillus* törzsek savas proteáz termelésének vizsgálata

Konzulens: Dr. Kohári-Farkas Csilla, egyetemi adjunktus

Beadás dátuma: 2023. április 28.


szakedolgozat készítés helyének vezetője
Dr. Nguyen Duc Quang


konzulens
Dr. Kohári-Farkas Csilla


Dr. Nguyen Duc Quang
modul szerinti tanszék vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS.....	6
2	A MUNKA CÉLJA	8
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1	Proteázok	9
3.1.1	Proteázok előfordulása és hatásmechanizmusa	9
3.1.2	Proteázok csoportosítása és típusai	11
3.2	Enzimfermentáció technikák.....	13
3.2.1	Aszpartát-proteáz termelés szubmerz rendszerekben	15
3.2.2	Aszpartát-proteáz termelés szilárd fázisú rendszerekben	17
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	19
4.1	Felhasznált anyagok	19
4.1.1	Alkalmazott mikroorganizmusok.....	19
4.1.2	Tápközegek és agarok.....	19
4.3	Alkalmazott módszerek	21
4.3.1	Konídium szuszpenzió és inokulum készítése.....	21
4.3.2	Extracelluláris proteáz aktivitás screenelése.....	21
4.3.3	Enzimfermentáció technikák	21
4.3.4	Központi elrendezésű kísérlettervezés	22
4.3.5	Extracelluláris proteáz enzimaktivitás mérés	23
5	KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	25
5.1	Savas proteáz aktivitás screenelése	25
5.2	Különböző enzimfermentációs technikák hatása.....	26
5.2.1	Szubmerz enzimfermentáció.....	26
5.2.2	A szilárd fázisú enzimfermentáció.....	30
5.3	Környezeti tényezők hatása a savas proteáz aktivitására.....	33
5.4	Alternatív szénforrások hatása.....	35
5.5	Szubmerz és szilárd fázisú fermentáció összehasonlítása	37
5.5	A gyümölcs-zöldség rostállomány és a kazein hatása	38
6	ÖSSZEFOGLALÁS	41
7	IRODALOMJEGYZÉK	43
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	48

1 BEVEZETÉS

A proteázok a világ teljes enzimértékesítésének körülbelül 65%-át teszik ki. Az enzimek egy igen összetett csoportjából állnak. A proteázok tulajdonságaikban egymástól eltéréseket mutatnak, mint szubsztrátspecifitás, katalitikus mechanizmus, környezeti tényezők hatása és stabilitási profil terén (Usman *et al.* 2021). A proteázokat ma már mikrobiális szervezetekkel termeltetik. A mikrobiális proteázok használata igen elterjedt számos ipari ágazatban, a teljesség igénye nélkül mosó- és tisztítószer gyártásánál, élelmiszeripari termékek, állati takarmányok, gyógyászati készítmények előállításánál, biopolimerek lebontásánál, vagy akár bőriparban (bőrcserzés) is alkalmazzák (Pécs, 2011).

A nagyüzemi enzimfermentáció során ma már jellemzően genetikailag módosított termelő szervezeteket alkalmaznak, azonban a kutatások másik irányvonala a természeti mintákban izolált új törzsek enzimprofiljának feltérképezésére, a jó enzimtermelő törzsek szelektálására és teljesítményük optimalizálására irányul. A természetben számos fonalgomba található, mint az *Aspergillus*, a *Penicillium*, a *Rhizopus*, a *Mucor*, a *Humicola*, a *Thermoascus*, a *Thermomyces* nemzetség tagjai, amelyeknél igen kedvező proteolitikus aktivitást mutattak ki. A fonalgomba eredetű proteázok több előnyös tulajdonsággal is rendelkeznek a bakteriális proteázokkal szemben, amelyek között említhető a fementlé könnyebb kezelhetősége (micélium eltávolítása szűréssel), valamint nagyobb enzimhozam érhető el csökkentett nedvességtartalmú fermentációs rendszerben (de Souza *et al.* 2015, Li *et al.* 2014). Az iparban ugyan a szubmerz rendszereket részesítik előnyben a technológiai tényezők könnyebb szabályozhatósága miatt, azonban ez utóbbi szilárd fázisú fermentációs rendszer kivitelezése egyszerűbb és a termelési költségek is alacsonyabbak (Pécs, 2011).

Az utóbbi években több kutatás is az alternatív szubsztrátumok körének megismerését, ezen belül is az agro-ipari maradványok hasznosítási lehetőségeit célozta (de Souza *et al.* 2015). Világszerte az emberi fogyasztásra előállított élelmiszer egyharmada kárba vész, ami évente körülbelül 1,6 milliárd tonnát jelent. Az élelmiszerek közül a gyümölcsök és a zöldségek pazarlása a legjelentősebb. Az Európai Unióban az élelmiszer pazarlás évente 89 millió tonna élelmiszert tesz ki, míg a teljes mezőgazdasági hulladéktermelés (termésmaradványok, valamint termesztett növények részei, amelyek nem fogyaszthatók élelmiszerként) évi 367 millió tonnára becsülhető. A növényi maradványok egy részét a gazdaságba visszaforgatják takarmányként, komposztként. Az agro-ipari maradványok ezen túl biofeldolgozási folyamatokba integrálhatók, így akár iparilag hasznos biokatalizátorok előállításának

alapanyagiként is hasznosíthatók. Ez az úgynevezett „pazarlástól a gazdagságig” irányba történő elmozdulás lehetőséget ad a még értékes növényi maradványok újra hasznosítására, és más ipari tevékenységek számára hosszabb távon fenntartható, folyamatosan megújuló erőforrásokká is válhatnak (Fazilat *et al.* 2016, Ravindran *et al.* 2018).

Gingász Anita szakdolgozat

2 A MUNKA CÉLJA

Kutatómunkám a természeti mintákból is izolálható *Aspergillus* törzsek extracelluláris proteáz termelésének feltérképezésére, valamint a termelési hatékonyság optimalására irányult cellulózban gazdag agro-ipari melléktermékeken.

Az alábbi részfeladatokat tűztem ki:

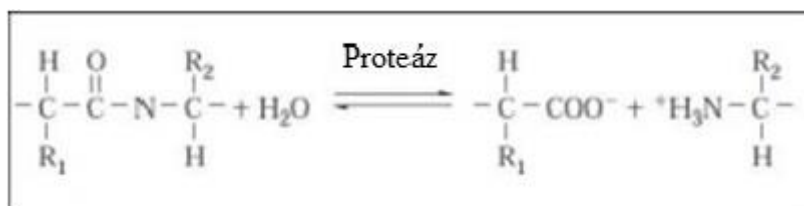
1. **Törzsszelekció:** a törzsek proteolitikus aktivitásának gyors screenelése.
2. **Különböző enzimermentációs technikák:** a szubmerz, rázatott enzimermentáció (SmF) és a csökkentett nedvességtartalmú enzimermentáció (SSF) hatásának nyomon követése.
3. **Alternatív szénforrások:** a búzakorpa, a búzaszalma, a kukoricacsutka, a sörtörköly és a gyümölcs/zöldség rostállomány alkalmazhatóságának vizsgálata.
4. **Enzimermentáció optimalása:** a szénforrás és az induktor (kazein) hatásának elemzése.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Proteázok

3.1.1 Proteázok előfordulása és hatásmechanizmusa

A proteázok (EC 3.4.11-24) (másnéven peptidázok, proteinázok) fehérjebontó enzimek, amelyek a hidrolázok csoportjába tartoznak. Minden élő sejt számára létfontosságúak, előfordulnak mikro- és makroszervezetekben (emberekben, állatokban, növényekben, protozoákban, gombákban, baktériumokban és vírusokban) egyaránt (Razzaq *et al.* 2019). A proteázok rendkívül összetett enzimszortot alkotnak, ugyanis különböző szubsztrátspecifitással, katalitikus mechanizmusokkal és aktivitási helyekkel rendelkeznek és eszerint hasítják a fehérjékben és peptidláncokban a peptidkötéseket (Kamal *et al.* 2016). A bontási mechanizmus eredményeként kisebb peptideket és aminosavakat hoznak létre. A proteázok emellett az egyéb amidkötések és az észterkötések hidrolízisében is részt tudnak venni.



1.ábra: Proteázok bontási mechanizmusának sémája (Pécs, 2011)

A proteázok szintézisének gyakori jelenség, hogy az enzim egy inaktív fehérje, úgynevezett zimogén formájában jön létre és csak a sejten kívül térben aktiválódik. Az aktiválódási folyamat irányított proteolízisnek tekinthető, amely során egy rövidebb, esetenként hosszabb peptid a fehérjeláncról lehasad (Pécs, 2011).

A papain, a bromelain, a keratináz és a ficin néhány jól ismert növényi eredetű proteáz (Rao *et al.* 1998). A növényi proteázok hasznosítását számos tényező korlátozza, mint a termőföld szükséglet, az éghajlati viszonyok változékonysága, valamint az időigényes előállítási folyamat is. Az állati proteázok, mint a hasnyálmirigyből nyert tripszin, a pepszin, a kimotripszin és a rennin ugyan széles körben ismert, azonban a növekvő ipari igényeknek megfelelő mennyiségben szintén nem termeltethetők. Ennek eredményeként a kutatások az enzimforrások körének kiterjesztésére, a mikrobiális úton történő enzimfermentáció fejlesztésére irányultak. A termelő szervezetek kedvező tulajdonságai és a proteolitikus

aktivitású enzimfehérjék széles spektruma miatt ma már a mikrobiális enzimszintézist részesítik előnyben a növényi és állati proteázokkal szemben. A proteáz enzimkészítmények kétharmadát mikrobiális úton állítják elő (Razzaq *et al.* 2019). Az állati és növényi enzimek helyettesítésére rendelkezésre állnak natív, valamint génsebészeti úton manipulált mikroorganizmusokkal termeltetett változatok, amelyek tulajdonságaikban egyenértékűek vagy akár jobbak is lehetnek. Erre példaként hozható a borjúgyomor eredetű rennin, a sajtgyártásban használatos tejjalvasztó enzim, amelyet ma már a *Kluyveromyces lactis* élesztő segítségével termeltetnek ipari szinten. Az enzimtechnológiák fejlesztéseinek eredményeként jelenleg a mikrobiális enzimek közel 90%-át rekombináns törzsekkel termeltetik, azonban a kutatási tevékenységek során intenzíven tanulmányozzák a természeti mintákból izolált, potenciális termelő törzseket és az általuk szintetizált enzimek tulajdonságait, alkalmazási lehetőségeit (Pécs, 2011). A proteázt termelő törzsek között ismertek baktériumok, fonalas gombák, élesztők és sugárgombák is (Chandrasekaran *et al.* 2015). A mikrobiális proteázok, hasonlóan a többi mikrobiális úton termelt enzimhez, olyan kedvező tulajdonsággal rendelkeznek, mint, hogy a nagyüzemi termelés zárt bioreaktorokban megy végbe, ezáltal helyigényük lényegesen csökken, továbbá szabályozott körülmények között, a termelő törzstől függően, különböző fizikai és kémiai tulajdonságú proteáz állítható elő. Az enzimtermelés időtartama jelentősen csökken, ezáltal az enzimtermelés költségei is kisebbek (Sumantha *et al.* 2006).

A mikroorganizmusok számos proteázt termelnek, amelyek között vannak intracelluláris és extracelluláris természetűek. A sejtek csak az extracelluláris proteázok mechanizmusa során felszabadított peptideket és aminosavakat tudják a sejten belüli térben tovább hasznosítani. Mindemellett az intracelluláris proteázok is fontosak a sejt különféle celluláris és anyagcsere folyamatainak biztosításához, mint például a fehérjék megújulása, a sejtek differenciálódása, valamint a fehérjék aktiválása terén (Pécs, 2011). A baktériumok körében nagyobb proteolitikus aktivitás a *Bacillus*, a *Pseudomonas*, a *Clostridium* fajokat jellemzi. A bakteriális proteázok hőmérséklet optimuma 40-50 °C, és általában a lúgos közegben fejtik ki aktivitásukat. A bakteriális eredetű proteázok előállítására elsősorban a *Bacillus subtilis* fajt alkalmazzák. A fonalasgombákat a széles enzim spektrum és az egyéb, iparilag hasznos metabolit termelés miatt számos ipari folyamatban alkalmazzák. A fonalasgombák körében elterjedt proteáz termelő szervezetek az *Aspergillus*, a *Penicillium* és a *Mucor* fajok. A bakteriális eredetű enzimekhez képest alacsonyabb reakciósebességűek és a hőtűrésük is kisebb, viszont széles pH optimummal rendelkeznek. A „penészproteázok” pH 4 és 11 tartományban működőképesek. Az *Aspergillus* fajokkal előállított proteázok rendkívül

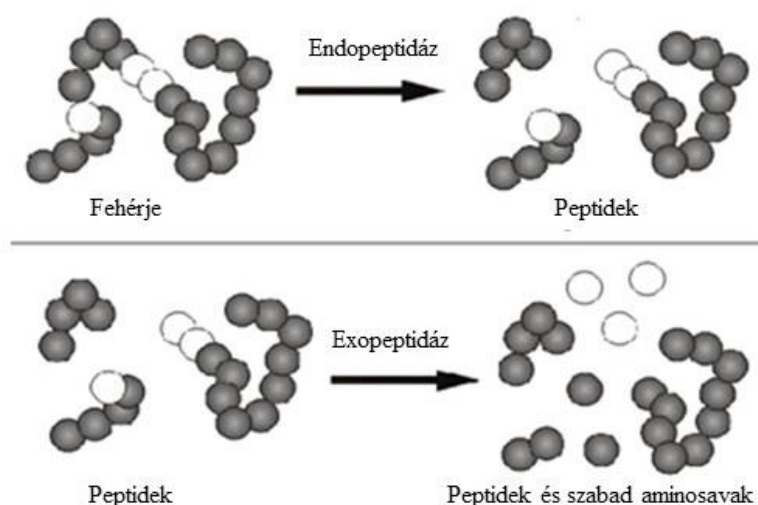
savtűrők (Rao *et al.* 1998). A fonalgombákkal történő enzimtermelés további előnye között említhető, hogy az általuk termelt proteázok jellemzően extracellulárisak, így azok a fermentációs rendszerből könnyen kinyerhetők (Vishwanatha *et al.* 2010b). A fermentálé elválasztásánál a fonalgombák növekedési képletei, mint a micéliumok, pelletek elválasztása szűrővel gyorsan kivitelezhető. A termelési és enzim tisztítási költségek ezáltal csökkenthetők.

A mikrobiális proteázokat széleskörűen alkalmazzák élelmiszeripari ágazatokban (tejipar, húsipar, sörfőzés, sütőipar stb.), az állati takarmányozásban (emészthetőség javítása), a gyógyászatban (bioaktív peptidek előállítása), bőrgyártásban (bőr cserzése), mosószer gyártásban stb. (Razzaq *et al.* 2019).

Számos kereskedelmi forgalomban elérhető enzimkészítmény nem homogén, hanem kisebb-nagyobb arányban többféle fehérjebontó hatású enzimet tartalmaz. Ezeket a termelő szervezet párhuzamosan szintetizálja, és nem érdemes az egyes enzimeket tisztítani, mert együttesen általában hatékonyabban működnek, mint tisztított formában. A gyógyszeriparban szigorúbbak a tisztasági követelmények, de az élelmiszeriparban és a mosószerekénél inkább a vegyes enzimkészítmények használata terjedt el (Tolnay, 1963).

3.1.2 Proteázok csoportosítása és típusai

A proteázok osztályozása az eredetük, a katalitikus mechanizmusuk (hatásuk helye), az aktív helyen lévő aminosav természete, valamint a pH tartományuk szerint történhet. A polipeptidláncokra gyakorolt hatásuk alapján a proteázok két nagy csoportja ismert, az exopeptidázok és endopeptidázok (Singh *et al.* 2016).



2.ábra: Az endo- és exohatású proteázok hatásmechanizmusa (ThiQuynhHoa *et al.* 2014)

A mikrobiális proteázok többsége az endopeptidázok közé sorolható, amelyek fehérjék és a hosszú peptidláncok belső régióiban hasítják a peptidkötéseket. Az exopeptidázok a rövidebb peptidláncok végein aktívak, maximum három aminosav-maradékot bontanak le a szabad amino- vagy karboxil-terminálison. Az exopeptidázok így további két csoportba, az amino- és karboxi-peptidázok közé sorolhatók (Singh *et al.* 2016).

A pH optimum alapján különbséget teszünk savas (pH 2-6), semleges (pH 6-8) és lúgos (pH 8-13) proteázok között (Gupta *et al.* 2002, Rao *et al.* 1998, Sabotic és Kos, 2012). Az alkalikus proteázokat ipari léptékben a szélsőséges körülmények között is jól működő baktériumokkal, nagyrészt a *Bacillus* fajokkal termeltetik. Az alkalikus proteázok körét erősíti a szubsztilizin, amely termelő szervezetei a *Bacillus subtilis* fajból kerülnek ki, de sok más organizmus termel hasonló szerin proteázokat. Ugyan már több neutrális proteázt azonosítottak, azonban ezen proteázok gyakorlati jelentősége mégis kisebb, mert a tűrőképességük a szélsőséges körülményeken csökken. A savas proteázokon belül két alaptípus különíthető el: a pepszin típusú enzimek (pH 2-4), amelyeket elsősorban *Aspergillus* fajok termelnek, valamint a rennin típusú enzimek (pH 5-7), amelyeket pedig főleg a *Mucor* és a *Rhizomucor* törzsek termelnek (Hsiao *et al.* 2014, Vishwanatha *et al.* 2009).

A katalitikus helyen található aminosav alapján a proteázok további hat csoportra oszthatók, eszerint vannak szerin-, aszparaginsav-, cisztein-, metallo-, glutaminsav- és treoninproteázok (Singh *et al.* 2016).

3.1.2.1 Aszpartát-proteázok

Az aszpartát-proteázok (EC 3.4.24) endohatású fehérjebontó enzimek. A proteázokra jellemzően az aszpartát-proteázok is zimogének formájában szintetizálódnak és egy legfeljebb 50 aminosav hosszúságú N-terminális propeptid lehasadásával aktiválódnak. Az aktív enzimfehérje mintegy 320-360 aminosavból álló polipeptidlánc, amelyet nagyrészt β -redőzött másodlagos lemezszerkezet jellemez. Az enzim molekulatömege jellemzően 30- 45 kDa között található (Gomri *et al.* 2018). A különböző eredetű proteázok háromdimenziós szerkezete nagyon hasonló egymáshoz. Az enzimek két szerkezetileg hasonló doménből állnak, és az aktív centrum a két domén közötti résben alakul ki (Souza *et al.* 2017).

Az aszpartát-proteázok a maximális aktivitásukat alacsony kémhatású környezetben, savas tartományban (pH 3-5,5) fejtik ki, amiért az aktív helyen lévő két aszparaginsav-maradék felel (Li *et al.* 2014). Az izoelektromos pontjuk jellemzően pH 3-4,5 tartományban van (Mamo *et al.* 2018). Az aszpartát-proteázok hőmérséklet optimuma 30-50 °C között található. Ugyan a legtöbb aszpartát-proteáz a magas hőmérsékletre érzékeny és gyenge termostabilitást mutatnak,

azonban néhány esetben a maximális aktivitás elérheti az 55 °C-ot is. Az aszpartát-proteázok alkalmazása jellemzően mezofil körülményekre korlátozott (da Silva *et al.* 2016).

Az aszpartát-proteázok előállítására többnyire fonalgombákat (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus fumigatus* stb.) alkalmaznak. A kutatások során leírásra került, hogy ezeket az aspergillopepszineket és egyéb aszpartát-proteázokat a hexapeptid gátolja, amely két pepstatin nevű sztatínmaradékot tartalmaz. Az aszpartát-proteázok igen érzékenyek a diazoacetyl-DL-norleucin-metil-észterre (DAN), az 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)-propánra (EPNP) réz ionok jelenlétében (Mamo *et al.* 2018, Usman *et al.* 2021)

A savas aszpartát-proteázokat több területen is felhasználják, például emésztést elősegítő preparátumokban (a gyomorban a pepszin hatás kiegészítésére, pótlására), szójaszószt előállítására, szójafehérjék irányított hidrolízisére, valamint tej alvasztására is (ez a sajtgyártás kritikus lépése, a tej kolloid szerkezetének megbontása, aminek hatására a tej két fázisra, túróra és savóra válik szét) (Pécs, 2011). A kutatások többnyire a keleti fermentált élelmiszerek (szaké, szójaszószt, miso) előállításánál is ismert *Aspergillus oryzae*, továbbá az *Aspergillus niger* faj savas proteáz termelésének tanulmányozására irányulnak, köszönhetően annak, hogy nagy mennyiségben termelnek hidrolitikus aktivitású enzimeket (Li *et al.* 2014).

Az intenzív kutatások eredményeként ma már egyre több, új és újszerű biotechnológiai alkalmazási terület is ismertté válhat. A különböző bioműanyagok lebontási folyamatában több enzim, az észterázok, a lipázok, a kutinázok, a proteázok igen fontos szerepet töltenek be. Számos tanulmány megerősítette, hogy a keményítő-alapú tejsav polimer, a politejsav (PLA) enzimes degradációja során hatásosabbnak a proteázok bizonyultak. Az egyik ígéretes műanyag helyettesítőként tekinthető, amelynek csomagolóanyagként, evőeszközként és egyéb fogyasztási cikkek formájában történő hasznosítása, valamint a biodegradáció mechanizmusának megértése még kutatások alatt áll (Sankhla *et al.* 2020).

3.2 Enzimfermentáció technikák

Az enzimtermelés hatékonyságára több tényező is, közöttük a termelő szervezet jellege, a fermentációs tápközeg összetétele, különösen a szén-és nitrogénforrások, továbbá a környezeti feltételek, mint a kémhatás, a hőmérséklet, az oldott oxigén koncentráció (levegőztetés és kevertetés), a beoltási ráta, a termelési (inkubációs) idő és a fermentációs technika is jelentős hatással van (Aniflousa *et al.* 2002, Siala *et al.* 2012).

A tápközegben a megfelelő, a termelő szervezet számára könnyen hasznosítható szén- és nitrogénforrást tiszta formában, valamint összetett, agro-ipari maradványok formájában is

lehet biztosítani. A szénforrások körében a glükóz, a szacharóz, a fruktóz, a glicerín, továbbá a búzakorpa, a kukoricacsutka, a rizskorpa stb. is hasznosítható. Ez utóbbiak, az agro-ipari tevékenységek során keletkező maradványok szénhidrátokban, továbbá fehérjékben is igen gazdagok, sőt ásványi anyagokat, mikro- és makroelemeket tartalmaznak, ezért komplex tápanyagként vehetnek részt az enzimtermelés folyamatában. Az értékes összetételüknek köszönhetően a fermentációs rendszerek költségei csökkenthetők. A tápanyagigény termelő szervezeteként eltéréseket mutathat, azonban az eddigi ismeretek alapján elmondható, hogy a fonalgombák több proteolitikus enzimet termelnek összetettebb, szénhidrátokban és fehérjékben (fehérjetermészetű anyagokban) gazdag erőforrásokon, mint könnyen hasznosítható szénhidrátok és kis molekulatömegű, valamint szerves természetű nitrogénforrások (nitrátok, ammóniumsók) jelenlétében (de Souza *et al.* 2015). A kutatások tehát jellemzően a szerves természetű és összetett tápanyagforrásokat részesítik előnyben, ugyanis azok hasznosítása lényegesen több időt igényel, ezáltal a katabolit represszió és a fehérjék lassabb bomlása során az oldatba vitt egyes peptidek/aminosavak enzimszintézisre gyakorolt kedvezőtlen hatása is kiküszöbölhető, azáltal, hogy jelenlétük a rendszerben alacsonyabb szinten és hosszabb időn át biztosított (Nadeem 2009, Nirmal *et al.* 2011).

A savas proteáz termelésnél a hőmérsékletnek, a kémhatásnak és az inkubációs időnek is igen fontos szerepe van. A legtöbb aszpartát-proteázt termelő mikroorganizmus számára az optimális hőmérséklet tartomány 30-55°C között található. A termelő szervezeteknek jellemzően 24-144 óra szükséges a maximális enzimhozam eléréséhez. Az enzimszintézisnek a pH 3 és 6 között tartomány kedvez (Sethi *et al.* 2016).

A fermentációs technikát nem csupán a tápanyag összetétele, hanem a termelő szervezetek természete is befolyásolja, amely alapján azok két nagy csoportba: a szubmerz (süllyesztett) és csökkentett nedvességtartalom mellett indított fermentációs technikák közé sorolhatók. Az enzimfermentáció ipari szinten többnyire szubmerz rendszerekben történik, azonban ismertek olyan kutatások és törekvések, amelyek a természetes degradáció folyamatának modellezésére, a csökkentett nedvességtartalmú rendszerek hatékonyságának növelésére és a léptéknövelt konstrukciók kivitelezésére irányulnak. Ezeket a rendszereket elsősorban a fonalgombák enzimjeinek termelésénél alkalmazzák, ugyanis a környezeti feltételek a természetes élőhelyükhöz (korhadó fa, komposzt stb.) igen hasonlóak. A fermentációs technika számos előnnyel rendelkezik, többek között nagyobb termelékenység érhető el, az energia- és vízhasználat csökken, jelentősen kevesebb szennyvíz is keletkezik, és a tápanyagszükséglet is olcsóbb (Belorkar *et al.* 2022)

A mikrobiális eredetű proteázok alkalmazásának területeit minőségük és költségük korlátozza. A kutatások egyik irányvonala ma a proteázok új és újszerű hasznosítási lehetőségeinek feltérképezését, és a környezetbarátabb termelési lehetőségek kivitelezését célozza nagy mennyiségben és olcsóbban elérhető tápanyagban gazdag mezőgazdasági, erdészeti és egyéb ipari tevékenységei során keletkező, még értékes maradványokon. Ezen maradványok körében az egyik potenciális erőforrás lehetne a búzakorpa, amelyen már sikeresen növelték az elérhető enzimhozamot csökkentett nedvességtartalmú rendszerekben. Ezen túlmenően az ipari szennyvizek, a magas szervesanyagtartalmuknak köszönhetően szintén egy alternatív fermentációs közeget biztosíthatnak az enzintermeléshez, és egyben hozzájárulnak a környezetszennyezés csökkentéséhez is. A kutatások sikerességéből adódóan a proteázokon túl, más enzimek nagyüzemi előállításához a jövőben várhatóan a növényi maradványok, agro-ipari melléktermékek/hulladékok hasznosítása terjedhet el (Razzaq *et al.* 2019).

3.2.1 Aszpartát-proteáz termelés szubmerz rendszerekben

A szubmerz (másnéven süllyesztett, folyadékkultúrás) (SmF) fermentáció során a bioreaktorban a termelő szervezet növekedéséhez és enzintermeléséhez szükséges tápanyagok nagy mennyiségű vizes oldat formájában vannak jelen, ezáltal a megfelelő anyagáram a bioreaktor kevertetésével és levegőztetésével jól alakítható ki. A szubmerz rendszerekben a környezeti tényezők szabályozhatók. Ennél a fermentációs technikánál a tápközeg hajlamosabb a befertőződésre, a tápközeg összetétele és a termelés során a sejtbiomassza és egyéb metabolitok mennyiségének növekedése a gáz- és folyadékfázis közötti anyagátadást nehezíti (Sinha, 2009).

Siala és munkatársai (2012) az *Aspergillus niger* I1 savas proteáz termelését szubmerz, rázatott fermentáció során követték nyomon, ahol szénforrásként többek között glükózt, maltózt, laktózt, hántolt búzaszemeket, nitrogénforrásként pedig kazein peptont, húsból emésztett peptont, ureát, zselatint, nátrium-kloridot, élesztőkivonatot és halászati termékekből (rákokból) nyert peptont hasznosítottak. A termelő törzs extracelluláris proteáz aktivitása hántolt búzaszem és rákpepton alkalmazása esetén savas környezetben (pH 4) és magas hőmérsékleten (50 C°) tetőzött. A szén- és nitrogénforrás jellegén és mennyiségén (10 g/L koncentrációban) túl szintén igen nagy hatást fejtett ki a fermentáció során az inkubációs idő és hőmérséklet is, továbbá a foszforkoncentráció is, amelyet dikálium-hidrogén-foszfát formájában, alacsony koncentrációban (1g/L) biztosítottak. Az enzimszintézisnek az enyhén

savas (pH 5) és mezofil hőmérséklet tartomány (30 °C) kedvezett, 150 rpm rázatási sebesség mellett. A termelő törzs enzintermelésére nem fejtettek ki kedvezőtlen hatást a fémionok (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , K^+ , Zn^{2+}) 5 mM koncentrációban.

Radha és munkatársai (2011) a talajmintából izolált *Aspergillus* proteáz termelésének optimalizálása során kedvezőbb enzimhozamot a tejsavó és melasz azonos arányban történő használata során írtak le. Az enzintermelést tovább növelte, amennyiben a tápközeg szénforrásként glükóz (15 g/L) és rizsliszt (10 g/L), valamint nitrogénforrásként szójabab kivonat (10 g/L) kiegészítést tartalmazott. Az enzintermelés szintén enyhén savas kémhatáson (pH 5) és $32 \pm 2^\circ\text{C}$ -on tetőzött, 150 rpm rázatási sebességen, 120 órás fermentációs időtartamot követően.

Sinha és munkatársai (2009) az *Aspergillus awamori* MTCC-548 törzs aktivitás profilját különböző nitrogénforrások, mint kazein, pepton, sovány tejpor és mogyoróliszt jelenlétében vizsgálták. Kedvezőbb aktivitást a mogyoróliszt használata eredményezett 20 g/L koncentrációban. A szubmerz fermentáció pH 6,5 értéken és 30°C -on, 220 rpm rázatási sebességen történt. A proteolitikus aktivitás pH 6,5 értéken és 60°C -on tetőzött.

1.táblázat: *Aspergillus* törzsek savas proteáz aktivitása szubmerz, rázatott rendszerekben

Termelő törzs	Szubsztrátum	T (°C)	pH	Enzimhozam (U/ml)	Forrás
<i>Aspergillus niger</i> II	hántolt búzaszem, rákpepton	50	4	96,86	Siala <i>et al.</i> 2012
<i>Aspergillus</i> <i>izolátum</i>	sajtsavó, nádmelasz	60	6,5	0,4481	Radha <i>et al.</i> 2011
<i>Aspergillus</i> <i>awamori</i> MTCC-548	mogyoróliszt, glükóz	60	6,5	0,218	Sinha <i>et al.</i> 2009
<i>Aspergillus</i> <i>carbonarius</i> IMI 366159	szójaliszt, glükóz	40	6	0,110	Ire <i>et al.</i> 2011

Ire és munkatársai (2011) kísérleti munkája során az *Aspergillus carbonarius* IMI 366159 törzs proteáz szintézisét jelentősen növelte a glükóz és a szójaliszt együttes alkalmazása. A maximális proteáztermelést 50 g/L glükóz és 50 g/L szójaliszt esetén, továbbá 1 g/L pepton, 0,4 g/L vas-szulfát, 0,1 g/L nátrium-klorid és 0,1 ml/L Tween 80 nem-ionos

felületaktív anyag alkalmazása esetén érték el 30°C-on, pH 3 értéken és 100 rpm rázatási sebesség mellett. Az enzimaktivitásnak a 40 °C és pH 6 érték kedvezett.

Az 1. táblázat összefoglalóan szemlélteti, hogy a proteáz termelés tekintetében ígéretes *Aspergillus* fajok is igen eltérő aktivitásprofilot mutatnak a szubmerz, rázatott fermentációs technikák kivitelezésétől függően.

3.2.2 Aszpartát-proteáz termelés szilárd fázisú rendszerekben

A szilárd fázisú enzimermentáció (SSF) során az enzintermelő törzseket különösebb előkészítést nem igénylő összetett szubsztrátumokon (búzakorpa, gabonaszalma stb.) csökkentett szabad vizes fázis jelenlétében tenyésztik. A fermentációs technika előnye, hogy az enzintermelési költségek csökkenthetők azáltal, hogy a lényegesen kevesebb vizet, energiát és helyet igényel, a kisebb vízigénynek köszönhetően pedig a befertőződés kockázata is csökkenthető. Azonban, a termelési folyamat szabályozása nehezebben tartható kézben, az anyagáramok: a víz, a hő, a levegő (oldott oxigén), a tápanyagok eloszlása nem biztosított. Továbbá, a termék kinyerése és tisztítása is nehezebb, a micéliumok/pelleték, spórák és egyéb metabolitok elválasztása több műveletet igényel (Wu *et al.* 2006).

2.táblázat: *Aspergillus* törzsek savas proteáz aktivitása szilárd fázisú rendszerekben

Termelő törzs	Szubsztrátum	T (°C)	pH	Enzimhozam (U/g)	Forrás
<i>Aspergillus niger</i> LBA02	búzakorpa	50	5	186,42	de Castro <i>et al.</i> 2014
	szójababliszt	50	5	152,38	de Castro <i>et al.</i> 2014
	gyapotmagliszt	50	5	118,83	de Castro <i>et al.</i> 2014
<i>Aspergillus niger</i> izolátum	növényi hulladék (karfiol)	60	7	1,082	Madhumithah <i>et al.</i> 2011
<i>Aspergillus oryzae</i> LBA 01	búzakorpa	55	5	29,27	de Castro <i>et al.</i> 2014

de Castro és munkatársai (2014) tanulmányukban az *Aspergillus niger* LBA 02 proteáz termelését követték nyomon mezőgazdasági melléktermékeken. A szénforrások rangsorolása

során kedvezőbb enzimhozamot búzakupán (50 %-os nedvességtartalom) 30 °C-on, 96 óra alatt értek el. Az enzimaktivitás optimuma pH 3-4 és 50 °C volt.

Madhumithah és munkatársai (2011) *Aspergillus* izolátum esetén a növényi eredetű élelmiszermaradványok, többnyire zöldségtermények és azok keverékeinek enzimtermelésre gyakorolt hatását vizsgálta. A proteáz termelésnek a pépesített karfiolt és a káposztát tartalmazó fermentációs közegek kedveztek. A szubsztrátum nedvesítése ez esetben 1:2 arányban történt (5 g szubsztrátum és 10 ml víz). Az enzimtermelésnek a 30 °C kedvezett, ez esetben 96 óra alatt a proteázaktivitás pH 6 értéken tetőzött (2. táblázat).

A növényi maradványokban a rostok nagyrészt szénhidrát polimereket, cellulózt és hemicellulózt, továbbá aromás lignint tartalmaznak. A szénhidrát polimerek, valamint a növényi maradványok egyéb értékes komponenseinek hozzáférhetőségének biztosítása érdekében nélkülözhetetlen az előkezelés műveletének alkalmazása, amely során a rostok szerkezete lazul, és részben bomlanak is. Ma már számos előkezelési eljárás (fizikai, kémiai, biológiai és kombinált technikák) ismert, azonban azok hatékonysága az alapanyag természetétől függően jelentős eltéréseket mutat. A növényi maradványok biofeldolgozási folyamatába integrált enzimfermentáció, úgynevezett „on-site” enzimfermentáció során a mikrobiális rostbontással egyidejűleg értékes metabolitok, így enzimek is termeltethetők. Amennyiben az enzimtermelés során olyan termelő törzset (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* törzsek) alkalmazunk, amely lignocellulóz-bontó aktivitást is mutat, abban az esetben az előkezelés költségei csökkenthetők. A ma elterjedten alkalmazott fiziko-kémiai eljárások (gőzrobbantás és annak változatai) az adott biofeldolgozási folyamat költségeinek 40-60 %-át is kitehetik (Shinkawa és Mitsuzawa 2020).

A proteáz termelés szempontjából ígéretesnek többek között a búzakuppa bizonyult, amely keményítőből (10-20%), nem keményítő poliszacharidokból (41-60%) és fehérjéből (15-20%) áll, továbbá vitaminokat és ásványi anyagokat is tartalmaz. A szemcsemérete, porozitása is kedvező, így lehetővé teszi a fonalasgombák számára a tápanyaghoz való jobb hozzáférést (Biswas *et al.* 2019). A cellulózban gazdag agro-ipari maradványok körében a búzaszalma, a kukoricacsutka, vagy a sörtörköly szintén igen nagy mennyiségben áll rendelkezésre, hasonlóan az élelmiszer ellátási lánc mentén keletkező gyümölcs- és zöldségmaradványokhoz. Ezen maradványok gazdaságba történő visszaforgatása, akár enzimtermelés céljában a fenntartható fejlődést segítheti elő (Sain *et al.* 2006).

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Felhasznált anyagok

4.1.1 Alkalmazott mikroorganizmusok

A szakdolgozati kutatómunkám során vizsgált mezofil fonalgombákat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM, Budapest) biztosította. Az *Aspergillus niger* IMI 303386 törzs az angliai Nemzetközi Mikológiai Intézetből (International Mycological Institute, IMI) származott.

3. táblázat: Mezőfil fonalgomba törzsek

Nemzetség/Faj	Törzs
<i>Aspergillus niger</i>	F.00632
<i>Aspergillus niger</i>	F.00714
<i>Aspergillus niger</i>	F.00721
<i>Aspergillus niger</i>	F.00735
<i>Aspergillus niger</i>	IMI 303386
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	F.00892
<i>Aspergillus awamori</i>	F.00030
<i>Aspergillus awamori</i>	F.00720

4.1.2 Tápközegek és agarok

Kazein agar

A proteáz aktivitás screeneléséhez a kazein agarlemez összetételét az alábbi 4. táblázat tartalmazza (Vijayaraghavan *et al.* 2013). A komponenseket desztillált vízben oldottam, majd a csíramentesítés 121 °C-on 15 percen át történt.

4. táblázat: A screeneléshez szükséges táptalaj összeállítása

Összetevők	Mennyiség (g/l)
kazein	10
pepton	5
húskivonat	1,5
élesztőkivonat	1,5
NaCl	5
agar	20
desztillált víz	1000 ml

Inokulum (burgonya kivonat-glükóz, PDB) tápközeg

5.táblázat: Az inokulum tápközeg összetétele

Összetevők	Mennyiség (g/l)
Burgonya kivonat- Glükóz tápleves por	2,4 g
Desztillált víz	100 ml

Fermentációs tápközégek

Az enzimermentáció hatékonyságát 5 különböző összetételű, szénforrásként búzakorpát tartalmazó tápközegben vizsgáltam (Fazilat *et al.* 2016, Mukthar *et al.* 2009, Siala *et al.* 2012, Namasivayam *et al.* 2010). A fermentációs tápközégek összetételét az alábbi 6. táblázat tartalmazza.

5.táblázat: Enzimermentáció során alkalmazott tápközégek összetétele

	A1	A2	A3	A4	A5
Búzakorpa	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
NaNO ₃	0,5 g	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	0,25 g	0,5 g	0,25 g	-	-
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,125 g	0,75 g	0,125 g	-	-
KCl	0,125 g	-	-	-	-
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,025 g	-	-	-	-
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,025 g	-	0,025 g	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,375 g	1,25 g	-	-
Urea	-	0,75 g	-	-	-
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	-	0,75 g	0,1 g	-	-
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	-	-	2 g	-	-
NaCl	-	-	0,075 g	-	-
Élesztőkivonat	-	-	-	5 g	-
Pepton	-	-	-	5 g	-
Kazein	-	-	-	5 g	-
Desztillált víz	250 ml	250 ml	250 ml	250 ml	250 ml

A fermentációs tápközégek kémhatását minden esetben pH 5 értékre állítottam be 0,1 N-os sósav oldattal. A tápközégeket 500 ml-es Erlenmeyer lombikokba osztottam szét: szubmerz, rázatott enzimermentáció esetén 250 ml-ként, míg a csökkentett nedvességtartamú fermentáció esetén 40 ml-ként. A tápközégek csíraamentesítése 121 °C-on 15 percen át történt. A kedvezőbb

eredményeket mutató fermentációs rendszer esetén szénforrásként egyéb mezőgazdasági melléktermékeket, mint búzaszalma, kukoricacsutka, sörtörköly és gyümölcs/zöldség rostállomány alkalmazhatóságát a búzakupával azonos mennyiségben is vizsgáltam.

4.3 Alkalmazott módszerek

4.3.1 Konídium szuszpenzió és inokulum készítése

A folyadéktenyészetek előállítása burgonyakivonat-glükóz táplevesben történt. Az átoltás során a szilárd PD agarlemezen fenntartott tenyészetből 2*2 cm részt távolítottam el lelángolt, steril szike segítségével, amelyet 0,001 %-os Triton-X oldatba vittem át és a konídiumok lemosódása érdekében steril üveggyöngyök jelenlétében rázattam. Az előkészített konídium szuszpenzióval oltottam be a PDB táplevest. A szubmerz tenyésztés rázóinkubátorban 28 ± 2 °C-on, 180 rpm rázatási sebességen, 72 órán át tartott.

4.3.2 Extracelluláris proteáz aktivitás screenelése

Az *Aspergillus* törzsek proteáz aktivitásának kimutatására egy igen gyors és egyszerű módszert, az 1 (m/v) %-ban kazeint tartalmazó agarlemezekben történő screenelési technikát alkalmaztam (Vijayaraghavan *et al.* 2013). Az agarlemezekbe fúrt mélyedésekbe a törzstenyészetekből előkészített konídium szuszpenziót 20 µl mennyiségben pipettáztam steril körülmények között, lamináris fülke alatt. A leoltott agarlemezek inkubálása 28 ± 2 °C-on, 3-4 napon át tartott. Az inkubálást követően a fonalgomba telepek körül megjelenő feltisztulási zóna a kazein bontására és bontásának mértékére utalt. Az agarlemezeket brómkrezol zöld indikátoroldattal árasztottam el (0,56 m/v % borostyánkősav, 0,1 m/v % NaOH, 0,028 m/v % brómkrezol zöld), majd 20-30 percet követően az agarlemezeket desztillált vízzel lemostam és azokat egy éjszakán át szobahőmérsékleten szárítottam. Az indikátoroldat színváltozása rámutatott arra, hogy a termelő törzseket savas, neutrális, esetleg alkalikus proteáz termelése jellemezte.

4.3.3 Enzimfermentációs technikák

A szelektált termelő törzs savas proteáz termelését, a termelés hatékonyságát 5 különböző összetételű fermentációs tápközegekben és két különböző technika: a szubmerz, rázatott (SmF) és a csökkentett nedvességtartalmú (SSF) enzimfermentáció alkalmazásával követtem nyomon. Szénforrásként cellulózban gazdag növényi maradványokat: búzakupát, búzaszalmát, kukoricacsutkát, sörtörkölyt és gyümölcs/zöldség rostállományt alkalmaztam.

Az enzimermentációt minden esetben 5 (v/v) % szubmerz tenyészet beoltásával indítottam el lamináris fülke alatt. A fermentációs tápközegeket 28 ± 2 °C -os termosztátba helyeztem. Az SmF eljárásnál a fermentációs közegeket 180 rpm sebességen rázattam. A mintavételezés a 48., a 72., a 96. és a 168. órában történt. Az SmF fermentáció tápközegeiből ekkor 5 ml mintát vettem és azokat a kémhatás és az enzimaktivitás mérése előtt szűrőpapíron átszűrtem. Az SSF eljárásnál az adott mintavételi naphoz tartozó lombik tartalmát 40 ml desztillált vízben 1 órán át 200 rpm sebességen rázattam, ezáltal segítettem elő a termelt enzimek rostokról történő lemosását. Az enzimaktivitás mérése előtt a mintákat szintén szűrőpapíron szűrtem át.

4.3.4 Központi elrendezésű kísérlettervezés

A szelektált törzs savas proteáz enzimermelésének optimalizálását központi elrendezésű kísérlettervezési módszerrel (CCD) és válaszfelület analízissel (RSM) végeztem el. A kísérletsorozat során arra kerestem a választ, hogy az enzimaktivitás profil alakulására milyen hatást fejt ki a gyümölcs/zöldség rostállomány (szubsztrátum) (Faktor 1), valamint a kazein (induktor) (Faktor 2) mennyiségének változtatása. Az alábbi 7. táblázat a faktorkombinációk kódolt szint értékeit és a tényleges koncentrációkat tartalmazza.

7.táblázat: A munkapontokhoz tartozó zöldség/gyümölcs rostállomány és kazein

Mintasám	Faktor 1	Faktor 2	Gyümölcs/Zöldség rostállomány (g/100ml)	Kazein (g/100ml)
1.	$-\sqrt{2}$	0	1,48	1,5
2.	-1	1	2,5	2
3.	0	$\sqrt{2}$	5	2,21
4.	1	1	7,5	2
5.	$\sqrt{2}$	0	8,5	1,5
6.	1	-1	7,5	1
7.	0	$-\sqrt{2}$	5	0,8
8.	-1	-1	2,5	1
9.	0	0	5	1,5
10.	0	0	5	1,5

A munkapont (centrumpont) gyümölcs/zöldség rostállomány esetén 5 (m/v), kazein esetén 1,5 (m/v) %, míg a lépték gyümölcs/zöldség rostállomány esetén 2,5 (m/v) %, kazein esetén 0,5 (m/v)% volt.

Az eredményeket STATISTICA program segítségével értékeltem. A hatásfelület ábrázolására a következő modellt használtam:

$$Y = a_0 + a_1x + a_2x^2 + a_3y + a_4y^2 + a_5xy$$

ahol: Y: proteáz aktivitás

a_{1-5} : regressziós együtthatók

x: gyümölcs/zöldség rostállomány koncentráció

y: kazein koncentráció

4.3.5 Extracelluláris proteáz enzimaktivitás mérés

Az enzimaktivitás méréséhez 1,5 (m/v) %-os kazein oldatot készítettem. A kazeint két különböző pufferben: 10 mM glicin-HCl pufferben (pH=2,5-4 tartomány) és 10 mM citrát-foszfát pufferben (pH 4,5-6 tartomány) oldottam fel. A kazein oldódása érdekében az oldatokat 30 percen át 80 °C-os vízfürdőben inkubáltam. A reakció indításánál 250 µl kazein oldathoz 250 µl enzimoldatot pipettáztam. Az egységvak mintákhoz 1,5 ml 5 (m/v) %-os TCA (triklór-ecetsav) oldatot adtam az enzimoldatot megelőzően, ezzel az enzimes reakciót állítottam le. A reakció 30 percen át 28±2 °C-os vízfürdőben történt. A reakció végén az elegyekhez (egységvak minta kivételével) 1,5 ml TCA oldatot adtam. 10 perc pihentetést (vízfürdőben) követően 1,5 ml mennyiségeket Eppendorf csövekbe mértem át és azokat 14000 rpm sebességen, 10 percen át centrifugáltam. A következő lépésben 0,5 ml felülúszóhoz 1,5 ml 50 mM Na₂CO₃ oldatot, valamint 0,5 ml háromszoros hígítású Folin-Ciocalteu reagenst adtam. A kémcsöveket ismét 30 percre, 28±2 °C-os vízfürdőbe helyeztem. A reakció végén a mintákat küvettákba pipettáztam át és az abszorbanciájukat spektrofotométer segítségével (UNICAM Helios γ), 660 nm-en mértem le (Ire *et al.* 2011). Az alábbi egyenlet alapján számítjuk ki az aktivitás értékeket mintánként.

$$Aktivitás \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{(AMinta - AEnzimvak - Aszubsztrátvak) * Vreakció}{x * treakció * Vminta} * h$$

ahol,

$V_{reakció}$: a reakcióelegy térfogata (ml)

x: a felszabadított termék (L-tirozin) kalibrációs egyenesének meredeksége (1,1 mM

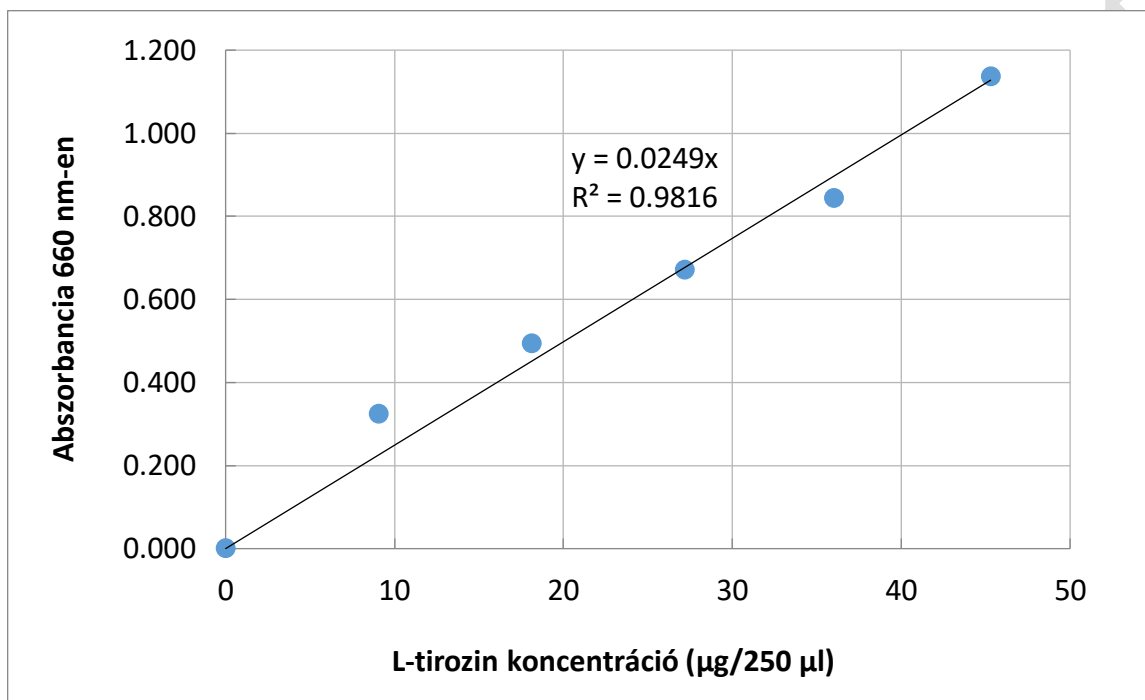
L-tirozin törzsoldatra készítettem standard sorozatot esetén)

$t_{reakció}$: reakció időtartama (perc)

V_{minta} : a minta (enzimoldat) térfogata (ml)

h: a minta hígítási faktora

A kalibráció felállításához 1,1 mM L-tirozin törzsoldatot használtam. A 250 µl hígított törzsoldathoz 250 µl desztillált vizet, 1,5 ml 0,5 M Na₂CO₃ oldatot, valamint 500 µl háromszoros hígítású Folin-Ciocalteu reagenst adtam. Az oldatok abszorbanciáját 660 nm-en, spektrofotométerrel mértem. A koncentrációk függvényében ábrázolt abszorbancia értékekre regressziós egyenest illesztettem. A függvény meredekségének ismeretében az enzimaktivitásokat számítottam.



3.ábra: L-tirozin kalibrációs egyenese

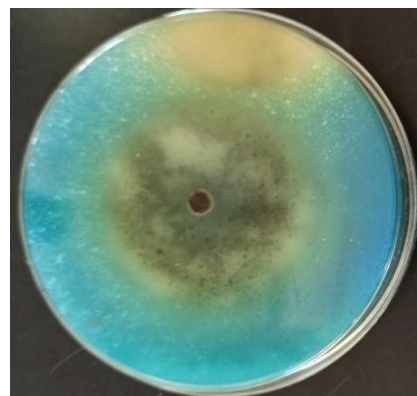
5 KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 Savas proteáz aktivitás screenelése

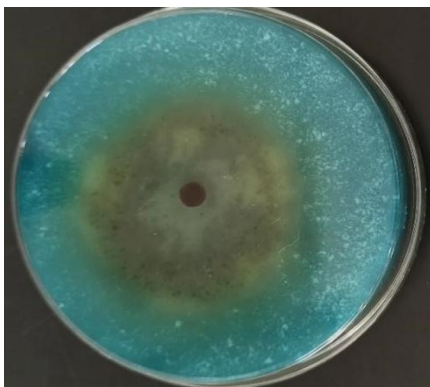
Mind a 8 mezofil fonalagomba törzs egyedüli szénforrásként a kazeint hasznosította, azonban annak mértékében eltéréseket mutattak. Az alábbi 4.ábra a gyors screenelési technika eredményeit szemlélteti $28 \pm 2^\circ\text{C}$ -on, 24 órás inkubálást követően.



Aspergillus niger F.00632



Aspergillus brasiliensis F.00892



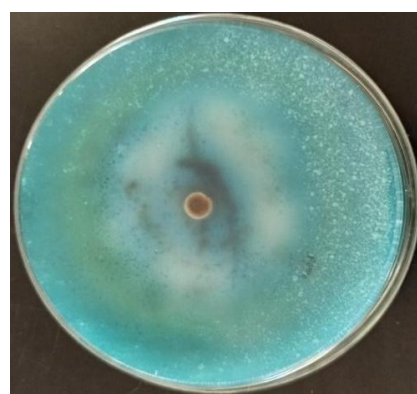
Aspergillus niger F.00735



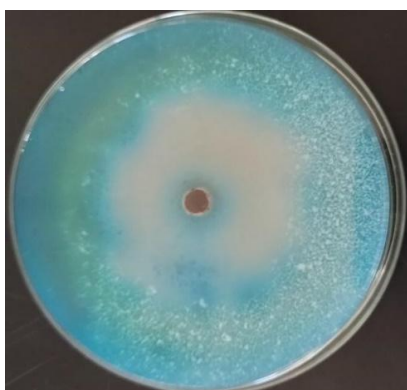
Aspergillus niger F.00714



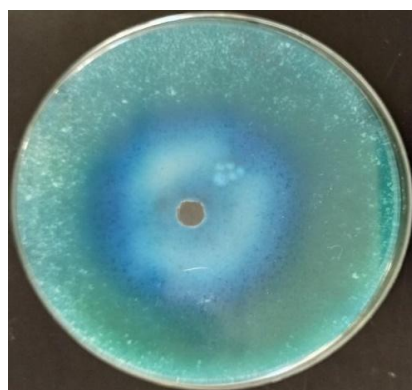
Aspergillus awamori F.00721



Aspergillus niger IMI 303386



Aspergillus awamori F.00030



Aspergillus awamori F.00720

4.ábra: *Aspergillus* törzsek proteáz aktivitásának gyors screenelése kazein tartalmú agarlemezen

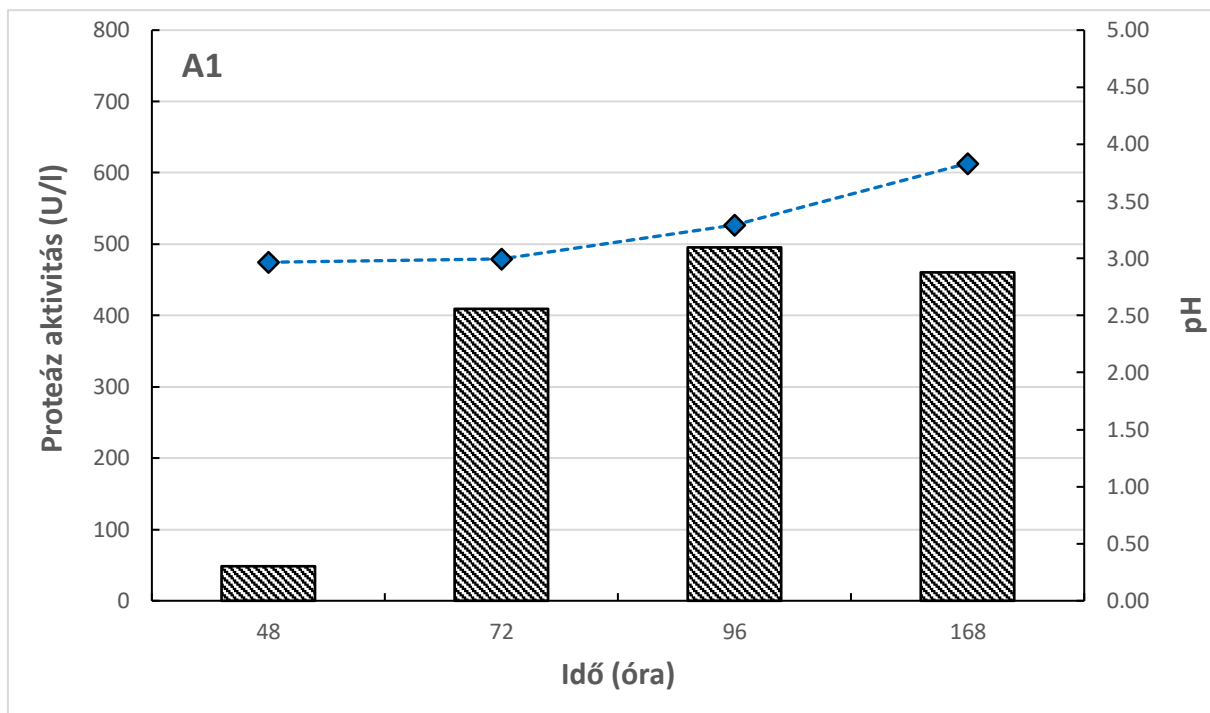
A screenelési eljárás során az *Aspergillus niger* F.00632 és F.00735 törzset, valamint az *Aspergillus brasiliensis* F.00892 törzset erősebb növekedés jellemzett, amelyeket az *Aspergillus niger* F.00714, F.00721, IMI 303386, végezetül az *Aspergillus awamori* F.00030 és F.00720 törzs követett. A tenyészetek körül nagyobb feltisztulási zónát, tehát erősebb proteolitikus aktivitást azok a törzsek mutattak, amelyek micéliumaikkal az agarlemezeket gyorsabban átszőtték. A termelt proteázok többsége erősen savas tartományban fejtette ki az aktivitását, ezen esetekben az agarlemezbe diffundált BCG indikátor színe sárgára (pH=2-3,5) változott. Az *Aspergillus awamori* F.00720 törzs esetén a BCG indikátor kék színt jelzett, ami az enyhén savas proteáz (pH=5-6), esetleg neutrális proteáz (pH>6) termelésére utal (de Souza *et al.* 2015, Pilli *et al.* 2016).

5.2 Különböző enzimfermentációs technikák hatása

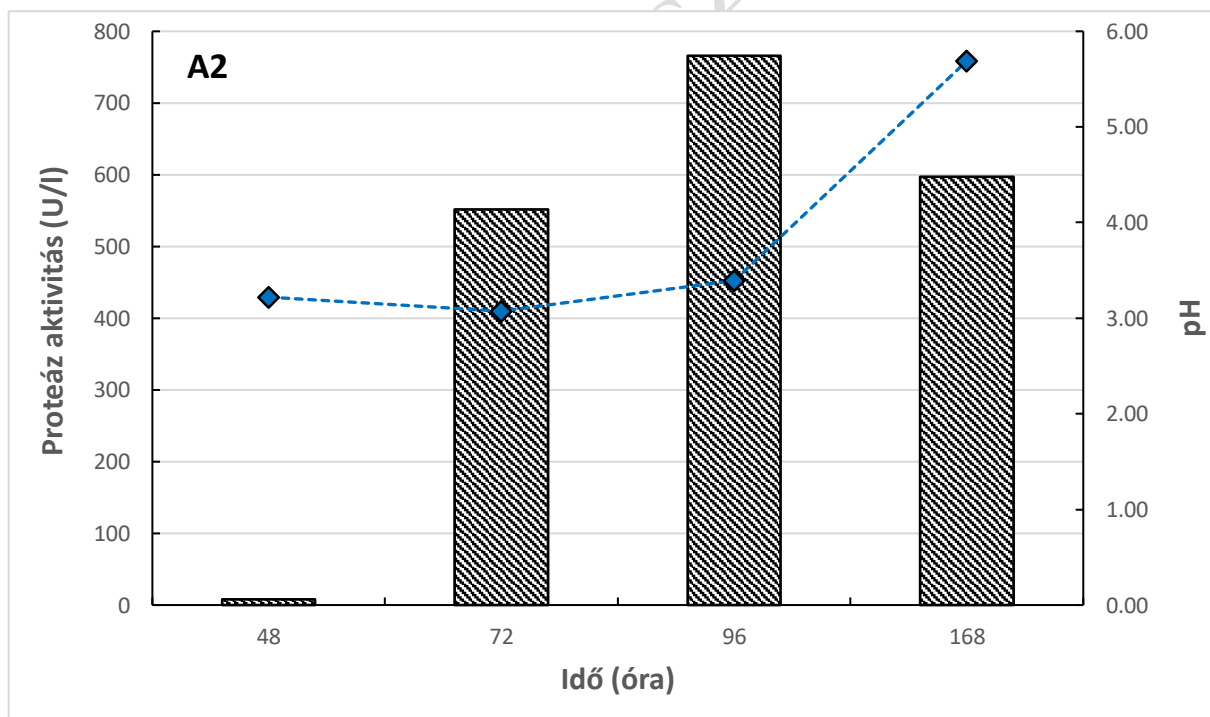
A screenelés eredményei alapján előszelektált *Aspergillus niger* F.00632 törzs extracelluláris proteáz termelését szubmerz, rázatott rendszerekben, valamint csökkentett nedvességtartalmú rendszerekben követtem nyomon. A törzs enzintermelési profiljának jobb megismerése érdekében mind a két fermentációs eljárásnál különböző összetételű tápközegek hatását is tanulmányoztam.

5.2.1 Szubmerz enzimfermentáció

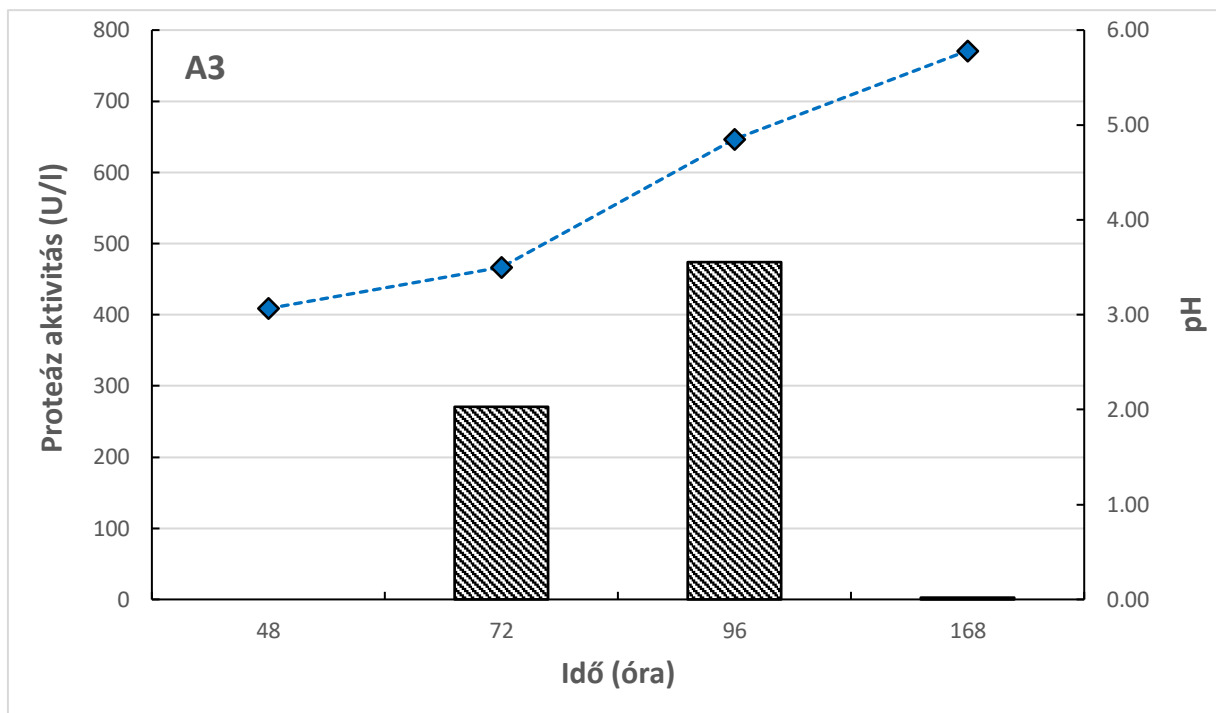
A szerves és szervetlen természetű szubmerz, rázatott rendszerek az *Aspergillus niger* F.00632 törzs extracelluláris proteáz termelésére és aktivitására eltérő mértékben fejtették ki hatásukat.



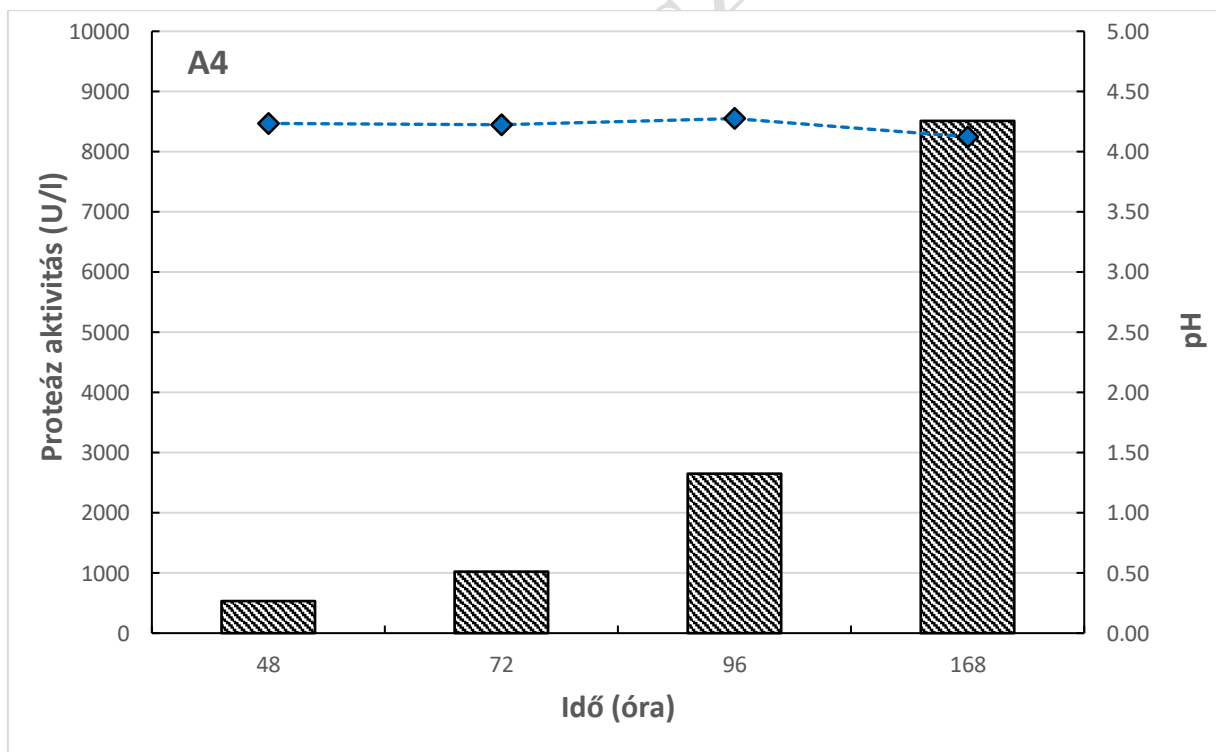
5. ábra: Az A1 tápközeg összetételének hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szubmerz, rázatott rendszerben (28 ± 2 °C, 180 rpm)



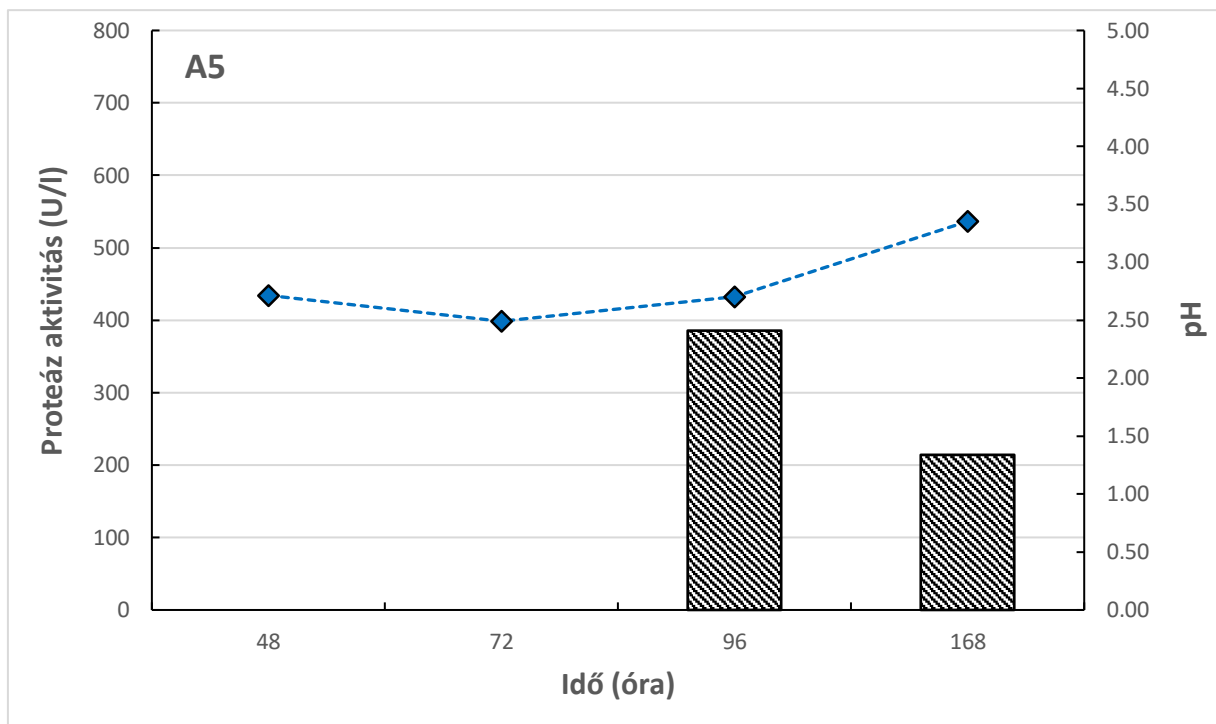
6. ábra: Az A2 tápközeg összetételének hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szubmerz, rázatott rendszerben (28 ± 2 °C, 180 rpm)



7. ábra: Az A3 tápközeg összetételének hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szubmerz, rázatott rendszerben (28 ± 2 °C, 180 rpm)



8. ábra: Az A4 tápközeg összetételének hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szubmerz, rázatott rendszerben (28 ± 2 °C, 180 rpm)



9. ábra: Az A4 tápközeg összetételének hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szubmerz, rázatott rendszerben (28 ± 2 °C, 180 rpm)

Az alábbi 5., 6., 7., 8. és 9. ábra a fermentációs közegek enzimettermelésre gyakorolt hatását és pH alakulását szemlélteti a 168 órás inkubációs időtartam alatt. Kedvezőbb enzimszintézist kazein jelenlétében, az A4 tápközeg esetén értem el, ekkor az enzimaktivitás az enzimfermentáció 168. órájára meghaladta a 8000 U/l egységet. A termelő törzs a 96. órától kezdődően mutatott lényeges enzimaktivitás növekedést, míg az A1, A2, A3 és A5 tápközegekben az aktivitás értékek már előbb, jellemzően az enzimfermentáció 72. és 96. órája között tetőztek. Ezeknél a rendszereknél azonban a mért aktivitások csupán 386 U/l és 766 U/l között alakultak. A savas proteáz aktivitás az A1 tápközegben 495 U/l, az A2 tápközegben 766 U/l, az A3 tápközegben 474 U/l, az A5 tápközegben 386 U/l volt. Az eredmények alapján elmondható, hogy amennyiben egyedüli tápanyagként búzakorpát tartalmazott a szubmerz, rázatott rendszer (A5 tápközeg), a termelő törzs egyéb hidrolitikus aktivitásának köszönhetően az összetett, növényi szerkezet bontása során a fehérjetermészetű anyagok hozzáférhetősége javult, ami a proteázok szintézisét segítette elő. A szervetlen komponensek adagolása (A1 és A3 tápközeg) a termelő törzs teljesítményére jelentősebb hatást nem fejtett ki, míg a szerves nitrogénforrás, az urea jelenléte (A2 tápközeg) részben növelte, a csak szerves komponensek és a kazein jelenléte (A4 tápközeg) pedig több mint tízszeresére növelte a savas proteáz aktivitást.

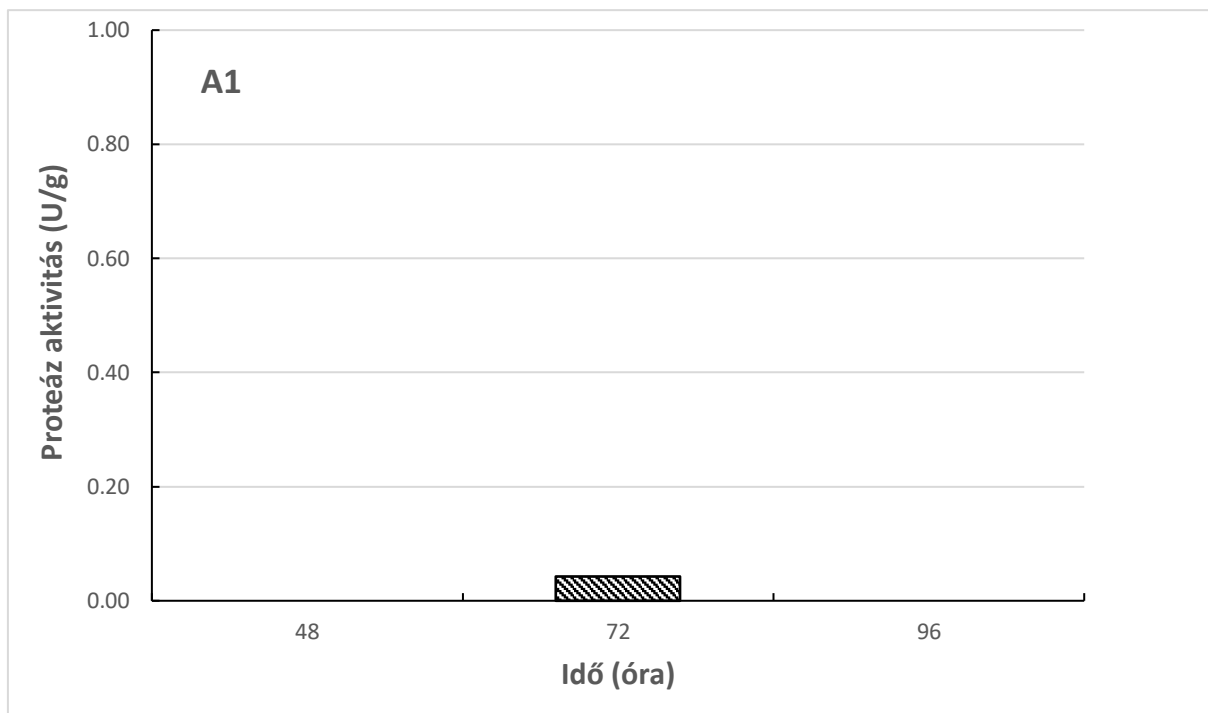
A savas proteázok jellemzően inaktív formában termelődnek és a kiválasztódást követően a savas környezetben aktíválódnak. A fermentációs profilokon a szubmerz rendszerek kémhatása és a savas proteáz termelés dinamikája közötti összefüggés igen jól látható, ugyanis a termelő törzs savas proteáz aktivitását a pH 3 és pH 4 közötti tartomány segítette. A termelő törzs metabolikus aktivitása során a tápközegek kémhatása, ez alól az A4 és A5 tápközeg kivétel, jellemzően az enyhén savas, közel semleges pH tartományba tolódott, pH 5 felett pedig a savas proteáz aktivitás nagymértékben csökkent.

Gnanadoss és Devi (2015) az *Aspergillus flavus* LCJ253 és az *Aspergillus nidulans* LCJ249 törzs savas proteáz termelését követték nyomon különböző összetételű szubmerz rendszerekben, amely során szintén szerves természetű tápközeg, amely 5 g/L élesztőkivonatot, 5 g/L peptont, 10 g/L glükózt és 20 g/L kazeint tartalmazott, eredményezett nagyobb aktivitás értéket. Az enzimtermelést pH 7 értéken, 30 °C és 120 rpm rázatási sebességen indították el. Az enzimhozam optimalása során az *A. nidulans* LCJ249 törzs 20 g/L glükózt, 15 g/L maláta kivonatot és 5 g/L kazeint, míg az *A. flavus* LCJ253 törzs 20 g/L keményítőt, 20 g/L peptont és 15 g/L kazeint tartalmazó fermentációs rendszerben elérte a 2000-2500 U/l körüli értéket.

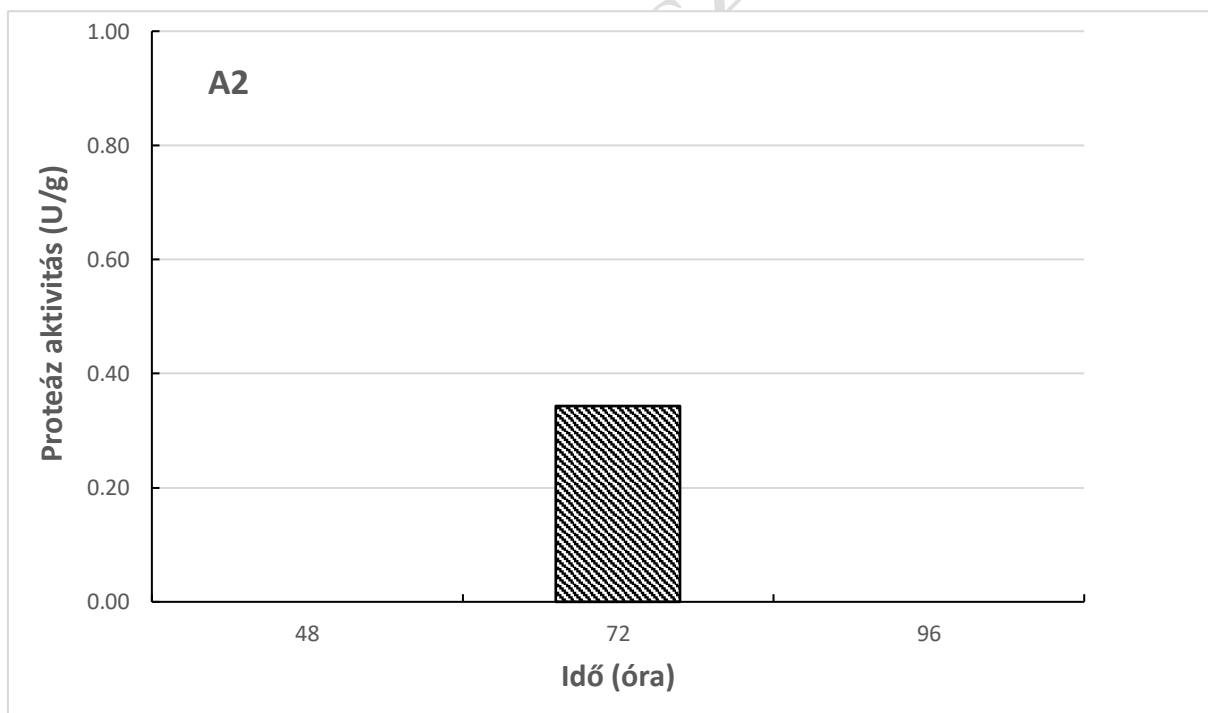
5.2.2 A szilárd fázisú enzimfermentáció

A szilárd fázisú enzimfermentáció során a szerves és szervesetlen tápoldatokkal nedvesített búzakorpa szubsztrátumon az *Aspergillus niger* F.00632 törzs extracelluláris proteáz aktivitásának profilját az 10., 11., 12., 13. és 14. ábra szemlélteti.

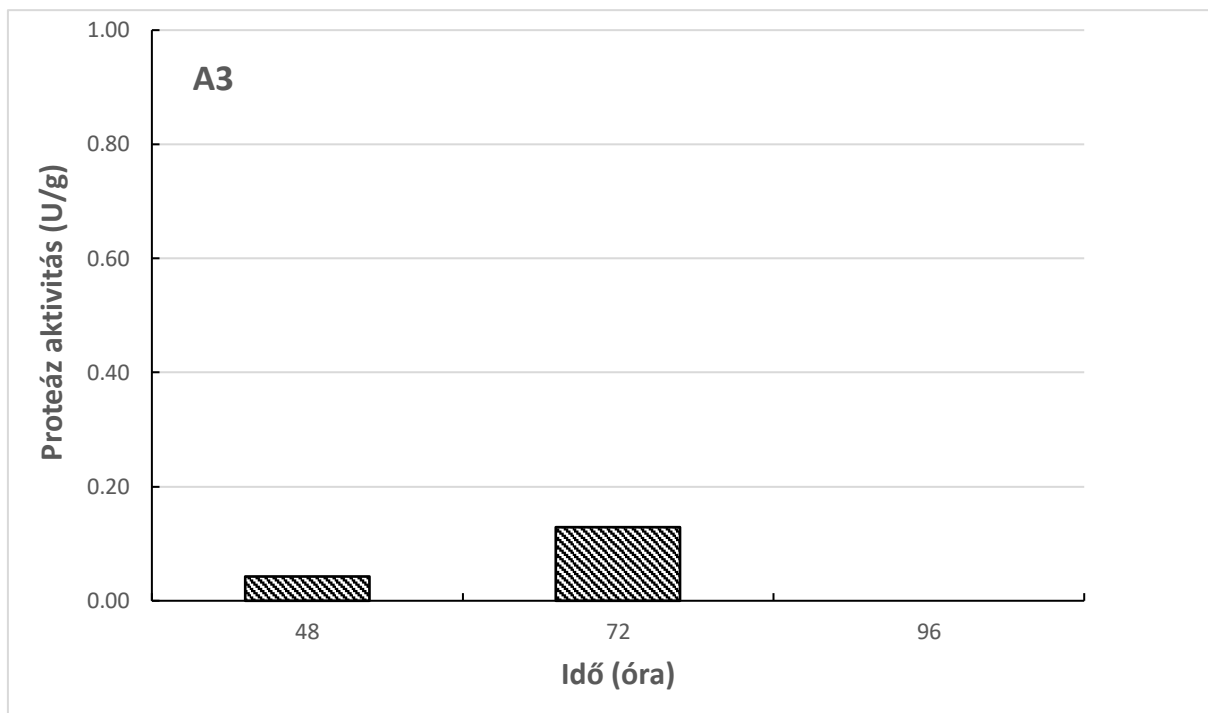
A búzakorpa 1:5 arányban történő nedvesítésének eredményeként szintén az A4 tápoldat esetén mértem lényegesen nagyobb aktivitás értéket. Az enzimaktivitás a 72. órától volt kimutatható és 96. órában elérte a 48 U/g értéket. Ezzel szemben az A1, A2, A3 és az A5 tápoldatban az aktivitás értékek igen alacsony értéken mozogtak, ezekben az esetekben csupán 0,13 és 0,34 U/g értéket mértem a csökkentett nedvességtartalmú rendszerekben az inkubáció 48. és a 72. órája között. A csökkent aktivitás értékek szintén arra utalnak, hogy a szervesetlen természetű nitrogénforrások komponensek nem megfelelő szinten álltak rendelkezésre, esetleg a könnyebb hasznosítás során az enzimtermelést gátolták és más metabolikus utak kerültek előtérbe.



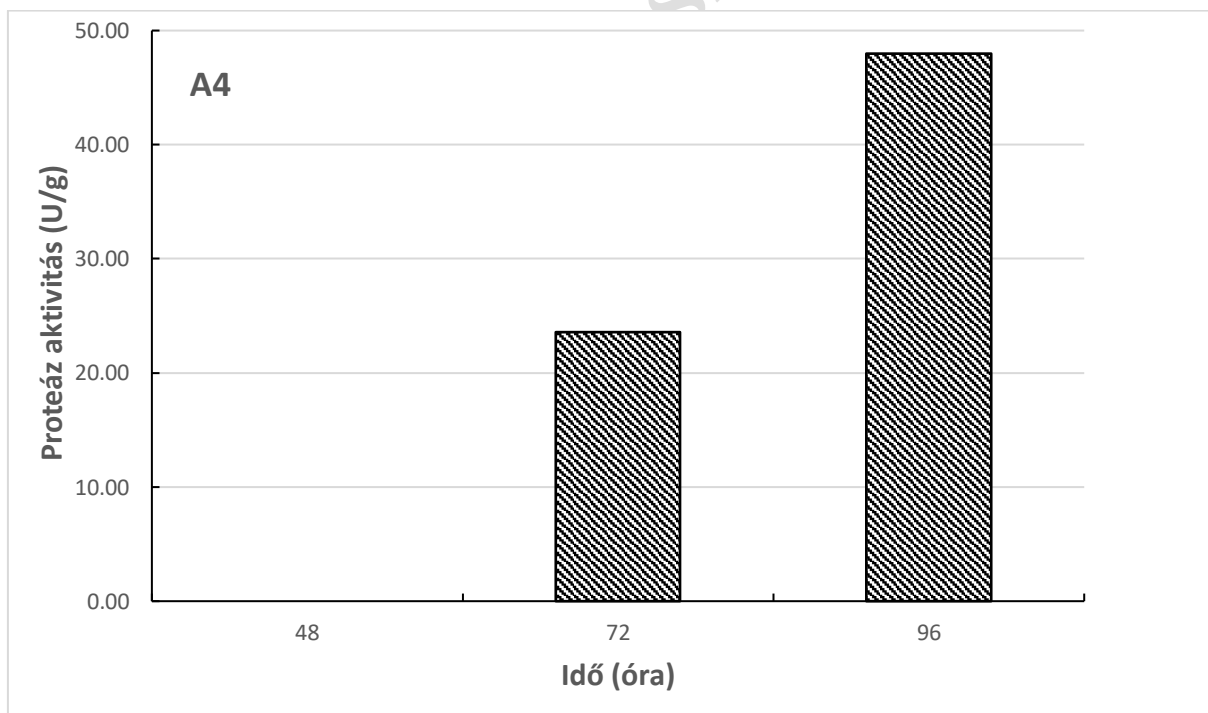
10. ábra: Az A1 tápközeg összetételének hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szilárd fázisú rendszerben (28 ± 2 °C)



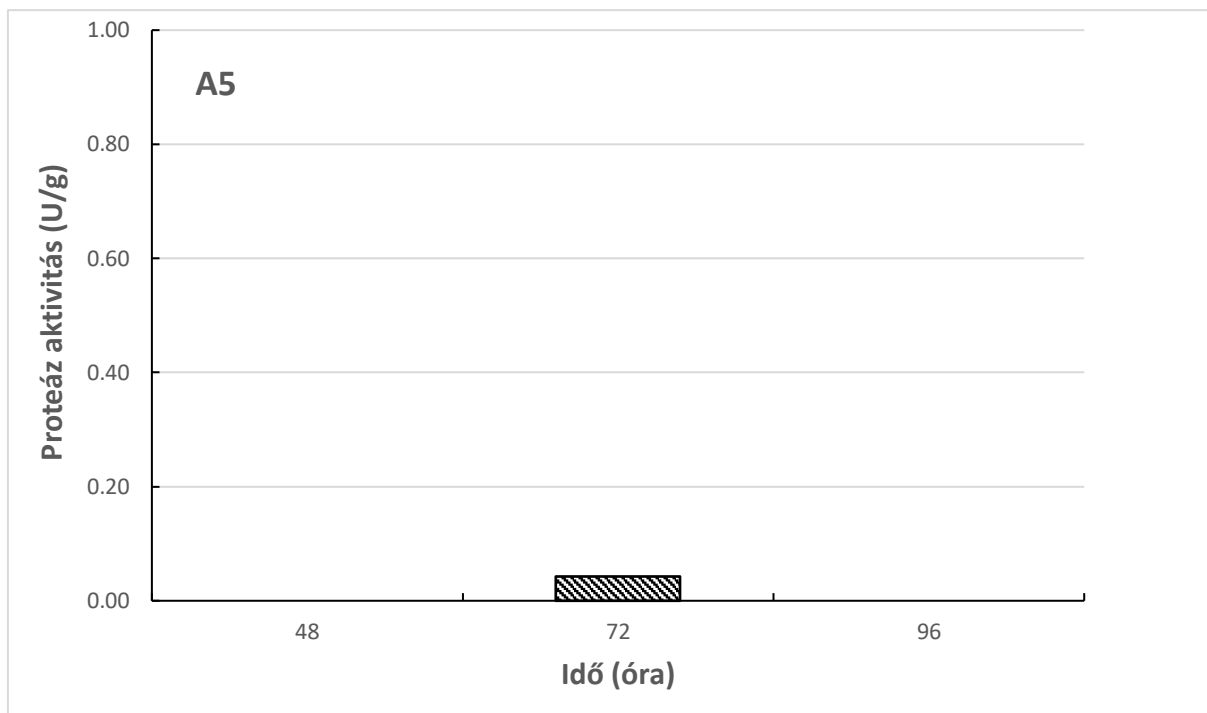
11. ábra: Az A2 tápközeg összetételének hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szilárd fázisú rendszerben (28 ± 2 °C)



12. ábra: Az A3 tápközeg összetételének hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szilárd fázisú rendszerben (28 ± 2 °C)



13. ábra: Az A4 tápközeg összetételének hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szilárd fázisú rendszerben (28 ± 2 °C)

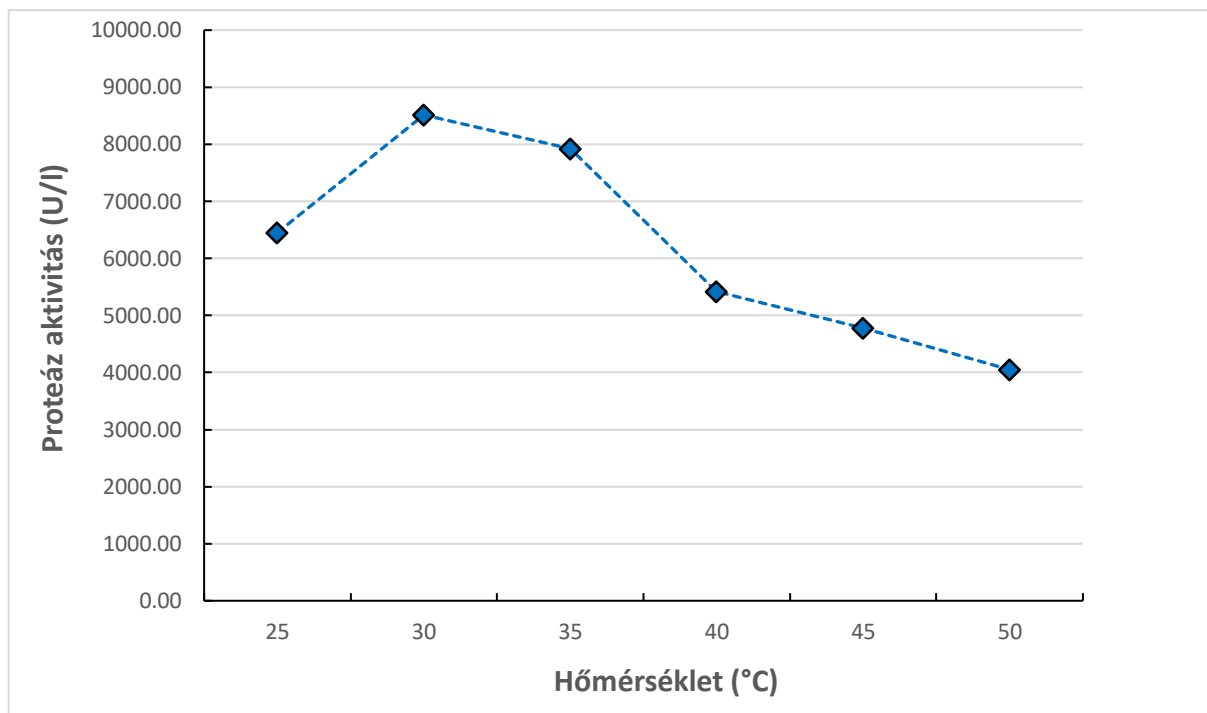


14. ábra: Az A5 tápközeg összetételének hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szilárd fázisú rendszerben (28 ± 2 °C)

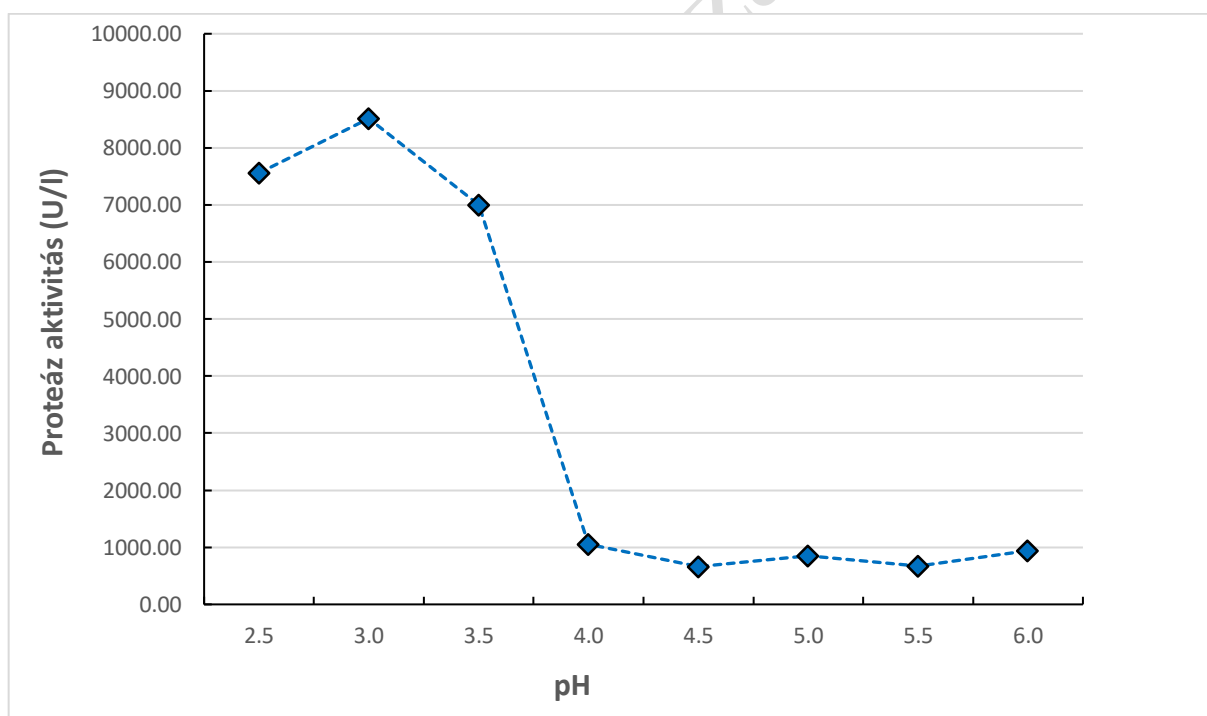
Mukhtar és munkatársai (2009) az *Aspergillus niger* IHG9 törzs proteáz termelését vizsgálták különböző agro-ipari maradványokon, csökkentett nedvességtartalmú rendszerekben. A szubsztrátum nedvesítése 1:1 arányban történt, az enzimfermentáció pedig 30 °C-on, 120 órán át tartott. Abban az esetben értek el növelt aktivitást, amikor napraforgóliszt és búzakorpa keveréken (1:1) indították el az enzimfermentációt. Ekkor a savas proteáz aktivitás elérte a 6 U/g értéket. Nitrogénforrás pótlásként a rendszer húskivonatot is tartalmazott, ami hozzájárult az enzimszintézis növekedéséhez. Az aktivitás a 72. órában tetőzött, ekkor 30 °C-on és pH 4,5 értéken elérte a 8,5 U/g értéket.

5.3 Környezeti tényezők hatása a savas proteáz aktivitására

A továbbiakban az enzimaktivitás mérés optimum hőmérsékletét és kémhatását térképeztem fel, ahol a hőmérsékletet 25-50 °C között 5 °C léptékekkel, a kémhatást pedig pH 2,5-6 tartományban 0,5 léptékekkel emeltem. Az alábbi 15. ábra a hőmérséklet hatását, a 16. ábra a kémhatást szemlélteti. Az aktivitásmérésnél minden esetben az A4 szubmerz, rázatott rendszer 96. órás szűrt fermentlevét használtam.



15.ábra: A savas proteáz aktivitás hőmérséklet optimuma (pH 3, glicin-HCl puffer)



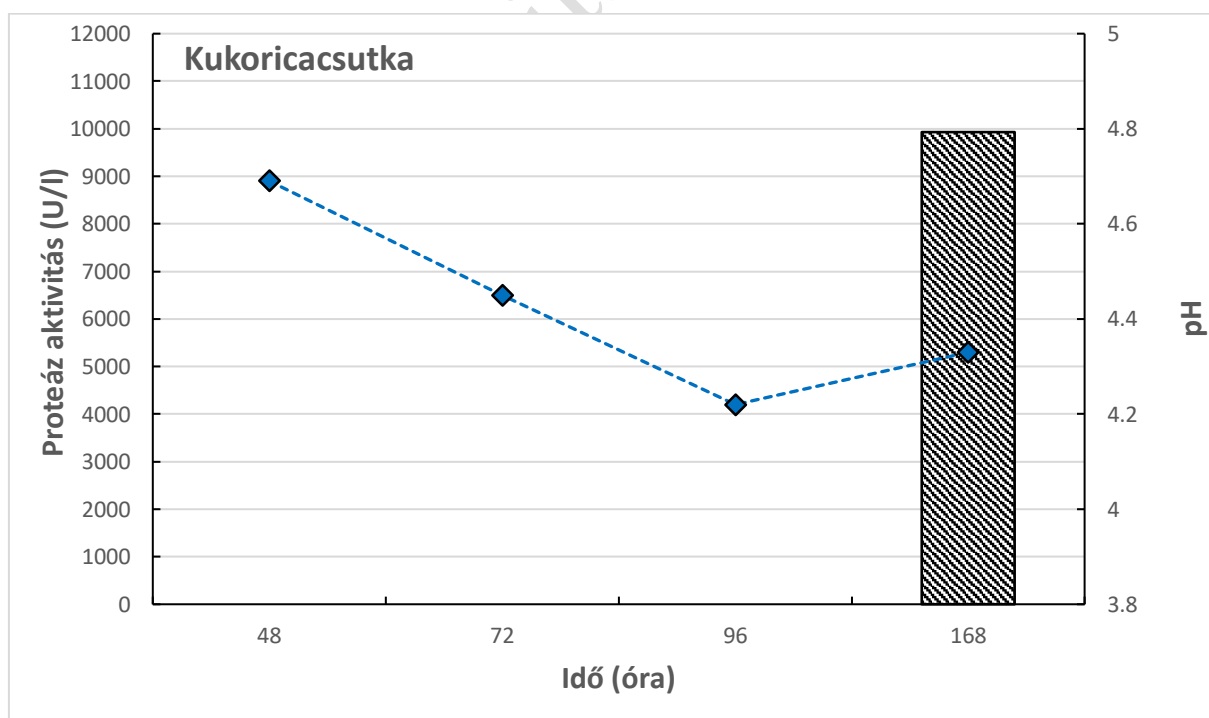
16.ábra: A savas proteáz aktivitás pH optimuma (30 °C, glicin-HCl puffer)

A savas proteáz az enzimfermentációs körülmények között, 30-35 °C közötti hőmérséklet tartományban és pH 2,5-3,5 tartományban mutatott nagyobb aktivitást. A hőmérséklet és a kémhatás csökkentése, valamint növelése a savas proteáz aktivitásnak nem kedvezett. Chimbekujwo és munkatársai (2020) az *Aspergillus brasiliensis* JC-A3 törzs proteáz

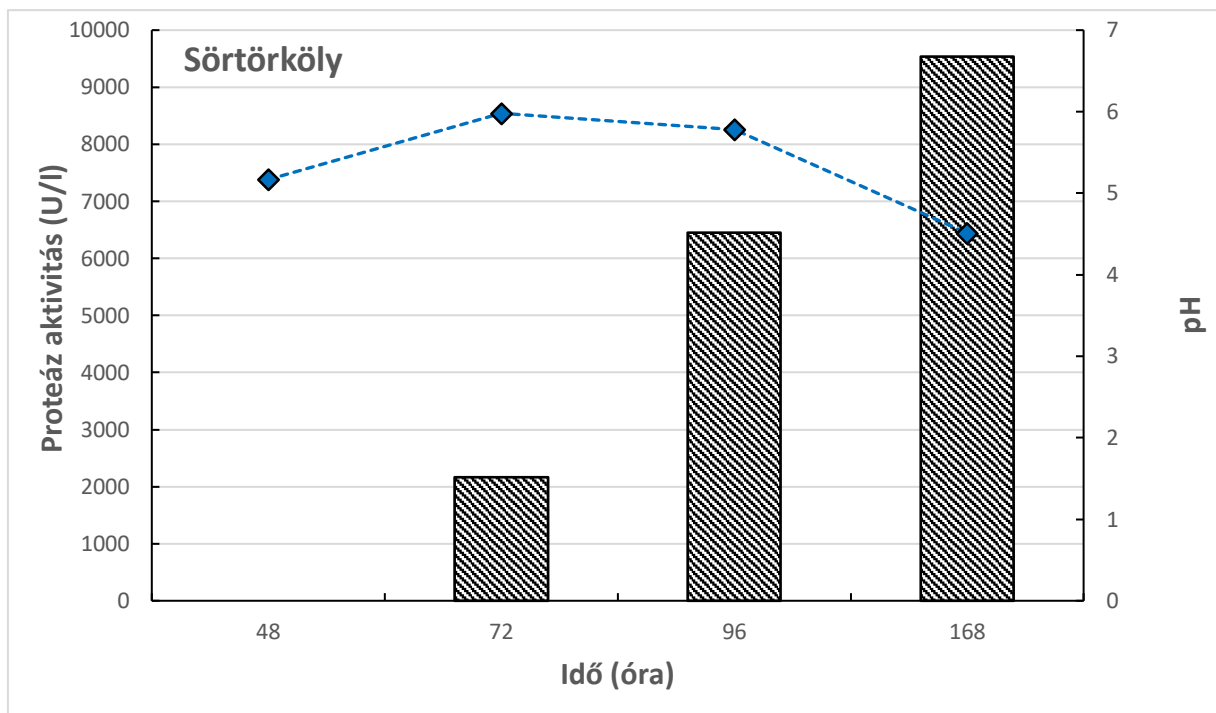
enzimaktivitásának optimális tartományait vizsgálták, amely során kedvezőbbnek a 30-40 °C és a pH 4-6 közötti tartomány mutatkozott. Tremacoldi és munkatársai (2004) az *Aspergillus clavatus* izolátum esetén az általam vizsgált törzshöz hasonló hőmérséklet tartományt írtak le, azonban esetükben a még savasabb kémhatású környezet (pH 2) eredményezett nagyobb aktivitást. Siala és munkatársai (2012) az *Aspergillus niger* I1 esetén 50°C-on és pH 4 értéken érték el maximális savas proteázaktivitást.

5.4 Alternatív szénforrások hatása

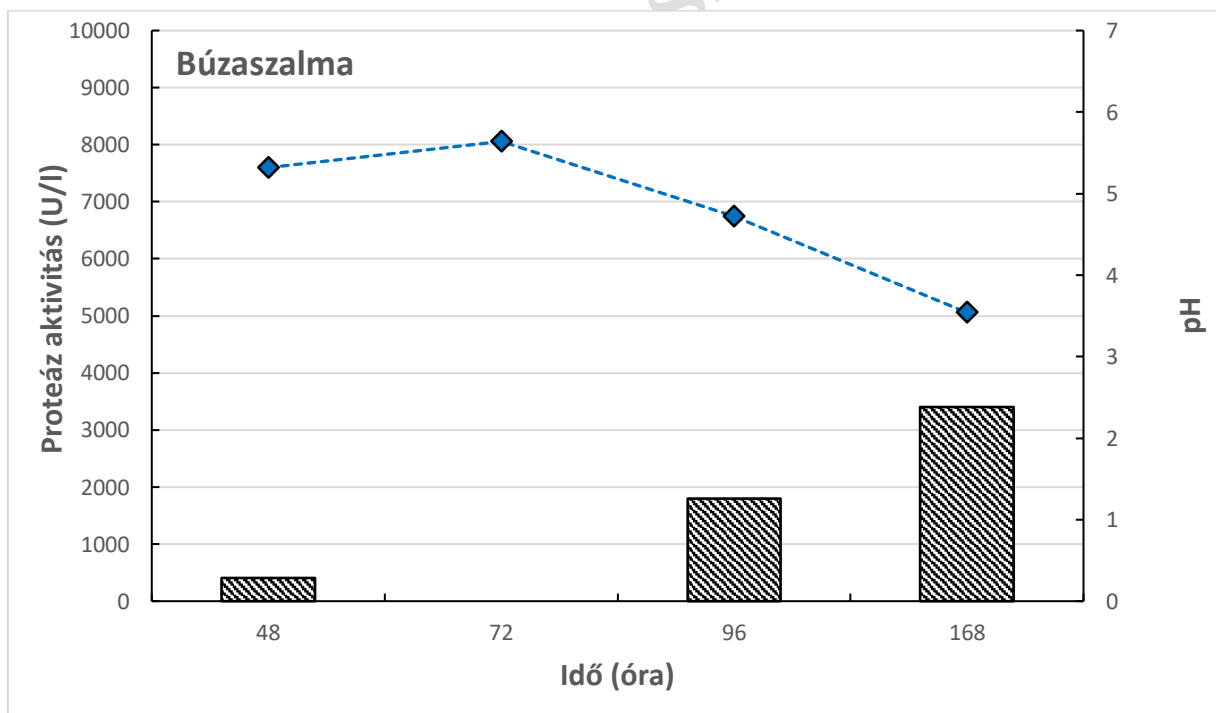
A továbbiakban a szelektált termelő törzs aktivitásprofiljait cellulózban gazdag agroipari maradványokon: kukoricacsutkán, sörtörkölyön, búzaszalmán és gyümölcs-zöldség rostállományon követtem nyomon, A4 alaptápközeget tartalmazó szubmerz, rázatott rendszerekben. Az alábbi 17., 18., 19. és 20. ábra szemlélteti az aktivitás és a pH alakulását. A búzaszalma kivételével a többi szubsztrátumon a búzakupán mutatott aktivitásoktól nagyobb aktivitásokat sikerült elérnem. Ennek oka lehet a növényi maradványok eltérő összetétele, valamint az is, hogy a búzaszalmát durva őrlemény formájában, míg a kukoricacsutkát, sörtörkölyt finom őrlemény formájában, a gyümölcs-zöldség rostállományt pépesítést követően hasznosítottam, ami az értékes anyagok hozzáférhetőségét lényegesen befolyásolta.



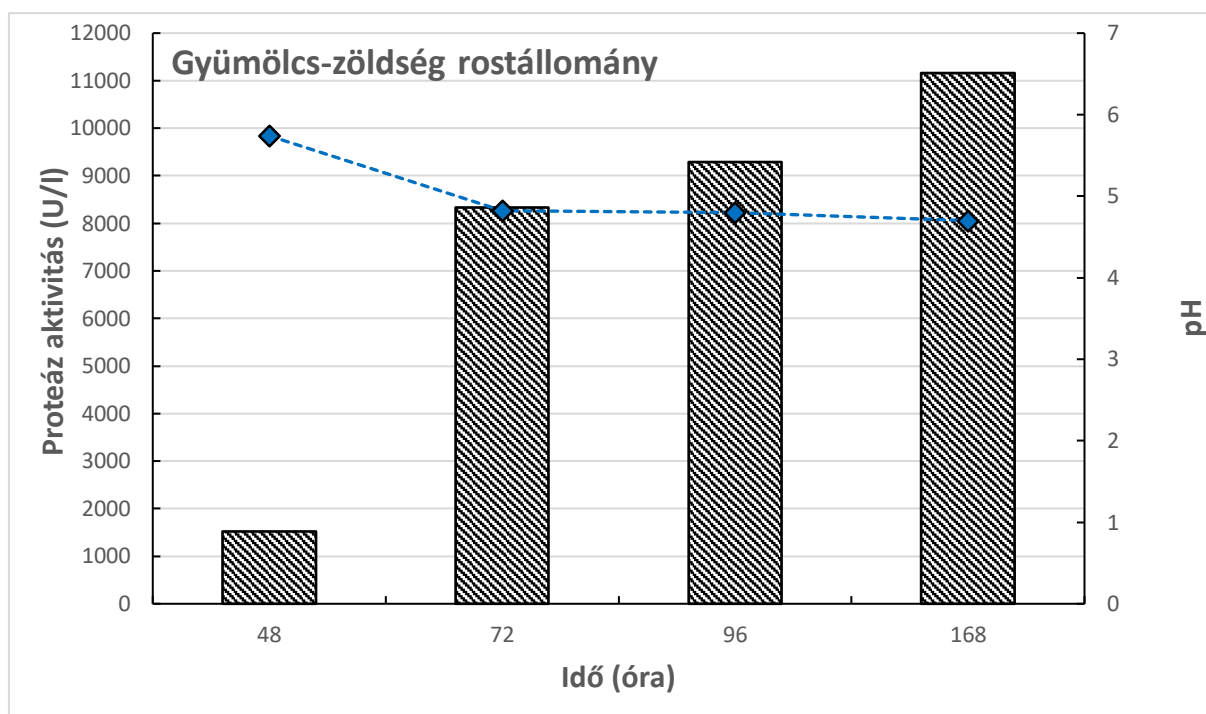
17. ábra: A kukoricacsutka hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szubmerz, rázatott rendszerben (A4, 28±2 °C)



18. ábra: A sörtörköly hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szubmerz, rázatott rendszerben (A4, 28 ± 2 °C)



19. ábra: A búzaszalma hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szubmerz, rázatott rendszerben (A4, 28 ± 2 °C)



20. ábra: A gyümölcs-zöldség rostállomány hatása a savas proteáz aktivitás alakulására, szubmerz, rázatott rendszerben (A4, 28 ± 2 °C)

Az eredmények alapján a növényi maradványokat rangsoroltam, ezáltal kedvezőbbnek a gyümölcs-zöldség rostállomány bizonyult, amelyet a kukoricacsutka, a sörtörköly és a búzaszalma követett. A gyümölcs-zöldség rostállomány hatására már a 48. órában mértem aktivitást, amely a 72 órára elérte a 8300 U/l értéket, a 168. órára pedig 11000 U/l értéken tetőzött. A kukoricacsutka esetén csak a 96. órát követően mértem aktivitást, ekkor az közelítette a 10000 U/l értéket. A sörtörköly esetén a 72. órától mutattam ki a savas proteáz jelenlétét, amely az enzimfermentáció végén 9500 U/l körül alakult. A búzaszalma esetén a 168. órában ezzel szemben közel háromszor kisebb aktivitást mértem.

A szubmerz rendszerekben a kémhatás pH 5 értékről egyedül a kukoricacsutka esetében csökkent le nagyobb mértékben, ekkor a fermentáció végén pH 3,5 érték volt. A többi szubsztrátum esetén kémhatás a fermentáció végén pH 4,3-4,7 között alakult.

5.5 Szubmerz és szilárd fázisú fermentáció összehasonlítása

Az összetett növényi erőforrásokat csökkentett nedvességtartalom mellett indított fermentációs rendszerekben is teszteltem. Ezekben az esetekben is a nedvesítési arány a korábban búzakorpán indított enzimtermeléshez hasonlóan, 1:5 arányban történt. Az alábbi 8. táblázat a termelő törzs teljesítményét szemlélteti.

8.táblázat: A szubmerz és szilárd fázisú fermentációk teljesítményének összehasonlítása

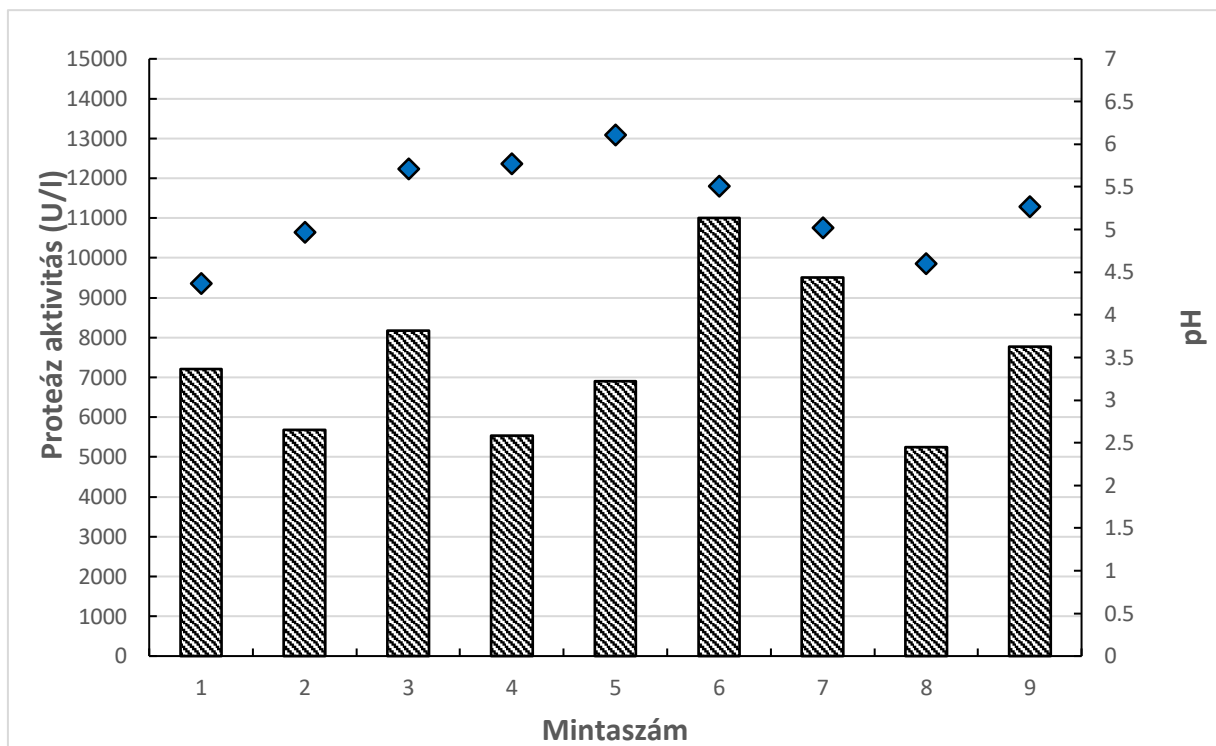
Szubsztrátum	Proteáz aktivitás a 168. órán (U/ml) <i>SmF</i>	Proteáz aktivitás a 96.órán (U/g) <i>SSF</i>
Búzakorpa	8514	47,98
Kukoricacsutka	9933	34,69
Sörtörköly	9531	11,35
Búzaszalma	3400	27,63
Gyümölcs-zöldség rostállomány	11165	45,19

Nagyobb aktivitás értéket a szubmerz, rázatott rendszerekben a gyümölcs- és zöldség rostállomány és a kukoricacsutka, míg szilárd fázisú enzimermentáció esetén szintén a gyümölcs-zöldség rostállomány, valamint a búzakorpa hasznosítása eredményezett. A kísérleteim során ezért a továbbiakban a rostállomány és az induktor (kazein) koncentráció hatását követtem nyomon.

5.5 A gyümölcs-zöldség rostállomány és a kazein hatása

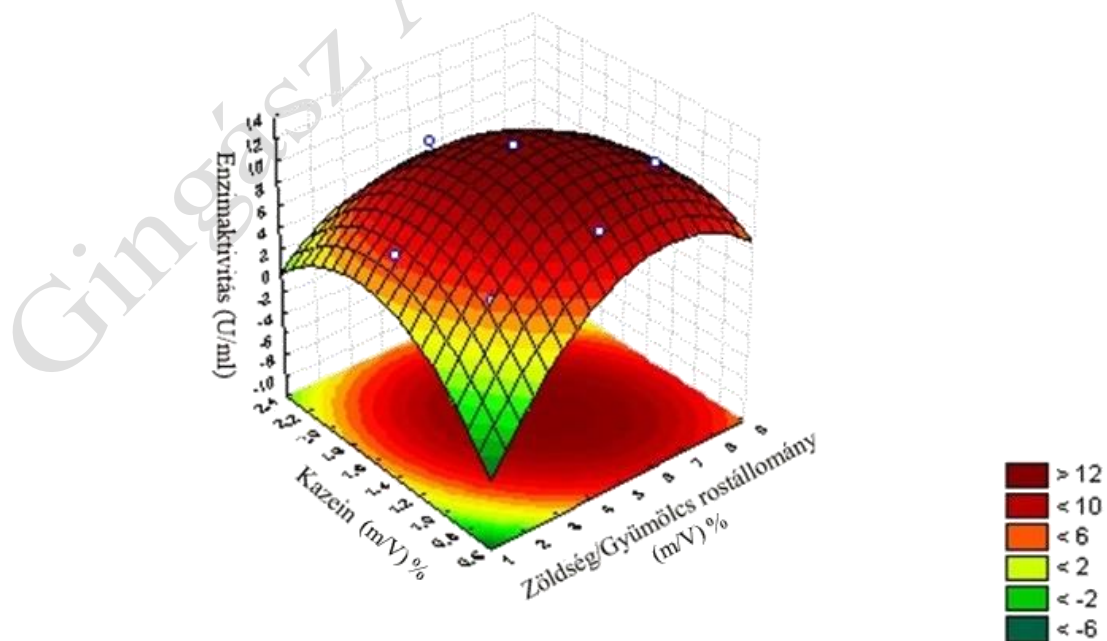
A termelő törzs enzimtermelésének és aktivitásprofiljának megismerésénél és a fermentációs rendszer optimum munkatartományának meghatározásánál gyakorta alkalmazott a kísérlettervezés. A kiválasztott tényezők hatásának és kölcsönhatásának feltérképezése központi elrendezésű kísérlettervezéssel és válaszfelület analízissel történt. A fermentáció nyomon követhetősége érdekében a 96. és a 168. órán is mintavételezést és enzimaktivitás mérést végeztem. A szubmerz, rázatott enzimermentáció 96. órájában értem el nagyobb aktivitás értékeket, amelyeket az alábbi 21. ábra szemléltet. A statisztikai elemzéshez is ezeket az aktivitásértékeket használtam.

A faktorkombinációk között kedvezőbbnek a 6. és 7. kombináció bizonyult, ahol a gyümölcs-zöldség rostállományt 5 és 7,5 (m/v) %-ban, a kazeint pedig csökkent értéken, 0,8 és 1 (m/v) % között használtam. Ezekben az esetekben a savas proteáz aktivitás már a fermentáció 96. órájában elérte a 9500 és 11000 U/l értéket.



21.ábra: A gyümölcs- zöldség rostállomány és a kazein koncentráció hatása a savas proteáz termelésre a fermentáció 96. órájában (A4, 28±2 °C)

Az eredmények statisztikai értékelése során megállapítottam, hogy a 96. órás enzimfermentáció során mind a két vizsgált tényező 95% szignifikancia szinten hatást gyakorolt az *Aspergillus niger* F.00632 törzs extracelluláris proteáz termelésére.



22.ábra: 3D válaszfelület

A statisztikai elemzés során az alábbi másodfokú polinom egyenletet kaptam, amely leíró összefüggés a savas proteáz enzimaktivitás és a faktorok között:

$$Y = -25,734 + 6,817x - 0,479x^2 + 29,016y - 8,273y^2 - 1,178xy$$

Összességében elmondható, hogy a szubmerz, rázatott fermentációs rendszer optimalizálása megerősítette a két faktor fontosságát, továbbá a munkatartomány pontosítása által a savas proteáz aktivitás is nőtt, a fermentáció időtartama pedig csökkent.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A szakdolgozati munkám néhány *Aspergillus* törzs proteolitikus aktivitásának vizsgálatára irányult cellulózban gazdag agro-ipari növényi maradványokon, szubmerz és csökkentett nedvességtartalmú rendszerben indított enzimfermentáció során. Kísérleteim során az alábbi főbb eredményeket értem el:

A gyors screenelési eljárás során egyedüli szénforrásként 1 (m/v) % kazeint tartalmazó agarlemezen a feltisztulási zóna és a savtermelés intenzitása alapján rangsoroltam a törzseket. A törzsek között az *Aspergillus niger* F.00632 törzs bizonyult jobb enzintermelőnek 28 ± 2 °C-on. A szelektált törzs esetén a BCG indikátor erős sárga színe a savas proteáz termelését jelezte.

A szelektált törzs enzintermelésének profilját a továbbiakban 5 különböző, szerves és szervetlen természetű tápoldatban, 5 (m/v) % búzakuppa szubsztrátum jelenlétében követtem nyomon. Mind a két fermentációs technika esetén nagyobb aktivitás értékeket az A4 tápoldatban tapasztaltam, amelynek összetétele (g/250 ml) szerint 5 g búzakuppát, 5 g élesztőkivonatot, 5 g peptont és 5 g kazeint tartalmazott. A szubmerz, rázatott enzimfermentáció eredményeként az aktivitás a 168. órában elérte az igen magas 8514 U/l értéket. A csökkentett nedvességtartalmú rendszerek (1:5 nedvesítési arány) esetén a 96. órában tetőzött az aktivitás, ekkor 47,98 U/g értéket mértem. A kísérletek ezen részénél a savas proteáz aktivitásának optimum tartományát is vizsgáltam. Az enzimaktivitás mérés pH 3 és 30 °C-on történt, az optimálás során pedig megállapítottam, hogy a pH 2,5-3,5 és 30-35 °C tartományban mutat nagyobb aktivitást a savas proteáz.

A szubmerz, rázatott rendszer optimálása során különböző alternatív szénforrások hatását vizsgáltam. A cellulózban gazdag növényi maradványok körében búzakuppát, kukoricacsutkát, sörtörkölyt, búzaszalmát és a gyümölcs/zöldség rostállományt használtam. Az aktivitás profilok alapján a szelektált törzs az 5 (m/v) % -ban gyümölcs/zöldség rostállományt tartalmazó A4 tápoldatban mutatott nagyobb savas proteáz termelést. Az enzimfermentáció 168. órájában a savas proteáz aktivitása 11165 U/l értéken tetőzött. Ez meghaladta a korábban búzakuppa szubsztrátum jelenlétében indított fermentáció eredményét.

A továbbiakban a szelektált törzs savas proteáz enzim termelésének optimálását végeztem el központi elrendezésű kísérlettervezési módszer alkalmazásával. Két független faktorként a gyümölcs/zöldség rostállomány, valamint a kazein (induktor) hatását és kölcsönhatását tanulmányoztam, és statisztikai úton értékeltem (Statistica 9.0 szoftvercsomag),

hogy azok koncentrációinak változtatása miként befolyásolják az enzimaktivitás alakulását. A faktorkombinációk hatásait tekintve, a gyümölcs/zöldség rostállomány 5-7,5 (m/v) %-ban, a kazein 1 (m/v) % -ban történő alkalmazása kedvez az enzintermelésnek 95 %-os szignifikancia szinten. Ekkor az enzimfermentáció 96. órájában a savas proteáz aktivitás elérte 11004 U/l értéket.

Az elért eredmények ígéretesek a növényi maradványok biofeldolgozási lehetőségeinek fejlesztésére, ami a még értékes megújuló anyagok körforgásban tartását segíti elő.

Gingász Anita szakdolgozat

7 IRODALOMJEGYZÉK

Aniflousa, A., A.S. Leonie, F. Kasutaka, M. Makoto, N. Kozako, M.C.T. Galba, (2002) Production of extracellular protease by *M. circinelloides* using D. Glucose as carbon source/substrate. Braz. J. Microbiol., 23: 112-114.

Belorkar, S. A., Jogaiah, S., (2022) Solid-state fermentation and submerged fermentation for enzyme production, Protocols and Applications in Enzymology, pp.71-90

Biswas, P., Bharti, A. K., Kadam, A., Dutt, D. (2019) Wheat bran as substrate for enzyme production and its application in the bio-deinking of mixed office waste (MOW) paper, BioResources. 14(3), 5788-5806.

Chandrasekaran, S., Kumaresan, S.S.P., Manavalan, M., (2015) Production and Optimization of Protease by Filamentous Fungus Isolated from Paddy Soil in Thiruvavur District Tamilnadu, Journal of Applied Biology and Biotechnology Vol. 3 (06), pp. 066-069, DOI: 10.7324/JABB.2015.3610

Chimbekujwo, K. I., Ja'afaru, M. I., & Adeyemo, O. M. (2020). Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. Scientific African, 8, e00398. doi:10.1016/j.sciaf.2020.e00398

da Silva, R. R., Souto, T. B., de Oliveira, T. B., de Oliveira, L. C. G., Karcher, D., Juliano, M. A., Juliano, L., de Oliveira, A.H.C., Rodrigues, A., Rosa, J.C., Cabral, H. (2016). Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 43(8), 1059–1069. doi:10.1007/s10295-016-1780-4

de Castro, R. J. S., Nishide, T. G., Sato, H. H. (2014). Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(4), 236–245. doi: 10.1016/j.bcab.2014.06.001

de Castro, R.J.S., Sato, H. H. (2014). Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using

agroindustrial wastes as supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 20–25. doi:10.1016/j.bcab.2013.12.002

Fazilat, A., (2016). Production, isolation, purification and partial characterization of an extracellular acid protease from *Aspergillus niger*, *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 3(3): 32-38

Gnanadoss, J. J., Devi, S. K., (2015). Optimization of nutritional and culture conditions for improved protease production by *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus flavus*, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(6): 518-523

Gomri, M. A., Rico-Díaz, A., Escuder-Rodríguez, J. J., EL Moulouk Khaldi, T., González-Siso, M. I., Kharroub, K. (2018). Production and characterization of an extracellular acid protease from thermophilic *Brevibacillus* sp. OA30 isolated from an algerian hot spring. *Microorganisms*, 6, 31

Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:15-32.

Hsiao N. W., Chen Y., Kuan Y. C. (2014). Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, *Peptidase R. Electronic Journal of Biotechnology*.17(2):89–94. doi: 10.1016/j.ejbt.2014.02.002.

Ire, F. S., Okolo, B. N., Moneke, A.N., Odibo, F.J.C. (2011). Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation. *African Journal of Food Science* Vol. 5(6), 353 – 365

Kamal, S., Rehman, S., Iqbal, H.M.N., (2017). Biotechnological valorization of proteases: from hyperproduction to industrial exploitation-a review. *Environ Prog Sustain.*, 36(2):511–22.

Li, C., Xu, D., Zhao, M., Sun, L., Wang, Y., (2014). Production optimization, purification, and characterization of a novel acid protease from a fusant by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*, *European Food Research and Technology*, vol. 238, no. 6, pp. 905–917

Madhumithah, C. G., Krithiga, R., Sundaram, S., Sasikumar, C. S., Guhathakurta, S., Cherian, K. M., (2011). Utilization of Vegetable Wastes for Production of Protease by Solid State Fermentation Using *Aspergillus niger*, *World Journal of Agricultural Sciences* 7 (5): 550-555

- Mamo J., Assefa F. (2018). The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. *Journal of Food Quality*. vol. 2018, Article ID 7957269, 15 pages, <https://doi.org/10.1155/2018/7957269>
- Mukhtar, H., Haq I. U., (2009). Production of Acid Protease by *Aspergillus niger* Using Solid State Fermentation, *Pakistan Journal of Zoology*, 41: 253-260
- Nadeem, M. (2009). Biotechnological production of alkaline protease for industrial use. University of the Punjab, Lahore, Pakistan.
- Namasivayam, S.K.R., Sivasubramanian, S., Kumar, G. (2010). Influence of media on protease production by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. and stability towards commercially available detergents, surfactants and enzyme inhibitors. *International Journal of Biological Technology*, 1(1), 78-83.
- Nirmal, N., Shankar, S. & Laxman, R. (2011). Fungal proteases: an overview. *International Journal of Biotechnology & Biosciences*, 1, 1-40.
- Pécs M. (2011). Fermentációs feldolgozási műveletek, egyetemi tananyag, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
- Pilli, R., Siddalingeshwara, K. G., (2016). Mutational Studies on Alkaline Protease from *Aspergillus awamori*, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 41(2), Article No. 49, 269-272
- Radha S., Nithya V. J., Himakiran Babu R., Sridevi A., Prasadand N. B. L., Narasimha G. (2011) Production and optimization of acid protease by *Aspergillus spp.* under submerged fermentation. *Archives of Applied Science Research*, 3 (2):155-163
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597–635.
- Ravindran, R., Hassan, S., Williams, G., Jaiswal, A. (2018). A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. *Bioengineering*, 5(4), 93. doi:10.3390/bioengineering5040093
- Razzaq A, Shamsi S, Ali A, (2019). Microbial proteases applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 7:110. doi: 10.3389/fbioe.2019.00110

Sabotic, J., Kos, J., (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1351-1375.

Sain, M., Panthapulakkal, S., (2006). Bioprocess preparation of wheat straw fibers and their characterization. *Industrial Crops and Products*, 23(1), 1–8. doi:10.1016/j.indcrop.2005.01.006

Sankhla, I. S., Sharma, G., & Tak, A. (2020). Fungal degradation of bioplastics: An overview. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 35–47. doi:10.1016/b978-0-12-821007-9.00004-8

Sethi, B. K., Jana, A., Nanda, P. K., Das Mohapatra, P. K., Sahoo, S. L. (2016). Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 571–583. doi:10.1016/j.jtusci.2015.11.001

Shinkawa, S., Mitsuzawa, S. (2020) Feasibility study of on-site solid-state enzyme production by *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Biofuels* 13:31 <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1669-3>

Siala, R., Frikha, F., Mhamdi, S., Nasri, M, Kamoun, A.S., (2012) Optimization of Acid Protease Production by *Aspergillus niger* I1 on Shrimp Peptone Using Statistical Experimental Design *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 564932, 11 pages doi:10.1100/2012/564932

Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P. K. (2016). Microbial protease in commercial applications. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 4, 365–374.

Sinha, S., Shalini, S. (2009). Studies on the Production of Acid Protease by Submerged Fermentation, *International Journal of Food Engineering*: Vol. 5: Iss. 1, Article 5. DOI: 10.2202/1556-3758.1338

Souza, P. M. de, Bittencourt, M. L. de A., Caprara, C. C., Freitas, M. de, Almeida, R. P. C. de, Silveira, D., Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337–346. doi:10.1590/s1517-838246220140359

Souza, P. M., Werneck, G., Aliakbarian, B., Siqueira, F., Ferreira filho, E. X., Perego, P., Converti, A., Magalhães, P. O. & Junior, A. P. (2017). Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1103-1110.

Sumantha, A., Larroche, C., and Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44:211.

ThiQuynhHoa, N., Minh, N., Dao, D. (2014). Performance Enhancing Soy Milk Extraction By Flavourzyme, *International Journal of Scientific & Technology Research*, Vol.3, Issue 8, 101-106

Tolnay P.(1963): *Ipari enzimológia, Műszaki Könyvkiadó*

Tremacoldi, C. R., Watanabe, N. K., Carmona, E. C. (2004). Production of Extracellular Acid Proteases by *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(6), 639–642. doi:10.1023/b:wibi.0000043194.21080.c1

Usman, A., Mohammed, S., Mamo, J. (2021). Production, Optimization, and Characterization of an Acid Protease from a Filamentous Fungus by Solid-State Fermentation, *International Journal of Microbiology*, Vol. 2021, Article ID 6685963, 12 pages, <https://doi.org/10.1155/2021/6685963>

Vijayaraghavan, P. Vincent, S.G.P. (2013). A Simple Method for the Detection of Protease Activity on Agar Plates Using Bromocresolgreen Dye. *Journal of Biochemical Technology*, 4, 628-630.

Vishwanatha, K., Appurao, A., Singh, S. (2009). Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*. 114(2):402–407. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.070.

Vishwanatha, K. S, Rao, A. G, Singh, S. A. (2010b). Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:129–138

Wu, T. Y., Mohammad, A. W., Jahim, J. M., Anuar, N. (2006). Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6), 1223–1229. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.03.007

8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek, Dr. Kohári-Farkas Csilla egyetemi adjunktusnak, aki a laboratóriumi munkám során végig segített, valamint kiváló szakértelmével, útmutatásaival hozzájárult a szakdolgozatom elkészítéséhez.

Szeretném köszönetemet kifejezni továbbá a Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék munkatársainak, akikhez mindig fordulhattam segítségért és hasznos tanácsért.

Gingász Anita szakdolgozat

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Gingász Anita
A Hallgató Neptun kódja: AKPDRW
A dolgozat címe: *Aspergillus* törzsek savas proteáz termelésének vizsgálata
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: Biomérnöki és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

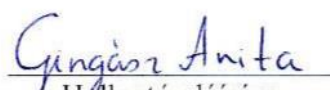
Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2023. április 24.


Hallgató aláírása

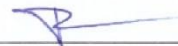
KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Gingász Anita (hallgató Neptun azonosítója: AKPDRW) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: 2023. április 24.



Belső konzulens