

Instytut Mikrobiologii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Jan FIEDUREK

**Synteza pektynaz przez auktroficzne mutanty *Aspergillus niger*
w hodowli wglębnej**

Синтез пектиназ ауксотрофными мутантами *Aspergillus niger* в глубинной культуре

Pectinase Synthesis by Auxotrophic Mutants of *Aspergillus niger*
in a Submerged Culture

W literaturze istnieje wiele danych przemawiających za celowością poszukiwania aktywnych kultur produkcyjnych mikroorganizmów wśród mutantów auktroficznych. Wydaje się, iż tego typu zmiany mogą w istotniejszy sposób naruszać aparat biochemiczny drobnoustroju w porównaniu z mutacjami morfologicznymi (11).

Z punktu widzenia mikrobiologii technicznej najlepsze wyniki w selekcji auktrofów uzyskano dotychczas wśród szczepów syntetyzujących pierwotne produkty przemiany materii o znanym szlaku metabolicznym (aminokwasy, witaminy, zasady purynowe). Wymowną tego ilustrację stanowią homoserynowe auktrofy *Micrococcus glutamicus*, które pozwoliły osiągnąć 200—300 razy większą wydajność syntezy lizyny niż szczep rodzicielski. Tak duży wzrost produktywności, uzyskany w następstwie pojedynczej mutacji biochemicznej, stanowi jedno z największych osiągnięć współczesnej genetyki mikroorganizmów przydatnych w technice (1).

Wiele danych dotyczących mutacji auktroficznych odnosi się do szczepów *Penicillium*, wytwarzających antybiotyki (12). Zauważono na przykład, że mutanty *Penicillium*, zależne od adeniny i aminokwasów, cechuje malejąca wydajność penicyliny w przeciwieństwie do szczepów witamino-zależnych, które przejawiały tendencję do wyższej produktywności. Wśród auktrofów *Streptomyces antibioticus*, wytwarzających ak-

tynomycynę, szczepy wymagające aminokwasów, będących prekursorami antybiotyku, wykazały na podłożu minimalnym, uzupełnionym tymi aminokwasami, wyraźny spadek syntezy aktynomycyny. Nie stwierdzono natomiast większej różnicy pod tym względem między szczepem rodzicielskim a auksotrofami wymagającymi aminokwasów, które nie były prekursorami tego antybiotyku (16).

Także w odniesieniu do syntezy kwasu cytrynowego stwierdzono, że wśród mutantów auksotroficznych *A. niger* mogą występować szczepy znacznie przewyższające aktywnością prototroficznych rodziców (10, 11, 13).

Znane są też przykłady korzystnego oddziaływania auksotrofii na syntezę enzymów. Między innymi u histydyno-zależnego mutantu *A. awamori* stwierdzono zwiększoną o 43% syntezę kwaśnej proteinazy (5).

BADANIA WŁASNE

Punktem wyjścia do uzyskania auksotrofów była mutagenizacja prototroficznych kultur *A. niger* 71 i *A. niger* 23 (o różnej aktywności pektynolitycznej) przy użyciu 1% N-nitrozo-metylomocznika (NMM) i promieni UV. Opis mutagenizacji podano wcześniej (6). Selekcja auksotroficznych mutantów *A. niger* z zawiesiny konidiów, potraktowanej mutagenami, dokonywana była przez jej krótkotrwałą inkubację na wytrząsarce w podłożu Czapeka i późniejsze oddzielenie na sączku G-2 kiełkujących spor od nie wykiełkowanych (10). Zapotrzebowanie pokarmowe wyselekcjonowanych auksotrofów określono metodą Hollidaya (9).

Hodowlę auksotrofów prowadzono w ciągu 4 dni w temp. 30°C na wytrząsarce (220 obr./min.) w kolbkach à 500 ml, zawierających po 100 ml podłoża hodowlanego o wcześniej ustalonym składzie (6).

Aktywność poligalakturonazy (PG) oznaczano metodą wiskozymetryczną w jednostkach umownych RA (8) oraz metodą Samogyi-Nelsona (14), wyrażając ją w jednostkach J_2PG (7).

Aktywność liazy pektynowej (PL) i pektynianowej (PAL) określano metodą Bugbee'a (4) w jednostkach umownych (J.U.) przy zastosowaniu 1% roztworów pektyny w przypadku PL oraz kwasu poligalakturonowego lub polipektanu sodu w przypadku PAL (7).

Aktywność pektynoesterazy (PE) określano metodą potencjometrycznego miareczkowania uwolnionych grup karboksylowych powstałych w wyniku enzymatycznej deestryfikacji pektyny (2). Wyrażano ją za pomocą jednostek J_2PE (7). Skuteczność działania PE określono w drodze obliczenia stopnia deestryfikacji pektyny na podstawie ilości (w mg) uwolnionych grup karboksylowych (7).

Ogólną aktywność pektynolityczną płynu pohodowlanego oznaczano metodą wiskozymetryczną i wyrażano w stopniach PM — °PM (15).

Zawartość białka w podłożu hodowlanym oraz płynie pohodowlanym oznaczano metodą Schacterle'a i Pollacka (18). Poziom pektyny w podłożu hodowlanym ustalano metodą Bartholomae i wsp. (3), natomiast cukrów redukujących — metodą Samogyi-Nelsona (14).

W celu lepszej oceny wartości użytkowej enzymu określono także stosunek liczbowy aktywności PG do PE.

Wszystkie wyniki dotyczące aktywności enzymów oraz oznaczeń chemicznych stanowią średnie z trzech równoległych oznaczeń.

WYNIKI

Stwierdzono, że średnia częstotliwość pojawiania się mutantów auktrotroficznych *A. niger* indukowanych promieniami UV i nitrozometylo-mocznikiem wynosiła $0,75-1,0 \times 10^{-4}$ w stosunku do liczby spor w zawiesinie wyjściowej, zaś w stosunku do ilości kolonii wyrosłych na podłożu agarowo-brzeczkowym od 1,4 do 4,0%.

W wyniku przeprowadzonej selekcji wyodrębniono 6 auktrotrofów pochodzących od szczepu *A. niger* 23 (w tym 4 zależne od PABA i 2 od seryny) oraz 20 auktrotrofów pochodzących od szczepu *A. niger* 71, wśród których 15 wymagało do rozwoju niacyny, 4 — tiaminy i 1 — biotyny.

Auktrotrofy niacyno-, tiamino- i biotyno-zależne wykazały bardzo ograniczony wzrost na podłożu hodowlanym i kilkakrotnie mniejszą aktywność PG niż szczep rodzicielski. Ponadto można było zauważyć, że niskim aktywnościom PG zawsze towarzyszyło u tych szczepów silne zakwaszenie podłoża do pH 2,5—2,8 (tab. 1).

W przypadku niacyno-zależnego szczepu *A. niger* 20 stwierdzono, że dodatek do pożywki niacyny w dawkach 0,1—100 $\mu\text{g/ml}$ wpływał stymulująco na wzrost aktywności PG, przy czym najlepsze efekty uzyskano przy zastosowaniu tej witaminy w ilości 2 $\mu\text{g/ml}$ podłoża. Dalszy wzrost stężenia niacyny pozostawał w zasadzie bez widocznego wpływu na aktywność PG. Podobne działanie wywierał również dodatek 10% wyciągu z otręb pszennych w ilościach 0,5—25,0 ml/100 ml podłoża, przy czym optymalna dawka, przy której zaobserwowano najwyższą aktywność PG, wyniosła 15 ml. W tych warunkach szczep auktrotroficzny wykazał wzrost aktywności PG w stosunku do szczepu rodzicielskiego o 74,5%. Warto podkreślić, że maksymalna aktywność PG, uzyskana pod wpływem dodatku 2 μg niacyny na 1 ml podłoża, wynosząca 71,3 RA/ml płynu hodowlanego, była zbliżona do efektu osiągniętego przez dodanie do podłoża 15 ml 10% wyciągu otręb pszennych (75,2 RA/ml). Jednakże dodatek wyciągu otręb pszennych w nadmiarze (tzn. w ilościach ponadoptymalnych) wpływał hamująco na aktywność PG u tego szczepu (ryc. 1).

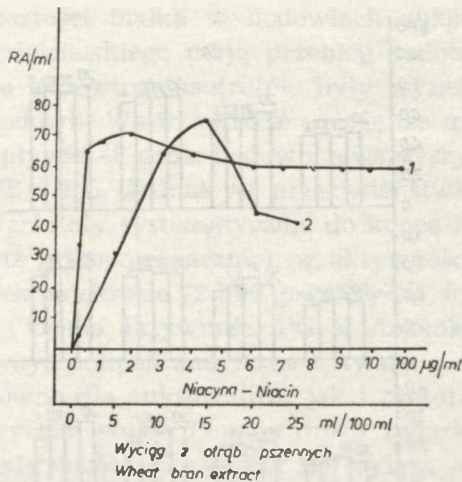
W dalszych doświadczeniach wykazano, że wzbogacenie podłoża hodowlanego dodatkiem 10% wyciągu z otręb pszennych (w ilości 15 ml do 100 ml podłoża) wpłynęło korzystnie na wzrost grzybni i aktywność PG nie tylko u mutantów niacyno-zależnych, ale też i wszystkich zależ-

Tab. 1. Aktywność PG szczepów aukstotroficzných *A. niger* na podłożu z dodatkiem i bez dodatku wyciągu otrąb pszennych, po 96 godz. hodowli
 PG activity of the auxotrophic strains of *A. niger* on the medium with an addition of wheat bran extract and without this addition

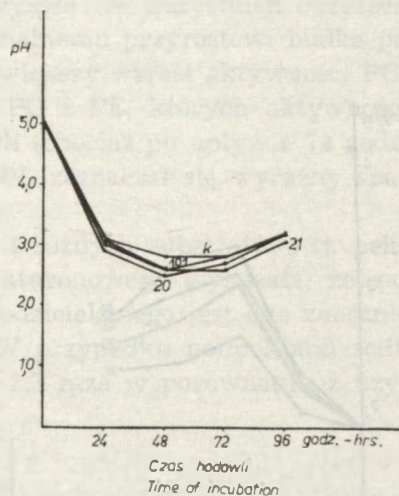
Nr szczepu No of strain	Czynnik wymagany do wzrostu Nutritional requirement	Odczyn podłoża Reaction of medium (pH)		Aktywność PG w jedn. umownych RA/ml PG activity in RA units/ml of medium		Aktywność PG względem proto- trofa rodzicielskiego PG activity in relation to parental strain (%)	
		a	b	a	b	a	b
71	prototrof prototroph	3,1	3,3	44,0	43,1	100,0	100,0
5	tiamina thiamin	2,6	3,2	8,2	45,0	18,6	104,4
7		2,7	3,2	8,0	18,2	18,2	42,2
22		2,5	2,6	6,2	19,9	14,1	46,2
101		2,8	3,1	6,1	52,8	13,8	122,5
8	niacyna niacin	2,5	3,6	8,6	49,2	19,5	114,2
16		2,65	3,5	8,5	51,0	19,3	118,3
20		2,6	3,5	12,3	75,2	27,9	174,5
21		2,55	3,4	8,9	55,6	20,2	129,0
51		2,6	3,95	8,1	35,2	19,4	81,7
52		2,7	3,45	12,2	31,3	27,7	72,6
61		2,8	3,5	8,7	51,4	19,8	119,9
91		2,6	3,4	11,4	46,5	25,9	107,9
104		2,7	3,4	11,8	34,3	26,8	79,6
121		2,5	3,2	8,8	50,8	20,0	117,8
141		2,5	3,5	9,0	34,0	20,4	78,9
151		2,65	3,2	10,6	50,2	24,1	116,5
191		2,85	3,9	6,7	48,1	15,2	111,6
201		2,65	3,4	6,6	47,3	15,0	109,7
211		2,6	3,7	7,6	40,8	17,3	94,7
40	biotyna biotin	2,75	2,9	6,8	47,0	15,4	109,0
A-23	prototrof prototroph	3,75	3,8	8,4	7,2	100,0	100,0
A-10	PABA	3,0	2,9	14,6	12,3	173,8	170,8
A-11		3,0	2,95	13,1	12,6	155,9	175,0
A-12		2,85	3,1	15,6	12,5	185,7	173,6
A-15		2,7	2,95	11,1	10,2	132,1	141,7
A-20	seryna serine	3,0	2,9	15,2	13,3	180,9	184,7
A-25		3,1	3,2	16,1	14,0	191,7	194,4

Objaśnienia: a — na podłożu bez dodatku wyciągu z otrąb, b — na podłożu z dodatkiem wyciągu z otrąb.

Explanation a — on the medium without the addition, b — on the medium enriched with wheat bran extract.



Ryc. 1. Wpływ dodatku do podłoża hodowlanego niacyny oraz 10% wyciągu otręb pszenicznych na syntezę PG przez niacyno-zależny szczep *A. niger* 20; 1 — niacyna, 2 — wyciąg otręb pszenicznych
The effect of the addition of niacin and 10% wheat bran extract to culture medium on PG synthesis by the niacin-dependent strain *A. niger* 20; 1 — niacin, 2 — wheat bran extract

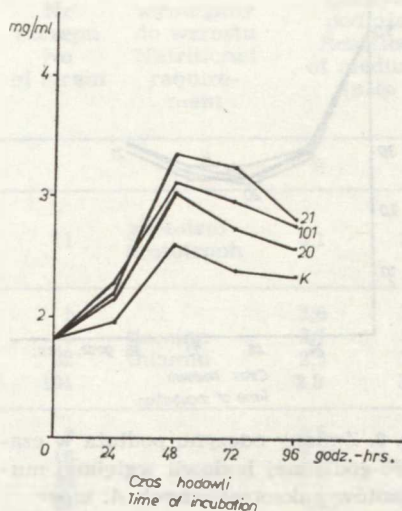


Ryc. 2. Zmiany odczynu podłoża w czasie 96-godzinnej hodowli wglębnej mutantów auksotroficznych *A. niger*
Changes in the medium pH during the 96-hour culture of the auxotrophic mutants of *A. niger*

nych od tiaminy i biotyny, natomiast w stosunku do mutantów wymagających PABA i seryny nie stwierdzono w tym zakresie większych różnic.

Spośród 4 auksotrofów tiamino-zależnych, hodowanych na pożywce z dodatkiem wyciągu z otręb, 2 wykazały aktywność PG o 4,4 i 22,5% wyższą od prototrofa rodzicielskiego. Wśród 15 szczepów niacyno-zależnych 5 charakteryzowało się w tych warunkach aktywnością PG niższą od szczepu wyjściowego w granicach 5,3—27,4%, natomiast pozostałe przewyższały go pod tym względem od 7,9 do 74,5%. Także jedyny szczep biotyno-zależny przewyższał aktywnością PG kulturę rodzicielską o 9,0%. Wysokie przyrosty aktywności PG (od 41,7 do 94,4%) widoczne były również u wszystkich auksotrofów wymagających PABA i seryny, pochodzących od szczepu *A. niger* 23, przy czym jednak w tym przypadku wszystkie kultury — zarówno szczep wyjściowy, jak i pochodzące od niego mutanty — charakteryzowały się zdecydowanie mniejszą aktywnością pektynolityczną niż szczep *A. niger* 71 (tab. 1). Uzyskane wyniki świadczą o tym, że nie istnieją żadne określone związki między rodzajem auksotrofii szczepów *A. niger* a możliwością wzrostu u nich aktywności PG.

W dalszym etapie badań prześlędzono dynamikę procesu syntezy en-

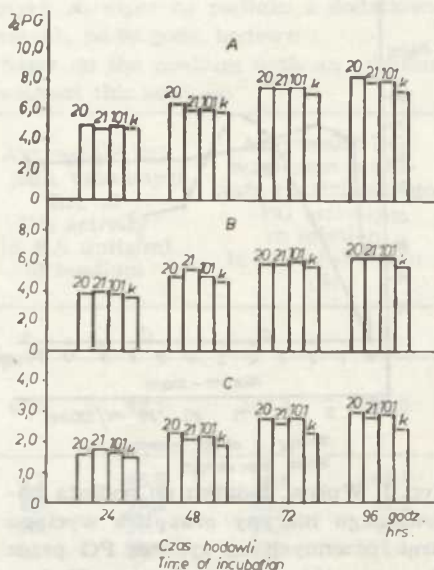


Ryc. 3. Zmiany zawartości białka w podłożu w czasie 96-godzinnej hodowli wglębnej szczepów auksotroficznyc \bar{h} *A. niger*

Changes in the medium protein content during the 96-hour culture of the auxotrophic mutants of *A. niger*

zymów pektynolitycznych w warunkach hodowli wglębnej, na przykła-dzie szczepu rodzicielskiego *A. niger* 71 i trzech pochodzących od niego najaktywniejszych auksotrofów (*A. niger* 20, 21, 101). W trakcie hodowli tych kultur zaobserwowano wyraźne zmiany odczynu podłoża. W pierwszym etapie (po 24 godz.) następował spadek wartości *pH* od 5,0 do ok. 3,0. Proces ten pogłębiał się w ciągu następnej doby, osiągając poziom *pH* w granicach 2,5—2,8, po czym w ostatnim etapie (po upływie 72 godz.) następował nieznaczny wzrost *pH* do wartości powyżej 3,0 (ryc. 2).

Na ryc. 3 przedstawiono krzywe obrazujące zmiany zawartości białka w płynach pochodowlanych, które zarówno u auksotrofów, jak i u prototroficznego szczepu rodzicielskiego w ciągu pierwszych 48 godz. hodowli wykazują tendencję wzrostową. W dalszych etapach ilości białka w podłożu malały. Można sądzić, że spadki te spowodowane zostały raczej zużyciem składników białkowych pożywki niż stratami aktywnego białka enzymatycznego. Jak wynika z ryc. 3, krzywe ilustrujące zmiany za-

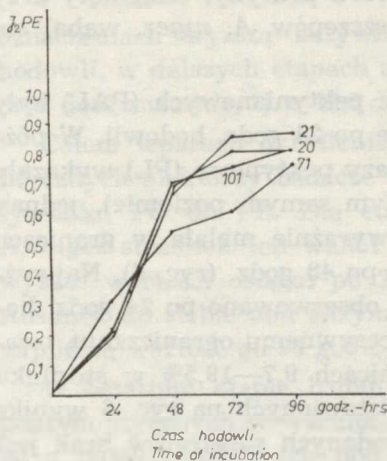


Ryc. 4. Aktywność poligalakturonazy (PG) mutantów auksotroficznyc \bar{h} *A. niger* w czasie 96-godzinnej hodowli wglębnej wobec: A — kwasu poligalakturonowego, B — polipektanu sodu, C — pektyny

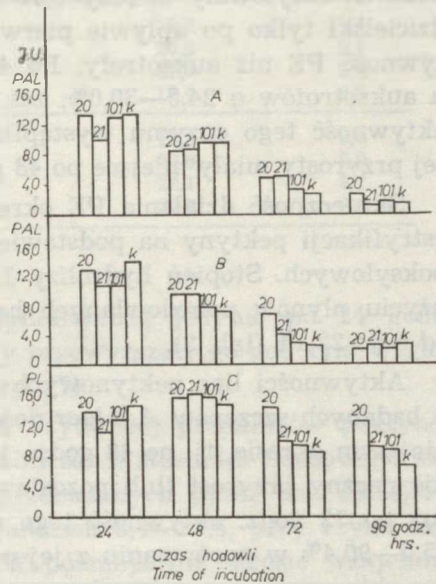
Polygalacturonase (PG) activity of the auxotrophic mutants of *A. niger* during the 96-hour submerged culture in respect to: A — polygalacturonic acid, B — sodium polypectate, C — pectin

wartości białka w hodowlach auktotrofów i prototroficznego szczepu rodzicielskiego mają przebieg podobny, chociaż ilości białka w płynach po hodowli auktotrofów były wyraźnie wyższe we wszystkich okresach hodowli. Warto zwrócić uwagę, że maksymalnemu przyrostowi białka po upływie 48 godz. hodowli towarzyszył największy wzrost aktywności PG, PE i PL. Jednak w przeciwieństwie do PG i PE, których aktywności wzrastały systematycznie do końca hodowli (choć po upływie 72 godz. już tylko nieznacznie), w aktywnościach PL zaznaczał się wyraźny spadek po okresie 72 i 96 godz. (ryc. 4, 5 i 6).

Ocena aktywności PG w stosunku do 3 różnych substratów, tj. pektyny, polipektanu sodu i kwasu poligalakturonowego wykazała, że zarówno dla auktotrofów, jak i prototrofa rodzicielskiego jest ona znacznie wyższa wobec dwu ostatnich związków. W przypadku polipektanu sodu aktywność PG okazała się wyższa o 2,1—2,3 raza w porównaniu z uży-



Ryc. 5. Aktywność PE szczepów auktotroficznych *A. niger* w czasie 96-godzinnej hodowli wstępnej
The PE activity of the auxotrophic strains of *A. niger* during 96 hours of the submerged culture



Ryc. 6. Aktywność liaz pektynowych (PL) i pektynianowych (PAL) mutantów auktotroficznych *A. niger* w czasie 96-godzinnej hodowli wstępnej wobec: A — kwasu poligalakturonowego, B — polipektanu sodu, C — pektyny
The activities of pectin lyase (PL) and pectinate lyase (PAL) of the auxotrophic mutants of *A. niger* during 96 hours of submerged culture in respect to: A — polygalacturonic acid, B — sodium polypectate, C — pectin

skaną wobec pektyny, zaś przy użyciu kwasu poligalakturonowego jako substratu o 2,6—2,9 raza (ryc. 4). Natomiast najwyższe przyrosty aktywności PG u przebadanych auktrotrofów w stosunku do szczepu prototroficznego wystąpiły wobec pektyny. Wahwały się one w granicach 3,4—25,0%, podczas gdy wobec polipektanu sodu wyniosły 1,8—17,8%, zaś w stosunku do kwasu poligalakturonowego nie przekroczyły 14,3% (ryc. 4).

U przebadanych szczepów auktrotroficznych najwyższe aktywności PG wobec kwasu poligalakturonowego po 96 godz. hodowli w głębszej wyrażone w jednostkach J_2PG , wahwały się w granicach 7,64—8,04 (ryc. 4).

W oparciu o przelicznik kwasu galakturonowego dla pektyny, który, wg Procentki (17), wynosi 1,37, określono stopień hydrolizy pektyny, który wahał się w granicach 17,2—35,1 (tab. 1).

Aktywności PE u przebadanych szczepów auktrotroficznych po 96 godz. hodowli oscylowały między 0,81 a 0,87 J_2PE . Prototroficzny szczep rodzicielski tylko po upływie pierwszych 24 godz. wykazywał wyższą aktywność PE niż auktrotrofy. Po 48 godz. aktywności PE były wyższe u auktrotrofów o 24,5—30,0%, zaś po 72 godz. o 27—43,4%. Maksymalna aktywność tego enzymu wystąpiła po 96 godz. hodowli, zaś największe jej przyrosty miały miejsce po 48 godz. (ryc. 5).

Skuteczność działania PE określono w drodze obliczenia stopnia destryfikacji pektyny na podstawie ilości (w mg) uwolnionych grup karboksylowych. Stopień hydrolizy 1,2% roztworu pektyny, osiągnięty przy użyciu płynów pochodzących z badanych szczepów *A. niger*, wahał się od 5 do 22,1% (tab. 2).

Aktywności liaz pektynowych (PL) oraz pektynianowych (PAL) były u badanych szczepów *A. niger* dość zbliżone po 24 godz. hodowli. W późniejszym okresie, tj. po 48 godz., jedynie liazы pektynowe (PL) wykazały nieznaczny przyrost (lub pozostawały na tym samym poziomie), jednak już po 72 godz. aktywność tego enzymu wyraźnie malała w granicach 45,5—90,4% w porównaniu z jej poziomem po 48 godz. (ryc. 6). Najwyższe aktywności liaz pektynianowych (PAL) obserwowano po 24 godz. hodowli. W dalszych etapach ulegały one sukcesywnemu ograniczaniu, osiągając po upływie 96 godz. poziom w granicach 9,7—19,5% w stosunku do aktywności wyjściowej. Z danych przedstawionych na ryc. 6 wynika ponadto, że w aktywnościach liaz wobec badanych substratów brak jest większych różnic między auktrotrofami a szczepem rodzicielskim *A. niger* 71.

Ogólną aktywność pektynolityczną badanych szczepów *A. niger* oznaczano dodatkowo w skali stopni PM na substracie w postaci pektyny krajowej zestryfikowanej w 70%. Szczep prototroficzny wykazał w tych

Tab. 2. Stopień hydrolizy oraz deestryfikacji pektyny pod działaniem płynów pochodzących z różnych okresów hodowli wglębnej auktotrofów
Degree of hydrolysis and deesterification of pectin under the influence of post-culture fluids from various periods of the auxotroph submerged culture

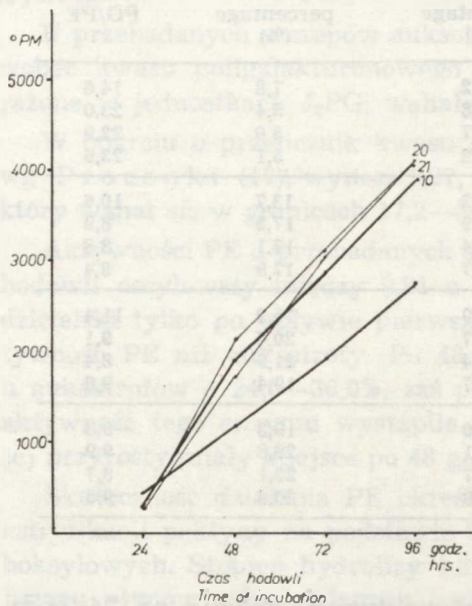
Szczep No of strain	Czas hodowli (godz.) Time of incubation (hrs)	Procent hydro- lizej pektyny Hydrolysis of pectin — percentage (%)	Procent deestry- fikacji pektyny Deesterification of pectin — percentage (%)	Stosunek PG/PE Relation PG/PE
71*	24	17,2	7,8	14,6
20		17,8	5,4	23,0
21		18,7	5,0	22,9
101		17,2	5,1	23,6
71*	48	22,2	13,7	10,6
20		26,9	17,5	8,9
21		23,4	17,1	8,8
101		25,7	17,9	8,4
71*	72	26,9	15,2	11,4
20		32,7	20,6	9,1
21		30,4	21,9	8,4
101		32,7	19,4	9,6
71*	96	28,0	19,3	9,3
20		35,1	20,6	9,9
21		32,7	22,1	8,7
101		33,9	20,6	9,6

* Kontrola — Control.

oznaczeniach wyższą aktywność pektynolityczną jedynie po 24 godz. hodowli, w dalszych etapach auktotrofy przewyższały go pod tym względem dość znacznie, tj. o 42,3 do 79,4% (ryc. 7).

Celem lepszego określenia wartości użytkowej preparatów pektynolitycznych niektórzy badacze zalecają obliczanie stosunku liczbowego aktywności PG do PE. Dla enzymów przebadanych przez nas szczepów *A. niger* stosunek ten wahał się w granicach 8,4—23,6, przy czym najwyższe wartości osiągał po 24 godz. W późniejszym okresie wzajemny stosunek do siebie obu enzymów nieznacznie malał, osiągając ostatecznie najniższą wartość po 96 godz. hodowli (tab. 2).

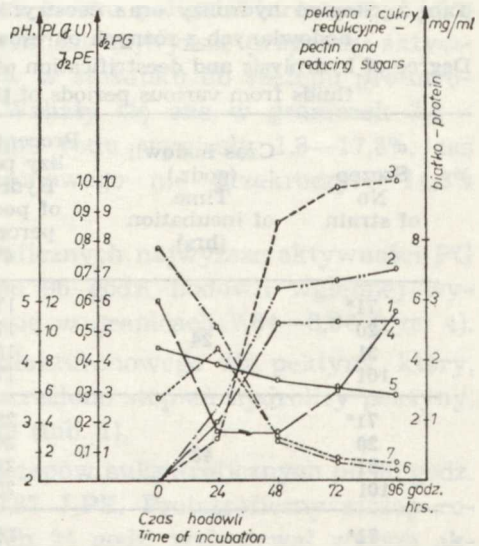
W ostatnim etapie badań prześledzono dynamikę syntezy enzymów pektynolitycznych w warunkach hodowli wglębnej na przykładzie jednego z najaktywniejszych pod tym względem szczepu auktotroficznego *A. niger* 20 z uwzględnieniem zużycia substratu (pektyny, cukrów), zmian odczynu podłoża hodowlanego, zawartości w nim białka oraz aktywności PG, PE i PL (ryc. 8). W celu łatwiejszego zbilansowania pektyny w podłożu podczas hodowli pleśni, zamiast dodatku wysłodków buraczanych użyto w pożywce ich 10% wyciągu.



Ryc. 7. Ogólna aktywność pektynolityczna mutantów auksotroficznych *A. niger* w °PM w czasie 96-godzinnej hodowli wstępnej

General pectinolytic activity of the auxotrophic mutants of *A. niger* in °PM during 96 hours of submerged culture

W czasie 96 godz. hodowli wstępnej, szczep *A. niger* 20 zużywał znaczne ilości pektyny i cukrów redukujących. Wprawdzie w okresie pierwszej doby zaznaczył się przejściowo wzrost zawartości cukrów redukujących w podłożu hodowlanym (o ponad 57% w porównaniu ze stanem wyjściowym), jednak zjawisko to było przypuszczalnie następstwem enzymatycznego rozkładu polisacharydów (pektyny), spowodowanego rozwojem pleśni. W dalszych etapach hodowli zużycie cukrów w podłożu było znaczne i po 48 godz. wynosiło 65,9% oraz 75% po 96 godz. w stosunku do ich zawartości po upływie pierwszej doby. Na uwagę zasługuje fakt, że krzywe ilustrujące zużycie pektyny i cukrów redukujących w podłożu w czasie hodowli badanego szczepu miały przebieg niemal identyczny, po-



Ryc. 8. Dynamika syntezy enzymów pektynolitycznych na podłożu z wyciągiem wysłodków buraczanych w czasie 96-godzinnej hodowli wstępnej szczepu *A. niger* 20; 1 — odczyn podłoża, 2 — aktywność PG, 3 — aktywność PE, 4 — aktywność PL, 5 — zawartość białka, 6 — zawartość pektyny, 7 — zawartość cukrów redukujących

The dynamics of pectinolytic enzymes synthesis on a medium with beet pulp extract during 96 hours of submerged culture of *A. niger*, strain 20; 1 — medium pH, 2 — PG activity, 3 — PE activity, 4 — PL activity, 5 — protein content, 6 — pectin content, 7 — reduction sugars content

cząwszy od 24 godz. Może to świadczyć o szybkiej hydrolizie pektyny do cukrów redukujących w początkowym okresie hodowli.

Można zauważyć, że najintensywniejszemu zużyciu pektyny i cukrów redukujących w podłożu hodowlanym w czasie 48 godz. hodowli towarzyszył największy przyrost aktywności PG, PE oraz PL. Równocześnie obserwowano w tym samym okresie dość znaczne zakwaszenie środowiska hodowlanego. W dalszym etapie hodowli (72—96 godz.) jego odczyn stawał się mniej kwaśny, osiągając końcową wartość zbliżoną do wyjściowego poziomu pH , tj. 4,8. Zawartość białka w podłożu hodowlanym systematycznie malała, począwszy od 24 godz. hodowli, osiągając po 96 godz. 64,8% w porównaniu z jego zawartością wyjściową. Aktywności PG badanego szczepu po 96 godz. hodowli wglębnej były nieznacznie niższe od osiągniętych przy zastosowaniu podłoża hodowlanego z użyciem wysłodków buraczanych (ryc. 4), natomiast PE były zdecydowanie wyższe (o 24,2%).

Liazy pektynowe najwyższą aktywność osiągnęły po 48 godz., przy czym w dalszych okresach hodowli nie zaobserwowano większych zmian jej poziomu, co, być może, wiąże się z niższymi wartościami stężenia jonów wodorowych w środowisku hodowlanym (pH 3,6—4,8).

DYSKUSJA

Wpływ auksotrofii na syntezę enzymów przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* nie został dostatecznie wyjaśniony. U mutantów auksotroficznych *A. awamori* w większości przypadków zaobserwowano spadek syntezy kwaśnej proteinazy w porównaniu ze szczepem rodzicielskim. Zauważono ponadto, że auksotrofy, wymagające do rozwoju histydyny, metioniny, cysteiny, argininy oraz witaminy B_1 , charakteryzowały się zarówno wysoką, jak i niską aktywnością proteolityczną. Natomiast mutantom wymagającym lizyny, leucyny i adeniny towarzyszyły wyraźnie niższe uzdolnienia do syntezy tego enzymu (5).

T a h a r a i wsp. (19, 20) wykazali, że uzyskany przez nich adenino-zależny szczep *A. niger* zdolny był w obecności pektyny do aktywnej syntezy PG. Proces ten następował po zakończeniu fazy wzrostu grzyba, tzn. po upływie ok. 20 godz., w ciągu których zawarta w pożywce adenina ulegała zużyciu. Dodatek do pożywki glukozy wpływał ujemnie na syntezę tego enzymu, hamując ją zarówno na etapie translacji, jak i transkrypcji, ponadto wpływ ten był odwracalny i wyrażał się przedłużeniem fazy wzrostu. Można zatem sądzić, że w wyniku określonej regulacji stężeń w podłożu czynników pokarmowych wymaganych przez aukso-

trofy istnieje możliwość skrócenia fazy wzrostu grzybni i przyspieszenia jej przejścia na etap syntezy charakterystycznych dla niej metabolitów.

W badaniach nie stwierdzono zależności między rodzajem wymaganych przez auktrofy *A. niger* czynników pokarmowych a poziomem ich aktywności pektynolitycznej. Wśród mutantów zależnych od niacyny i tiaminy występowały mutanty zarówno wysokoaktywne, jak i niskoaktywne, zaś wymagające biotyny, PABA i seryny charakteryzowały się wyższymi aktywnościami PG od szczepów rodzicielskich. Różnice w zakresie aktywności PG w obrębie mutantów auktroficznych o tych samych wymaganiach (niacyna, tiamina) spowodowane są przypuszczalnie efektem plejotropowym wobec *locus* auktroficzności lub wywołane mutacjami dodatkowymi.

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie możliwości ewentualnego praktycznego wykorzystania szczepów auktroficznych *A. niger* do syntezy pektynaz metodą wglębną. W tych warunkach wiele spośród nich charakteryzowało się wysoką aktywnością w zakresie tworzenia kompleksów pektynolitycznych złożonych z PG i PE. Wprawdzie auktrofy wymagają obecności w podłożu hodowlanym określonych stężeń wymaganych przez nie czynników wzrostowych, ale wymóg ten łatwo może być spełniony przez użycie dodatku tanich produktów odpadowych przemysłu rolno-spożywczego lub przez wykorzystanie ich jako materiałów wyjściowych do sporządzania zacierów produkcyjnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Alichanian S. J.: Prikladnyje uspiechi gienetiki mikroorganizmow. Gienetika 6, 4, 96—105 (1970).
2. Awrowa N. P., Goszko A. A.: Pektoliticzeskaja aktiwnost' sztamow *Clostridium felsineum* pri jejo opriedielenii raznymi metodami. Prikl. Bioch. i Mikrobiol. 9, 3, 414—417 (1973).
3. Bartholomae A., Kustner M., Gierschner K., Baumann G.: Abtrennung und quantitative Bestimmung von Pektin, Poligalacturonsäure und Monogalacturonsäure in Saften aus Schwarzen Johannisbeeren. Die industrielle Obst- und Gemüseverwertung. 62, 317—319 (1977).
4. Bugbee W. N.: Sucrose and Cell Walls as Factors Affecting *Phoma* storage Root of Sugar Beet. Phytopathology 63, 480—483 (1973).
5. Erogina L. J., Niestierowa J. M., Istoszyna S. P.: Sielekcja *Aspergillus awamori* — producenta kisłej proteiny i rol' morfologicznych, biochemicznych mutantów i prototrofnych riewiertantów w otborze aktywnych sztamów. Gienetika 12, 6, 135—140 (1976).
6. Fiedurek J., Ilczuk Z.: Mutagenizacja pleśni *Aspergillus niger* aktywnych pektynolitycznie w warunkach hodowli wglębnej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C 33, 29—39 (1978).

7. Fiedurek J.: Synteza kompleksu pektynolitycznego przez *A. niger* 71 w warunkach hodowli wglębnej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C 36. 37—50 (1981).
8. Hancock J. G., Eldridge C., Alexander M.: Characteristics of Pectate Lyase Formation by *Hypomyces solani* f. sp. *cucurbitae*. Can. J. Microbiol. 16, 69 (1970).
9. Holliday R.: A New Method for the Identification of Biochemical Mutants of Microorganisms. Nature 178, 987 (1956).
10. Ilczuk Z.: Genetik der Citronensäure erzeugenden Stämme *Aspergillus niger*. 2. Mitt. Citronensäuresynthese von mittels UV-Strahlen induzierten auxotrophen Mutanten von *A. niger*. Die Nahrung 14, 2, 97—105 (1970).
11. Ilczuk Z.: Genetyczne aspekty selekcji szczepów *Aspergillus niger* przydatnych w procesie syntezy kwasu cytrynowego. Część I. Przem. Ferm. i Rolny 7, 15—19 (1971).
12. Macdonald K. D., Hutchinson J. M., Gillett W. A.: Isolation of Auxotroph of *Penicillium chrysogenum* and Their Penicillin Yields. J. Gen. Microbiol. 33, 365—374 (1963).
13. Musilkowa M., Fencel Z.: Isolation of Auxotrophic Mutants of *Aspergillus niger* by Ethylmethane Sulphonate Treatment. Folia Microbiologica 15, 34—39 (1970).
14. Nelson N.: A Photometric Adaptation of the Samogyi Method for the Determination of Glucose. J. Biol. Chem. 153, 375—380 (1944).
15. Norma Zakładowa ZN-68-MPSS/C190: Preparaty pektolityczne „Pektopol P” i „Pektopol S” (1968).
16. Polsinelli M., Albertini A., Cassani G., Giferri O.: Relation of Biochemical Mutations to Actinomycin Synthesis in *Streptomyces antibioticus*. J. Gen. Microbiol. 39, 239—246 (1965).
17. Sapożnikowa E. W.: Pieklinowyje wieszczestwa płodow. Izdatielstwo „Nauka”, Moskwa 1965.
18. Schacterle G. R., Pollack R. L.: A Simplified Method for the Quantitative Assay of Small Amounts of Protein in Biologic Material. Analytical Biochemistry 51, 654—655 (1973).
19. Tahara T., Doi S., Shinmyo A., Terui G.: Translation Repression in the Preferential Synthesis of Some Molds Enzymes (I). J. Ferment. Technol. 50, 655—661 (1972).
20. Tahara T., Kotabani H., Shinmyo A., Enatsu T.: Inhibition of Accumulation of Polygalacturonase Forming Activity during Catabolite Repression in *Aspergillus niger*. J. Ferment. Technol. 53, 409—412 (1975).

Wyrażam podziękowanie Panu Prof. Drowi hab. Zdzisławowi Ilczukowi z UMCS (Lublin) za cenne uwagi w czasie wykonywania pracy.

РЕЗЮМЕ

Из двух прототрофных штаммов *Aspergillus niger* с высокой (штамм 71) и низкой (штамм 23) активностью полигалактуроназы (ПГ) был выделен ряд ауксотрофных мутантов и определена их способность к синтезу этого фермента. Большой прирост активности ПГ наблюдался у ауксотрофов, образованных от малоактивного штамма (41,7—94,4%). Для ауксотрофных мутантов, полученных из высокоактивных штаммов, эти приросты составляли от 4,4 до 74,5%.

Несомненной зависимости между видом питательной среды и уровнем пектинолитической зависимости у ауксотрофных штаммов *A. niger* не обнаружено.

Возникла необходимость стимулирования некоторых ауксотрофных (ниацино-, тиамино- и биотинозависимых) штаммов экстрактом из пшеничных отрубей с целью их лучшего развития и интенсификации синтеза пектинолитических энзимов.

На примере трех наиболее активных ауксотрофов и родительского штамма проследили динамику процесса синтеза пектинолитических энзимов во время 96 часов глубинной культуры, учитывая при этом изменения реакции субстрата, содержания белка и активности полигалактуроназы (ПГ), пектиноэстеразы (ПЭ), пектиновой лиазы (Л) и лиазы пектиниановой (ПАЛ).

SUMMARY

Out of two prototrophic strains of *Aspergillus niger*, one characterized by a high activity of polygalacturonase — PG (strain 71) and the other by low activity (strain 23), a number of auxotrophic mutants were selected and their ability to synthesize this enzyme was determined. Greater increases in PG activity were found in the auxotroph originating from the low-activity strain (41.7—94.4%). In the auxotrophic mutants obtained from the high-activity strain the increases were in the range of 4.4 to 74.5%.

Among the auxotrophic strains of *A. niger* no evident dependence was established between the kind of nutritional requirements and the level of pectinolytic activity.

For some auxotrophic strains (niacin-, thiamin- and biotindependent) it was necessary to enrich the culture medium with an addition of wheat bran extract in order to stimulate their better growth and to intensify pectinolytic enzyme synthesis.

The analysis of the chosen examples of three most active auxotrophs and parental strains made it possible to trace the dynamics of the process of pectinolytic enzyme synthesis during 96-hour submerged culturing, taking into consideration pH of medium, protein content, and the activities of polygalacturonase (PG), pectinesterase (PE), pectin lyase (PL) and pectinate lyase (PAL).