

СИНТЕЗ БЕТА-ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ *AUREOBASIDIUM PULLULANS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

Е. Р. АЛЕКСАНИАН, М. Н. МАЛАТЯН, Л. С. МАРКОСЯН

Исследовано влияние возраста посевного материала на синтез бета-фруктофуранозидазы, пуллулана, внеклеточного белка, а также изменение pH среды в культуральной жидкости и морфологию клеток в динамике роста *Aureobasidium pullulans*.

Отмечено, что использование более свежего посевного материала (3-суточного) приводит к сокращению срока достижения максимального синтеза как бета-фруктофуранозидазы, так и пуллулана.

Անվանադրվել է ցանքանյութի փոփոխությանը բետա-ֆրուկտոֆուրանոզիդազայի, պուլլուլանի, արտաբջջային սպիտակուցի սինթեզի վրա, ինչպես է կուլտուրայի մեդիումի pH-ի փոփոխության և բջջերի մորֆոլոգիայի վրա *Aureobasidium pullulans*-ի աճի զինամիջոցով:

The influence of sowing material age on the beta-fructofuranosidase synthesis, pullulan, extracellular protein, as well as change of medium pH in cultural liquid and morphology of cells in dynamics of *Aureobasidium pullulans* growth has been studied. It has been stated that by the use of a fresher sowing material (of 3 days age) it is possible to provide the highest yield of beta-fructofuranosidase and pullulan synthesis in a shorter period of time.

Ключевые слова: бета-фруктофуранозидаза, пуллулан.

При культивировании микроорганизмов с целью получения различных биологически активных веществ весьма существенное значение имеет возраст посевного материала [4—6]. *Aureobasidium pullulans* отличается изменчивой сложной морфологией. В процессе роста культуры обнаруживаются мицелиальные и дрожжеподобные клетки — бластоспоры, способные к почкованию [10, 14—16].

Известно, что синтез меланинового пигмента и пуллулана *A. pullulans* зависит от условий выращивания и возраста культуры [4, 10]. Ранее нами было показано, что уровень синтеза бета-фруктофуранозидазы [КФ 3.2.1.26], белка, пигмента, полисахарида в процессе роста культуры может сильно варьировать в зависимости от культивирования [1—3]. В данной работе приводятся результаты изучения влияния возраста посевного материала на биосинтез белка, пигмента, пуллулана, накопление биомассы и изменение pH в динамике роста культуры.

Материал и методика. Дрожжеподобный гриб *A. pullulans* выращивали в среде следующего состава (%): K_2HPO_4 —0,5; NaCl—0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,02; $(NH_4)_2SO_4$ —0,06; дрожжевой экстракт—2; сахароза—10 [7]. Твердая среда для посевного материала имела аналогичный состав с добавлением 2% агар-агара.

Посевной материал выращивали на косяках в течение 3, 7 и 10 суток при температуре 26°. Затем культурами указанного возраста засевали жидкую питательную среду (200 мл) в колбах Эрленмейера. Культивирование проводили на круговой скалке (180 об/мин) в течение 7 суток при 26°. Пробы отбирали на 1-, 2-, 3-, 4- и 7-е сутки. Культуральную жидкость после удаления клеток и спор центрифугированием при 10 000 г в течение 20 мин использовали для определения в ней пуллулана, вне-

клеточного белка и бета-фруктофуранозидазы, а также изменения pH в динамике роста культуры. Абсолютно сухую биомассу определяли методом Малеста [12].

Активность бета-фруктофуранозидазы определяли в инкубационной среде, состоящей из 0,7 мл 0,5%-ной сахарозы, 0,3 мл ферментного буфера, pH 5,7 при 50° и течение 15 мин по степени гидролиза сахарозы. Редуцирующие вещества определяли методом Сомоджи-Нельсона [13, 17], белок — по Лоури [11]. Удельную активность фермента (Ед) рассчитывали по количеству образовавшихся редуцирующих веществ (по глюкозе) на мг белка за одну минуту (мкмоль глюкозы/мг белка/мин).

Морфологические особенности культуры изучали в динамике роста с помощью фазово-контрастного микроскопа.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты (рис. 1) свидетельствуют о том, что возраст посевного материала *A. pullulans* ока-

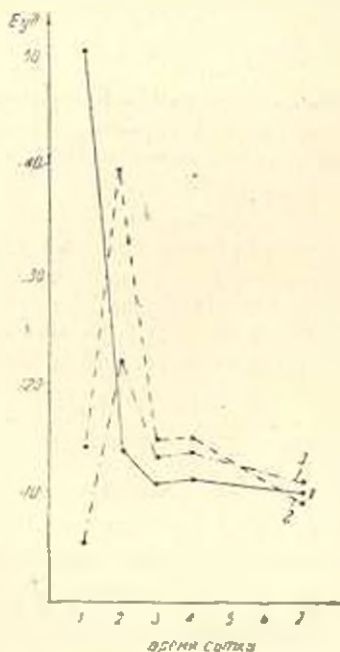


Рис. 1. Влияние возраста посевного материала на активность бета-фруктофуранозидазы. Условные обозначения:

- 1—3-суточный посевной материал,
- 2—7-суточный посевной материал,
- 3—10-суточный посевной материал

зывает существенное влияние на уровень и скорость синтеза бета-фруктофуранозидазы. Наиболее высокие показатели активности и скорости синтеза фермента отмечаются при использовании 3-суточного посевного материала. Максимальная активность выявляется уже в первые сутки роста культуры. В дальнейшем она резко падает и с 3 по 7 сутки находится почти на одинаковом уровне. Инкуляция 7- и 10-суточным посевным материалом приводит к задержке достижения максимальной активности фермента.

Аналогично бета-фруктофуранозидазной активности отмечено определенное сходство между культурами, выращенными из 7- и 10-суточного посевного материала, в отличие от культуры, выращенной при засеве 3-суточным материалом, в процессе синтеза биомассы, пуллулана, внеклеточного белка, а также pH. 3-суточный посевной материал способствует более эффективному биосинтезу пуллулана и лучшему росту культуры, особенно заметному на 4—7-е сутки (табл.). С большей интенсивностью протекает процесс накопления внеклеточного белка в культуральной жидкости. И, наконец, в этом случае зафиксиро-

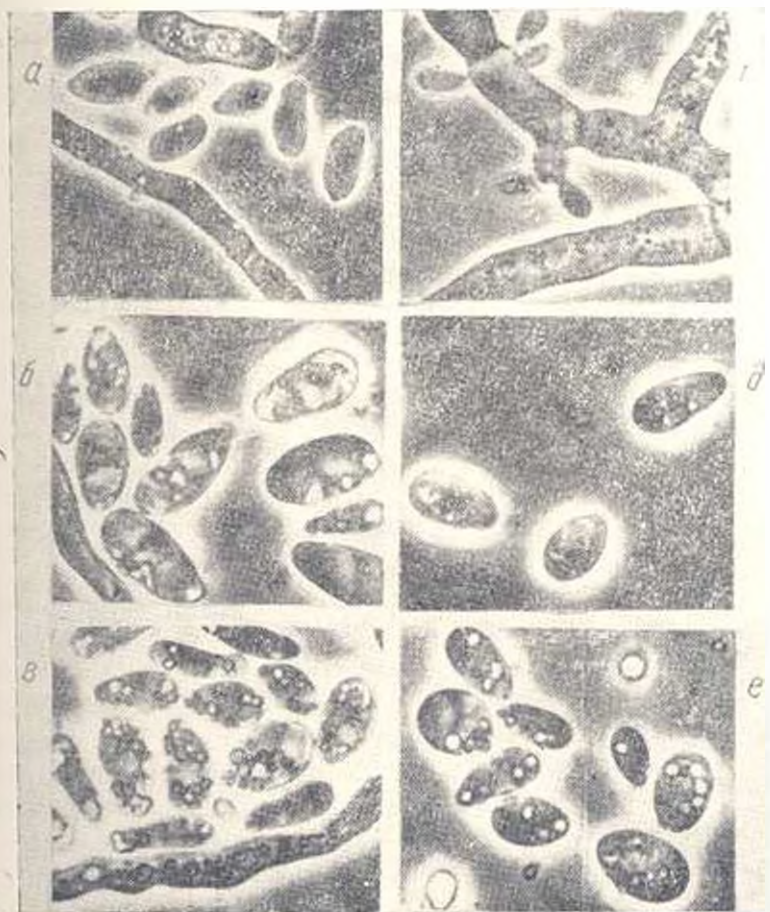


Рис. 2. Морфологические изменения культуры *A. pullulans* в процессе роста. Фазовый контраст. Об. 90X, гомаль 5X. а) 3-суточная культура на агаризованной среде, б) 7-суточная культура на агаризованной среде, в) 10-суточная культура на агаризованной среде. г) 1-суточная культура в жидкой среде, д) 2-суточная культура в жидкой среде, е) 7-суточная культура в жидкой среде.

Таблица. Влияние возраста посевного материала на биосинтетическую активность *A. pullulans*.

Возраст посевного материала, сутки	Время культивирования, сутки				
	1	2	3	4	7
пуллулан, мг/мл					
3	0.23	2.68	10.11	15.50	25.41
7	0.04	0.41	6.25	12.51	20.03
10	0.03	0.17	6.61	12.51	20.90
белок, мг/мл					
3	0.33	0.30	0.46	0.88	0.90
7	0.27	0.37	0.45	0.77	0.82
10	0.25	0.39	0.48	0.76	0.82
биомасса (абсолютно сухая), мг/мл					
3	0.25	1.97	3.11	3.68	5.45
7	0.65	1.34	2.74	3.28	4.05
10	0.28	1.48	2.97	3.25	4.22
pH					
3	7.44	6.89	6.55	5.92	5.02
7	7.51	6.99	6.91	6.83	6.42
10	7.68	7.11	6.84	6.70	6.22

вано сравнительно более сильное подкисление pH питательной среды к концу ферментации.

Результаты исследований показали также, что независимо от возраста посевного материала постепенно усиливается пигментация. Изучение морфологии клеток культур, выращенных на агаризованной среде, также выявило зависимость от возраста (рис. 2). Культура 3-суточного возраста (рис. 2а) представлена в основном дрожжеподобными клетками—бластоспорами и небольшим количеством мицелиальных форм. Цитоплазма бластоспор в условиях фазового контраста выглядит гомогенной. Обнаруживаются единичные почкующиеся бластоспоры. В цитоплазме мицелия наблюдаются светопреломляющие гранулы. В 7-суточной культуре (рис. 2б) присутствуют как дрожжеподобные клетки, так и мицелиальные формы. В бластоспорах обнаруживаются крупные вакуоли. Как дрожжеподобные клетки, так и мицелиальные содержат светопреломляющие гранулы различной величины.

В 10-суточной культуре (рис. 2в) соотношение количества дрожжеподобных и мицелиальных форм такое же, как и в 7-суточной, однако ее клетки отличаются наличием большого количества зерен запасных веществ в цитоплазме.

В первые сутки после пересева 3-суточной агаровой культуры в свежую жидкую питательную среду она переходит в мицелиальную стадию. В этот период свободных дрожжеподобных клеток в ней очень мало, но гифы активно почкуются (рис. 2г). Однако уже на вторые сутки количество дрожжеподобных клеток сильно увеличивается (рис. 2д), а мицелиальных форм становится значительно меньше. 3-суточная жидкая культура представлена в основном дрожжеподобными клетками и еди-

ничными мицелиальными формами. В дальнейшем (4–7-е сутки) подобное соотношение сохраняется. Однако сами клетки заметно меняются. В цитоплазме появляются вакуоли и зерна запасных веществ (рис. 2е).

При использовании 7- и 10-суточного посевного материала культура развивается аналогичным образом, но с некоторой задержкой по сравнению с 3-суточным посевным материалом.

Сопоставление морфологической картины развития культур с динамикой бета-фруктофуранозидазной активности и синтеза пуллулана показывает, что пик активности фермента (рис. 1) совпадает с увеличением количества мицелиальных форм. На вторые сутки бета-фруктофуранозидазная активность культуры из 3-суточного посевного материала резко падает, что совпадает с уменьшением количества мицелиальных форм и значительным увеличением дрожжеподобных. При этом усиливается и синтез пуллулана (табл.). Аналогичные результаты были описаны в работах Катлея [8, 9].

При использовании 7- и 10-суточного посевного материала максимум бета-фруктофуранозидазной активности по сравнению с 3-суточным сдвигается на вторые сутки, а ощутимый синтез пуллулана начинается на третьи сутки.

Проведенные исследования показывают, что биосинтез бета-фруктофуранозидазы и полисахарида *A. pullulans* существенно зависит от физиолого-морфологического состояния культуры. Подбором возраста инокулята возможно регулировать скорость и уровень биосинтеза бета-фруктофуранозидазы и полисахарида при культивировании *A. pullulans*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексанян Е. Р., Маркосян Л. С. Микробиология, 1, 49, 1985.
2. Алексанян Е. Р., Маркосян Л. С. Биол. ж. Армении, 37, 10, 892, 1984.
3. Алексанян Е. Р., Маркосян Л. С., Хачатурян А. А. Биол. ж. Армении, 39, 4, 1986.
4. Грачева Н. М. Фермент. и спирт. пром., 8, 31, 1982.
5. Орлов И. А., Толстиков В. Г. В кн.: Мат-лы науч. конф., посвящ. итогам научно-исслед. работы ин-та за 1970 г., 10, 1971.
6. Серова Ю. Э., Добролюбовская Г. М. Прикл. биохим. и микробиол., 2, 207, 1975.
7. Bender H., Wallenfels K. Biochem. Z., 324, 79, 1961.
8. Catley B. J. J. Gen. Microbiol., 78, 33, 1973.
9. Catley B. J. Microbial polysaccharides and polysaccharases, 12, 69, 1980.
10. Crang R. E., Pechak D. G. J. of Coatings Technology, 50, 639, 36, 1978.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall L. J. J. Biol. Chem., 193, 1, 265, 1951.
12. Malette M. F. Methods in Microbiology, 1, 539, 1969.
13. Nelson N., G. J. Biol. Chem., 53, 1, 375, 1944.
14. Pechak D. G., Crang R. E. Mycologia, 69, 773, 1977.
15. Ramos S., Garcia-Acha J. Trans. Brit. Mycol. Soc., 61, 129, 1975.
16. Ramos S., Garcia-Acha J., Peberdy J. F. Trans. Brit. Mycol. Soc., 61, 283, 1975.
17. Somiji M. J. Biol. Chem., 197, 1, 19, 1952.