

Instytut Mikrobiologii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Zdzisław ILCZUK, Jan FIEDUREK

**Indukcja i selekcja mutantów auktotroficznych *Aspergillus niger*
oraz ocena ich aktywności amylolitycznej***

**Индукция и селекция аукоотрофных мутантов *Aspergillus niger* и оценка их
амилолитической активности**

**Induction and Selection of Auxotrophic Mutants of *Aspergillus niger*
and Evaluation of Their Amylolytic Activity**

Zainteresowanie mutantami auktotroficznymi mikroorganizmów, jako kulturami potencjalnie przydatnymi w procesach biosyntezy przemysłowych, datuje się od niezbyt dawna. Niewątpliwie największe znaczenie praktyczne zyskały dotychczas niektóre auktotrofy bakteryjne, od lat stosowane z pełnym powodzeniem w fabrycznej produkcji aminokwasów, zwłaszcza zaś kwasu glutaminowego. Jednakże również wśród innych grup drobnoustrojów dostrzegana bywa możliwość aplikacyjnego wykorzystania mutantów tej kategorii. Odnosi się to także do grzybów niższych z rodzaju *Aspergillus*, którego auktotrofy nierzadko wyróżniają się korzystnymi cechami w zakresie syntezy określonych metabolitów, jak np. kwasu cytrynowego (4, 9), poligalakturonazy (2, 6), amylazy (11) lub glukoamylazy (1).

Uzyskane w naszych badaniach mutanty auktotroficzne *Aspergillus niger* poddane zostały ocenie pod względem aktywności dotyczącej syntezy amylaz w warunkach hodowli wglębnej. Mutanty te będą zarazem stanowić materiał wyjściowy do ich krzyżowania paraseksualnego, którego celem jest uzyskanie w dalszej kolejności — poprzez stadium syntezy wymuszonych heterokarionów — diploidów heterozygotycznych.

* Praca wykonana w ramach problemu MR.II.17.

BADANIA WŁASNE

Jako materiał wyjściowy do otrzymywania mutantów auktotroficznych posłużyły trzy prototroficzne szczepy *Aspergillus niger* o różnej aktywności amylolitycznej. Ich konidia w postaci wodnych zawiesin, o gęstości ok. $2,4 \times 10^6$ /ml, poddane zostały działaniu dwu różnych układów mutagennych: 1) 1% roztworu nitrozometylomocznika (NMM) i promieni UV w dawce ok. 4800 ergów/mm²; 2) promieni UV w dawce ok. 960 ergów/mm² i 0,01% roztworu nitrozoguanidyny (NTG). W pierwszym przypadku działanie NMM przerywano po 2 godz. przez dodanie do zawiesiny konidiów 0,1 ml 10% roztworu NaOH, w drugim — po 15 min. kontaktu NTG z konidiami oddzielano je od mutagenu przez odwirowanie przy szybkości 12 tys. obr./min.

Konidia pleśni, potraktowane mutagenami, poddawano krótkotrwałej (24 godz.) hodowli wglębnej na pożywce Czapeka w celu wykiełkowania form prototroficznych, które następnie oddzielano na sączku G-2. Przesącz, zawierający nie wykiełkowane konidia, wysiewano w odpowiednim rozcieńczeniu na brzeczke agarową, zaś wyrosłe kolonie sprawdzano w kierunku ich auktotrofii (4). Po wyizolowaniu auktotrofów, ich zapotrzebowania pokarmowe określano metodą Hollidaya (3).

Wszystkie auktotrofy *A. niger* poddane zostały wstępnej ocenie pod względem aktywności amylolitycznej metodą hodowli probówkowych oraz przy zastosowaniu testu opartego na pomiarach stref dyfuzji amylaz, zawartych w płynie pochodzonym, do agaru skrobiowego, po okresie jego inkubacji w temp. 35°C, trwającej 18 godz. (7).

Mutanty auktotroficzne, które osiągnęły najlepsze wskaźniki dyfuzji enzymów do agaru skrobiowego, przebadane zostały dodatkowo w hodowlach wytrząsanych (220 obr./min.) w kolbach płaskodennych, zawierających po 100 ml pożywki złożonej z wyciągu otrąb pszennych z dodatkiem 5% maki pszennej. Po 4 dniach inkubacji w temp. 30°C, w podłożu oznaczano aktywność glukoamylazy metodą Lloyda i Whelana (9) przy użyciu oksydazy glukozowej i peroksydazy wobec skrobi Zulkowskiego, w temp. 60°C.

Zdolność do komplementacji poszczególnych par auktotrofów sprawdzano metodą opisaną przez Ilczuka (5).

WYNIKI I DYKUSJA

Do otrzymania mutantów auktotroficznych wykorzystano trzy szczepy kropidlaka czarnego: *A. niger* C (o wysokiej aktywności amylolitycznej) oraz *A. niger* 23 i *A. niger* 71 (o niższych aktywnościach syntezy amylaz). Częstotliwość pojawiania się auktotrofów była u tych szczepów zbliżona i wahała się od $0,6 \times 10^{-4}$ (w przypadku UV + NTG) do $0,75-1,0 \times 10^{-4}$ (przy użyciu NMM + UV) w stosunku do liczby prototroficznych konidiów w zawiesinie wyjściowej.

Wśród uzyskanych 43 mutantów auktotroficznych 20 pochodziło od szczepu *A. niger* 71 (zależne od niacyny, tiaminy i biotyny), 17 od *A. niger* C (wszystkie niacynozależne) i 6 od *A. niger* 23 (zależne od PABA i seryny). Zostały one poddane wstępnej ocenie w zakresie zdolności do syntezy amylaz metodą hodowli probówkowych.

Jak wynika z danych, zestawionych w tab. 1, wiele szczepów auktotroficznych, pochodzących od kultur mniej aktywnych amylopolitycznie (tzn. od *A. niger* 23 i *A. niger* 71) charakteryzowało się wzrostem tej aktywności w porównaniu z ich prototroficznymi rodzicami. W przeciwieństwie do tego ani jeden z 17 auktotrofów wysoce aktywnego amylopolitycznie szczepu *A. niger* C nie dorównał pod tym względem kulturze rodzicielskiej, a najaktywniejsze wśród nich osiągnęły poziom wynoszący niewiele ponad połowę (ok. 57%) aktywności amylopolitycznej wyjściowego prototrofa.

Ponadto z danych tab. 1 wynika, że nie tylko nie istnieje żaden wyraźny związek między rodzajem auktotrofii a wydajnością syntezy amylaz u przebadanych auktotrofów, lecz w obrębie mutantów zależnych od tego samego czynnika mogą występować równocześnie formy bardziej i mniej aktywne amylopolitycznie w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Różnice te są, być może, następstwem efektu plejotropowego wobec locus auktotroficzności bądź też powstały jako skutek mutacji dodatkowych.

Wyniki oceny wstępnej znalazły potwierdzenie także w analizie aktywności glukoaamylazowej auktotrofów wybranych na podstawie użytych przez nie najlepszych wskaźników syntezy amylaz w warunkach hodowli probówkowych. Również w tym przypadku auktotrofy szczepu *A. niger* C okazały się znacznie słabsze od ich rodzica (tab. 2). W pozostałych dwu grupach auktotrofów aktywności glukoaamylazy były większe niż u ich wyjściowych prototrofów, przy czym procentowy przyrost aktywności tego enzymu był tym wyższy, im słabsze zdolności do jego syntezy wykazywał szczep rodzicielski. Na przykład najlepszy auktotrof szczepu *A. niger* 71 osiągnął wzrost syntezy glukoaamylazy o 23,5% (z 13,6 do 16,8 mg uwolnionej glukozy/ml/min.), podczas gdy u najmniej aktywnych amylopolitycznie szczepów *A. niger* 23 maksymalny wzrost aktywności glukoaamylazowej wyniósł ponad 44%, co jednak wyrażone w wartościach bezwzględnych stanowiło zaledwie 4,9 mg uwolnionej glukozy/ml/min.

W literaturze niewiele istnieje danych na temat wpływu auktotrofii na syntezę amylaz przez grzyby niższe. Sinha i Chakrabarty (11) uzyskali wiele mutantów auktotroficznych w obrębie gatunku *Aspergillus wentii*, wśród których tylko nieliczne, wymagające argininy, wykazały wzrost aktywności amylopolitycznej w porównaniu z prototroficznym szczepem rodzicielskim (maksymalnie nieco ponad 100%).

Również w przypadku oddziaływania auktotrofii na procesy syntezy kwaśnej proteiny przez *Aspergillus awamori* u większości auktotrofów odnotowano spadek aktywności tego enzymu w porównaniu ze szczepem rodzicielskim (8). Dotyczyło to zwłaszcza mutantów zależnych od lizyny,

Tab. 1. Ocena aktywności amylolitycznej szczepów auktotroficznych *A. niger* na podstawie wyników uzyskanych w hodowlach probówkowych
 Evaluation of amylolytic activity of *A. niger* auxotrophic strains on the basis of results obtained in test-glass cultures

Szczep <i>Aspergillus niger</i> <i>A. niger</i> strain	Czynnik wymagany do wzrostu Factor required for growth	Aktywność amylolityczna po 18 godz. inkubacji Amylolytic activity after 18 hrs incubation		Aktywność amylolityczna względem prototrofa rodzicielskiego w % Amylolytic activity in relation to the parental prototroph strain in %
		wrażona wielkość średnicy strefy dyfuzji enzymu do agaru skrobiowego w mm	wrażona w mg rozłożonej skrobi na ml przesączu hodowlanego	
		expressed by the zone diameter of enzyme diffusion to starch agar in mm	expressed in mg of decomposed starch per ml of culture filtrate	
71	-	14	62.2	100.0
5	tiamina	14	62.2	100.0
7		14	62.2	100.0
22		16	90.4	145.3
101		14	62.2	100.0
8	niacyna	15	75.6	121.5
16		14	62.2	100.0
20		16	90.4	145.3
21		15	75.6	121.5
51		11	26.8	43.1
52		12	37.7	60.6
61		11	26.8	43.1
91		14	62.2	100.0
104		14	62.2	100.0
121		15	75.6	121.5
141		16	90.4	145.3
151		14	62.2	100.0
191		14	62.2	100.0
201		15	75.6	121.5
211		14	62.2	100.0
40	biotyna	15	75.6	121.5
23	-	16	90.4	100.0
10	PANA	17	105.9	117.1
11		15	75.6	83.6
12		15	75.6	83.6
15		17	105.9	117.1
20	seryna	13	49.4	54.6
25		18	122.5	135.5
C	-	20	158.2	100.0
1	niacyna	16	90.4	57.1
2		15	75.6	47.8
3		15	75.6	47.8
4		16	90.4	57.1
5		14	62.2	39.2
6		15	75.6	47.8
7		11	26.8	16.9
8		13	49.4	31.2
9		16	90.4	57.1
10		16	90.4	57.1
11		15	75.6	47.8
12		14	62.2	39.2
13		15	75.6	47.8
14		12	37.7	23.8
15		11	26.8	16.9
16		16	90.4	47.8
17		16	90.4	57.1

Tab. 2. Aktywności glukoamylazy wybranych szczepów auktotroficznych *Aspergillus niger* po 96 godz. hodowli wytrząsanych w kolbach płaskodennych
 Glucoamylase activity values of the selected auxotrophic strains of *Aspergillus niger* incubated for 96 h with aeration

Szczep <i>Aspergillus niger</i> A. niger strain	Czynnik wymagany do wzrostu Factor required for growth	Aktywność glukoamylazy Glucoamylase activity	
		w mg uwolnionej glukozy na ml przebiegu hodow- lanego na min. in mg of liberated glucose per ml of culture filtrate per min.	w stosunku do prototrofa ro- dzicielskiego w % in relation to parental prototroph strain in %
71	-	13,6	100,0
22	tiamina	14,2	104,4
20	niacyna	14,8	108,8
141	niacyna	16,8	123,5
23	-	3,4	100,0
10	PABA	3,8	111,8
18	PABA	3,9	114,7
25	seryna	4,9	144,1
C	-	20,5	100,0
1	niacyna	6,9	33,6
4	niacyna	7,4	36,1

leucyny i adeniny. Natomiast wśród pozostałych auktotrofów, wymagających histydyny, cysteiny, metioniny, argininy i tiaminy występowały szczepy zarówno o mniejszej, jak i większej aktywności proteinyazy niż u wyjściowego prototrofa.

Bardziej jeszcze jednoznaczne wyniki w odniesieniu do syntezy glukoamylazy przez *Aspergillus foetidus* uzyskali Chang i Terry (1). Wśród pięciu auktotrofów tego grzyba, zależnych od proliny, argininy, histydyny i niacyny, żaden nie dorównał swemu prototroficznemu przodkowi aktywnością glukoamylazy. Jej poziom wahał się u auktotrofów w szerokim przedziale od nieco ponad 20 do ok. 50% w stosunku do wartości syntezy tego enzymu przez szczep wyjściowy.

Uzyskane mutanty auktotroficzne *A. niger* użyte zostaną jako materiał wyjściowy do syntezy wymuszonych heterokarionów. Wśród dotychczas sprawdzonych 51 par auktotrofów, zestawionych parami między szczepem zależnym od biotyny (pochodzącym od *A. niger* 71) oraz zależnym od seryny (pochodzącym od *A. niger* 23) z jednej, a niacynozależnymi auktotrofami *A. niger* C z drugiej strony, w 9 przypadkach wystąpił efekt komplementacji, co stanowi ok. 10% ogółu szczepów dotąd przebadanych (tab. 3). Jest to odsetek dostatecznie wysoki, aby można było rokować pomyślne nadzieje na możliwość uzyskania stosunkowo znacznej liczby heterokarionów. Ich analiza pod względem aktywności amylolitycznej będzie przedmiotem naszych dalszych badań.

Tab. 3. Częstotliwość komplementacji u przebadanych 51 par auktotrofów *Aspergillus niger*
 Frequency of complementation in the 51 examined auxotrophic pairs of *Aspergillus niger*

Zestawienia par auktotrofów List of auxotrophic pairs	Liczba par komplementujących Number of complementing pairs	Zestawienie par komplementujących szczepów <i>Aspergillus niger</i> List of complementing strains of <i>Aspergillus niger</i>	Odsentek par komplementujących w stosunku do przebadanych par auktotrofów Per cent of complementing pairs in relation to the examined auxotrophic pairs
<i>A. niger</i> 71 ₄₀ × <i>A. niger</i> C ₁ ...17	1	71 ₄₀ × C ₆	5.8
<i>A. niger</i> 23 ₁₁ × <i>A. niger</i> C ₁ ...17	4	23 ₁₁ × C ₃ ; 23 ₁₁ × C ₁₂ ; 23 ₁₁ × C ₁₄ ; 23 ₁₁ × C ₁₅	23.5
<i>A. niger</i> 23 ₂₀ × <i>A. niger</i> C ₁ ...17	4	23 ₂₀ × C ₆ ; 23 ₂₀ × C ₇ ; 23 ₂₀ × C ₈ ; 23 ₂₀ × C ₁₅	23.5
Łącznie par	51	9	9.8

PISMIENICTWO

1. Chang L. T., Terry C. A.: Intergenic Complementation of Glucoamylase and Citric Acid Production in Two Species of *Aspergillus*. *Applied Microbiol.* 25, 890—895 (1973).
2. Fiedurek J.: Synteza pektynaz przez auktotroficzne mutanty *Aspergillus niger* w hodowli wglębnej. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C* 37, 181—194 (1982).
3. Holliday R.: A New Method for the Identification of Biochemical Mutants of Microorganisms. *Nature* 178, 987 (1956).
4. Ilczuk Z.: Citronensäuresynthese von mittels UV-Strahlen induzierten auxotrophen Mutanten von *Aspergillus niger*. *Nahrung* 14, 97—105 (1970).
5. Ilczuk Z.: Citronensäuresynthese durch erzwungene Heterokaryen zwischen auxotrophen Mutanten von *Aspergillus niger*. *Nahrung* 15, 251—262 (1971).
6. Ilczuk Z., Fiedurek J.: Gewinnung pektinolytisch aktiver Mutanten von *Aspergillus niger*. *Zeitschrift für Allg. Mikrobiol.* 20, 523—526 (1980).
7. Ilczuk Z., Fiedurek J.: Selekcja i mutagenizacja grzybów niższych w kierunku zwiększonej aktywności amylolitycznej. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* 38, 1—9 (1983).
8. Jerochina L., Niestierowa I., Istoszyna S.: Selekcja *Aspergillus awamori* — producenta kisioły proteiny i rol' morfologiczskich i biochmicheskich mutantów i prototrofnych rlewertantów w doborze aktywnych sztamów. *Gienietika* 12, 135—140 (1976).
9. Lloyd I. B., Whelan W. J.: Enzymic Determination of Glucose in the Presence of Maltose. *Analyt. Biochem.* 30, 467—470 (1969).
10. Misilkova M., Fencel Z.: Isolation of Auxotrophic Mutants of *Aspergillus niger* by Ethylmethane Sulphonate Treatment. *Folia Microbiol.* 15, 34—39 (1970).
11. Sinha S., Chakrabarty S.: Ultraviolet Induced Mutations in *Aspergillus wentii*. *Acta Microbiol. Polon.* 27, 347—352 (1978).

РЕЗЮМЕ

У части аукоотрофных мутантов *Aspergillus niger*, происходящих от родительских прототрофов с меньшей амилолитической активностью, наблюдался рост синтеза амилаз. И наоборот — ни один из аукоотрофов, полученных из штамма *A. niger* С, отличающегося высокой амилолитической активностью, не обнаружил роста синтеза этого энзима. Исследовали способность к комплементации 51 пары аукоотрофов. Обнаружили возможность соединения друг с другом и образования гетерокарионов у 9-и из них (около 10%).

S U M M A R Y

A part of auxotrophic mutants of *Aspergillus niger* originating from amylolytically less active parental prototrophs showed an increase in the synthesis of amylases. In opposition to this, none of the auxotrophs obtained from amylolytically highly active *A. niger* C strain, when compared with the latter, did not increase the synthesis of that enzyme. Among 51 auxotrophic pairs tested in respect to their aptitude for complementation, 9 pairs (i.e. ca 10%) were found to be able to join each other and to form heterokaryons.

Materials for the Knowledge of Macromycetes Flora of the Lethia Area

