

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 165 – 173

M. A. Dzhakasheva, G. S. Rysbaeva, A. M. Essimova, Z. K. Narymbaeva, Zh. R. Elemanova

M. Auezov South-Kazakhstan state university, Shymkent, Kazakhstan.

E-mail: dzhakasheva_m@mail.ru

**SELECTION OF *ASPERGILLUS AWAMORI* STRAIN
FOR RECEPTION OF THE HIGHLY ACTIVE PRODUCER
OF THE COMPLEX OF PECTOLYTIC ENZYME**

Abstract. On a basis of filamentous fungi *Aspergillus awamori* by selection methods it is received new perspective mutant strain *Aspergillus awamori F-RKM 0719*, which complex of extracellular enzymes contains pectinases, cellulase and β -glucanase. As a result of screening of pectinases producers among the fungi cultures isolated from environment it is selected strain *A. awamori 56-2* which has served as an initial material for the subsequent selection work. With a view of an effective way of reception of low-toxicity mutagens, giving a high output of valuable mutations for selection, influence of monochromatic light on a metabolism of investigated producers is investigated. On the basis of multistage selection with processing of spores by beams of monochromatic light and nitrosomethyl urea it is received new mutant strain *A. awamori F-RKM 0719*, which pectolytic activity is increased in 7,5 times in comparison with mother wild strain. Cultural-morphological and physiology-biochemical properties of new mutant strain *A. awamori F-RKM 0719* are investigated. Strain is deposited in the Republican State Enterprise with the Right of Economic Management «Republican Collection of Microorganisms» of the Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan. As the perspective producer pectin fissionable enzymes, mutant strain can be used for creation of domestic biotechnology of reception fermental pectolytic preparation for winemaking.

Keywords: filamentous fungi, *Aspergillus awamori*, pectolytic enzyme, selection, screening, pectolytic activity.

УДК 77.151.52

М. А. Джакашева, Г. С. Рысбаева, А. М. Есимова, З. К. Нарымбаева, Ж. Р. Елеманова

Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Шымкент, Казахстан

**СЕЛЕКЦИЯ ШТАММА *ASPERGILLUS AWAMORI*
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОАКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА
КОМПЛЕКСА ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ**

Аннотация. На основе мицелиального гриба *Aspergillus awamori* методами селекции получен новый перспективный мутантный штамм *Aspergillus awamori F-RKM 0719*, комплекс внеклеточных ферментов которого содержит пектиназы, целлюлазы и β -глюканазы. В результате скрининга продуцентов пектиназ среди выделенных из природной среды грибных культур отобран штамм *A. awamori 56-2*, который послужил исходным материалом для последующей селекционной работы. В целях эффективного способа получения малотоксичных мутагенов, дающих высокий выход селекционно-ценных мутаций, исследовано влияние монохроматического света на метаболизм исследуемых продуцентов. На основе многоступенчатой селекции с обработкой спор лучами монохроматического света и нитрозометилмочевьиной получен новый мутантный штамм *A. awamori F-RKM 0719*, пектолитическая активность которого увеличена в 7,5 раз по сравнению с родительским диким штаммом. Исследованы культурально-морфологические и физиолого-биохимические

свойства нового мутантного штамма *A. awamori* F-RKM 0719. Штамм депонирован в Республиканском государственном предприятии на праве хозяйственного ведения «Республиканская коллекция микроорганизмов» комитета науки министерства образования и науки Республики Казахстан. Как перспективный продуцент пектинрасщепляющих ферментов, мутантный штамм может быть использован для создания отечественной биотехнологии получения пектолитического ферментного препарата для виноделия.

Ключевые слова: мицелиальный гриб, *Aspergillus awamori*, пектолитические ферменты, селекция, скрининг, пектолитическая активность.

Введение. В настоящее время пектолитические ферменты (ПФ) играют большую роль в осуществлении физиологических процессов, связанных с разрушением растительных клеточных стенок или модификаций [1]. Из аспектов практического использования пектиназ следует выделить винодельческую промышленность, так как они способствуют повышению выхода сока и содержания в нем ароматобразующих, красящих и других экстрактивных веществ [2]; облегчению прессования мезги; осветлению виноматериалов; повышению розливостойкости готовой продукции к помутнениям коллоидной природы [3].

На современном этапе для разработки научных основ ферментных технологий для перерабатывающих отраслей агропромышленного комплекса является поиск эффективных продуцентов пектиназ, полученных на основе генетических и селекционных методов [4]. Наиболее часто используемые промышленные штаммы-продуценты пектиназ относятся к роду *Aspergillus*, синтезирующие богатый комплекс гидролитических ферментов [5-7]. 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 [8-10]. 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. Всякая мутация – это внесение нового элемента в отрегулированную систему гено-типа. В результате эффект мутации может оказаться как положительным (улучшающий генотип), так и отрицательным (нарушающим его слаженность, жизнеспособность) для данного микроорганизма [11]. Поэтому в настоящее время ведется поиск новых малотоксичных, но эффективных способов получения мутагенов, дающих высокий выход селекционно-ценных мутаций. В связи с тем, что в Казахстане отсутствует производство ферментных препаратов (ФП) и в винодельческой промышленности используются импортные ФП, разработка биотехнологии производства отечественного пектолитического препарата, основанная на использовании микроорганизмов – высокоактивных продуцентов ферментов является актуальной и значимой.

Цель исследований – получение высокоактивного штамма-продуцента комплекса пектин-расщепляющих ферментов.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали более 100 грибных штаммов, относящихся к роду *Aspergillus* и выделенных из различных природных объектов (почв, растительных остатков). Изоляты грибов выделяли методами почвенных разведений или накопительных культур [12, 13]. Идентификацию выделенных грибов до рода проводили на основании результатов, полученных при анализе макро, микроморфологических признаков, морфологических особенностей спороншения исследуемой культуры, и сопоставление с таковыми, представленными в определителях [14, 15].

Для выделения продуцента, обладающего способностью к сверхсинтезу ПФ, использовали качественный (чашечный) метод скрининга [16], основанный на выращивании культур на агаризованных селективных средах с применением метилового оранжевого в качестве индикатора, позволяющего по окрашенным зонам гидролиза, отбирать колонии. Выявление наиболее активных штаммов проводили высевом 7-ми дневной споровой суспензии исходных штаммов на чашки, содержащие трудногидролизуемые селективные агаризованные среды из яблочного, арбузного, цитрусового, виноградного пектина. Посевы выращивали в течение 7-ми суток при 28°C до фор-

мирования колоний. Интенсивность синтеза пектиназ клонов тестировали по величине отношения диаметра окрашенных зон гидролиза к диаметру колонии ($D = D_{\text{озг}}/D_{\text{к}}$). Клоны, имеющие значение D в 2-3 раза выше, чем в контроле, тестировали на эффективность синтеза ПФ при периодическом культивировании на жидких средах.

Для получения гиперпродуцента ПФ споры мицелиальных грибов, выращенных на сусло-агаре, смывали со скошенного агара стерильной дистиллированной водой. На первой ступени селекции 10 мл водной суспензии спор (титр разведения – 10^{-4} - 10^{-6}) выращивали в чашках Петри с селективными агаризованными средами, содержащими арбузный, виноградный пектин при постоянном освещении монохроматором «ЛМ-3» с $\lambda=530$ нм и мощностью светового потока $3,5 \text{ Вт/м}^2$ в течение 2-5 суток при 28°C . Интенсивность синтеза пектиназ клонов тестировали по вышеописанной методике. На второй ступени селекции наиболее продуктивный вариант снова подвергли облучению при выращивании на селективных агаризованных средах, содержащих виноградный пектин и лактозу 0,1%. Суспензию конидий наиболее активного штамма (титр разведения – 10^{-4} - 10^{-6}) на третьей ступени селекции вносили в пробирки с фосфатным буфером объемом 1 мл, содержащие нитрозометилмочевину (НММ) в концентрации от 0,1-0,5 мг/мл и инкубировали в течение 10-30 мин. По окончании тридцатиминутной инкубации из обработанной мутагеном суспензии отбирали пробы выживаемостью 0,5-1% по 0,5 мл и делали ряд десятикратных разведений в фосфатном буфере pH 7,0. Затем клетки засеивали на селективные среды из виноградного пектина и лактозы 0,1% и облучали по схеме, описанной выше.

Глубинное культивирование грибов проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды (ПС) на качалке (200-220 об/мин) при $28\text{-}30^\circ\text{C}$ в течение 96 ч с pH – 3,2. ПС содержала масс. %: свекловичный жом – 3, сахароза – 2, солодовые ростки – 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1, KH_2PO_4 – 0,1, MgSO_4 – 0,1.

Активность пектолитического комплекса ферментов определяли по методике действующего ГОСТ Р 55298-2012. Целлюлазную и β -глюканазную активность определяли по количеству высвободившихся редуцирующих веществ, определяемых методом Шомоди-Нельсона [17].

Результаты и их обсуждение

В результате анализа литературных данных [6, 7, 18, 19] в качестве наиболее перспективных видов микроорганизмов, продуцирующих внеклеточные пектиназы, нами были определены мицелиальные грибы рода *Aspergillus* видов *A. foetidus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. orizae* и из всего множества микрофлоры образцов выделяли только эти микроорганизмы. С помощью чашечного метода скрининга проанализировали способность более 100 штаммов синтезировать ПФ. Было установлено, что грибы образовали большие зоны гидролиза в течение 3-7 суток. На первом этапе по зоне просветления вокруг колоний отобраны 9 штаммов, из которых 3 – *A. foetidus*, 4 – *A. niger*, 2 – *A. awamori*. Отобранные штаммы культивировали на жидкой ПС и определяли общую пектолитическую активность. Наибольшее количество пектиназы продуцировали штаммы *A. niger* (0,30 ед/мл), *A. foetidus* (0,25 ед/мл) и *A. awamori* (0,22 ед/мл), которые были вновь пересеяны на селективные агаризованные среды с трудногидролизруемыми субстратами для вторичного скрининга. В результате было получено более 300 различных образцов исходных штаммов, из которых было отобрано 15 изолятов, отличающихся морфологическими признаками. Для определения пектолитической активности, отобранные колонии культивировали в колбах с жидкой ПС в течение 4-х суток. Наиболее активным по пектиназной активности оказался штамм *A. awamori* 56 (0,64 ед/мл), который был выбран для дальнейших селекционных работ.

В работе [20] описано активирующее действие монохроматического света (МХС) на мицелиальные грибы для получения продуктов микробиологического синтеза. МХС представляет собой электромагнитную волну одной определённой и строго постоянной частоты, которую получают, выделяя спектральную линию или узкий участок спектра при помощи спектральных приборов, таких как монохроматоры или светофильтры. Такое воздействие МХС мощностью светового потока $3,5 \text{ Вт/м}^2$ в течение 4-х сут на первом этапе экспериментов дало положительные результаты. В результате селекции активированных штаммов было получено более 100 различных клонов исходного штамма *A. awamori* 56-2. Отобранные на данном этапе 11 вариантов с наилучшими

морфологическими признаками культивировали на жидких ПС для определения общей пектолитической активности. По результатам данных рисунка 1, наибольшая пектолитическая активность (0,85 ед/мл) наблюдалась у варианта *A. awamori* 56-2-53. На этом этапе отбора пектолитическая активность штамма *A. awamori* 56-2-53 повысилась на 25%.

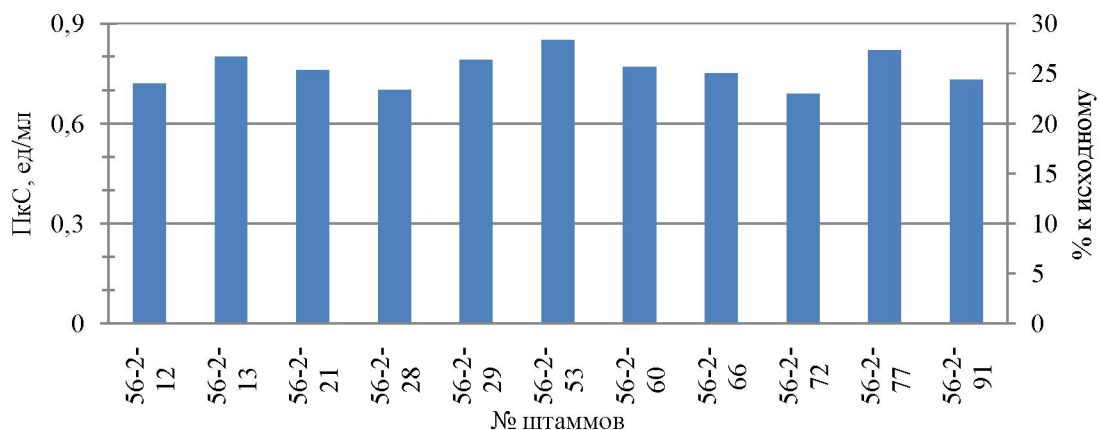


Рисунок 1 – Результаты первой ступени селекционных работ активированного штамма *A. awamori* 56-2

На второй ступени селекции наиболее продуктивный вариант штамм *A. awamori* 56-2-53 снова подвергли облучению МХС длиной волны $\lambda=530$ нм и мощностью светового потока $3,5 \text{ Вт/м}^2$ в течение 4 суток при 28°C при выращивании на селективных агаризованных средах, содержащих виноградный пектин и лактозу 0,1%, которая, как известно [21], в определенных условиях обладает свойствами индуктора ферментов.

В результате второго отбора выделено 5 вариантов из 150, отличающихся по морфологическим признакам и повышенной способностью к образованию ПФ (рисунок 2). Наибольшая активность пектиназы наблюдалась у варианта *A. awamori* 56-2-53-85, которая составила 1,17 ед/мл, что на 27% выше активности предыдущего клона.

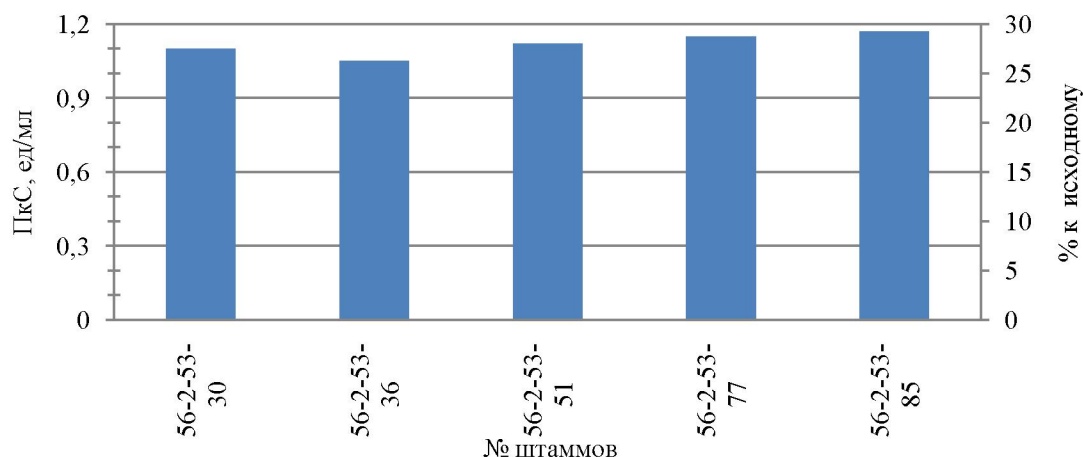


Рисунок 2 – Результаты второй ступени селекционных работ активированного штамма *A. awamori* 56-2-53

Для дальнейшего повышения физиологической активности отобранного штамма была проведена третья ступень селекции, в которой мутант получен в результате комбинированного действия НММ и МХС. НММ является мощным химическим мутагеном (супермутантом), который вызывает мутации посредством алкилирования и окисления оснований нуклеотидов [22]. Подсчет колоний осуществляли на третьи сутки, строили график выживаемости клеток в зависимости от концентрации НММ и длительности инкубации (рисунок 3).

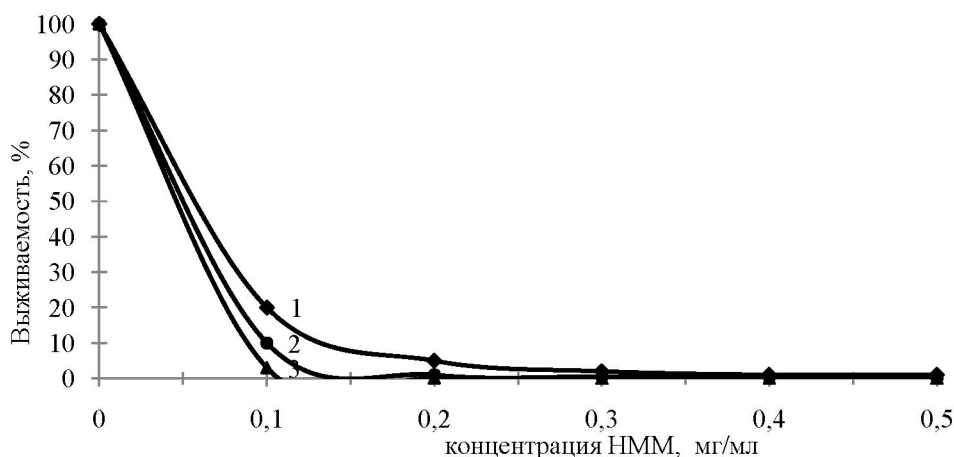


Рисунок 3 – Кривая выживаемости клеток штамма *A. awamori* 56-2-53-85 после обработки НММ. Обозначение кривых: длительность облучения: 1 – 10 мин; 2 – 20 мин; 3 – 30 мин.

Из полученных данных рисунка 3 видно, что обработка спор НММ при концентрации 0,2 мг/мл в течение 20 мин обеспечивает долю выживших клеток 0,5-1%. Под влиянием НММ и МНХ было получено еще 230 клонов штамма *A. awamori* 56-2-53-85, 9 из них были отобраны по морфологическим признакам и активности пектиназ (рисунок 4).

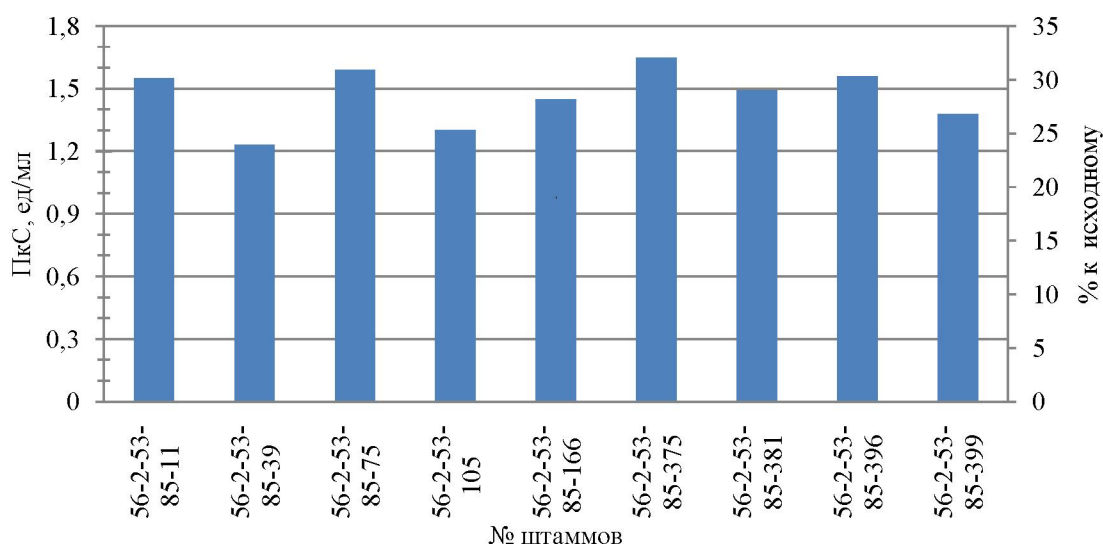


Рисунок 4 – Результаты третьей ступени селекционных работ мутантного штамма *A. awamori* F-RKM 0719

В результате третьей ступени селекции были получены клоны с пектолитической активностью, превышающих активность мутантных штаммов после первой и второй ступеней селекции от 5 до 29%. Наиболее активным оказался штамм *A. awamori* F-RKM 0719 с пектолитической активностью 1,65 ед/мл.

На следующем этапе работ изучали морфологию отобранного штамма *A. awamori* F-RKM 0719. В таблице 2 представлены основные культурально-морфологические характеристики полученного мутантного штамма *A. awamori* F-RKM 0719.

Как видно из данных таблицы 2, выделенный мутантный штамм *A. awamori* F-RKM 0719 отличается размерами колоний, их цветом, структурой и плотностью биомассы на различных агаризованных средах. Колонии мутантного штамма по размеру меньше, имеют более однородную структуру колоний. Исследования, проведенные в лаборатории контроля качества и безопасности продуктов питания Казахской академии питания ТОО «Нутритест» показали, что селекционированный мутантный штамм *A. awamori* F-RKM 0719 непатогенен.

Таблица 2 – Макроскопические характеристики штамма *A. awamori F-RKM 0719*

Признаки	Морфологические характеристики		
	Питательная среда		
	Сусло-агар	Мальт-пептонный агар	Картофельно-глюкозный 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

Для получения технических ФП с помощью микробиологического синтеза одним из важных моментов является продуцируемый микроорганизмом ферментативный состав. В большинстве культур микроорганизмов ПФ присутствуют в виде сложного комплекса, состоящего из деэтерифицирующих ферментов – пектинметилэстераз и деполимеризующих ферментов – полигалактуроназ и лиаз. Представленные в табл. 3 биохимического состава ферментативного комплекса штамма *A. awamori F-RKM 0719* показывают о наличии комплекса пектиназ, а также целлюлазы, β -глюканазы.

Таблица 3 – Биохимический состав ферментативного комплекса исходного и мутантного штамма *A. awamori F-RKM 0719*

Биохимический состав	Ферментативная активность, ед/мл	
	исходный	мутантный
Общая пектолитическая	0,22	1,65
Полигалактуроназная	0,11	0,97
Пектинэстеразная	0,10	0,52
Пектинлиазная	0,19	1,30
Целлюлазная	0,15	0,90
β -глюконазная	0,19	1,22

Таким образом, в результате многоступенчатой селекции получен новый мутантный штамм *A. awamori F-RKM 0719*, по уровню активностей который превышает родительский штамм: по общей пектолитической активности на 86,7%; полигалактуроназе – 88,7%; пектинэстеразе – 80,8%; пектинлиазе – 85,4%; целлюлазе на 83,3% и β -глюконазе – 84,4%. Штамм депонирован в Республиканском государственном предприятии на праве хозяйственного ведения «Республиканская коллекция микроорганизмов» комитета науки министерства образования и науки Республики Казахстан.

Заключение. Проведены сравнительные исследования различных микроорганизмов-продуцентов ПФ и осуществлен скрининг наиболее активного штамма *A. awamori 56*. Методами мутагенеза и селекции получен новый активный штамм *A. awamori F-RKM 0719*, пектолитическая активность которой увеличена в 7,5 раза по сравнению с исходным диким штаммом. Исследованы культурально-морфологические особенности мутантного штамма. Установлен состав ферментативного комплекса, синтезируемого данной культурой. Полученный штамм обладал биосинтетической способностью по отношению к комплексу пектиназ, а именно полигалактуроназе, пектинэстеразе и пектинлиазе, а также ферментам целлюлазе и β -глюконазе. Полученный высокоактивный мутантный штамм *A. awamori F-RKM 0719* может быть использован для создания отечественной биотехнологии получения пектолитического ферментного препарата для виноделия.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Донцов А.Г. Пектинолитические ферменты: очистка, активация, микробиологический синтез / А.Г. Донцов, А.А. Шубаков. – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2010. – С. 82-90. – ISBN 978-5-7691-2148-7.
- [2] Агеева Н.М. Влияния ферментных препаратов на состав ароматообразующих компонентов в красных столовых винах / Н.М. Агеева, В.А. Маркосов // Виноделие и виноградарство. – 2013. – № 3. – С. 19-22.
- [3] Ajayi A.A. Studies on pectinolytic and proteolytic enzymes from deteriorated grapes (*Vitis vinifera*) / A.A. Ajayi, E.O. Osunlalu, C.F. Peter-Albert, A.O. Adejuwon // Covenant Journal of Physical and Life Sciences. – 2014. – Vol. 1, N 2. – P. 1-15.
- [4] Бушина Е.В. Новые ферментные препараты с высокой активностью пектиназ и гемицеллюлаз на основе штаммов-продуцентов *Penicillium canescens* / Е.В. Бушина, О.Г. Короткова, А.В. Копелев, В.А. Немапкалов, А.М. Рожкова, Е.А. Рубцова, А.П. Синицын // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 5. – С. 502-511. – DOI: 10.7868/S0555109915050141.
- [5] Nakkeeran E. Techno-economic analysis of processes for *Aspergillus carbonarius* polygalacturonase production / E. Nakkeeran, M.K. Gowthaman, S. Umesh-Kumar, R. Subramanian // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2010. – Vol. 113, N 5. – P. 634-40. – DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.021.
- [6] Dhillon S.S. Studies of the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger* / S.S. Dhillon, R.K. Gill, S.S. Gill, M. Singh // International Journal of Environmental Studies. – 2004. – Vol. 61. – P. 199-210. – DOI: 10.1080/0020723032000143346
- [7] Blandino A. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation / A. Blandino, T. Iqbalsyah, S.S. Pandiella, D. Cantero, C. Webb // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 58, N 2. – P. 164-169. – DOI: 10.1007/s00253-001-0893-4.
- [8] Radha S. Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation / S. Radha, R. Himakiran Babu, A. Sridevi, N. B. L. Prasad, G. Narasimha // European Journal of Experimental Biology. – 2012. – Vol. 2, N 5. – P. 1517-1528. – DOI: 10.1080/09593330.2012.701236
- [9] Skowronek M. Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production / M. Skowronek, J. Fiedurek // J. Appl. Microbiol. – 2003. – N 4. – P. 686-692. – DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02027.x.
- [10] Ho H.L. Strain development of *Aspergillus brasiliensis* using physical and chemicals mutagenesis for possible overproduction of xylanase, amylase, protease and cellulase under submerged fermentation / H.L. Ho, M.H. Abduljubar // British Microbiology Research Journal. – 2016. – Vol. 12, N 5. – P. 1-19. – DOI: 10.9734/BMRJ/2016/22953.
- [11] Барабанщиков Б.И. Мутационный анализ: учебное пособие / Б.И. Барабанщиков, Э.В. Бабынин, Р.Г. Хамидулина. – Казань: Изд-во КГУ, 2003. – С. 45-50.
- [12] Билай В.И. Методы экспериментальной микологии / В.И. Билай; под ред. В.И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1973. – 242 с.
- [13] Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. уч. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук Н.Н. Колотилова; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с. ISBN 576951809X.
- [14] Билай В.И. Аспергиллы / В.И. Билай, Э.З. Коваль. – Киев: Наукова думка, 1988. – 204 с.
- [15] Билай Т.И. Определитель термофильных грибов / Т.И. Билай, В.А. Захарченко. – Киев: Наукова думка, 1987. – 112 с.
- [16] Сапунова Л.И. Чашечный метод скрининга микроорганизмов – продуцентов ксилонизомеразы / Л.И. Сапунова, А.Г. Лобанок, И.О. Казакевич, А.Н. Евтушенко // Микробиология. – 2004. – № 1. – С. 126-132.
- [17] Препараты ферментные. Методика выполнения измерений β глюконазной, ксиланазной, целлюлазной активностей. – Минск: РУП «Бел. гос. ин-т метрологии», 2009. – 36 с.
- [18] Roselei C.F. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* / C.F. Roselei, A.P. Tomas, M. D. S. Mauricio // Bioresource Technology. – 2009. – Vol. 100. – P. 4493-4498.
- [19] Taskin E. The enhancement of polygalacturonase and polymethylgalacturonase production on solid state conditions by *Aspergillus foetidus* / E. Taskin, R. Eltem // Food Biotechnology. – 2008. Vol. 223, N 22. – P. 203-217. – DOI: 10.1080/08905430802262533.
- [20] Величко Б.А., Абрамова Г.В., Шутова Л.А., Когтев Л.С., Волохова М.В. Способ получения продуктов микробиологического синтеза: Патент № 2027758, РФ, МПК C12N9/14, C08B37/08, C12P7/64, C12N1/14. Заяв. 30.03.1992. Опубл. 27.01.1995.
- [21] Сапунова Л.И. Условия синтеза пектиназ и протеаз грибом *A.alliaceus* и получение комплексного препарата мацерующего действия / Л.И. Сапунова, А.Г. Лобанок, Р.В. Михайлова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. – Т. 33, № 3. – С. 292-295.
- [22] Rosenkranz H.S. Effects of nitrosomethylurea and nitrosomethylurethan on the physical chemical properties of DNA / H. S. Rosenkranz, S. Rosenkranz, R. M. Schmidt // Biochimica et Biophysica Acta - Nucleic Acids and Protein Synthesis. – 1969. – Vol. 195, N 1. – P. 262-265. – DOI: 10.1016/0005-2787(69)90627-3.

REFERENCES

- [1] Doncov A.G., Shubakov A.A. (2010) Pectinolytic enzymes: cleaning, activating, microbiological synthesis [Pektinoliticheskie fermenty: ochistka, aktivacija, mikrobiologicheskij sintez]. Ekaterinburg: Publishing House of the Ural Branch of R [Ekaterinburg: UrO RAN]. P. 82-90. ISBN 978-5-7691-2148-7. (In Russian)
- [2] Ageeva N.M., Markosov V.A. (2013) Influence of enzyme preparations on the composition of aromaforming components in the red table wines. [Vlijaniya fermentnyh preparatov na sostav aromatoobrazujushhih komponentov v krasnyh stolovyh vinah]. Wine-making and Viticulture [Vinodelie i vinogradarstvo]. 3: 19-22. (In Russian)
- [3] Ajayi A.A., Osunlalu E.O., Peter-Albert C.F., Adejuwon A.O. (2014) Studies on pectinolytic and proteolytic enzymes from deteriorated grapes (*Vitis vinifera*), *Covenant Journal of Physical and Life Sciences*, 1(2): 1-15.
- [4] Bushina E.V., Korotkova O.G., Koshelev A.V., Nemashkalov V.A., Rozhkova A.M., Rubcova E.A., Sinicyn A.P. (2015) Novel preparations with high pectinase and hemicellulase activity based on *Penicillium canescens* strain [Novye fermentnye preparaty s vysokoj aktivnost'ju pektinaz i gemicelljulaz na osnove shtammov-producentov *Penicillium canescens*] *Applied Biochemistry & Microbiology [Prikladnaja biohimija i mikrobiologija]*. 51(5): 502-511. DOI: 10.7868/S0555109915050141. (In Russian)
- [5] Nakkeeran E., Gowthaman M.K., Umesh-Kumar S., Subramanian R. (2010) Techno-economic analysis of processes for *Aspergillus carbonarius* polygalacturonase production, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 113(5): 634-40. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.021.
- [6] Dhillon S.S., Gill R.K., Gill S.S., Singh M. (2004) Studies of the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*, *International Journal of Environmental Studies*. 61:199-210. DOI: 10.1080/0020723032000143346.
- [7] Blandino A., Iqbalsyah T., Pandiella S.S., Cantero D., Webb C. (2002) Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58(2):164-169. DOI: 10.1007/s00253-001-0893-4.
- [8] Radha S., Himakiran Babu R., Sridevi A., Prasad N. B. L., Narasimha G. (2012) Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation, *European Journal of Experimental Biology*. 2(5): 1517-1528. DOI: 10.1080/09593330.2012.701236
- [9] Skowronek M., Fiedurek J. (2003) Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. 3(4):686-692. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02027.x.
- [10] Ho H.L., Abduljubar M.H. (2016) Strain development of *Aspergillus brasiliensis* using physical and chemicals mutagenesis for possible overproduction of xylanase, amylase, protease and cellulase under submerged fermentation, *British Microbiology Research Journal*. 12(5): 1-19. DOI: 10.9734/BMRJ/2016/22953.
- [11] Barabanshchikov B.I., Babynin E.V., Khamidullina R.G. (2003) Mutational analysis: a manual [Mutatsionnyy analiz: uchebnoye posobiye]. Kazan: Publishing house KSU [Kazan': Izd-vo KGU]. 45-50. (In Russian)
- [12] Bilay V.I. (1973) Methods of experimental mycology [Metody eksperimental'noy mikologii]. Kiev: Naukova Dumka [Kiyev: Naukova dumka]. 242 p. (In Russian)
- [13] Netrusov A.I., Yegorova M.A., Zakharchuk L.M., Kolotilova N.N. (2005) Practice on Microbiology: Textbook for students of higher educational institutions [Praktikum po mikrobiologii: ucheb. posobiye dlya stud. vyssh. uch. Zavedeniy]. Moscow: Publishing Center «Academy» [M.: Izdatel'skiy tsentr «Akademija»]. 608 p. ISBN 576951809X. (In Russian)
- [14] Bilay V.I., Koval E.Z. *Aspergilla [Aspergilly]* Kiev: Naukova Dumka [Kiyev: Naukova dumka]. 204 p. (In Russian)
- [15] Bilay T.I., Zakharchenko V.A. Determinant of thermophilic fungi [Opredelitel' termofil'nykh gribov]. Kiev: Naukova Dumka [Kiyev: Naukova dumka]. 112 p. (In Russian)
- [16] Sapunova L.I., Lobanok A.G., Kazakevich I.O., Evtushenkov A.N. (2004) A qualitative method for screening microorganisms - producers of xylo isomerase [Chashechnyy metod skrinings mikroorganizmov – produktentov ksiloizomerazy]. *Microbiology [Mikrobiologiya]*. 1:126-132. (In Russian)
- [17] (2009) Enzyme preparations. The method for measuring β -glucanase, xylanase, cellulase activity [Preparaty fermentnyye. Metodika vypolneniya izmereniy β -glyukanaznoy, ksilanaznoy, tsellyulaznoy aktivnostey]. Minsk: RUE "Bel. State. Institute of Metrology [Minsk: RUP «Bel. gos. in-t metrologii»]. 36 p. (In Russian)
- [18] Roselei C. F., Tomas A.P., Mauricio M. D. S. (2009) Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*. 100: 4493-4498.
- [19] Taskin E., Eltem R. (2008) The enhancement of polygalacturonase and polymethylgalacturonase production on solid state conditions by *Aspergillus foetidus*. *Food Biotechnology*. 223(22): 203–217 DOI:10.1080/08905430802262533.
- [20] Velichko B.A., Abramova G.V., Shutova L.A., Kogtev L.S., Volokhova M.V. (1995) Method for obtaining products of microbiological synthesis [Sposob polucheniya produktov mikrobiologicheskogo sinteza]: Patent No. 2027758, the Russian Federation [Patent №2027758, Rossiyskaya Federaciya]. (In Russian)
- [21] Sapunova L.I., Lobanok A.G., Mikhaylova R.V. (1997) Conditions of synthesis of pectinases and proteases by *Aspergillus alliaceus* and production of a complex macerating preparation [Usloviya sinteza pektinaz i proteaz gribom *A.alliaceus* i polucheniye kompleksnogo preparata matseriruyushchego deystviya]. *Appl. Biotechnol. Microbiol. [Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya]*. 33:257 (In Russian)
- [22] Rosenkranz H.S., Rosenkranz S., Schmidt R. M. (1969) Effects of nitrosomethylurea and nitrosomethylurethan on the physical chemical properties of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta - Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 195(1): 262-265 DOI: 10.1016/0005-2787(69)90627-3.

М. Ә. Джақашева, Г. С. Рысбаева, А. М. Есімова, З. Қ. Нарымбаева, Ж. Р. Елеманова

М. Өуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, Шымкент, Қазақстан

**ASPERGILLUS AWAMORI ШТАММЫНЫҢ ЖОҒАРЫБЕЛСЕНДІ КОМПЛЕКСТІ
ПРОДУЦЕНТТЕРІН ПЕКТОЛИТИКАЛЫҚ ФЕРМЕНТТЕРДІ АЛУ ҮШІН СЕЛЕКЦИЯЛАУ**

Аннотация. *Aspergillus awamori* мицелиалық саңырауқұлағының негізінде селекциялау тәсілі арқылы жаңа келешегі зор мутантты *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 штаммы алынды, бұл комплексті жасушасыртындағы ферменттерді пектиназаны, целлюлазаны және β-глюканазаны құраушы болып келеді. Скрининг нәтижесінде пектиназа продуценттерінің ішіндегі табиғи ортадан бөлініп алған саңырауқұлақтардың ішінде *A. awamori* 56-2 штаммы тандалды, бұл бастапқы материал ретінде келесі селекциялық жұмыстарға қажет болды. Азмөлшерлі мутагендердің тиімді тәсілдер арқылы алу мақсатында, селекциялық-бағалы мутациялардың шығымы жоғары көрсетті, монохроматикалық сәулелі жарықтың әсері зерттеп отырған продуценттердің метаболизміне әсер етуі зерттелді. Көпсатылы селекциялаудың негізінде монохроматикалық сәулелі жарықпен және нитрозометилмочевинамен спораларды өңдеу арқылы жаңа мутантты штамм *A. awamori* F-RKM 0719 алынды, оның пектолитикалық белсенділігі ата-аналық жабайы штаммдармен салыстырғанда 7,5 есе өтті. *A. awamori* F-RKM 0719 жаңа мутант штаммының мәдени-морфологиялық және физиологиялық-биохимиялық қасиеттері зерттелді. Штамм Қазақстан Республикасының Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» ішіне қарасты Республикалық мемлекеттік өндірістің құқығында шаруашылық қожалықтың меншігінде депонирленген. Келешегі зор пектиныдратушы фермент продуценттері есебінде, мутантты штамм есебінде отандық биотехнологияны құру үшін пектолитикалық фермент препараты шарап өндірісі үшін қолдана алады.

Түйін сөздер: мицелиалық саңырауқұлақтар, *Aspergillus awamori*, пектолитикалық ферменттер, селекция, скрининг, пектолитикалық белсенділігі.