

УДК 604.4:577.15+602.3:582.282.123.4

О. Б. РУСЬ, А. В. КАЧАН, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ

### СКРИНИНГ ШТАММОВ *ASPERGILLUS AWAMORI*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГЛЮКОАМИЛАЗУ

Белорусский государственный университет, Минск, e-mail: zrbio@mail.ru

(Поступила в редакцию 14.11.2013)

**Введение.** Мицелиальные грибы рода *Aspergillus* способны продуцировать целый ряд гидролитических ферментов, среди которых основное место занимают амилазы, целлюлазы и протеазы. Амилазы, гидролизующие  $\alpha$ -(1,4)- и  $\alpha$ -(1,6)-гликозидные связи в молекулах амилозы, амилопектина, гликогена и других мальтоолигосахаридах, представлены преимущественно глюकोамилазой (КФ 3.2.1.3), последовательно отщепляющей от молекул субстрата остатки D-глюкозы, и  $\alpha$ -амилазой (КФ 3.2.1.1), расщепляющей субстрат внутри полимерной цепи с образованием преимущественно декстринов. В мировой практике в качестве высокоэффективных продуцентов глюकोамилазы часто используют штаммы мицелиальных грибов рода *Aspergillus*, принадлежащих видам *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. usamii* и др. В течение многих лет амилаолитические ферменты грибов незаменимы при ферментативной обработке крахмалсодержащего сырья в спиртовой, пивоваренной, крахмалопаточной, хлебопекарной отраслях промышленности, поэтому актуальными остаются исследования, направленные на получение более продуктивных штаммов микромицетов.

Целью настоящей работы был скрининг имеющихся микромицетов *A. awamori* по способности расщеплять крахмал, в первую очередь до D-глюкозы, и выявление штаммов с повышенной продукцией глюकोамилазы для дальнейшей работы по получению штамма-продуцента.

**Материалы и методы исследования.** В работе использованы штаммы *A. awamori* БИМ F-6, БИМ F-7, БИМ F-10, БИМ F-272, БИМ F-333, БИМ F-342, ЛФ F-2015, ЛФ F-2016 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», штамм *A. awamori* 4, предоставленный РУП «Энзим» и штамм *A. awamori* 466, предоставленный УП «Лотиос».

Культуры *A. awamori* поддерживались на модифицированной среде Чапека, содержащей (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 9,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01; крахмал – 30; агар-агар – 15.

Суспензии конидий 6-суточных культур микромицетов засеивали в питательную среду, содержащую 24 % пшеничной муки, предварительно обработанной солодовым молоком (рН 6,7). Глубинное культивирование проводили с аэрацией (160 об/мин) в течение 120 ч при 30 °С, после чего оценивали способность расщеплять крахмал, используя в качестве источника неочищенного ферментного препарата культуральную жидкость. Количественное определение редуцирующих сахаров проводили с использованием реактива с 3,5-динитросалициловой кислотой (ДНС) [1]. За единицу (1 ед.) амилазной активности принимали количество фермента, которое приводило к образованию 1 мкмоль редуцирующих сахаров (в эквиваленте глюкозы) за 1 мин реакции гидролиза крахмала при 30 °С и рН 4,7 в пересчете на 1 мл культуральной жидкости. Количественное определение D-глюкозы проводили глюкозооксидазным-пероксидазным методом с использованием набора D-glucose assay kit (GOPOD-Format, Megazyme). За 1 ед. активности фермента глюкоамилазы принимали его количество, приводящее к образованию 1 мкмоль D-глюкозы в 1 мин при 30 °С в пересчете на 1 мл культуральной жидкости. Данные в работе представлены как средние значения, полученные в результате проведения трех независимых экспериментов. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2003.

Для определения содержания ферментов с амилазной активностью в культуральных жидкостях проводили нативный электрофорез в 10%-ном ПААГ и SDS-электрофорез в 10%-ном ПААГ, используя буферную систему Лэммли [2]. Электрофорез в гелях толщиной 1 мм проводили в камере для вертикального электрофореза (Biorad, США), при постоянном напряжении 70 В в течение 4 ч. После электрофореза гели окрашивали раствором Кумасси R-250 в 10%-ной уксусной кислоте и 30%-ном этаноле в течение 14 ч при комнатной температуре. Несвязавшийся краситель отмывали раствором, содержащим 7 % уксусной кислоты и 5 % этанола.

Зимограмму амилолитических ферментов получали по следующей методике. После нативного электрофореза гель 2 раза по 20 мин инкубировали в отмывочном буфере (0,02 М Na-ацетатном буфере (pH 4,7), содержащем CaCl<sub>2</sub> в конечной концентрации 0,1 мМ). После отмывания гель помещали в субстратную смесь, содержащую 1 % растворимого крахмала и 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub> в 0,02 М Na-ацетатном буфере (pH 4,7), и инкубировали при 37 °С. Через 20 мин гель промывали дистиллированной водой и помещали в раствор, содержащий 0,25 % I<sub>2</sub> и 2,5 % KI, до полного прокрашивания йодом связавшегося с гелем крахмала. Для получения зимограммы после электрофореза в денатурирующих условиях использовали аналогичную процедуру, однако после двукратной инкубации в отмывочном буфере гель помещали на 30 мин в раствор, содержащий 0,05 % тритона X-100 и 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub> в 0,02 М Na-ацетатном буфере (pH 4,7), затем 30 мин отмывали в отмывочном буфере, после чего гель инкубировали в субстратной смеси в течение 40 мин.

Результаты электрофореза анализировали с помощью программы GelAnalyzer.

**Результаты и их обсуждение.** В ходе исследований необходимо было отобрать штамм *A. awamori* с наибольшей способностью гидролизовать картофельный крахмал. Культуры микромицетов выращивали с аэрацией в течение 120 ч, после чего определяли амилолитическую активность в культуральных жидкостях по количеству редуцирующих сахаров в эквиваленте глюкозы.

Как следует из данных, представленных на рис. 1, а, все из протестированных штаммов продуцировали амилолитические ферменты. Наибольшей способностью расщеплять картофельный крахмал с образованием редуцирующих сахаров характеризовались штаммы *A. awamori* БИМ F-333 ((201,4±20,8) ед/мл), 466 ((158,8±16,8) ед/мл) и БИМ F-7 ((152,9±15,6) ед/мл). Амилолитическая активность штамма ЛФ F-2015 была низкой, в пределах ((57,0±6,0) ед/мл).

Глюкоамилазную активность штаммов оценивали глюкозооксидазным-пероксидазным методом. Согласно данным рис. 1, б, низкая активность ферментов наблюдалась у штаммов БИМ F-10 ((20,5±1,5) ед/мл), БИМ F-272 ((19,3±1,9) ед/мл), ЛФ F-2015 ((12,8±1,3) ед/мл). Микромицеты же штаммов 466 и БИМ F-342 продуцировали значительно больше глюкоамилазы – ((90,1±9,2) ед/мл) и ((88,7±8,4) ед/мл) соответственно.

В публикациях, посвященных характеристике глюкоамилаз грибов рода *Aspergillus*, представлены различные методики для получения зимограмм амилолитических ферментов данных микроорганизмов. В нашей работе было опробовано несколько методик, однако только при использовании одной из них удалось получить положительные результаты. В методике [3] после промывания гель инкубировали в течение 1 ч при 4 °С в буферном растворе, содержащем 1 % крахмала, после чего выдерживали гель в этом же растворе 1 ч при 50 °С. Для препаратов культуральных жидкостей грибов *A. awamori* данная методика не позволяла получить видимые полосы гидролиза крахмала. В другой методике [4] для отмывания геля перед проведением реакции гидролиза крахмала использовали буферный раствор с 2 % тритона X-100, затем в течение 10 мин инкубировали гель в буферном растворе без его добавления. При использовании этой процедуры для препаратов культуральных жидкостей штаммов *A. awamori* полосы гидролиза крахмала на зимограмме также отсутствовали.

Чтобы оптимизировать методику [4], концентрация тритона X-100 в растворе для отмывки была уменьшена в 20 раз до 0,05 %. В результате на зимограмме были получены четкие полосы гидролиза крахмала.

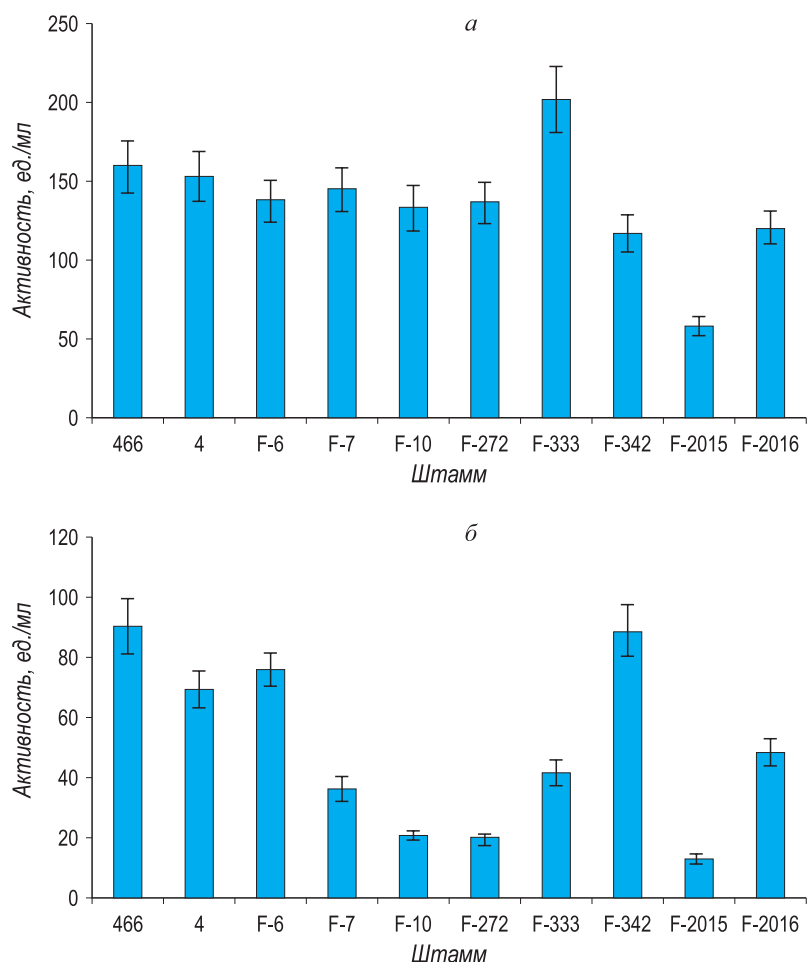


Рис. 1. Способность различных штаммов *A. awamori* расщеплять картофельный крахмал, оцененная по количеству образующихся редуцирующих сахаров (а) и глюкозооксидазным-пероксидазным методом (б)

В результате проведения нативного ПААГ-электрофореза белков культуральных жидкостей штаммов *A. awamori* на зимограммах формировались две крупные полосы, в каждой из которых обнаруживалась амилолитическая активность (рис. 2). Кроме того, присутствовала дополнительная полоса небольшой интенсивности, не различимая на гелях, окрашенных Кумасси. Штаммы БИМ F-6 и БИМ F-342 содержали больше белка в верхней полосе при пониженной концентрации белка в нижней полосе. Штаммы БИМ F-10 и ЛФ F-2015 характеризовались слабой интенсивностью верхней полосы, при этом штамм ЛФ F-2015 на зимограмме образовывал, в отличие от других штаммов, 3 полосы амилолитической активности. У штаммов БИМ F-6 и ЛФ F-2015 на зимограмме отсутствовала низкоинтенсивная средняя полоса.

Результаты ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях, проведенного с теми же препаратами, и полученная зимограмма свидетельствовали о накоплении в культуральных жидкостях штаммов *A. awamori* трех белков с амилолитической активностью с молекулярными массами 51, 63 и 114 кДа. Интенсивность полос амилолитической активности на зимограмме коррелировала с результатами нативного ПААГ-электрофореза: культуральные жидкости штаммов БИМ F-6 и БИМ F-342 содержали повышенные количества белка размером 114 кДа, у штаммов БИМ F-10 и ЛФ F-2015 этот белок практически отсутствовал. Наибольшее количество амилолитических белков, исходя из результатов зимограммы, наблюдалось в культуральной жидкости штамма БИМ F-342, наименьшее – у штаммов БИМ F-10, БИМ F-272 и ЛФ F-2015.

Из литературных источников известно, что грибы рода *Aspergillus* способны продуцировать различные типы амилолитических ферментов. Это могут быть как  $\alpha$ -амилазы, так и глюкоамилазы, синтез которых индуцируется в присутствии крахмала. Внеклеточные  $\alpha$ -амилазы *A. awamori*

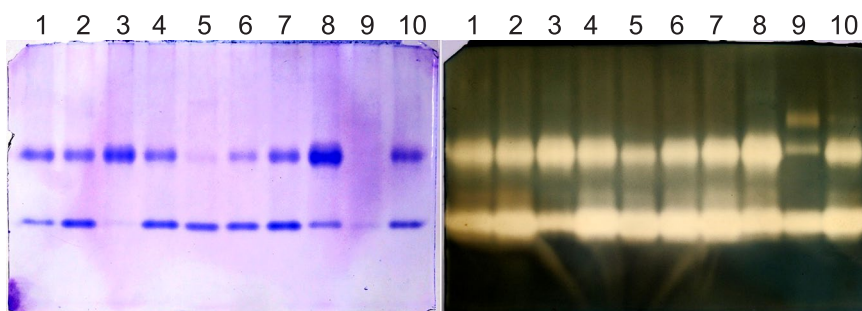


Рис. 2. Электрофореграмма (слева) белков культуральных жидкостей различных штаммов *A. awamori*, полученная методом нативного ПААГ-электрофореза и зимограмма (справа) на ее основе. Дорожки: 1–10 – белки культуральных жидкостей штаммов *A. awamori*: 1 – 466, 2 – 4, 3 – БИМ F-6, 4 – БИМ F-7, 5 – БИМ F-10, 6 – БИМ F-272, 7 – БИМ F-333, 8 – БИМ F-342, 9 – ЛФ F-2015, 10 – ЛФ F-2016

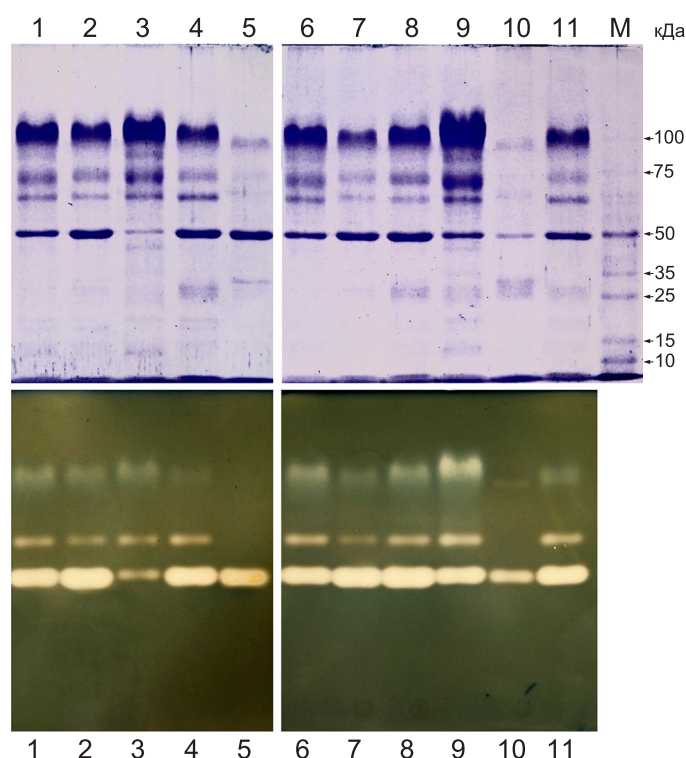


Рис. 3. Электрофореграммы (вверху) белков культуральных жидкостей различных штаммов *A. awamori*, полученные методом ДСН-ПААГ-электрофореза, и зимограммы (внизу) на их основе. Дорожки: 1–11 – белки культуральных жидкостей штаммов *A. awamori*: 1 – 466, 2 – 4, 3 – БИМ F-6, 4 – БИМ F-7, 5 – БИМ F-10, 6 – 466, 7 – БИМ F-272, 8 – БИМ F-333, 9 – БИМ F-342, 10 – ЛФ F-2015, 11 – ЛФ F-2016; М – белки-маркеры молекулярной массы (Promega, #V8491)

и *A. oryzae* имеют молекулярную массу 57 кДа [5], а у *A. niger* – 53 кДа [6]. Показано, что глюкоамилазы *A. awamori* могут синтезироваться в виде нескольких форм с молекулярной массой 109, 87 и 59 кДа [7, 8]. В культуральной жидкости *A. terreus* обнаружена глюкоамилаза размером 86 кДа [9]. При исследовании внеклеточных ферментов *A. niger* посредством ДСН-ПААГ электрофореза и гель-хроматографии выявлена глюкоамилаза с молекулярной массой около 90 кДа [10]. Несколько позднее группой других исследователей в культуральной жидкости *A. niger* обнаружены 4 формы глюкоамилаз с молекулярными массами 112, 104, 74 и 61 кДа [11]. Можно предполагать, что полоса в 51 кДа на электрофореграмме (рис. 3) соответствует  $\alpha$ -амилазе, что подтверждается также высокой интенсивностью данной полосы на зимограмме даже при низком количестве белка.  $\alpha$ -Амилаза, как известно, является эндоферментом и поэтому приводит к более быстрой деградации крахмала до растворимых продуктов, по сравнению с экзо-активной глюко-

амилазой [12]. Аналогично верхняя полоса может предположительно соответствовать глюкоамилазной активности ввиду ее низкой интенсивности при значительно большей, по сравнению с полосой в 51 кДа, концентрации белка.

**Заключение.** В ходе проведенных исследований установлено, что все из протестированных штаммов грибов *A. awamori* способны продуцировать амилолитические ферменты. Основываясь на данных измерения количества D-глюкозы, образующейся при гидролизе крахмала, обнаружено, что максимальный уровень глюкоамилазной активности характерен для грибов штаммов 466 и БИМ F-342. В ходе проведения электрофоретического разделения белков культуральных жидкостей и получения зимограмм выявлено наличие белков с амилолитической активностью, предположительно относящихся к глюкоамилазе и к  $\alpha$ -амилазе. Исходя из результатов данных исследований, в качестве исходных штаммов для создания штамма-продуцента глюкоамилазы целесообразнее использовать *A. awamori* 466 и БИМ F-342.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований на 2011–2015 гг. «Молекулярно-генетические, физиолого-биохимические и клеточные основы создания новых биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, промышленности и охраны окружающей среды (Фундаментальные основы биотехнологий)».

Авторы выражают благодарность УП «Лотиос», РУП «Энзим» и ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» за предоставление штаммов *A. awamori*.

### Литература

1. Miller G. L. // Anal. Chem. 1959. Vol. 31. P. 426–429.
2. Laemmli U. K. // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
3. Koc O., Metin K. // African Journal of Biotechnology. 2010. Vol. 9, № 23. P. 341–342.
4. Upadhyay M. K., Sharma R., Pandey A. K., Rajak R. C. // Mycologist. 2005. Vol. 19, № 4. P. 138–140.
5. Evstatieva Y., Nikolova D., Ilieva S. et al. // Second Balkan conference on biology, 21–23 may 2010, Plovdiv, 50 years University of Plovdiv. Plovdiv 2010. P. 613–617.
6. Dubey A. K., Suresh C., Kavitha R. et al. // FEBS Letters. 2000. Vol. 471. P. 251–255.
7. Yamasaki Y., Suzuki Y., Ozawa J. // Agric. Biol. Chem. 1977. Vol. 41. P. 2149–2155.
8. Negi S., Banerjee R. // Biotechnol. Bioprocess Engineering. 2009. Vol. 14. P. 60–66.
9. Ali S., Hossain Z., Mahmood S., Alam R. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1990. Vol. 6. P. 431–433.
10. Vandersall A. S., Cameron R. G., Nairn C. J. et al. // Prep. Biochem. 1995. Vol. 25. P. 29–55.
11. Selvakumar P., Ashakumary L., Helen A., Pandey A. // Lett. Appl. Microbiol. 1996. Vol. 23. P. 403–406.
12. Xiao Z., Storms R., Tsang A. // Analytical Biochemistry. 2006. Vol. 351, № 1. P. 146–148.

O. B. RUS, A. V. KACHAN, A. N. EVTUSHENKOV

### SCRINING OF THE GLUCOAMYLASE-PRODUCING STRAINS OF *ASPERGILLUS AWAMORI*

#### Summary

The scrining of *Aspergillus awamori* strains with increased production of amylolytic enzymes was performed. The potato starch cleavage capability of micromycetes was evaluated based on the amount of reducing sugars generated and by the glucose oxidase/peroxidase assay. Using native and SDS-PAAG electrophoresis of extracellular proteins and zymographic technique the presence of amylolytic enzymes presumably related to glucoamylase and  $\alpha$ -amylase with molecular weights of 114, 63 and 51 kDa was detected.