

УДК 663.15

## ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВНОГО ШТАММА ASPERGILLUS AWAMORI – ПРОДУЦЕНТА ПЕКТИНАЗ

Джакашева М.А., Кедельбаев Б.Ш.

*Южно-Казахстанский Государственный Университет им. М. Ауэзова,  
Шымкент, e-mail: dzhakasheva\_m@mail.ru*

В результате ступенчатого скрининга и индуцированного мутагенеза после трехкратного облучения монохроматическим светом с длиной волны  $\lambda = 530$  нм и обработки спор нитрозометилмочевинной получен новый активный штамм *A. awamori* 56-85-357 с общей пектолитической активностью 1,65 ед/мл, которая превышает активность исходного дикого штамма *A. awamori* в 7,5 раз.

**Ключевые слова:** скрининг, мутагенез, пектолитические ферменты, пектолитическая активность, монохроматический свет

## GETTING THE ACTIVE STRAIN OF ASPERGILLUS AWAMORI – PECTINASE PRODUCER

Dzhakasheva M.A., Kedelbayev B.S.

*M. Auezov South Kazakhstan State University, Shymkent city, e-mail: dzhakasheva\_m@mail.ru*

As a result of the gradation screening and induced mutagenesis after three-fold irradiation by monochromatic light with a wavelength  $\lambda = 530$  nm and treatment of spores by nitrosomethyl urea was obtained the active new strain *A. awamori* 56-85-357 with common pectolytic activity 1,65 units/ml, which exceeds the activity of the original wild strain *A. awamori* in 7,5 times.

**Keywords:** screening, mutagenesis, pectolytic enzymes, pectolytic activity, monochromatic light

Пектолитические ферменты, катализирующие реакции расщепления пектиновых веществ [8], имеют большое промышленное значение в различных отраслях биотехнологии: при получении пектинов [10]; при обработке текстильных волокон [4]; для получения пищевых красителей и танинов [7]; для интенсификации производства соков из плодово-ягодного сырья [2, 9]; в виноделии [3]. Актуальность вопроса о рентабельном производстве пектиназ связана, в первую очередь, с поиском новых высокоактивных продуцентов. Получение высокопродуктивного штамма с помощью методов селекции дает возможность повысить выход готовой продукции на единицу биомассы и понизить его себестоимость. Постоянный поиск новых штаммов, а также селекция отобранных штаммов методом ступенчатого стабилизированного отбора и индуцированного мутагенеза позволяет создать высококороткоцикловую технологию производства современных ферментных препаратов [5].

Ярко выраженной способностью к биосинтезу пектолитических ферментов обладают микроскопические грибы рода *Aspergillus*, т.к. они обладают высоким уровнем белковой секреции, широким диапазоном продуцируемых пектолитических ферментов, кроме того, они безопасны при использовании в пищевой промышленности [1]. Грибы рода *Aspergillus* очень быстро размножаются с помощью спор и дают огромное количество колоний за сравнительно короткое время. Уже в первом поколении наблюдается фенотипическое проявление

хозяйственно ценных мутаций. Благодаря этим свойствам они являются удобным объектом для селекции [6]. Целью исследований является проведение селекционных работ с тремя наиболее продуктивными и перспективными продуцентами пектиназ, выделенными из почв Южно-Казахстанской области, пшеничного зерна, свежего винограда и виноградных выжимок.

### Материалы и методы исследований

Отобраны следующие продуценты пектиназ: *A. foetidus* (из пшеничного зерна Тюлькубасского района, с. Ынтымак) с общей пектолитической активностью 0,30 ед/мл, *A. niger* с пектолитической активностью 0,25 ед/мл (с кожицы виноградных выжимок сорта Баян ширей винодельческого завода «Молчанов и К») и *A. awamori* с общей пектиназной активностью 0,22 ед/мл (с кожицы виноградных выжимок сорта Сапарави винодельческого завода «Нур»).

Выявление наиболее активных штаммов проводили высевом 7-ми дневной споровой суспензии исходных штаммов на чашки Петри, содержащие селективные агаризованные среды из яблочного, арбузного, цитрусового, виноградного пектина, и посевы выращивали в течение 4-х суток при 30 °С до формирования колоний.

Для получения гиперпродуцента пектолитических ферментов, на первой ступени селекции суспензию спор (титр разведения –  $10^4$ – $10^6$ ) отобранных штаммов *A. foetidus* 66-2, *A. awamori* 56-2 и *A. niger* 86-2 высевали на чашки Петри с селективными агаризованными средами, содержащими арбузный и виноградный пектин и подвергли облучению монохроматором «ЛМ-3» длиной волны  $\lambda = 530$  нм и мощностью светового потока 2–4 Вт/м<sup>2</sup> в течение 2–5 суток при 28 °С. Интенсивность синтеза пектиназ мутантных клонов тестировали по величине отношения диаметра окрашенных зон гидролиза к диаметру колонии

(D = Дозг/Дк). На второй ступени селекции в питательную среду была введена лактоза в концентрации 0,1%. На третьей ступени селекции суспензию конидий (титр разведения –  $10^4$ – $10^6$ ) обрабатывали нитрозометилмочевиной в концентрации 0,1% в течение 1–4 ч. Облучение проводили по схеме первой ступени селекции.

Культивирование полученного мутантного штамма проводили на жидкой питательной среде состава, масс. %: свекловичный жом : виноградные выжимки : хлопковые створки (1:1:1) – 3, солодовые ростки – 1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,1,  $\text{MgSO}_4$  – 0,1. Культивирование проводили в течение 72 ч при температуре 24°С и pH – 3,2.

Активность пектолитического комплекса ферментов определяли по методике действующего ГОСТ 20264.3-81.

Статистическую оценку достоверности результатов проводили по общепринятым методам с использованием компьютерных прикладных программ «MathCAD» и «Statistica». Достоверность полученных результатов обеспечивается корректным набором экспериментально-измерительных средств и методов обработки экспериментальных результатов. Примененная в исследовании аппаратура откалибрована по эталонам.

### Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе ступенчатого скрининга в два цикла посева был произведен

отбор наиболее активных штаммов, выращенных на селективных питательных средах. На основании морфологических признаков (диаметр колонии), нами были выделены колонии, вокруг которых имелись интенсивно окрашенные зоны гидролиза, эти колонии были пересеяны в жидкую среду для определения пектолитической активности. В результате первичного скрининга нами было получено более 300 различных образцов исходных штаммов *A. awamori*, *A. niger* и *A. foetidus*. В зависимости от состава селективной среды отобранные штаммы проявляли различную пектолитическую активность при культивировании на агаризованных средах в течение 4-х суток. Так, штамм *A. foetidus* наиболее продуктивен на агаризованной среде, содержащей в качестве источника углерода арбуз, а штаммы *A. awamori* и *A. niger* на виноградной среде (рис. 1).

В табл. 1 приведены результаты отбора наиболее продуктивных штаммов. Было отобрано 15 изолятов, отличающихся морфологическими признаками и высоким уровнем биосинтеза пектиназ.

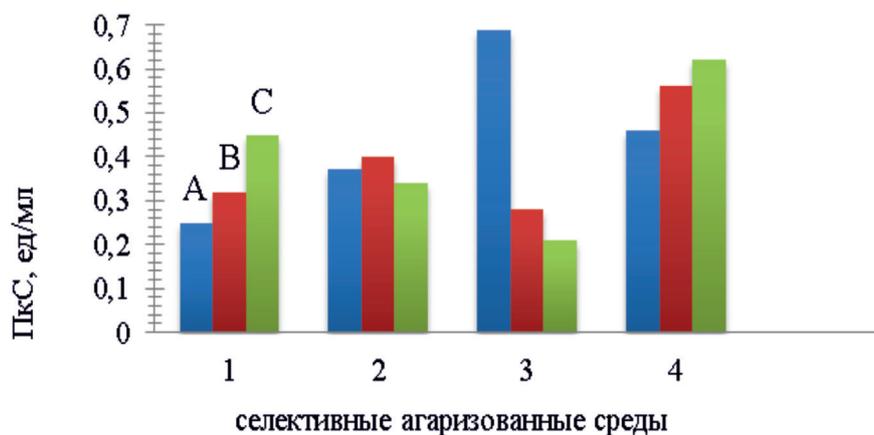


Рис. 1. Биосинтез пектиназ в зависимости от состава селективных сред.

Условия: вариант среды: 1 – яблочный пектин; 2 – цитрусовый пектин; 3 – арбузный пектин; 4 – виноградный пектин; штамм: А – *A. foetidus*; В – *A. awamori*; С – *A. niger*

Таблица 1

Результаты скрининга наиболее продуктивных штаммов *A. foetidus*, *A. awamori* и *A. niger*

Исходный штамм	Штамм	Селективная среда	Средний размер колонии, мкм	КОЕ/г* $10^{-6}$	ПКС, ед/мл
1	2	3	4	5	6
<i>A. foetidus</i>	<i>A. foetidus</i> 12	2	20–25	10,4	0,45
	<i>A. foetidus</i> 70	4	20–25	5,8	0,53
	<i>A. foetidus</i> 66	3	25–30	15,3	0,84
	<i>A. foetidus</i> 255	3	20–25	11,8	0,57
	<i>A. foetidus</i> 18	1	25–30	8,5	0,42

1	2	3	4	5	6
A. awamori	A. awamori 25	2	25–30	11,6	0,63
	A. awamori 56	4	25–30	15,8	0,76
	A. awamori 179	1	25–30	9,8	0,60
	A. awamori 17	3	20–25	14,5	0,52
	A. awamori 6	4	20–25	13,6	0,69
A. niger	A. niger 86	4	25–30	12,8	0,80
	A. niger 165	2	25–30	16,0	0,40
	A. niger 36	4	20–25	10,3	0,60
	A. niger 124	1	20–25	11,7	0,73
	A. niger 12	1	20–25	11,0	0,68

Примечание: Селективные агаризованные среды, содержащие пектин: 1 – яблочный; 2 – цитрусовый; 3 – арбузный; 4 – виноградный.

Как видно из данных табл. 1, наибольшей пектолитической активностью обладают штаммы *A. foetidus* 66 с активностью 0,84 ед/мл, *A. niger* 86 с активностью 0,80 ед/мл и штамм *A. awamori* 56, активность которого составила 0,76 ед/мл.

Колонии этих штаммов были вновь пересеяны на среды с трудногидролизуемыми субстратами, такими как арбузный пектин для *A. foetidus* 66, виноградный пектин для *A. awamori* 56 и *A. niger* 86 и культивировали в течение 4-х суток при 30 °С. В результате вторичного скрининга из 15 полученных штаммов нами было отобрано 3 штамма, наиболее активно синтезирующие пектиназу: *A. foetidus* 66-2 (1,01 ед/мл); *A. awamori* 56-2 (0,83 ед/мл); *A. niger* 86-2 (0,88 ед/мл). Полученные в результате ступенчатого скрининга микроорганизмы послужили исходным материалом для последующей селекционной работы.

Применение методов многоступенчатой селекции с использованием физических (УФ-облучение, рентгеновское облучение, ультразвук и т.д.) и химических (нитрозогуанидин, нитрозометилмочевина и др.) мутагенов позволяет повысить частоту мутаций и получить активные штаммы микроорганизмов-продуцентов. Однако классические мутагенные факторы (ионизирующая радиация, химические мутагены) оказывают

грубое действие на генетические структуры клетки, а полученные мутанты имеют пониженную жизнеспособность и продуктивность, что затрудняет их использование в селекционной практике. В настоящее время ведется поиск новых малотоксичных мутагенов, дающих высокий выход селекционно-ценных мутаций.

На втором этапе отбора для получения гиперпродуцента пектолитических ферментов, суспензию спор (титр разведения – 10<sup>-4</sup>–10<sup>-6</sup>) отобранных штаммов высевали на чашки Петри с селективными агаризованными средами и подвергли облучению монохроматическим светом длиной волны λ = 530 нм и мощностью светового потока 2–4 Вт/м<sup>2</sup> в течение 2–5 суток при 28 °С.

Отобранные из 100 одинаковых колоний 11 вариантов с наилучшими морфологическими признаками культивировали на жидких средах для определения общей пектолитической активности. Как видно из данных табл. 2, наибольшая зона гидролиза наблюдалась у штамма *A. awamori* 56-2 при облучении его спор световым потоком мощностью 3,5 Вт/м<sup>2</sup> в течение 3 суток. На этом этапе отбора пектолитическая активность штамма *A. awamori* 56-2 повысилась на 25% и составила 1,04 ед/мл.

Таблица 2

Влияние условий облучения на интенсивность синтеза ферментов

Условия облучения		Отношение Дозг / Дк			Выживаемость*, %
Мощность, Вт/м <sup>2</sup>	Время, сут	<i>A. foetidus</i> 66-2	<i>A. awamori</i> 56-2	<i>A. niger</i> 86-2	
1	2	3	4	5	6
2	2	1,2	1,3	1,3	50/58/62
	3	1,2	1,4	1,6	41/52/56
	4	1,3	1,4	1,6	34/48/52
	5	1,3	1,8	1,6	22/29/38

Окончание табл. 2					
1	2	3	4	5	6
2,5	2	1,5	1,8	1,7	45/52/60
	3	1,7	1,9	1,7	38/49/54
	4	1,8	1,7	1,5	31/39/46
	5	1,8	1,7	1,4	20/31/37
3	2	2,0	2,2	1,5	24/30/33
	3	2,2	2,3	1,8	14/21/20
	4	1,8	2,5	1,7	4/8/7
	5	1,4	2,0	1,7	2/4/3
3,5	2	1,4	2,7	2,1	1/2/1
	3	1,4	3,0	2,3	0,5/1/0
	4	1	2,8	1	0/0,5/0
	5	1	1	1	0/0/0
4	2	1,2	1,5	1,7	0,6/0,3/0,3
	3	1,2	1	1	0,5/0/0
	4	1	1	1	0/0/0
	5	1	1	1	0/0/0

Примечание: \* A. foetidus 66-2/ A. awamori 56-2/ A. niger 86-2.

На второй ступени селекции наиболее продуктивный вариант выселили на селективные агаризованные среды, содержащие виноградный пектин и лактозу 0,1%, которая в определенных условиях обладает

свойствами индуктора ферментов и снова подвергли облучению монохроматическим светом длиной волны  $\lambda = 530$  нм и мощностью светового потока 3,5 Вт/м<sup>2</sup> в течение 3 суток при 28 °С и (рис. 2).

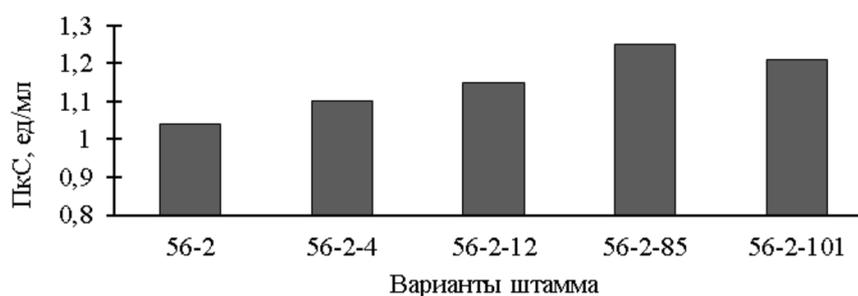


Рис. 2. Результаты работ второй ступени селекции. Условия культивирования: рН – 3,2,  $t = 24^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 72$  ч, состав, масс. %: свекловичный жом : виноградные выжимки: хлопковые створки (1:1:1) – 3, солодовые ростки – 1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1,  $\text{MgSO}_4$  – 0,1

На данном этапе отбора выделено 5 вариантов из 50 с повышенной способностью к образованию пектолитических ферментов. Наибольшая активность пектиназы наблюдалась у варианта A. awamori 56-2-85, которая составила 1,25 ед/мл, что на 20% превышала активность предыдущего мутанта.

Для дальнейшего повышения физиологической активности отобранного штамма была проведена третья ступень селекции, в которой получен мутант A. awamori 56-2-85-375 в результате комбинированного действия нитрозометилмочевины и монохроматического света (рис. 3). Суспензию конидий (титр разведения –  $10^4$ – $10^6$ ) пере-

селили на среду, содержащую виноградный пектин и лактозу с концентрацией 0,1% и обрабатывали нитрозометилмочевинной в концентрации 0,1% в течение 1–4 ч, одновременно индуцируя монохроматическим светом в течение 3-х суток мощностью светового потока 3,5 Вт/м<sup>2</sup> при 28 °С по схеме, описанной выше.

В результате третьей ступени селекции получен высокоактивный штамм A. awamori 56-2-85-375, активность которого составила 1,65 ед/мл.

Были исследованы морфологические и биохимические характеристики полученного мутантного штамма A. awamori 56-2-85-375. Штамм A. awamori 56-2-85-375 не

обладает патогенными свойствами, температурный оптимум роста составляет 28–30 °С, дыхание аэробное. Культура штамма хорошо усваивает такие углеводы, как глю-

козу, сахарозу, арабинозу, рафинозу, лактозу. Среди источников азота хорошо ассимилирует аммонийные соли неорганических кислот, пептон, казеин.

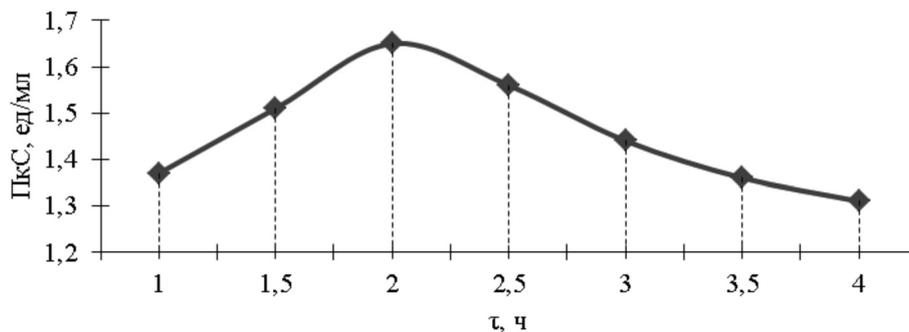


Рис. 3. Результаты работ третьей ступени селекции штамма *A. awamori* 56-2-85. Условия культивирования: см. рис. 2; условия облучения: см. табл. 2

Вегетативное тело мицелиального гриба *A. awamori* 56-2-85-375 имеет очень ветвистый мицелий, пронизывающий субстрат. Конидиеносцы слабо окрашены в коричневый цвет, имеют гладкую поверхность и состоят из ветвящихся клеток. Верхняя часть конидиеносца вздутая и образует шаровидные головки, диаметр которых 20–40 мкм. На них пучками расположены фиалиды, размеры которых колеблются в пределах 5–8 мкм в длину и 2–4 мкм в ширину. Стеригмы представ-

ляют собой двухъярусные короткие цилиндрические клетки. Метулы, расположенные на вершине конидиеносца в виде пучка, имеют размеры от 6–10 до 3–7 мкм. Конидии гладкие, в основном имеют круглую форму и окрашены в серовато-коричневый цвет.

Макроскопические характеристики штамма *A. awamori* 56-2-85-375 на сусло-агаре, на агаре Чапека и Мальц-агаре имеют отличительные признаки, указанные в табл. 3.

Таблица 3

Макроскопические характеристики штамма *A. awamori* 56-2-85-375

Признаки	Морфологические характеристики		
	Питательная среда		
	Сусло-агар	Агар Чапека	Мальц-агар
Форма и диаметр колоний	Круглые, гладкие, 20–25 мкм	Круглые, радиально-бороздчатые, 30–35 мкм	Круглые, радиально-бороздчатые, 35–40 мкм
Поверхность колоний	Клочковато-шершистая	Бархатистая	Клочковато-шершистая
Край колоний	Неровный, тонкий	Неровный, тонкий	Неровный, тонкий
Цвет конидиальной области	Темно-коричневый	Серовато-коричневый	Темно-серый
Экскудат	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Обратная сторона колоний	Тускло-желтая	Тускло-желтая	Тускло-желтая

**Заключение**

В результате ступенчатого срининга и индуцированного мутагенеза после трехкратного облучения монохроматическим светом и обработки спор нитрозометилмочевинной получен новый активный штамм *A. awamori* 56-2-85-375 с общей пектолитической активностью

1,65 ед/мл, которая превышала по общей пектолитической активности у исходного дикого штамма *A. awamori* в 7,5 раз. В результате исследования свойств нового штамма в течение 6 месяцев сделан вывод о его стабильности и необратимости наследственной изменчивости, вызванной перестройкой наследственного аппарата

микроорганизма. Полученный мутант по своим морфологическим свойствам отличается от исходного интенсивностью спороношения, цветом пигмента спор, окраской колонии с обратной стороны при выращивании на агаризованных средах, более коротким циклом роста, образованием более обильной биомассы, повышенной способностью к биосинтезу пектолитического фермента при глубинном культивировании на жидких средах.

#### Список литературы

1. Айзенберг В.Л. Отбор микромицетов по способности к образованию фермента пектинэстеразы // Экспериментальная и клиническая медицина. – 1999. – Т. 45, № 2. – С. 21–23.
2. Волчок А.А. Использование ферментных комплексов нового поколения для обработки различных плодово-ягодных субстратов // Виноделие и виноградарство. – 2012. – № 1. – С. 20–21.
3. Галушко Н.А., Сидоренко В.В., Куприянов А.Д. Применение ферментных препаратов в плодовом виноделии // Прикл. биохим. и микробиол. – 2008. – №3. – С. 177–186.
4. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – М.: Изд-во «Элевар», 2000. – 512с.
5. Донченко Л.В. Технология пектина и пектинопродуктов. – М.: ДеЛи, 2000. – 255 с.
6. Семенова М.В. Выделение и свойства пектиназ из гриба *Aspergillus japonicus* // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 5. – С. 686–697.
7. Супонина Г.А. Получение порошкообразного пищевого красителя из выжимок черной смородины // Известия вузов «Пищевая технология». – 2005. – № 2. – С. 47–48.
8. Benen J.A.E., Vincken J.-P., Van Alebeek. Microbial pectinases in pectins and their manipulation. CRS Press, USA, 2002. – P. 174–190.
9. Sun T., Tang J., Powers J.R. Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice // J. Agric. Food Chem. – 2004. – P. 919–925.
10. Uhlig H. Industrial enzymes and their applications. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. 1998. – 454 p.