

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Zdzisław ILCZUK

**Synteza enzymów pektolitycznych przez mutanty *Aspergillus niger*
uzyskane w drodze indukcji wielostopniowej***

Синтез пектолитических ферментов через мутанты *Aspergillus niger*,
полученные путем многоступенчатой индукции

The Synthesis of Pectolytic Enzymes by *Aspergillus niger*
Mutants Obtained through Multistep Induction

Znaczenie osiągnięć współczesnej genetyki drobnoustrojów dla mikrobiologii technicznej polega przede wszystkim na wykorzystaniu efektów indukowanej zmienności mikroorganizmów, połączonej z selekcją form przydatnych technicznie. Wykazano, że szczególną efektywnością odznacza się w tym względzie zwłaszcza technika wielokrotnej indukcji mutantów w kolejno po sobie następujących pokoleniach. Celowość jej użycia w procesie wytwarzania aktywnych mutantów w obrębie pleśni z rodzaju *Aspergillus* z pełnym powodzeniem wykazana została w stosunku do syntezy różnych metabolitów, w tym także w odniesieniu do niektórych enzymów, takich zwłaszcza jak kwaśna proteinaza (5), amylaza (4, 12), a także enzymy pektolityczne (3, 9, 10, 14).

BADANIA WŁASNE

Przedmiotem badań była dalsza sukcesywna indukcja aktywnych pektolitycznie mutantów *Aspergillus niger* III stopnia przy użyciu etylenoiminy i promieni UV jako środków mutagennych. W przeprowadzonych w tym zakresie doświadczeniach jako materiał wyjściowy posłużyły spory najaktywniejszego mutantu II stopnia (M_2) *A. niger* 3n14 (9), którego aktywność syntezy poligalakturonazy (PG), mierzona jako procent spadku lepkości substratu pektynowego w warunkach standardowych (6),

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 09.3.1 koordynowanego przez Polską Akademię Nauk.

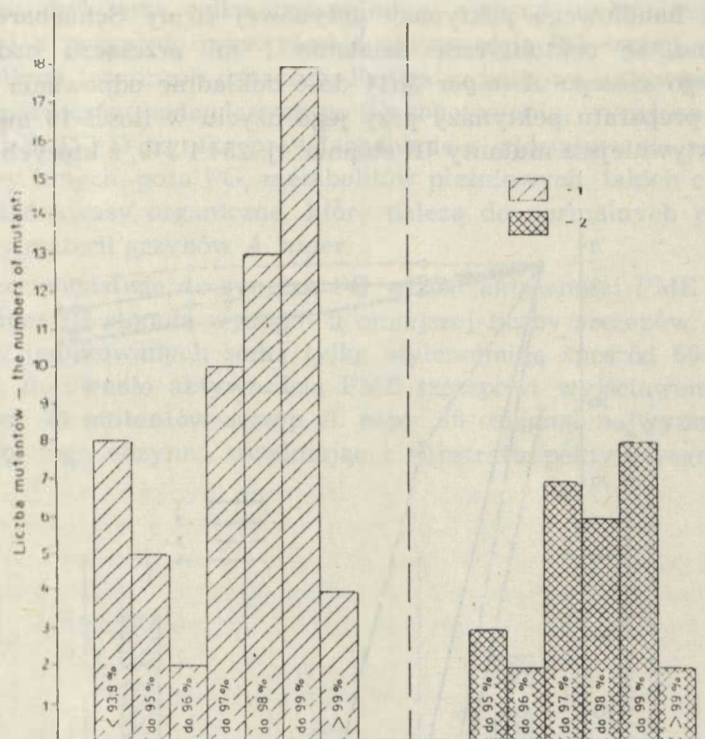
wyrażała się wartością 93,8% (wobec 66,1% u jego protoplasty M_1). Aktywność pektynometyloesterazy (PME), oznaczona według Hancocka i współprac. (7), osiągnęła u szczepu *A. niger* 3n14 maksymalną wartość, równą 5,89 mg uwolnionych grup metoksyłowych w ciągu 100 min. inkubacji enzymu z substratem w warunkach standardowych (wobec 3,6 mg u szczepu wyjściowego M_1).

Technika indukcji mutantów III stopnia (M_3) przy użyciu etylenoiminy. Konidia szczepu *A. niger* 3n14 poddawano działaniu etylenoiminy firmy Koch-Light Ltd (Anglia) w roztworze wodnym o rozcieńczeniu 1:500 w ciągu 1 i 2 godz. oraz 1:1 000 w czasie 3 i 3,5 godz. Stopień przeżywalności potraktowanych w ten sposób konidii wahał się od 0,0054% (dla rozcieńczenia 1:500) do 0,042% (dla rozcieńczenia 1:1000). Uzyskane tą drogą kultury ocenione zostały wstępnie metodą cetawlonową (10). Współczynnik cetawlonowy wahał się u nich w granicach 1,39—4,8 przy wartości równej 2,1 dla szczepu wyjściowego. Kultury charakteryzujące się wartością współczynnika cetawlonowego powyżej 2,1 poddawane były szczegółowym badaniom w hodowlach płynnych na pożywce Czapeka z dodatkiem pektyny według metody powierzchniowej. Po upływie 3, 5 i 7 dni hodowli w podłożu, pobieranym do analiz w ilości 1 ml, określano aktywność PG; w tych samych terminach oznaczano także aktywność PME.

Technika indukcji mutantów III stopnia (M_3) przy łącznym użyciu etylenoiminy i promieni UV. Konidia szczepu *A. niger* 3n14 poddawano w pierwszej kolejności działaniu etylenoiminy w rozcieńczeniu 1:2 000 w ciągu 1 godz., po czym bezpośrednio po wysianiu na płytki Petriego z agarową pożywką Czapeka dodatkowo traktowano je promieniami UV w dawkach od 13 000 do 75 000 erg/mm². Otrzymane szczepy przebadane zostały wstępnie metodą cetawlonową i selekcjonowane na podstawie wyższych wartości współczynników w porównaniu ze szczepem wyjściowym *A. niger* 3n14. Wyodrębnione na tej drodze kultury były następnie szczegółowo badane pod względem zdolności do syntezy PG i PME.

WYNIKI

Śpośród 900 kolonii *A. niger*, wyrosłych z konidii mutantu II stopnia 3n14 potraktowanych etylenoiminą, wyselekcjonowano wstępnie na podstawie testu cetawlonowego 60 mutantów III stopnia. Wszystkie one zostały dokładnie przebadane pod względem aktywności PG i PME. W dalszym etapie konidia szczepu *A. niger* 3n14 traktowane były kolejno etylenoiminą i bezpośrednio po tym promieniami UV. W tym przypadku z liczby ponad 300 sprawdzonych wstępnie testem cetawlonowym kultur wyodrębniono do dalszego szczegółowego badania 28 mutantów III stopnia. Stosunki ilościowe, dotyczące podziału szczepów według ich aktywności PG w obu grupach, przedstawione zostały na diagramie (ryc. 1). Jak wynika z zestawienia, mutanty III stopnia, indukowane samą tylko etylenoiminą w 52 przypadkach na 60 (a więc w ponad 86%) osiągnęły przyrost aktywności PG, przy czym największy ich odsetek przypadł na szczepy upłynniające substrat pektynowy w granicach 97—99%. Cztery spośród zbadanych mutantów przekroczyły granicę 99%, w tym najbardziej ak-



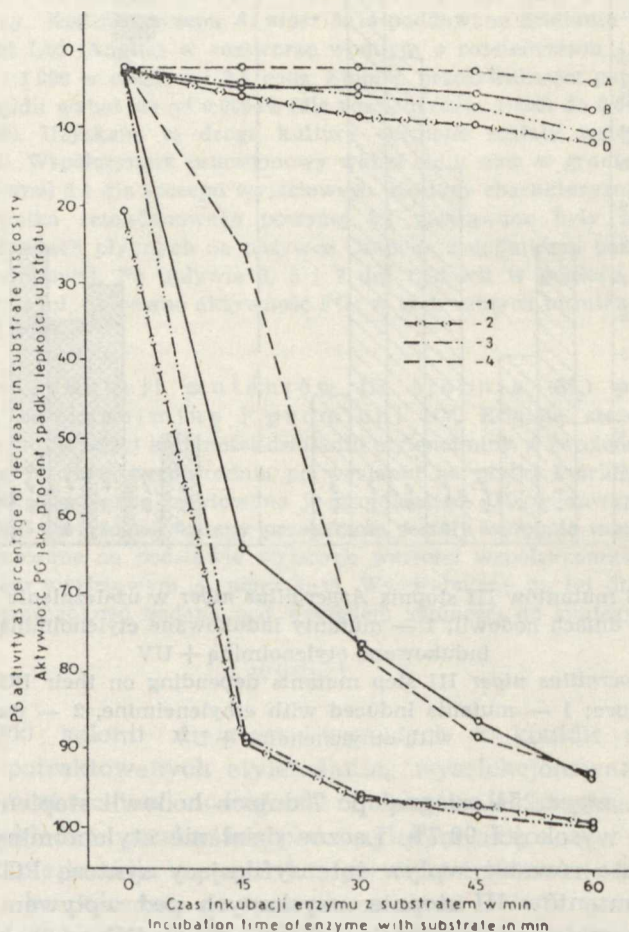
Ryc. 1. Podział mutantów III stopnia *Aspergillus niger* w uzależnieniu od ich aktywności PG po 7 dniach hodowli; 1 — mutanty indukowane etylenoiminą, 2 — mutanty indukowane etylenoiminą + UV

Groups of *Aspergillus niger* III step mutants depending on their PG activity after 7 days of culture; 1 — mutants induced with ethyleneimine, 2 — mutants induced with ethyleneimine + UV

tywny — *A. niger* 254 osiągnął po 7 dniach hodowli stopień upłynnienia substratu w wysokości 99,7%. Łączne działanie etylenoiminy i promieni UV wywierało również wpływ intensyfikujący syntezę PG u *A. niger*. Wśród 28 mutantów III stopnia, uzyskanych pod wpływem tych mutagenów, wszystkie przewyższyły aktywnością PG szczep wyjściowy *A. niger* 3n14. Najbardziej aktywny mutant *A. niger* 349 osiągnął zdolność wytwarzania i wydzielania tego enzymu do środowiska w stężeniu, które powodowało, że 1 ml przesączu hodowlanego praktycznie całkowicie upłynniał substrat pektynowy w ciągu 60 min. inkubacji.

Sledząc dynamikę hydrolizy substratu pektynowego, wyrażoną jako procent spadku lepkości pod wpływem działania poligalakturonazy, syntetyzowanej przez wyjściowego mutantu II stopnia *A. niger* 3n14 oraz dwa najbardziej aktywne mutanty III stopnia w porównaniu z działaniem

preparatu handlowego pektynazy grzybowej firmy Schuchardt (NRF), stwierdzono, że pektolityczne działanie 1 ml przesączu hodowlanego wyjściowego szczepu *A. niger* 3n14 dość dokładnie odpowiada takiemuż działaniu preparatu pektynazy przy jego użyciu w ilości 10 mg (ryc. 2). Oba najaktywniejsze mutanty III stopnia, tj. 254 i 349, z których pierwszy

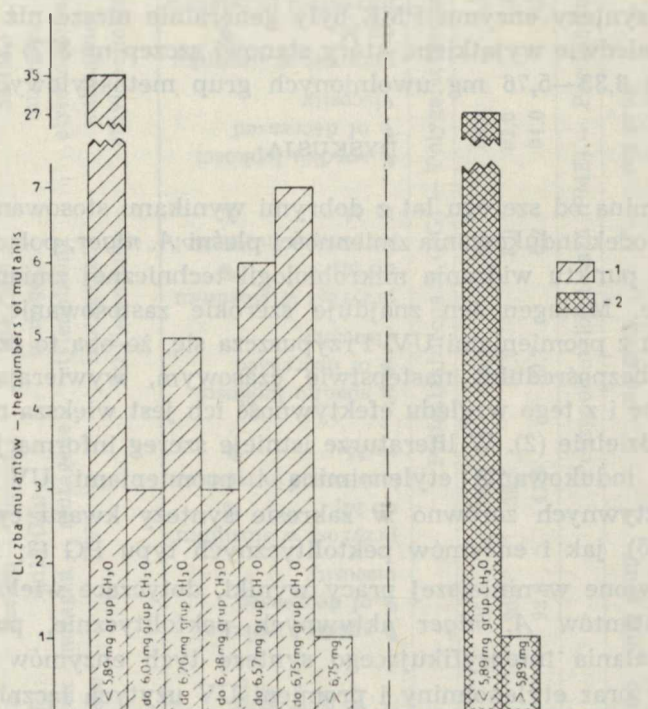


Ryc. 2. Aktywności PG najlepszych mutantów *Aspergillus niger* III stopnia po 7 dniach hodowli w porównaniu ze szczepem wyjściowym (mutantem II stopnia 3n14) i handlowym preparatem pektynazy; 1 — *A. niger* 3n14, 2 — *A. niger* 254, 3 — *A. niger* 349, 4 — preparat handlowy pektynazy (10 mg), A, B, C, D — przesącze po zagotowaniu

The PG activity of the best *Aspergillus niger* III step mutants in comparison with the initial II step 3n14 mutant and trade pectinase preparation; 1 — *A. niger* 3n14, 2 — *A. niger* 254, 3 — *A. niger* 349, 4 — trade pectinase preparation (10 mg), A, B, C, D — PG activity following the boiling of the filtrates after 7 days of culture

indukowany był samą tylko etylenoiminą, a drugi etylenoiminą i promieniami UV, wyraźnie przewyższają aktywnością PG szczep wyjściowy we wszystkich terminach oznaczeń. Pewna szczątkowa aktywność hydrolityczna przesączów hodowlanych po ich zagotowaniu, wyrażona na ryc. 2 krzywymi B, C i D wynika prawdopodobnie z oddziaływania na substrat pektynowy innych, poza PG, metabolitów pleśniowych, takich choćby jak na przykład kwasy organiczne, które należą do normalnych produktów przemiany materii grzybów *A. niger*.

W przeciwieństwie do syntezy PG wzrost aktywności PME u mutantów *A. niger* III stopnia wystąpił u mniejszej liczby szczepów. W grupie mutantów indukowanych samą tylko etylenoiminą spośród 60 szczepów aż 35 nie dorównało aktywnością PME szczepowi wyjściowemu. Wśród pozostałych 25 mutantów szczep *A. niger* 36 osiągnął najwyższy poziom aktywności tego enzymu, uwalniając z substratu pektynowego w ciągu



Ryc. 3. Podział mutantów III stopnia *Aspergillus niger* w uzależnieniu od ich aktywności PME po 7 dniach hodowli; oznaczenia patrz ryc. 1

Groups of *Aspergillus niger* III step mutants depending on their PE activity after 7 days of culture; for explanation see Fig. 1

100 min. inkubacji 7,13 mg grup metoksylowych, tj. o 21% więcej niż szczep wyjściowy. W grupie mutantów *A. niger* III stopnia, indukowanych łącznie etylenoiminą i promieniami UV, wyniki intensyfikacji aktywności PME były jeszcze słabsze. W tym przypadku tylko jeden mutant nieznacznie przekroczył aktywnością PME szczep wyjściowy (*A. niger* 377), którego maksymalna zdolność odszczepiania grup metoksylowych wyniosła 6,01 mg, tj. zaledwie o 2% więcej w porównaniu ze szczepem wyjściowym (ryc. 3).

Z zestawienia danych wynika, że w obrębie mutantów *A. niger* III stopnia aktywność PME u obu mutantów wysoce aktywnych w zakresie syntezy PG, indukowanych etylenoiminą oraz etylenoiminą i promieniami UV (tj. u szczepów nr 254 i 349), nie wzrosła ponad tę, jaką reprezentuje mutant wyjściowy II stopnia. Natomiast najwyższą wartość syntezy PME wykazał szczep 36, który w zakresie aktywności PG tylko nieznacznie przewyższył mutant wyjściowego (niespełna o 1%). W przypadku mutantów indukowanych łącznie etylenoiminą i promieniami UV wydajności syntezy enzymu PME były generalnie niższe niż w kontroli (z jednym zaledwie wyjątkiem, który stanowi szczep nr 377) i wahały się w granicach 3,35—5,76 mg uwolnionych grup metoksylowych.

DYSKUSJA

Etylenoimina od szeregu lat z dobrymi wynikami stosowana jest jako skuteczny środek indukowania zmienności pleśni *A. niger*, połączonej z korzystnymi z punktu widzenia mikrobiologii technicznej zmianami w ich metabolizmie. Mutagen ten znajduje szerokie zastosowanie, zwłaszcza w połączeniu z promieniami UV. Przypuszcza się, że oba te czynniki stosowane w bezpośrednim następstwie czasowym, wywierają działanie synergetyczne i z tego względu efektywność ich jest większa niż każdego czynnika oddzielnie (2). W literaturze istnieje szereg informacji na temat skutecznego indukowania etylenoiminą i promieniami UV mutantów *A. niger*, aktywnych zarówno w zakresie syntezy kwasu cytrynowego (8, 11, 13, 15), jak i enzymów pektolitycznych typu PG (3, 14).

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki, dotyczące wielostopniowej indukcji mutantów *A. niger* aktywnych pektolitycznie, potwierdzają istnienie działania intensyfikującego syntezę tych enzymów ze strony etylenoiminy oraz etylenoiminy i promieni UV użytych łącznie. Charakterystyczną cechą procesu indukcji mutantów pleśni *A. niger* na tym etapie (tj. w obrębie mutantów III stopnia) jest stosunkowo powolniejszy wzrost ich aktywności enzymatycznej w porównaniu z fazami wcześniejszymi, tj. mutantami I i II stopnia (tab. 1). Jest to, jak można sądzić, normalne następstwo intensywnej selekcji tzw. mutantów fizjologicznych,

Tab. 1. Porównanie przyrostów syntezy PG i PME u najbardziej aktywnych szczepów *Aspergillus niger* trzech kolejnych etapów mutagenizacji
A comparison of PG and PE synthesis increases in the most active *Aspergillus niger* strains in 3 successive stages of mutagenesis

Dzień inkubacji	Szczep Strain	Szczep — Strain	Szczep — Strain	Szczep — Strain	Szczep — Strain	Szczep — Strain
	3n (M ₁) mutagen mutagene UV	3n14 (M ₂) mutagen — mutagene UV	254 (M ₂) mutagen: etylenoimina mutagene: ethyleneimine	36 (M ₂) mutagen: etylenoimina mutagene: ethyleneimine	349 (M ₂) mutagen: etylenoimina + UV mutagene: ethyleneimine and UV	377 (M ₂) mutagen: etylenoimina + UV mutagene: ethyleneimine and UV
	% spadku lepkości	przyrost w stosunku do M ₁ increment in relation to M ₁	% spadku lepkości	przyrost w stosunku do M ₂ increment in relation to M ₂	% spadku lepkości	przyrost w stosunku do M ₂ increment in relation to M ₂
	% of decreased viscosity	% of decreased viscosity	% of decreased viscosity	% of decreased viscosity	% of decreased viscosity	% of decreased viscosity
Poligalakturnaza (PG) — Polygalacturonase (PG)						
3	54,5	85,3	56,5	3,1	89,2	4,5
5	65,2	90,3	38,5	8,0	92,0	1,8
7	66,1	93,8	41,9	6,2	94,0	0,2
Pektynometyloesteraza (PME) — Pectinesterase (PE)						
	mg grup CH ₂ O	mg grup CH ₂ O	mg grup CH ₂ O	mg grup CH ₂ O	mg grup CH ₂ O	mg grup CH ₂ O
3	0,31	4,15	1340,0	—	4,90	3,0
5	1,49	5,15	345,8	—	5,27	—
7	3,60	5,89	63,7	—	7,13	—
					4,71	2,0
					5,08	—
					4,90	3,0
					6,01	2,0

w początkowym okresie zawsze bardziej sprzyjającej pojawianiu się skokowych zmian w ich aktywności biosyntetycznej. W późniejszych etapach przeważa pojawianie się „małych mutacji ilościowych”, jak je określa Alichanian (1), odgrywających jednak istotną rolę w procesie wielostopniowej selekcji szczepów wysoko wydajnych.

Z przytoczonych w niniejszej pracy danych wynika, że w obrębie mutantów III stopnia istnieje pewna preferencja w zakresie indukcji aktywności PG nad PME. W przypadku użycia samej etylenoiminy aktywniejsze od szczepu wyjściowego pod względem syntezy PG mutanty stanowiły 86,6%, podczas gdy w zakresie syntezy PME — tylko 41,6%. Przy łącznym użyciu etylenoiminy i promieni UV wszystkie mutanty były aktywniejsze w syntezie PG od szczepu wyjściowego, a w syntezie PME wśród 28 szczepów niemal wszystkie (z jednym tylko wyjątkiem) były mniej aktywne. Nie jest to jednak następstwo ukierunkowanego działania użytych mutagenów, lecz bez wątpienia rezultat zastosowanego testu z cetawlonem, którego wyniki są bardziej miarodajne dla PG niż PME.

Jakkolwiek wzrostowi aktywności PG u *A. niger* towarzyszy przeważnie przyrost syntezy PME, to jednak zjawisko to nie ma charakteru całkiem powszechnego, zwłaszcza w odniesieniu do selekcji w obrębie szczepów o bardzo wysokiej już aktywności pektolitycznej. Z tego zapewne względu maksymalny przyrost syntezy obu tych enzymów osiągnięty został w naszych doświadczeniach przez różne mutanty. Wskazuje to na możliwość, a nawet celowość prowadzenia odrębnej selekcji dla każdego z enzymów, przy zastosowaniu również dla PME wstępnej selekcji na podstawie skróconego, różnicującego testu doboru mutantów aktywnych pod tym względem. Warto w tym miejscu odnotować, że dla niektórych celów jest niezwykle istotne, aby preparaty pektolityczne miały w maksymalnym stopniu jednolity charakter. W przypadku na przykład przemysłu winiarskiego specjalną wartość przedstawiają pektynazy typu PG pozbawione pektynometyloesterazy, która swoją obecnością w moszczu i winie może się przyczynić do wzrostu zawartości alkoholu metylowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Alichanian S.: Prikladnyje uspiechi gienietiki mikroorganizmów. Gienietika 6, 95—105 (1970).
2. Alichanian S.: Prikladnyje problemy gienietiki mikroorganizmów. Citologija i Gienietika 6, 3—12 (1972).
3. Dianowa O., Martakow A., Bańkožitienko R., Nowikowa A.: Selekcija producentow piektolitieskich fiermentow s ispolzowanijem mutagennych faktorow. Tr. In-ta Mikrobiol. Wirusol. AN Kaz. SSR 15, 149—163 (1970).
4. Giendina S.: Ispolzowanije ultrafioletowych łuczey i etylenoimina w selekcji *Aspergillus awamori* producyrujuszczego amilolitieskije fiermenty. Tr. Mosk. obszcz. ispyt. prirody 22, 235 (1957).

5. Grigorian D., Konowalov S., Kotov W.: Селекция *Aspergillus fumigatus* — продуцента кислой протеиназы. *Микробиология* **40**, 1088—1093 (1971).
6. Hancock J.: Degradation of Pectic Substances Associated with Pathogenesis by *Sclerotinia sclerotium* in Sunflower and Tomato Stems. *Phytopath.* **56**, 975—980 (1966).
7. Hancock J., Millar R., Lorbeer J.: Pectolytic and Cellulolytic Enzymes Produced by *Botrytis alli*, *B. cinerea* and *B. squamosa* in Vitro and in Vivo. *Phytopath.* **54**, 928—936 (1964).
8. Ilczuk Z.: Генетические аспекты селекции штаммов *Aspergillus niger* пригодных в процессе синтеза кислоты лимонной. Ч. I. *Прем. Ферм. и Роль* **15**, нр 7, 15—19 (1971).
9. Ilczuk Z.: Synthesis of Pectolytic Enzymes by UV-induced Mutants of *Aspergillus niger*. *Acta Microbiol. Polon.*, серия B **5** (22), 95—102 (1973).
10. Ilczuk Z., Wołek K.: Селекция активных пектолитических мутантов *Aspergillus niger* в основном индуцированных лучами УФ. *Прем. Ферм. и Роль* **17** (9), 11—14 (1973).
11. Imszeniecki A., Kuziurina A.: Изменчивость *Aspergillus niger* вызванная комбинированным действием этиленimina и ультрафиолетовых лучей. *Микробиология* **35**, 812—817 (1966).
12. Meyrath J., Bahn M., Han H., Altmann H.: Induction of Amylase-Producing Mutants in *Aspergillus oryzae* by Different Irradiations. Radiation and Radioisotopes for Industrial Microorganisms, Int. Atomic Energy Agency, Vienna, 137—155 (1971).
13. Sanchez-Marroquin A., Vierna L., Meza G.: Mutantes de *Aspergillus niger* en la producción de ácido cítrico. *Rev. lat-amer. Microbiol. Parasitol.* **11**, 191—197 (1969).
14. Siliszczenskaja O., Bummanowa N.: Селекция плесневых грибов активных продуцентов пектиназы. *Тр. Всес. Науч.-Иссл. Ин-та Прод. Брожения* **19**, 126—133 (1970).
15. Щербакова Е.: Сравнительная характеристика и устойчивость активных штаммов *Aspergillus niger* образующих лимонную кислоту. *Прикл. Биохим. Микробиол.* **6**, 69—74 (1970).

РЕЗЮМЕ

Из конидий штамма *Aspergillus niger* 3n14 (исходный мутант II-ой степени), подвергаемого воздействию этиленimina, получили 900 культур, из которых на основе цетавлонового теста выделили первоначально 60 штаммов. Из этого числа 52 штамма образовали больше полигалактуроназа (ПГ), чем исходный штамм (в пределах от 0,2 до 6,2%), а 25 штаммов больше пектинметилэстеразы (в пределах от 2,1 до 21%). Вторую группу мутантов III степени образовали штаммы, выросшие из спор *A. niger* 3n14 обработанных этиленимином и лучами УФ. В этой группе из более 300 культур для дальнейших исследований выделили, пользуясь цетавлоновым тестом, 28 мутантов, из которых все образовали больше ПГ (в пределах от 0,8 до 6,5%), чем исходный штамм и только один мутант оказался минимально активнее в отношении ПМЕ. Максимальную активность ПГ показал мутант *A. niger* 349, а наиболее

активным в отношении синтеза ПМЕ оказался мутант *A. niger* 36. Кажется целесообразным проведение дальнейшей селекции пектолитических штаммов *A. niger* другим способом для мутантов, активных с точки зрения синтеза ПГ, чем те, которые показывают повышенную активность в диапазоне ПМЕ.

SUMMARY

Nine hundred cultures were obtained from the spores of a *Aspergillus niger* 3n14 strain (initial II step mutant) treated with ethyleneimine, from which on the basis of a cetavlon test initially 60 strains were isolated. In this number 52 strains formed more polygalacturonase (PG) than the initial 3n14 strain (in the range of 0.2 to 6.2%) and 25 of them formed more pectinesterase (in the range of 2.1 to 21.0%). The second group of III step mutants included strains obtained from *A. niger* 3n14 spores treated subsequently with ethyleneimine and UV rays. From among over 300 cultures of this group 28 mutants were initially selected by the use of the cetavlon test for further examination and all of them produced more PG (in the range of 0.8 to 6.5%) than the initial strain, and only one mutant was slightly more active PE producer. The mutant No. 349 of *A. niger* revealed the highest PG activity, whereas the best PE synthesis was found with mutant No. 36. It seems profitable to carry out further selection of *A. niger* pectolytic strains separately for mutants active for PG synthesis and for those with an increased PE activity.