

ЭФФЕКТИВНЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ И МУТАНТНЫЕ ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ГЛУБОКОЙ ДЕСТРУКЦИИ МИКРОБНОГО СЫРЬЯ С ПОЛУЧЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК

Смирнова И.А., Серeda А.С., канд. техн. наук, Борщева Ю.А.,
Соколова Е.Н., канд. биол. наук, Сербa Е.М., канд. техн. наук

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой
биотехнологии, г. Москва

*По результатам исследований получены 2 рекомбинантных и 4 мутантных штамма *Aspergillus oryzae* и разработана технология производства высокоактивных ферментных препаратов для глубокого гидролиза растительного, микробного и животного сырья.*

В основе переработки сельскохозяйственного и микробного сырья лежат процессы ферментативной конверсии. Для их эффективной реализации требуются высокоактивные комплексные ферментные препараты. В промышленном производстве технических ферментов, актуальными проблемами является создание высокопродуктивных штаммов микроорганизмов с новыми свойствами.

В то же время одним из направлений в решении проблемы коррекции питания человека является использование натуральных биокорректоров пищи, способствующих повышению биологической полноценности продукции, созданию сбалансированных продуктов функционального назначения. К полноценным источникам белковых веществ, аминокислотный скор которых приближается к животному белку, можно отнести микробную биомассу[1].

В настоящее время проводятся работы по использованию мицелиальных грибов как субстратов для получения БАД. В биомассе микромицетов содержатся значительные количества белковых веществ (до 50%) и различные биополимеры, в т.ч. β -глюканы, маннаны, хитин, липиды. Поэтому получение БАД с функциональными свойствами на основе ферментативной деструкции грибной биомассы, содержащей полиаминосахариды, является актуальным.

На основе многоступенчатой селекции и эффективных методов мутагенеза, а также с использованием методов генной инженерии по разработанным во ВНИИПБТ методикам протопластирования и трансформации получены новые высокоэффективные мутантные и рекомбинантные штаммы микромицетов – активные продуценты комплекса ферментов амилолитического и протеолитического действия для эффективной конверсии сельскохозяйственного и микробного сырья в производстве пищевых и кормовых биологически полноценных продуктов,

белково-аминокислотных биокорректоров и БАД с функциональными свойствами [5].

Методами генной инженерии с использованием разработанной системы трансформации для получения высокоактивного продуцента комплекса грибных протеаз была проведена котрансформация штамма *P.canescens* PCA-RN3-11-7 *niaD*⁻ следующими плазмидами [2]:

- pPrXyl_PepA cl. 6, содержащей ген пенициллопепсина;
- pPrAbf_Lap1 cl. 3, несущей ген лейцинопептидазы *A.oryzae* под арабинофуранозидазным промотором;
- pSTA10, несущей маркерный ген нитратредуктазы.

Получено 22 трансформанта, из которых методом PCR с грибных колоний было отобрано 6 клонов, содержащих оба целевых гена (№№ 2, 3, 4, 7, 8 и 21). Тестирование отобранных клонов глубинным культивированием позволило выявить клон № 7 и 25 с высокой общей протеолитической активностью.

– созданы новые рекомбинантные штаммы – продуценты комплекса протеаз:

P. canescens PepA (cl. 25) – продуцент кислой грибной аспарагиновой протеазы – пенициллопепсина, с уровнем общей протеолитической активности 35 – 40 ед/мл (30°C, pH 4,7, субстрат – гемоглобин), что в 2 раза превышает уровень активности промышленного штамма;

P.canescens PepA + Lap1 (cl. 7) – продуцент комплекса кислых грибных протеаз (пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы), с уровнем общей протеолитической активности 64 ед/мл (30°C, pH 4,7, субстрат – гемоглобин), что в 3 раза превышает уровень активности промышленного штамма [3].

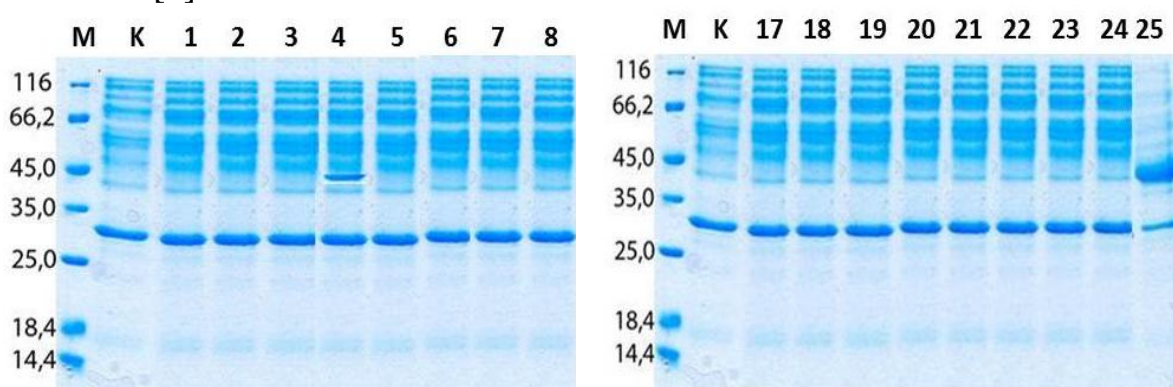


Рис. 1. ДДС-электрофорез образцов КЖ трансформантов

Исследованы физико-химические свойства ФП *Пенициллопепсин Гх*, полученного на основе штамма *P.canescens* PepA. Установлено, что препарат проявляет максимальную протеолитическую активность при pH 4,0 и температуре 50°C [4].

В результате с использованием комбинации методов селекции и генной инженерии, созданы 2 новых генно-инженерных штамма – продуценты

комплекса кислых протеаз, уровень биосинтетической активности которых по отношению к гидролазам превышает исходный штамм в 2-3 раза.

В результате проведенных селекционных работ и эффективных методов мутагенеза отобрано 4 наиболее физиологически активных штамма гриба *Aspergillus oryzae* и исследованы их морфологические свойства. Гигантские колонии, выращенные на агаризованной солодовой среде при температуре 30°C в течение 2-х суток, представлены на рис.2.

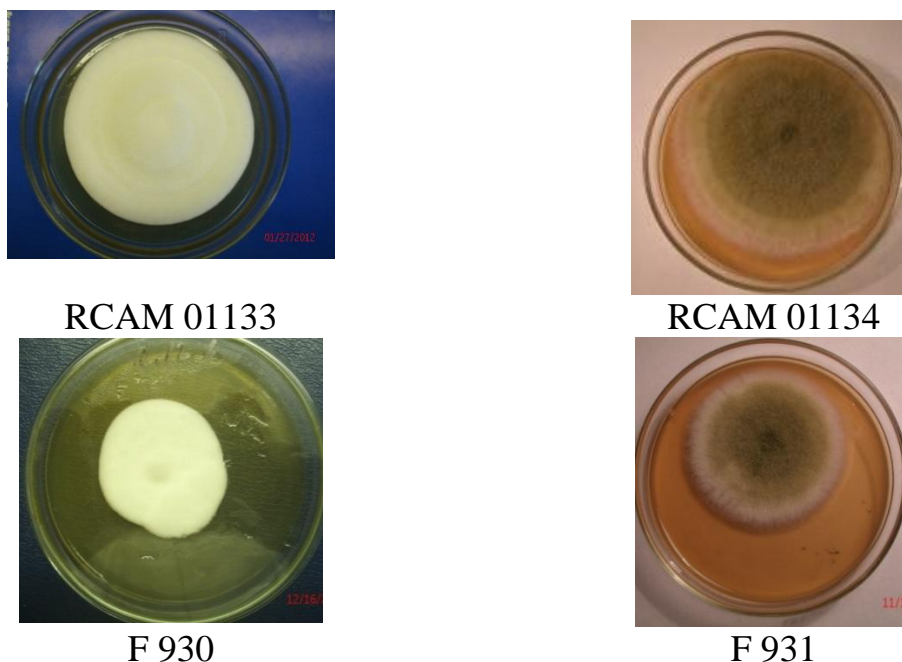


Рис. 2. Гигантские колонии штаммов *Aspergillus oryzae* на сусло-агаре на 2-ые сутки роста

Тестирование физиологической активности штаммов проводилось по уровню накопления биомассы, белка, аминного азота, гидролитических ферментов. Исследование культуральных свойств отобранных штаммов микромицета *Aspergillus oryzae* осуществляли на натуральных питательных средах глубинным и твердофазным методами.

Установлено, что наибольшей скоростью роста и высоким уровнем накопления биомассы и белковых веществ на 2-ые сутки при поверхностном культивировании обладал селекционированный штамм *A.oryzae RCAM01134*, в то время как другие штаммы достигали этих показателей только на 4-ые сутки. Наиболее высоким уровнем накопления протеолитической и амилолитической активности характеризовались штаммы *A.oryzae F-930* и *RCAM01133* (116 -117 ед.ПС/г и 262-287 ед.АС/г). Отмечено также более высокое образование белковых веществ и уровень накопления аминного азота у шт. *F-931* и *RCAM01133*, превышающие в среднем в 2-3 раза показатели других штаммов.

По результатам твердофазного культивирования на соевом субстрате отобран штамм *RCAM01133*, обладающий наиболее высокой продуктивностью по биомассе, высоким уровнем синтеза протеолитических и амилолитических ферментов, содержанием белковых веществ, что делает

его перспективным для дальнейшего использования при переработке соевого сырья. Кроме того, отобранный штамм может быть использован при разработке твердофазного процесса переработки зерно-бобового сырья в связи с низкой способностью к спорообразованию, что облегчает проведение технологического процесса.

Исследования по глубинному культивированию штаммов показали, что штамм *A. oryzae F-931* характеризуется более высокой биосинтетической способностью по отношению к синтезу ферментов, катализирующих конверсию полимеров микробной биомассы, накапливает наибольшее количество белковых веществ. Это свидетельствует о перспективности использования его биомассы в качестве субстрата для получения белково-аминокислотных корректоров пищи и функциональных БАД. Поскольку особое внимание приобретают вопросы утилизации вторичных ресурсов биотехнологических производств и, в первую очередь, грибного мицелия, использование гриба *A. oryzae F-931*, который имеет промышленное значение как продуцент экзогидролаз, а его биомасса – отход производства, весьма перспективно.

Кроме того, полученный в результате селекции и мутагенеза высокоактивный штамм *A. oryzae RCAM01134*, синтезирует комплекс гидролаз протеолитического, нуклеазного, хитиназного, β -глюканазного и маннаназного действия, уровень активности которых значительно превышает уровень активности ферментов, синтезируемых родительским штаммом: нуклеазы в 58-86 раз, хитиназы – в 3,0-5,0 раз, β -глюканазы - в 1,7-4,5 раза, маннаназы - в 1,4-7,5 раз.

Использование штамма *Aspergillus oryzae RCAM01134* позволяет получать высокоактивные комплексные ферментные препараты протеолитического, β -глюканазного, нуклеазного, хитиназного и маннаназного действия. Отличительной особенностью синтезируемого комплекса ферментов является широкая субстратная специфичность и способность гидролизовать высокомолекулярные полимеры как растительного и животного, так микробного сырья, в том числе белковых веществ, нуклеиновых кислот и полисахаридов. Вследствие этого, штамм микроорганизмов, продуцирующий комплекс гидролаз, и получаемый на его основе комплексный ферментный препарат имеют широкие перспективы применения во многих отраслях биотехнологии и пищевой промышленности. Использование такого препарата позволяет осуществлять более глубокий гидролиз сельскохозяйственного сырья, увеличить выход и качество целевых продуктов, улучшить экологическое состояние перерабатывающих производств.

На основе рекомбинантных штаммов и новых мутантных штаммов *A. oryzae* разработана технология производства высокоактивных комплексных ферментных препаратов без изменения основного технологического процесса, обеспечивающая повышение экономических показателей производства за счет повышения выхода целевых ферментов и

сокращения количества ферментаций. Показана высокая эффективность использования комплексных ферментных препаратов гидролаз, полученных на основе высокоактивных мутантных штаммов, для глубокого гидролиза растительного, животного и микробного сырья, в том числе белковых веществ, нуклеиновых кислот и полисахаридов, при получении биокорректоров пищи, белково-аминокислотных добавок кормового и пищевого назначения, биологически активных добавок с функциональными свойствами.

Штаммы микромицета *A.oryzae* RCAM01133 и *A.oryzae* RCAM01134, а также *A.oryzae* RCAM01135 депонированы в коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ГНУ ВНИИСХМ. Разработаны паспорта на штаммы и «Методические рекомендации по поддержанию мутантных штаммов в активном состоянии и ведению посевного материала».

Исследования выполнены по гранту Президента РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-3732.2014.4.

Литература

1. Серба Е.М., Оверченко М.Б., Римарева Л.В., Борщева Ю.А. Влияние детергентов на секрецию внутриклеточных ферментов из биомассы гриба *Aspergillus oryzae*./ Хранение и переработка сельхозсырья, 2011, №12, с.39-40
2. Серeda А.С., Цурикова Н.В., Костылева Е.В., Смирнова И.А., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Сеницын А.П. Создание рекомбинантных грибных продуцентов кислых протеаз. Сборник трудов Седьмого Московского Международного Конгресса «Биотехнология: Состояние и перспективы развития». 19-22 марта, Москва, 2013, с.14
3. Цурикова Н.В., Бурцева Э.И., Серeda А.С., Костылева Е.В., Веселкина Т.Н., Смирнова И.А. Методы селекции мицелиальных грибов *Aspergillus*. Тезисы докладов третьего съезда микологов России. – М.: Национальная академия микологии, 2012. с. 364 – 365.
4. Цурикова Н.В., Бурцева Э.И., Веселкина Т.Н., Костылева Е.В., Серeda А.С., Смирнова И.А., Сеницын А.П. Методы селекции мицелиальных грибов рода *Aspergillus*./ Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. Сборник научных трудов под ред. В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. – М.: ВНИИПБТ, 2012. - С. 8 - 20.
5. Решение о выдаче патента РФ от 21.01.2014 (заявка № 2013103988 от 30.01.2013 г. «Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Asp.oryzae* - продуцент мальтогенной альфа-амилазы»). Цурикова Н.В., Костылева Е.В., Серeda А.С., Нефедова Л.И., Веселкина Т.Н., Смирнова И.А., Римарева Л.В.