

ПОЛУЧЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ МУТАНТОВ *ASPERGILLUS AWAMORI* С ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ

О.Б. Русь, Л.Ю. Анищенко, И.А. Реутская, А.Н. Евтушенков

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

e-mail: ZRbio@mail.ru

Введение

Важным методом получения штаммов-продуцентов ферментов до настоящего времени остается индуцированный мутагенез и отбор наиболее продуктивных вариантов микроорганизмов. Обработанную мутагеном культуру высевают на селективные агаризованные питательные среды, полученные отдельные колонии исследуют на продуктивность, повторяют процедуру мутагенеза и отбора для более высокопродуктивных вариантов [1].

Из химических мутагенов широкое применение в работе с микроорганизмами получил алкилирующий агент N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (нитрозогуанидин, НГ). Он с успехом был использован для повышения продукции амилолитических ферментов [2–6], глюкозооксидазы [7], инулиназы [8], а также для отбора мутантов по признаку повышенного биосинтеза комплекса кислых и слабокислых протеолитических ферментов, α -амилазы и ряда других ферментов [9] штаммов рода *Aspergillus*.

Кроме химических мутагенов широкое использование при получении штаммов-продуцентов глюкоамилаз получили физические факторы: ультрафиолетовое излучение [4, 10, 11], и γ -излучение Co^{60} [4, 5, 12].

Индукцированный мутагенез и ступенчатый отбор наиболее активных вариантов использовался и для увеличения продукции внеклеточных ферментов у других грибов. Нитрозогуанидин и УФ-облучение применяли для повышения продукции α -амилазы и глюкоамилазы *Thermomyces lanuginosus* [13], эндоглюканазы *Fusarium oxysporum* [14] и β -глюкозидазы *Acremonium cellulolyticus* [15], глюкоамилазы *Thermomucor indicae-seudaticae* [16].

В ходе данной работы необходимо было повысить продукцию глюкоамилазы исходного штамма мицелиальных грибов *Aspergillus awamori* 466, любезно предоставленного УП «Лотиос».

Методы исследования

Культивирование *A. awamori* осуществляли на модифицированной среде Чапека, содержащей (г/л): NaNO_3 – 9,0; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,01, крахмал – 30; агар-агар – 15. Для проведения химического мутагенеза суспензию конидий исходного штамма (титр разведения 10^{-2}) обрабатывали нитрозогуанидином в концентрациях 25–175 мкг/мл в цитратном буфере (0,1 моль/л, pH 5,0) в течение 3-х часов при 28°C, конидии высевали на поверхность модифицированной среды Чапека в чашки Петри; культивировали при 28°C в течение 5–6 суток. Для проведения УФ-мутагенеза суспензию конидий в количестве 10 мл (титр разведения 10^{-3}) в физиологическом растворе с 20% глицерина помещали в чашки Петри и подвергали облучению (УФ-лампа класса CSYLVANIAG 15 W, длина волны – 280–100 нм, расстояние до лампы 20 см) в течение 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 мин при постоянном перемешивании, после чего чашки выдерживали в темноте в течение 2 ч во избежание фотореактивации. Конидии высевали на поверхность модифицированной среды Чапека; инкубировали при 28°C в течение 4–5 суток.

Для количественной оценки способности микромицетов гидролизовать крахмал суспензии конидий 6-суточных культур засевали в питательную среду, содержащую 24% пшеничной муки, предварительно обработанной солодовым молоком (pH 6,7), культивировали с аэрацией (180 об/мин) в течение 120 ч при 30°C. В качестве источника неочищенного ферментного препарата использовали культуральную жидкость.

Количественное определение редуцирующих сахаров проводили с использованием реактива с 3,5-динитросалициловой кислотой (ДНС) [17]. За единицу (1 ед.) амилазной активности принимали количество фермента, которое приводило к образованию 1 мкмоль редуцирующих сахаров за 1 мин реакции гидролиза крахмала при 30°C и pH 4,7 в пересчете на 1 мл культуральной жидкости. Количественное определение глюкоамилазной активности проводили глюкозооксидазным-пероксидазным методом с использованием набора D-glucose assay kit (GOPOD-Format, Megazyme). За 1 единицу активности фермента глюкоамилазы (1 ед.) принимали его количество, приводящее к образованию 1 мкмоль D-глюкозы за 1 мин при 30°C в пересчете на 1 мл культуральной жидкости. Данные в работе представлены как средние значения, полученные в результате проведения трех независимых экспериментов. Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием программы Past по критериям Стьюдента. Уровень значимости (p) был принят равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Для получения мутантов *A. awamori* с повышенной продукцией глюкоамилазы использовали высокоактивный алкилирующий мутаген с метильной группой N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин, который способен осуществлять алкилирование гуанина, находящегося в репликативной вилке [18].

Оценку выживаемости *A. awamori* 466 после обработки нитрозогуанидином проводили с использованием раствора мутагена в цитратном буфере (0,1 моль/л, pH 5,0) в диапазоне концентраций 25–175 мкг/мл. На рисунке 1 выживаемость конидий *A. awamori* 466 после обработки нитрозогуанидином в различных концентрациях выражена графически в процентах от контроля (необработанных мутагеном конидий). Как следует из данных эксперимента, выживаемость составляла от 26,0 до 0,7%.

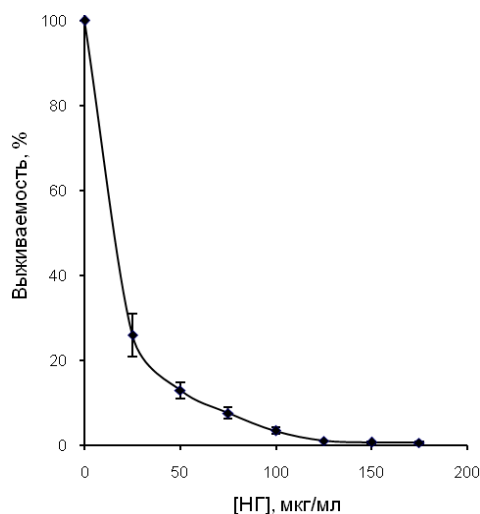


Рисунок 1 – Инактивирующее действие нитрозогуанидина на *A. awamori* 466

В большинстве методик, посвященных исследованию амилалитической активности микроорганизмов в чашечном тесте после образования колоний на агаризованной питательной среде с крахмалом в чашках Петри следующим этапом проведения эксперимента является наслаивание на поверхность среды реактива, содержащего KI и I₂. Но этот метод не всегда бывает удобен, поскольку большая часть клеток в процессе окрашивания гибнет. Нами были оптимизированы условия предварительной оценки интенсивности синтеза амилалитических ферментов в чашечном тесте. Добавление в агаризованную среду Чапека 2–3% картофельного крахмала и 0,05% дезоксихолата натрия позволяет получать компактные колонии грибов, окруженные прозрачной зоной гидролиза крахмала. По величине отношения диаметра зоны гидролиза крахмала вокруг колонии к диаметру колонии гриба ($D_{п.кр.}/D_{к.}$) можно сравнивать интенсивность расщепления крахмала, не прокрашивая среду реактивом KI и I₂.

После проведения НГ-мутагенеза каждую выросшую на модифицированной среде Чапека колонию по трафарету (30) переносили на чашки с аналогичной средой, содержащей

0,05% дезоксихолата натрия; выращивали при 28°C в течение 3–4 суток. Интенсивность синтеза амилалитических ферментов мутантными клонами тестировали по величине отношения диаметра зоны просветления крахмала вокруг колонии к диаметру колонии ($D_{г.кр}/D_{к.}$).

На способность гидролизовать крахмал в чашечном тесте всего было проверено более 5 тыс. мутантных клонов *A. awamori*. На рисунке 2 на фотографии чашки Петри видно, что для нескольких клонов значение $D_{п.кр.}/D_{к.}$ значительно выше, чем для исходного штамма *A. awamori* 466.

Клоны, имеющие наибольшую зону гидролиза крахмала по сравнению с таковой для исходного штамма, тестировали на эффективность синтеза амилалитических ферментов при глубинном культивировании.

Амилазную активность оценивали по количеству образующихся в ходе гидролиза крахмала редуцирующих сахаров. Глюкоамилазную активность определяли глюкозооксидазным-пероксидазным методом.



Рисунок 2 – Чашечный тест на способность продуцировать амилалитические ферменты мутантными клонами *A. awamori* на агаризованной среде Чапека с 2% картофельного крахмала и 0,05% дезоксихолата натрия

Как следует из результатов эксперимента, представленных в таблице 1, у всех мутантных штаммов отмечается статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение амилазной активности в сравнении с уровнем активности для исходного штамма *A. awamori* 466. Для модифицированных штаммов значение активности находилось в диапазоне от $(130,56 \pm 4,85)$ ед./мл до $(961,18 \pm 40,28)$ ед./мл. Исходный же штамм в тех же условиях проведения эксперимента характеризовался уровнем амилазной активности $(148,05 \pm 2,95)$ ед./мл.

Таблица 1 – Уровни амилазной и глюкоамилазной активности у штаммов *A. awamori*

Штамм	Амилазная активность, ед./мл	Глюкоамилазная активность, ед./мл
2/1	$191,14 \pm 4,21$	$67,53 \pm 7,39$
2/29	$134,82 \pm 1,81$	$78,57 \pm 15,09$
14т	$941,78 \pm 25,68$	$123,07 \pm 12,10$
М 1/4	$195,18 \pm 37,74$	$57,14 \pm 4,62$
35/19	$345,08 \pm 22,58$	$42,55 \pm 5,02$
15т	$130,56 \pm 4,85$	$72,62 \pm 13,23$
27/27	$150,50 \pm 5,63$	$49,17 \pm 1,02$
Мут 9	$702,94 \pm 19,15$	$94,17 \pm 17,20$
М 1/13	$961,18 \pm 40,28$	$141,6 \pm 22,33$
466 (исходный штамм)	$148,05 \pm 2,95$	$87,05 \pm 16,68$

По данным в таблице 1 также можно заключить, что значимое увеличение глюкоамилазной активности ($p < 0,05$) по сравнению со значением для исходного штамма отмечено у мутантных штаммов М 1/13 ($(141,6 \pm 22,33)$ ед./мл) и 14т ($(123,07 \pm 12,10)$ ед./мл). Именно их, по нашему мнению, следует использовать в дальнейшем в генетической селекции *A. awamori* с целью создания нового продуцента глюкоамилазы.

Как показывает многолетний опыт работы с микромицетами, для получения высокоактивных продуцентов целесообразно бывает чередовать мутагенные воздействия на ДНК [1], поэтому в ходе получения штамма-продуцента глюкоамилазы мы использовали кроме химического воздействия ультрафиолетовое облучение конидий грибов.

УФ-излучение относят к экзогенным физическим мутагенным факторам. При его воздействии в молекулах ДНК происходит образование димеров тимина, что приводит к ошибкам при репликации ДНК [18].

Конидии мутантного штамма *A. awamori* M1/13, полученного ранее в ходе нитрозогуанидинового мутагенеза, обрабатывали УФ-лучами в течение 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 минут.

Выживаемость конидий *A. awamori* M1/13 после их обработки УФ-облучением составляла от 10,7% после 2 мин облучения конидий до 100% после 14 мин облучения.

В результате эксперимента было отобрано около 1000 клонов, у которых способность гидролизовать картофельный крахмал тестировали в чашечном тесте по величине $D_{п.кр.}/D_{к.}$. Из всех проанализированных клонов в результате было отобрано пять, у которых была проведена количественная оценка способности гидролизовать картофельный крахмал.

Значения амилазной активности, как показано на рисунке 3, у протестированных штаммов составили: для мутанта M1/13-1 – (1211 ± 122) ед./мл, M1/13-2 – (1020 ± 122) ед./мл, M1/13-3 – (594 ± 60) ед./мл, M1/13-4 – (695 ± 67) ед./мл, M1/13-5 – (927 ± 90) ед./мл, M1/13 – (954 ± 78) ед./мл. Следовательно, наибольшая способность расщеплять крахмал была характерна для мутантного штамма *A. awamori* под номером M1/13-1.

Для отобранных после УФ-мутагенеза клонов, как видно на рисунке 4, глюкоамилазная активность, определенная глюкозооксидазным-пероксидазным методом, характеризовалась следующими значениями: для мутанта M1/13-1 – (172 ± 17) ед./мл, M1/13-2 – (160 ± 15) ед./мл, M1/13-3 – (112 ± 11) ед./мл, M1/13-4 – (114 ± 12) ед./мл, M1/13-5 – (113 ± 10) ед./мл, M1/13 – (142 ± 13) ед./мл. Следовательно, наибольшими статистически значимыми ($p < 0,05$) значениями глюкоамилазной активности по сравнению с *A. awamori* M1/13 характеризовались мутанты под номерами M1/13-1 и M1/13-2.

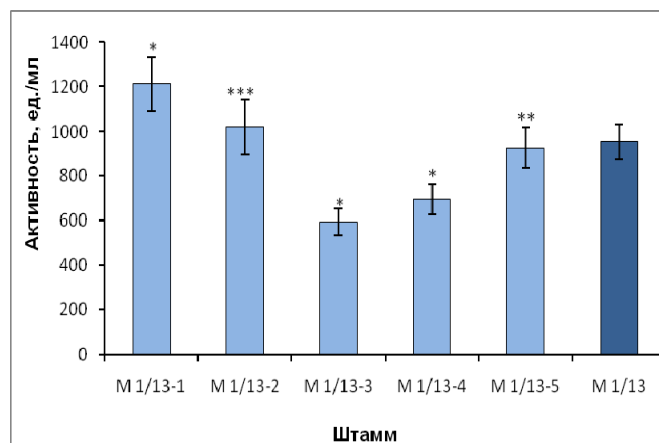


Рисунок 3 – Уровни амилазной активности мутантных штаммов *A. awamori* через 120 часов культивирования с аэрацией на среде с 24% пшеничной муки (ферментативная активность определена по количеству редуцирующих сахаров)

Примечание: * – результаты достоверны при $p < 0,05$, ** – $p = 0,06$, *** – $p = 0,12$.

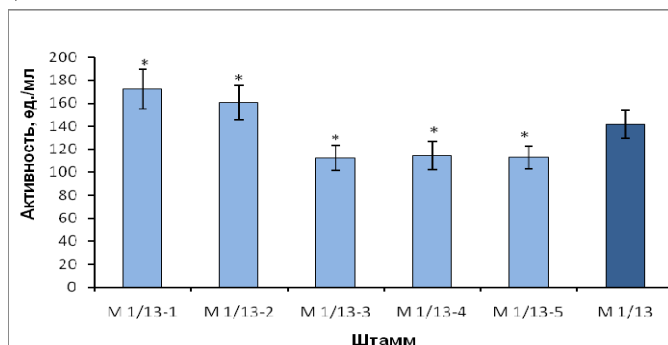


Рисунок 4 – Уровни глюкоамилазной активности мутантных штаммов *A. awamori* через 120 часов культивирования с аэрацией на среде с 24% пшеничной муки (ферментативная активность определена глюкозооксидазным-пероксидазным методом)

Примечание: * – результаты достоверны при $p < 0,05$.

Полученный в ходе этапов мутагенеза наиболее продуктивный вариант *A. awamori* M1/13 и его производный – M1/13-1 были проверены на стабильность по признаку синтеза глюкоамилазы в нескольких генерациях. После каждого из четырех пересевов на агаризованной модифицированной среде Чапека оценивали ферментативную активность микромицетов после глубинного культивирования в среде с 24% пшеничной муки. Обнаружено, что мутант *A. awamori* M1/13, полученный в результате НГ-мутагенеза, не

терял активности, в то время как у его производного М1/13-1, отобранного при воздействии УФ-лучей, наблюдалось снижение глюкоамилазной активности примерно на 16%.

Выводы

В результате этапов индуцированного мутагенеза с использованием алкилирующего агента N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидина и УФ-излучения отобран наиболее продуктивный вариант *A. awamori* М1/13 и его производный – *A. awamori* М1/13-1. В ходе проверки стабильности отобранных штаммов по признаку синтеза глюкоамилазы обнаружено снижение активности фермента у УФ-мутанта *A. awamori* М1/13-1; следовательно, на следующих этапах работы по созданию штамма-продуцента технического фермента глюкоамилазы целесообразнее использовать мутантный штамм *A. awamori* М1/13.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований на 2011–2015 годы «Молекулярно-генетические, физиолого-биохимические и клеточные основы создания новых биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, промышленности и охраны окружающей среды (Фундаментальные основы биотехнологий)».

Авторы выражают благодарность УП «Лотиос» за предоставление штамма *A. awamori* 466.

Список литературы

1. Дьяков, Ю.Т. Введение в генетику грибов / Ю.Т. Дьяков, А.В. Шнырева, А.Ю. Сергеев. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 304 с.
2. Hayashida, S. Production and characteristics of raw-starch-digesting α -amylase from a protease-negative *Aspergillus ficum* mutant / S. Hayashida, Y. Teramoto // Appl. Env. Microbiol. – 1986. – Vol. 52. – P. 1068–1073.
3. Ghosh, A. Production of glucoamylase by 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Aspergillus terreus* / A. Ghosh, B. Chatterjee, A. Das // Biotechnol. Letters. – 1991. – Vol. 13. – P. 515–520.
4. Hanh, V.V. Improvement of a fungal strain by repeated and sequential mutagenesis and optimization of solid-state fermentation for the hyper-production of raw-starch-digesting enzyme / V.V. Hanh, T.A. Pham, K. Kim // J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 20. – P. 718–726.
5. Увеличение продуктивности глюкоамилазы штамма *Aspergillus awamori* комбинацией методов радиационного мутагенеза и плазмидной трансформации / Ю.П. Винецкий [и др.] // Прикл. Биохим. Микробиол. – 2010. – Т. 46, № 6. – С. 685–692.
6. Серeda, А.С. Получение рекомбинантных штаммов *Aspergillus awamori* – продуцентов ферментов для эффективной конверсии полисахаридов зернового сырья при производстве спирта: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.18.07 / А.С. Серeda; ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии. – Москва, 2011. – 26 с.
7. Chemically treated strain improvement of *Aspergillus niger* for enhanced production of glucose oxidase / M.A. Zia [et al.] // Int. J. Agric. Biol. – 2010. – Vol. 12. – P. 964–966.
8. Skowronek, M. Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production / M. Skowronek, J. Fiedurek // J. of Applied Microbiol. – 2003. – Vol. 95. – P. 686–692.
9. Пат. 2070921 РФ, C12N1/14, C12N9/58. Штамм гриба *A. oryzae* – продуцент комплекса кислых и слабокислых протеаз, амилолитических и цитолитических ферментов. Римарева Л.В., Милукова Т.Б., Оверченко М.Б., Трифонова В.В., Устинников Б.А. Заявл. 19.10.1993; Опубл. 27.12.1996.
10. Пат. 2196821 РФ, C12N9/34, C12N1/14, C12N9/34, C12R1:665. Штамм мицелиального гриба *Aspergillus awamori* – продуцент глюкоамилазы. Окунев О.Н.; Сеницын А.П.; Черноглазов В.М.; Бурцева Э.И.; Цурикова Н.В. Заявл. 30.06.2000; Опубл. 20.01.2003.
11. Al-Turki, A.I. Improvement of glucoamylase production by *Aspergillus awamori* using microbial biotechnology techniques / A.I. Al-Turki, A.A. Khatlab, A.M. Ihab // Biotechnol. – 2008. – Vol. 7, №3. – P. 456–462.
12. Rajoka, M.I. Kinetics of enhanced ethanol productivity using raw starch hydrolyzing glucoamylase from *Aspergillus niger* mutant produced in solid state fermentation / M.I. Rajoka, A. Yasmin, F. Latif // Letters in Applied Microbiol. – 2004. – Vol. 39. – P. 13–18.
13. Amylase hyperproduction by deregulated mutants of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* / K. Rubinder [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 29. – P. 70–74.
14. Kuhad, R.C. A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum* / R.C. Kuhad, M. Kumar, A. Singh // Lett. Appl. Microbiol. – 1994. – Vol. 19. – P. 397–400.
15. Strain improvement of *Acremonium cellulolyticus* for cellulose production by mutation / X. Fang [et al.] // J. Biosci. Bioeng. 2009. – Vol. 107. – P. 256–261.
16. Kumar, P. Overproduction of glucoamylase by a deregulated mutant of a thermophilic mould *Thermomucor indicae-seudaticae* / P. Kumar, T. Satyanarayana // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – Vol. 158. – P. 113–125.
17. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / G.L. Miller // Anal. Chem. – 1959. – Vol. 31. – P. 426–429.
18. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта. М.: Мир, 1984. – Т.2. – 472 с.