

УДК 579.873.71.017.7

Р. К. БЛИЕВА, Ж. Б. СУЛЕЙМЕНОВА, Ж. К. РАХМЕТОВА, А. Е. НУРЛЫБАЕВА, Ж. К. САДУЕВА

(РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан)

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ *A. Awamori 1-8* В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Аннотация. В результате изучения популяционной изменчивости *Aspergillus awamori 1-8* было выявлено многообразие морфоформ исследуемой культуры. На II этапе процесса выращивания иммобилизованной культуры получен новый активный вариант *Aspergillus awamori 1-8/2* – продуцент пектинрасщепляющих ферментов. Если первоначально ферментативная активность исходной культуры *A. awamori 1-8* была 23,3% для ПМГ и 19,5% для ПГ, то среди вновь полученных изолятов сформировался вариант *A. awamori 1-8/2*, который образовывал пектинрасщепляющие ферменты (ПМГ и ПГ) до 34,9 и 29,3%, соответственно. Таким образом, в результате селекции получена культура, уровень ферментообразования которой превысил исходную в 1,3 раза.

Ключевые слова: пектинрасщепляющие ферменты, микромицеты, селекция, изменчивость, иммобилизация.

Тірек сөздер: пектиныдыратушы ферменттер, микромицеттер, сұрыптау, өзгергіштік, иммобилизация.

Keywords: pectin degrading enzymes, micromycetes, selection, variability, immobilization.

Введение. В настоящее время существует серьезная проблема низкого выхода сока и виноматериалов из тонны фруктово-овощного сырья вследствие присутствия в них и ягодах пектиновых веществ, составляющих 0,5% - 4% от свежей растительной массы, которые оказывают влияние на выход сока, его вязкость и прозрачность [1]. Одним из путей решения этой важной проблемы является добавление в ягоды, фруктовые и овощное сырье пектолитических ферментных препаратов. Наиболее важными ферментами пектолитического комплекса, участвующие в гидролизе пектиновых веществ различного типа являются полигалактуроназы. Производство ферментных препаратов, в том числе и пектинрасщепляющих, занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии, а основными используемыми продуцентами ферментов являются мицелиальные грибы.

Основным требованием, предъявляемым к ферментам, является их высокая каталитическая активность, которая напрямую связана с активностью продуцирующего этот фермент штамма микроорганизмов. Научные исследования ведущих биохимических лабораторий мира направлены на решение данной проблемы, т.е. на получение высокоактивного штамма – суперпродуцента пектиназ [2]. Использование такого высокоактивного штамма может снизить затраты на производство фермента что положительно скажется, в конечном счете, на стоимости конечного продукта. Однако, уровень производства промышленных ферментов часто остается очень низким из-за низкой активности используемых продуцентов и несовершенного метода их культивирования.

Одним из безопасных методов повышения активности микроскопических грибов является искусственная иммобилизация культуры на поверхности носителей, что приближает их рост к естественным условиям обитания в природе, повышая их резистентность и продуктивность, которые можно регулировать [3]. Традиционно применяемая в настоящее время технология производства ферментных препаратов использует глубинный метод культивирования микромицетов в периодических условиях. При таком выращивании их биомасса формируется в форме пеллетов, которая в процессе культивирования все больше уплотняется и становится малодоступной кислороду

и питательным веществам. Максимум целевого продукта такой биомассой образуется на 3-5 суток и только один раз, после чего культура автолизирована и ферментативная активность ее падает.

Нами предлагается новый способ культивирования мицелиальных микроорганизмов, который продлевает время культивирования продуцентов с 3-5 суток культивирования до 60 суток и создает возможность получать ферменты многократно, через каждые 2-3 суток выращивания. Он основан на иммобилизации продуцентов ферментов на твердом носителе и росте продуцента в глубинных условиях [4]. Более того, при длительном культивировании микромицетов на подложке культура претерпевает ряд причинных стрессов, что приводит к формированию множества новых морфологических форм (от 5 до 20), различающихся по ферментативной активности. Создается возможность отбора из популяции более активных вариантов без использования мутагенов химической и физической природы. Целью настоящего исследования явилось отбор высокоактивного изолята, сформированного на разных этапах длительного культивирования *Aspergillus awamori* 1-8.

Материалы и методы исследования

Объектами исследований служили микромицеты рода *Aspergillus* из коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии КН МОН РК и собственной коллекции лаборатории. В работе использовали общепринятые микробиологические и биохимические методы исследований.

Выращивание микромицетов рода *Aspergillus* проводили двумя методами – традиционным методом свободными клетками в периодических условиях роста и иммобилизованными клетками в глубинных условиях роста по методике, разработанной Р. К. Блиевой с использованием лабораторного аппарата [5]. Для селекции продуцентов ферментов также была использована иммобилизованная структура мицелия, длительно культивируемая на подложке.

Для выявления активного варианта, сформированного на подложке проводили отбор множества изолятов в разные периоды длительного культивирования, для чего отбирали изоляты на I и II этапах культивирования, связанные с периодичностью снятия мицелия с подложки. Пробы брали путем выщипывания мицелия с поверхности и из глубины иммобилизованной структуры. Готовили моноспоровую суспензию для посева на агаризованную питательную среду, для чего в пробирку добавляли 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученную взвесь – обрывки мицелия и одиночные клетки и клетки собранные в цепочки фильтровали через стеклянный фильтр с многослойной стерильной фильтровальной бумагой в стерильную пробирку. Фильтрованную взвесь разводили стерильной водой до нужной концентрации в соотношении 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000 и высевали на агаризованную среду в чашки Петри. В каждую чашку вносили по 0,1 мл разведенной взвеси, которую досуха растирали на поверхности среды с помощью стерильного стеклянного шпателя. Засеянные чашки инкубировали в течение 5-7 суток при 28-30 °С. После инкубации проводили подсчет выросших на чашках колоний. Полученные варианты выделяли в чистую культуру и выращивали в течение 3-4 суток в жидкой питательной среде. Затем определяли активность пектинрасщепляющих ферментов в культуральной жидкости.

Для определения потребности в отдельных компонентах питательной среды была использована среда Чапека, оптимизированная ранее для культуры *Aspergillus awamori* 1-8 следующего состава: пектин – 0,5%; глюкоза – 2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,7%; KCl – 0,05%; MgSO_4 – 0,05%; KH_2PO_4 – 0,1%; FeSO_4 – 0,001%. При изучении потребностей в источниках углерода и азота были использованы разные концентрации уже выявленного ранее оптимального источника углерода – сахара и пектин, а также оптимального источника азота – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Культивирование продуцентов осуществляли на качалке в периодических условиях роста при 28°C. В культуральной жидкости определяли ферментативную активность.

Определение полигалактуроназной (ПГ) и полиметилгалактуроназной (ПМГ) активностей проводили вискозиметрическим методом. В качестве субстрата были использованы 1% пектовая кислота и 1% высокоэтирифицированный яблочный пектин. Определение снижения вязкости субстратов проводили в сухом вискозиметре, погруженном в термостат при температуре 40°C. Реакционная смесь состояла из 5 мл субстрата, 0,5 мл 0,1 М ацетатного буфера с pH 4,6 и 0,5 мл культуральной жидкости. Определение снижения вязкости проводили с интервалом 2 мин. 1%

пектовую кислоту готовили следующим образом: навеску пектовой кислоты медленно всыпали при тщательном перемешивании в стакан с дистиллированной водой и из бюретки по каплям при перемешивании добавляли 1М раствор гидроокиси натрия для доведения раствора до рН 4,0. Полученный раствор пектовой кислоты количественно перенесли в мерную колбу на 100 мл, доводили до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивали и фильтровали через два слоя марли на воронке Бюхнера. Раствор субстрата использовали в день приготовления. 1%-ный раствор высокоэтерифицированного яблочного пектина готовили следующим образом: навеску пектина, взятую с таким расчетом, чтобы в 250 мл раствора было 2,5 г чистого пектина, который тонкой струей всыпали при непрерывном перемешивании на мешалке в коническую колбу вместимостью 300 мл, куда предварительно наливали около 130 мл дистиллированной воды. Раствор перемешивали в течение 4 часов на мешалке при комнатной температуре. По истечении этого времени в раствор добавляли при перемешивании раствор аммиака для установления рН 4,0. Затем объем раствора доводили дистиллированной водой до 250 мл, тщательно перемешали и профильтровали через два слоя марли на воронке Бюхнера. Раствор пектина готовили не менее чем за 4 часа до проведения анализа. За единицу полигалактуроназной и полиметилгалактуроназной активности принимали такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1% пектовой кислоты или 1% яблочного пектина со снижением вязкости раствора за 1 мин. при 35-40°C.

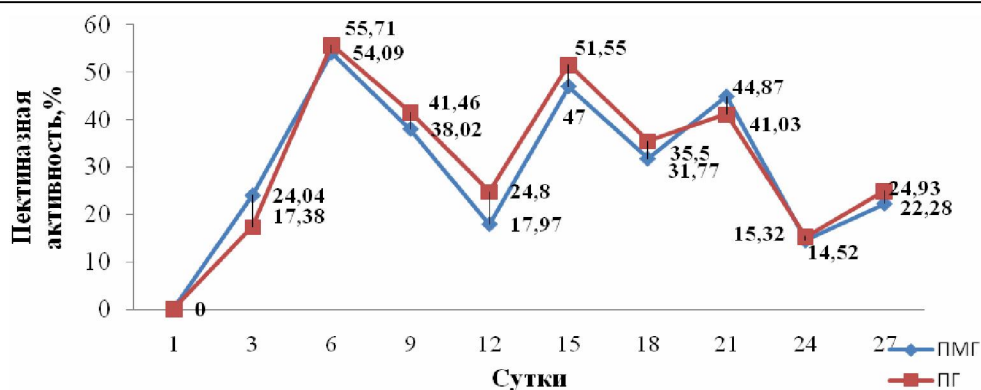
Результаты и их обсуждение

Для микромицетов, как и для других микроорганизмов, характерна популяционная изменчивость, которая обуславливает их приспособляемость к условиям среды обитания и прогрессивную эволюцию. Популяционная изменчивость может обеспечить возможность отбора из популяции более активных вариантов [6-8]. Изучение изменчивости микроорганизмов и отбор новых, более совершенных форм имеет большое значение. Метод непрерывного улучшающего отбора, разработанный В.И. Кудрявцевым дал одинаково хорошие результаты с дрожжами как для спиртовой, так и для винодельческой промышленности [9]. Для иммобилизованных клеток микроорганизмов популяционная изменчивость не изучена. Разработанный нами новый метод культивирования мицелиальных микроорганизмов создает оптимальные условия для биосинтеза ферментов и роста культур, а именно, резко возрастает продуктивность, резистентность и вариабельность культур, что может обеспечить возможность отбора у популяции более активных вариантов – продуцентов ферментов, обладающих высоким естественным потенциалом без использования мутагенов физической и химической природы.

При длительном выращивании иммобилизованных микроорганизмов на подложке формируется множество различных вариантов, среди которых образуется и высокоактивный. Предпосылкой для формирования активного варианта являются стрессы, которые испытывает культура в процессе длительного культивирования. Это механическое повреждение гиф при удалении скапливающегося мицелия с подложки, условия смены питательной среды – обедненной на полноценную и сам процесс длительного культивирования.

С целью изучения ферментообразующей способности пектинрасщепляющих ферментов *Aspergillus awamori* 1-8 на разных этапах длительного культивирования культуру выращивали в течение 27 суток при температуре 26-28°C на оптимизированной ранее питательной среде следующего состава: пектин – 0,5%, глюкоза – 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,7%; KCl – 0,05%; MgSO_4 – 0,05%; KH_2PO_4 – 0,1%; FeSO_4 – 0,001%, при 28-30°C (рисунок 1).

Как видно из представленных на рисунке данных максимум образования ПР ферментов приходится на 6 и 15 сутки, в связи с чем отбирали изоляты на I (6 сутки) и II (15 сутки) этапах культивирования. Всего с подложки было отобрано 12 изолятов – из периферийной и центральной зон роста. Все изоляты были пересеяны на косяки с оптимизированной ранее средой Чапека для дальнейшего изучения их биосинтетической способности. У каждого полученного варианта определяли уровень образования им комплекса пектинрасщепляющих ферментов (полиметилгалактуроназы и полигалактуроназы). С этой целью 12 полученных изолятов культивировали в периодических условиях в течение 3 суток. По истечении этого времени определяли уровень образования культурами пектинрасщепляющих ферментов (таблица 1).



Уровень образования пектинрасщепляющих ферментов иммобилизованной культурой *Aspergillus awamori 1-8*

Таблица 1 – Ферментативная активность вариантов, полученных на I этапе длительного культивирования *A. awamori 1-8*

№	Вариант	Активность пектинрасщепляющих ферментов, %	
		ПМГ	ПГ
1	<i>A. awamori 1-8 (исходный)</i>	24,3	22,6
2	<i>A. awamori 1-8/1</i>	20,0	29,3
3	<i>A. awamori 1-8/1-1</i>	12,2	5,1
4	<i>A. awamori 1-8/1-2</i>	27,6	22,6
5	<i>A. awamori 1-8/1-3</i>	8,9	18,7
6	<i>A. awamori 1-8/1-4</i>	10,6	17,9

Таблица 2 – Ферментативная активность вариантов, полученных на II этапе длительного культивирования *A. awamori 1-8*

№	Вариант	Активность пектинрасщепляющих ферментов, %	
		ПМГ	ПГ
1	<i>A. awamori 1-8 (исходный)</i>	25,79	24,86
1	<i>A. awamori 1-8/2</i>	34,9	31,8
2	<i>A. awamori 1-8/2-1</i>	15,5	12,8
3	<i>A. awamori 1-8/2-2</i>	22,4	5,9
4	<i>A. awamori 1-8/2-3</i>	16,3	14,8
5	<i>A. awamori 1-8/2-4</i>	19,6	25,2
6	<i>A. awamori 1-8/2-5</i>	26,5	13,8
7	<i>A. awamori 1-8/2-6</i>	18,6	8,6

Как видно из представленных в таблицах 1 и 2 данных, на I этапе длительного культивирования *A. awamori 1-8* уровень биосинтеза полиметилгалактуроназы (ПМГ) варьировал от 8,9 до 27,6% и полигалактуроназы (ПГ) – от 5, до 29,3%, тогда как на II этапе – от 15,5 до 34,9% (ПМГ) и от 5,9% до 31,8% (ПГ).

Таким образом, если первоначально ферментативная активность исходной культуры *A. awamori 1-8* на II этапе культивирования была 25,79% для ПМГ и 24,86% для ПГ, то среди вновь полученных изолятов сформировался вариант *A. awamori 1-8/2*, который образовывал пектинрасщепляющие ферменты (ПМГ и ПГ) до 34,9 и 29,3%, соответственно. Таким образом, получена культура, уровень ферментообразования которой превысил исходную в среднем в 1,3 раза.

Заключение. Изучение популяционной изменчивости исследуемой иммобилизованной культуры позволило выявить многообразие морфоформ у *Aspergillus awamori 1-8*. Получена новая активная культура – продуцент пектинрасщепляющих ферментов *Aspergillus awamori 1-8/2*, сформированная на II этапе процесса выращивания иммобилизованной культуры. если первоначально ферментативная активность исходной культуры *A. awamori 1-8* была 23,3% для ПМГ и 19,5% для

ПГ, то среди вновь полученных изолятов сформировался вариант *A. awamori* 1-8/2, который образовывал пектинрасщепляющие ферменты (ПМГ и ПГ) до 34,9% и 29,3%, соответственно. Таким образом, получена культура, уровень ферментообразования которой превысил исходную в 1,3 раза.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Manuel Pinelo et al. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity // Food and Bioproducts Processing. – 2010. – Vol. 88. – Issues 2-3. – P. 259-265.
- 2 Hu H.L., J. van den Brink, Gruben B.S., W?sten H.A.B., Gu J.-D., R.P. de Vries. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2011. – Vol. 65. – Issue 1. – P. 248-252.
- 3 Родионова Н.А., Миляева Э.В., Никифорова В.Ю., Мартинович Л.И., Загустина Н.А., Безбородов А.М. Влияние пектолитических ферментов и олигогалактуроновых кислот на цветение растений // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – № 5. – С. 564-569.
- 4 Блиева Р.К. Новый метод длительного культивирования и селекции продуцентов ферментов // Микробные биотехнологии: функциональные и прикладные аспекты. – 2013. – Т. 5. – С. 29-39.
- 5 Блиева Устройство для культивирования микроорганизмов с нитчатой структурой // Инновационный патент № 27164 от 25.06.2013 г.
- 6 Квачадзе Л.Л., Яшвили Т.Ш. Селекция термофильного штамма *Chaetomium thermophile* – продуцента термостабильных целлюлаз // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 5. – С. 644-649.
- 7 Steliana Clapco. Селекция некоторых штаммов микромицетов – продуцентов пектолитических ферментов и оптимизация условий развития и биосинтеза: Автореф. ...докт. биол. наук. – Румыния, 2006. – 26 с.
- 8 Алиханян С.И. Селекция промышленных микроорганизмов. – М.: Наука, 1968.
- 9 Печуркин Н.С., Термков И.А. Автоселекционные процессы в непрерывной культуре микроорганизмов. – Новосибирск, 1973.

REFERENCES

- 1 Manuel Pinelo et al. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. Food and Bioproducts Processing. 2010. Vol. 88. Issues 2-3. P. 259-265.
- 2 Hu H.L., J. van den Brink, Gruben B.S., W?sten H.A.B., Gu J.-D., R.P. de Vries. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. International Biodeterioration & Biodegradation. 2011. Vol. 65. Issue 1. P. 248-252.
- 3 Rodionova N.A., Miljaeva Je.V., Nikiforova V.Ju., Martinovich L.I., Zagustina N.A., Bezborodov A.M. Vlijanie pektoliticheskikh fermentov i oligogalakturonovykh kislot na cvetenie rastenij. Prikladnaja biohimija i mikro-biologija. 1999. № 5. S. 564-569.
- 4 Blieva R.K. Novyj metod dlitel'nogo kul'tivirovanija i selekcii producentov fermentov. Mikrobnye biotehnologii: funkcional'nye i prikladnye aspekty. 2013. T. 5. S. 29-39.
- 5 Blieva Ustrojstvo dlja kul'tivirovanija mikroorganizmov s nitchatoj strukturoj. Innovacionnyj patent № 27164 ot 25.06.2013 g.
- 6 Kvachadze L.L., Jashvili T.Sh. Selekcija termofil'nogo shtamma *Chaetomium thermophile* – producenta termostabil'nykh cellulaz, Mikrobiologija. 1997. T. 66, № 5. S. 644-649.
- 7 Steliana Clapco. Selekcija nekotoryh shtammov mikromicetov – producentov pektoliticheskikh fermentov i optimizacija uslovij razvitija i biosinteza: Avtoref. ...dokt. biol. nauk. Rumynija, 2006. 26 s.
- 8 Alihanjan S.I. Selekcija promyshlennykh mikroorganizmov. M.: Nauka, 1968.
- 9 Pechurkin N.S., Termkov I.A. Avtoselekcionnye processy v nepreryvnoj kul'ture mikroorganizmov. Novo-sibirsk, 1973.

Резюме

Р. К. Блиева, Ж. Б. Сүлейменова, Ж. Қ. Рахметова, А. Е. Нұрлыбаева, Ж. Қ. Садуаева

(ҚР БҒМ ҒК «Микробиология және вирусология институты» РМК, Алматы, Қазақстан)

ИММОБИЛИЗАЦИЯЛАНҒАН *A. awamori* 1-8 КУЛЬТУРАСЫНЫҢ ҰЗАҚ МЕРЗІМДІ ДАҚЫЛДАУ КЕЗІНДЕ ӨРТҮРЛІ КЕЗЕҢДЕРДЕГІ ӨЗГЕРГІШТІГІ

Микроскопиялық саңырауқұлақтар ферменттердің негізгі продуценттері болып табылады және тағам өндірісінде, ауылшаруашылығында қолданылады. Берілген зерттеу жұмысының мақсаты – ферменттердің продуцент-штамдарының белсенділігін жоғарылату әдістерін жасап шығару. Мақалада культураларды иммобилизациялау жолымен дақылдаудың жаңа технологиясы ұсынылған. *Aspergillus awamori* 1-8-дің популяциялық өзгергіштігін зерттеу нәтижесінде зерттелінген культураның көптеген морфоформалары анықталды.

Иммобилизацияланған культураны өсіру процесінің II кезеңінде пектиныдыратушы ферменттердің продуценті – *Aspergillus awamori* 1-8/2 жаңа белсенді варианты алынды. Алғашында *A. awamori* 1-8 бастапқы культураның ферменттік белсенділігі ПМГ үшін 23,3% және ПГ үшін 19,5% болса, жаңадан алынған изоляттардан *A. awamori* 1-8/2 варианты қалыптасып, ол пектиныдыратушы ферменттерді (ПМГ және ПГ) 34,9 және 29,3%, сәйкесінше, түзді. Сонымен, селекция жүргізу нәтижесінде бастапқы культураға қарағанда фермент түзу деңгейі 1,3 есеге артқан культура алынды.

Тірек сөздер: пектиныдыратушы ферменттер, микромицеттер, сұрыптау, өзгергіштік, иммобилизация.

Summary

R. K. Bliyeva, Zh. B. Suleimenova, Zh. K. Rakhmetova, A. E. Nurlybaeva, Zh. K. Saduyeva

(RSE «Institute of Microbiology and Virology» KH MES RK, Almaty, Kazakhstan)

VARIATION OF IMMOBILIZED CULTURE OF *A. awamori* 1-8 AT DIFFERENT PERIODS OF LONG TERM CULTIVATION

Filamentous fungi are major producers of enzymes that have important applications in the food and beverage industries. The overall objective of this research is a strain improvement technology for efficient enzymes production. In this paper a novel strain cultivation technology by immobilization of fungal cells for efficient pectinase production was presented. The study of population variability of *Aspergillus awamori* 1-8 was revealed many morfoforms. A new active variant of *Aspergillus awamori* 1-8/2 - pectinase enzymes producer was obtained during phase II of the process of growing of immobilized culture in liquid medium. Enzymatic activity of the parent culture of *A. awamori* 1-8 was 23.3% (PMG) and 19.5% (PG), and those of new variant of *A. awamori* 1-8/2 were 34.9 % and 29.3 %, respectively. Thus, as a result of selection process the level of pectinase activity of *A. awamori* 1-8/2 was 1.3 times higher than that of *A. awamori* 1-8 before selection procedure.

Keywords: pectin degrading enzymes, micromycetes, selection, variability, immobilization.