

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXIII, 5

SECTIO C

1978

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Jan FIEDUREK, Zdzisław ILCZUK

**Mutagenizacja pleśni *Aspergillus niger* aktywnych pektynolitycznie
w warunkach hodowli wgłębnej**

Мутагенизация плесеней *Aspergillus niger*, пектинолитически активных
в условиях глубинной культуры

Mutagenization of *Aspergillus niger* with Pectinolytic Activity under Conditions
of Submerged Culture

W przemyśle fermentacyjnym coraz większe zastosowanie mają kultury produkcyjne, udoskonalone w procesach mutagenizacji. Najbardziej wymownym tego przykładem może być otrzymywanie przy ich użyciu takich produktów, jak antybiotyki, aminokwasy, kwas cytrynowy i wiele innych. Również w zakresie biosyntezy enzymów pektynolitycznych można przy pomocy mutagenizacji osiągać pomyślne wyniki, przy czym proces doskonalenia produktywności szczepów może być z dobrym skutkiem realizowany w drodze wielostopniowej indukcji mutantów i sukcesywnej selekcji spośród nich form najbardziej wydajnych (1, 3, 4, 11).

BADANIA WŁASNE

Do badań użyto szczepu *Aspergillus niger* 349, mutantu III stopnia, o wysokiej aktywności w zakresie syntezy poligalakturonazy w warunkach hodowli powierzchniowej (4). Indukcję mutantów IV stopnia prowadzono poprzez łączne użycie N-nitrozometylomocznika (NNM) i promieni UV, których źródłem była lampa z palnikiem Philipsa TUV 30. W celu przeprowadzenia tego procesu do probówek z jałową wodą destylowaną wprowadzono 2—3 oczka konidiów oraz 0,1 ml 0,01% roztworu Tween-80 w celu spowodowania lepszego rozbitcia łańcuchów spor. Następnie w komorze Bürkera określano gęstość uzyskanej zawiesiny, po uprzednim przefiltrowaniu jej przez sączek ze szkła spiekane G-2. Liczbę konidiów ustalano zazwyczaj na ok. $2,5 \times 10^6$ w 1 ml, natomiast ich żywotność, oznaczano przez wysiew rozcieńczeń na płytce Petriego z podłożem agarowym.

Mutagenizacji dokonywano przez potraktowanie wyjściowej zawiesiny konidiów 1% NMM (tj. zmieszanie równych objętości tej zawiesiny z 2% roztworem NMM) na okres 1—5 godz. Po tym czasie zawiesinę konidiów uzupełniano dodatkiem 0,1 ml 10% NaOH w celu przerwania toksycznego działania NMM (13) i rozcieńczano jałową wodą destylowaną w stosunku od 1:10 do 1:1000. Ze wszystkich rozcieńczeń wysiewano na płytki Petriego z pożywką Czapeka po 0,1 ml zawiesiny (w kilku równoległych powtórzeniach) w celu określenia odsetka przeżywalności w porównaniu z zawiesiną kontrolną. Równocześnie część płytek zasianych konidiami po ich potraktowaniu 0,1% NMM dodatkowo poddawano działaniu promieni UV w dawkach 4800—14 400 ergów/mm² i inkubowano w temp. 30°C. Także część płytek zasianych wyjściową zawiesiną konidiów naświetlano promieniami UV w tych samych dawkach w celu określenia ich wrażliwości. Z liczby wyrosłych na płytkach kolonii ustalano stopień przeżywalności konidiów po działaniu obu mutagenów łącznie oraz każdego z osobna.

U otrzymanych w wyniku mutagenizacji szczepów *A. niger* określano zdolność do syntezy pektynaz typu PG. W celu usprawnienia selekcji form bardziej pod tym względem aktywnych od szczepu wyjściowego, zastosowano metodę wstępnej ich oceny na podstawie testu cetavlonowego (8). W dalszym postępowaniu test ten zastąpiony został metodą dyfuzji płytkowej, polegającą na dozowaniu płynu pochodzącego z hodowli próbowkowych badanych mutantów, do „studzienek” wyciętych w podłożu agarowym, zawierającym polipektan sodu w buforze Mc Ilvaina (7). Szczepy wytwarzające strefy dyfuzji enzymów o większej średnicy w porównaniu z kulturą wyjściową (w obu wersjach wstępnego ich testowania), sprawdzano ostatecznie w hodowlach wytrząsanych. W tym celu do kolb płaskodennych o pojemności 500 ml, zawierających 100 ml pożywki, wprowadzano po 1 ml zawiesiny konidiów, uzyskanej przez splukanie dojrzałych spor z powierzchni skosu agarowego. Zaszczepione podłoża inkubowano w ciągu 4 dni w temp. 30°C na wytrząsarce, przy szybkości 200—220 obr./min. i maksymalnym wychyleniu w płaszczyźnie poziomej, wynoszącym 25 mm. Aktywność pektynolityczną szczepów mierzono viskozymetrycznie w umownych jedn. RA/ml podłoża hodowlanego, wyliczonych z iloczynu: 100 × odwrotność czasu (w minutach) wymaganego do redukcji lepkości substratu o 50% (2).

WYNIKI

W pierwszej części badań określono skład podłoża optymalny dla szczepu *A. niger* 349 do syntezy PG w warunkach hodowli wstrząsanej. Jak wynika z danych tab. 1, za najbardziej odpowiednią można było uznać pożywkę z wysłodków buraczanych, uzupełnioną dodatkiem siarczanu magnezu, kwaśnego fosforanu potasu, fosforanu amonu i żelaza (tab. 1 poz. 2). W środowisku tym szczep *A. niger* 349 syntetyzował poligalakturonazy z aktywnością około 22 jedn. RA/ml, nie ustępując praktycznie wariantom pożywek z dodatkiem brzeczki słodowej (poz. 18 i 19) i wyciągu z wysłodków (poz. 22—24, 26).

Zauważono, że zmiany w składzie podłoża hodowlanego wywierały często określony wpływ na morfologię grzybni szczepu *A. niger* 349. Pod tym względem można było wyróżnić trzy charakterystyczne typy jej wzro-

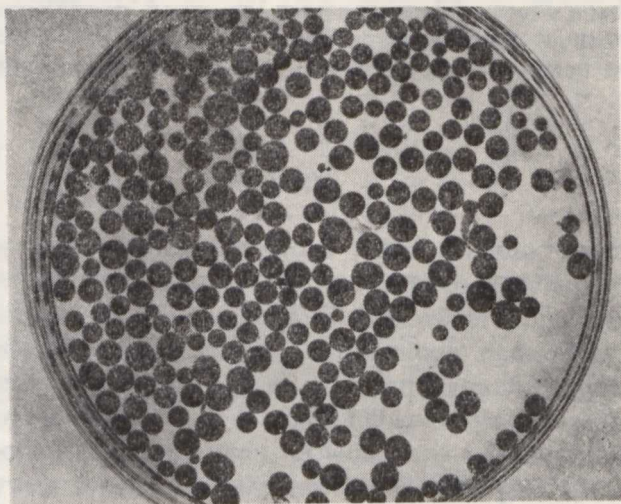
Tab. 1. Wpływ składu podłoża na aktywność pektynolityczną mutantu *A. niger* 349 w warunkach hodowli węgłnej
 Influence of the composition of the medium on pectinolytic activity of the mutant *A. niger* 349 under conditions of submerged culture

Nr pożywki — Medium no.	Składniki podłoża (%) Composition of the medium (%)											pH pożywki po 4 dniach hodowli pH of medium after 4 days of incubation	Aktywność PG w jedn. RA/ml podłoża PG activity in RA units/ml of medium							
	wysłodki — beet pulp wyciąg z wysłodków beet pulp extract	4,0	pektyna — pectin	autolizat drożdżowy yeast autolysate	namok z kukurydzy corn steep liquor	1,5	melasa — molasses	5,0	wyciąg z otrąb bran extract	2,5	wyciąg z kielków malt sprouts extract			5 ² Blg brzezka słodowa malt extract	0,7	(NH ₄) ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05	KH ₂ PO ₄
1.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	+	+	+	+	2,6	9,7
2.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	3,7	22,0
3.	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	+	2,8	6,0
4.	+	-	-	-	0,2	+	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	+	3,3	5,2
5.	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	3,6	9,2
6.	+	-	-	-	0,2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	3,4	8,1
7.	+	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,0	16,3
8.	+	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,0	15,7
9.	+	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,2	14,4
10.	+	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,2	13,5
11.	+	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,5	13,8
12.	+	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	4,7	13,0
13.	+	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	4,8	9,9
14.	+	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,5	8,8
15.	+	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,6	7,5
16.	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	3,0	6,0
17.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	4,5	6,4
18.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	+	-	+	+	-	+	2,5	22,8	
19.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	+	-	+	+	-	+	2,4	23,7	
20.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	+	-	+	+	-	+	2,3	18,4	
21.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	+	-	+	+	-	+	2,3	17,6	
22.	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,4	23,3	
23.	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,2	19,0	
24.	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,5	22,0	
25.	-	10	-	-	0,2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	5,7	20,8	
26.	-	10	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	5,4	23,9	
27.	-	10	1	-	0,2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	6,6	ślad	
28.	-	10	2	-	0,2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	6,3	8,5	
29.	-	-	2	-	0,2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	5,6	5,5	

stu. Mianowicie na podłożu optymalnym grzybnia rozwijała się w postaci nitkowatej, tj. w formie długich i cienkich strzępek, licznie rozgałęzionych i wzajemnie splątanych. Ta postać grzybni wydaje się najbardziej odpowiednia z punktu widzenia aktywnej biosyntezy pektynaz. Uzupełnienie składu podłoża optymalnego łatwo przyswajalnymi źródłami azotu organicznego z reguły powodowało obfitszy rozwój grzybni, wyrażający się we wzroście gęstości środowiska hodowlanego. Wzmocnionemu rozwojowi grzybni nie towarzyszył jednak wzrost syntezy pektynaz. Była ona na pożywce z dodatkiem namoku z kukurydzy lub autolizatu drożdżowego zawsze słabsza niż bez tych dodatków (tab. 1).

Drugi typ wzrostu charakteryzował się powstawaniem kulistej grzybni o średnicy 0,1—2,0 mm, która tworzyła się w podłożach zawierających zamiast wysłodków buraczanych ich 10% wyciągi wodne. Należy podkreślić, że ten typ morfologiczny grzybni zachował wysoką aktywność pektynolityczną, której wartości wahały się w granicach 20—23 jedn. RA/ml.

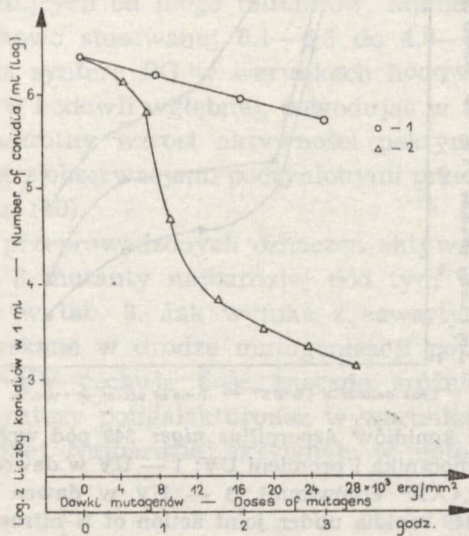
Najbardziej osobliwy kształt przybierała grzybnia *A. niger* 349 podczas hodowli w pożywce z dodatkiem pektyny jabłkowej zamiast wysłodków buraczanych. W tym przypadku powstawały olbrzymie formy kuliste, o średnicy 8—12 mm (ryc. 1) lub wydłużone, o wymiarach ok. 10×30 mm długości. Charakteryzowały się one konsystencją zbitych skupisk grzybni, których struktura na przekroju poprzecznym była nieco luźniejsza w strefie powierzchniowej i mocno zwarta w części centralnej. Hodowle



Ryc. 1. Wygląd grzybni *Aspergillus niger* 349 po 4 dniach hodowli wytrząsanej na podłożu z dodatkiem pektyny jabłkowej zamiast wysłodków buraczanych
Mycelium of *A. niger* 349 after 4 days of incubation in submerged culture on the medium with apple pectin added instead of beet pulp

o takim typie morfologicznym grzybni wykazywały bardzo słabą aktywność pektynolityczną.

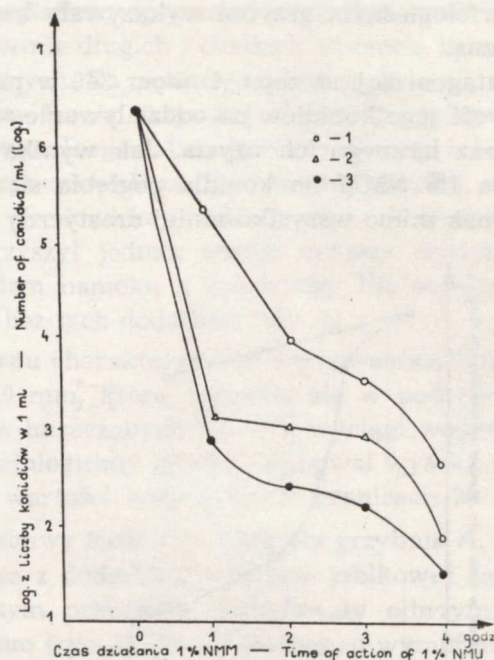
W procesie mutagenizacji szczepu *A. niger* 349 w pierwszej kolejności określono wrażliwość jego konidiów na oddziaływanie zarówno NMM, jak i promieni UV oraz łącznego ich użycia. Jak wynika z ryc. 2, stopień letalnego działania 1% NMM na konidia pogłębia się w miarę upływu czasu. Jest on jednak mimo wszystko mniej drastyczny niż oddziaływanie



Ryc. 2. Przeżywalność konidiów szczepu *Aspergillus niger* 349 pod wpływem działania mutagenów; 1 — N-nitrozometylomocznik (roztwór 1%), 2 — promienie UV
Survival of conidia of the strain *A. niger* 349 under the influence of: 1 — N-nitrosomethylurea (1%), 2 — UV irradiation

promieni UV, zwłaszcza przy użyciu dawek powyżej $9,6 \times 10^3$ ergów/mm². Łączne zastosowanie obu mutagenów powodowało odpowiednio silniejsze skutki letalne (ryc. 3).

Do selekcji mutantów aktywnych pektynolitycznie zastosowano ostatecznie następujące warunki ich indukcji, jako najbardziej odpowiednie: czas działania 1% NMM — 3 lub 4 godz. oraz dawki promieniowania UV w granicach od $4,8$ do $14,4 \times 10^3$ ergów/mm². W tych warunkach wyodrębniono łącznie 252 kultury, które poddano wstępnej ocenie metodą cetawlonową (70 kultur) lub metodą dyfuzji płytkowej (182 szczepy). W pierwszej grupie wyselekcjonowano 11 szczepów bardziej aktywnych niż rodzicielski (sądząc z wielkości stref dyfuzji enzymu wokół kolonii). Szczepy drugiej grupy w następstwie ich oceny w hodowlach probówkowych i wyników testu studzienkowego można było podzielić na trzy kategorie: 1) kultury tworzące strefy dyfuzji enzymu o średnicy nie większej od tej, która



Ryc. 3. Przeżywalność konidiów *Aspergillus niger* 349 pod wpływem łącznego działania N-nitrozometylomocznika i promieni UV; 1 — UV w dawce 4.8×10^3 ergów/mm², 2 — UV w dawce 9.4×10^3 ergów/mm², 3 — UV w dawce 14.4×10^3 ergów/mm²
Survival of *A. niger* 349 conidia under joint action of N-nitrosomethylurea and UV rays; 1 — UV at a dose of 4.8×10^3 erg/mm², 2 — UV at a dose of 9.4×10^3 erg/mm², 3 — UV at a dose of 14.4×10^3 erg/mm²

charakteryzowała szczep wyjściowy (19 mm), 2) szczepy o wielkości średnicy dyfuzji większej od 25 mm i 3) pozostałe o wartościach pośrednich, tj. od ponad 19 do 25 mm (tab. 2).

Do dalszego etapu selekcji wyodrębniono 53 mutanty, które charakteryzowały się zdolnością do tworzenia stref dyfuzji enzymów o średnicy

Tab. 2. Wyniki wstępnej oceny aktywności pektynolitycznej mutantów *A. niger* na podstawie hodowli probówkowych i analizy wielkości stref dyfuzji enzymu do podłoża agarowego

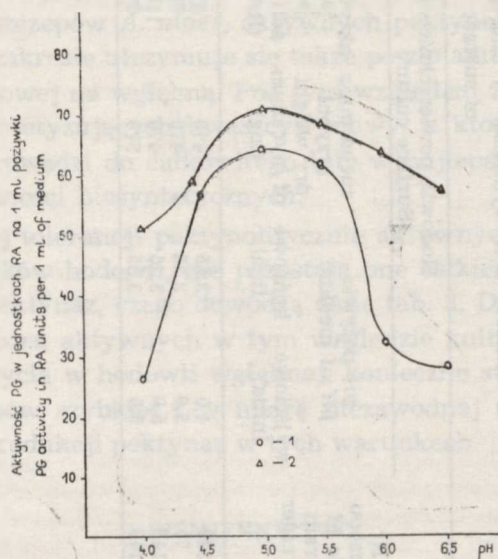
Results of initial evaluation of pectinolytic activity of *A. niger* mutants estimated by means of tube cultures and the size of zones of the enzyme diffusion

Szczepy wytwarzające strefy dyfuzji enzymu o średnicy: Number of strains giving enzyme diffusion zones of the diameter:					
poniżej below	19 mm	19—25 mm	ponad above	25 mm	
liczba number	%	liczba number	%	liczba number	%
71	39,0	58	31,9	53	29,1

powyżej 25 mm. Wszystkie one poddane zostały dokładnej ocenie pod względem aktywności pektynolitycznej w hodowlach wytrząsanych. W rezultacie tego można było wykazać, że u 13 szczepów (tj. niespełna 24% ogółu) była ona niższa niż u szczepu wyjściowego.

Należy odnotować, że w trakcie doświadczeń dał się zaobserwować istotny wpływ wyjściowego odczynu podłoża na aktywność pektynolityczną przesączów hodowlanych zarówno w odniesieniu do szczepu wyjściowego, jak i pochodzących od niego mutantów. Mianowicie zmiana wartości pH z początkowo stosowanej 6,1—6,3 do 4,9—5,0, w zauważalny sposób stymulowała syntezę PG w warunkach hodowli powierzchniowej i bardzo wydatnie w hodowli wgłębnej, powodując w tym ostatnim przypadku niemal dwukrotny wzrost aktywności pektynolitycznej (ryc. 4). Wyniki te są zgodne z obserwacjami poczynionymi przez K r a k o w i a k a i M a l a n o w s k ą (10).

W następstwie przeprowadzonych oznaczeń aktywności poligalakturonaz wyodrębniono 3 mutanty najbardziej pod tym względem wydajne, scharakteryzowane w tab. 3. Jak wynika z zawartych w niej danych, kultury pleśni uzyskane w drodze mutagenizacji poprzez łączne użycie NMM i promieni UV cechuje dość znaczne zróżnicowanie w zakresie uzdolnień do syntezy poligalakturonaz w warunkach hodowli powierzchniowej i wgłębnej. Najbardziej aktywnym w metodzie wgłębnej oka-



Ryc. 4. Wpływ wyjściowej wartości pH pożywki na aktywność poligalakturonazy mutantu *A. niger* 349/71; 1 — hodowla wytrząsana, 2 — hodowla powierzchniowa
The influence of initial pH value on the activity of polygalacturonase of *A. niger* 349/71; 1 — submerged culture, 2 — surface culture

Tab. 3. Synteza PG przez najbardziej aktywne mutanty *A. niger* w warunkach hodowli powierzchniowej i węgłnej
 Pectinases (PG) synthesis by the most active *A. niger* mutants under conditions of surface and submerged culture

Nr szczepeu No of strain <i>A. niger</i>	Hodowla powierzchniowa Surface culture						Hodowla węgłna Submerged culture					
	pH pożywki pH of medium	wyjściowe initial	końcowe final	sucha masa grzybni dry weight of mycelium (mg)	aktywność PG activity (RA/ml)	przyrost aktywności PG increase of PG activity (%)	pH pożywki pH of medium	wyjściowe initial	końcowe final	aktywność PG activity (RA/ml)	przyrost aktywności PG increase of PG activity (%)	
349	4,9	3,65	470	51,8	100,0	5,0	2,8	40,5	100,0			
71	5,0	3,35	470	73,4	22,4	5,0	3,1	63,6	57,0			
146	5,0	3,20	470	116,7	125,3	5,0	3,0	51,6	17,4			
149	5,0	3,35	570	77,6	49,8	5,0	3,0	54,7	35,0			

zał się szczep *A. niger* 349/71, którego przyrost syntezy PG osiągnął wartość 57% w stosunku do kontroli. Jest on zarazem najmniej aktywny, tzn. wykazał najmniejsze przyrosty aktywności tego enzymu, w hodowli powierzchniowej. Odwrotnie kształtują się te stosunki u mutantu *A. niger* 349/146. Natomiast najbardziej równomiernie wystąpił wzrost aktywności pektynolitycznej przy obu rodzajach warunków hodowli u mutantu *A. niger* 349/149.

DYSKUSJA

Grzyby *Aspergillus niger* obok niektórych innych gatunków są przedmiotem dużego zainteresowania jako tanie i wydajne źródło enzymów pektynolitycznych. Duże zapotrzebowanie na pektynazy sprawia, że w wielu ośrodkach prowadzi się obecnie badania zmierzające do intensyfikacji procesu biosyntezy tej grupy enzymów przez *A. niger*, zwłaszcza w drodze ustalania najbardziej korzystnych warunków jego hodowli (5, 9, 12, 14, 15) jak również poprzez próby użycia skutecznych sposobów indukcji mutantów o zwiększonej aktywności pektynolitycznej (1, 3, 4, 6, 11). Należy podkreślić, że dzięki mutagenizacji stało się możliwe doskonalenie kultur produkcyjnych przydatnych do syntezy pektynaz zarówno w metodzie powierzchniowej, jak i wgłębnej. Jest przy tym charakterystyczne, że w przypadku szczepów *A. niger*, aktywnych pektynolitycznie, cecha ta w dość szerokim zakresie utrzymuje się także po zmianie warunków hodowli z powierzchniowej na wgłębna. Pod tym względem znacznie różnią się one od kultur syntetyzujących kwas cytrynowy, u których tego rodzaju zmiana zawsze prowadzi do całkowitego lub, w najlepszym razie, silnego ograniczenia własności biosyntetycznych.

Mimo większej tolerancji pektynolitycznie aktywnych kultur *A. niger* na zmiany warunków hodowli, nie pozostają one całkiem bez wpływu na poziom syntezy pektynaz, czego dowodzą dane tab. 3. Dlatego wydaje się, że w procesie doboru aktywnych w tym względzie kultur *A. niger*, przeznaczonych do użycia w hodowli wgłębnej, konieczne staje się dalsze doskonalenie sposobów szybkiej i w miarę niezawodnej selekcji szczepów, przydatnych do produkcji pektynaz w tych warunkach.

PIŚMIENNICTWO

1. Dianowa O., Martakow A., Bankożytienko R., Nowikowa A.: Selekcja producentów pektolityczeskich fermentow s ispolzowanijem mutagiennych faktorow. Tr. In-ta Mikrobiol. Wirusol. AN Kaz. SSR, 15, 149—163 (1970).

2. Hancock J.: Degradation of Pectic Substances Associated with Pathogenesis by *Sclerotinia sclerotium* in Sunflower and Tomato Stems. *Phytopath.* **56**, 975—980 (1966).
3. Ilczuk Z.: Synthesis of Pectolytic Enzymes by UV-Induced Mutants of *Aspergillus niger*. *Acta Microbiol. Polon. Ser. B* **5** (22), 95—101 (1973).
4. Ilczuk Z.: Synteza enzymów pektolitycznych przez mutanty *Aspergillus niger* uzyskane w drodze indukcji wielostopniowej. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* **29**, 77—86 (1974).
5. Ilczuk Z.: The Effect of Medium Reaction and Sodium and Potassium Salts on the Synthesis of Pectinases by the Mutants of *Aspergillus niger*. *Acta Microbiol. Polon. Ser. B* **6** (23), 109—118 (1974).
6. Ilczuk Z., Wołek K.: Selekcja aktywnych pektolitycznie mutantów *Aspergillus niger* wtórnje indukowanych promieniami UV. *Przem. Ferm. i Rolny* **17**, nr 9, 11—14 (1973).
7. Ilczuk Z., Fiedurek J.: Metoda szybkiej oceny aktywności pektynolitycznej mutantów *Aspergillus niger*. *Przem. Ferm. i Rolny*, **21**, nr 8, 20—22 (1977).
8. Jayasankar N. P., Graham P. H.: An Agar Plate Method for Screening and Enumerating Pectinolytic Microorganisms. *Can. J. Microbiol.* **16**, 1023 (1970).
9. Krakowiak A.: Studia nad biosyntezą enzymów pektynolitycznych i otrzymaniem preparatu. Praca doktorska (maszynopis), Lublin 1974.
10. Krakowiak A., Malanowska J.: Rola stężenia jonów wodorowych w biosyntezie enzymów pektynolitycznych. *Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Spoż.* **25**, 221—228 (1975).
11. Sieliszczynska O., Bummanowa N.: Sielekcja plesniewych grzybów aktywnych producentów pektinazy. *Tr. WNI In-ta Prod. Brożenia* **19**, 126—133 (1970).
12. Srekantiah K. R., Jaleel S. A., Ramachandra Rao T. N.: Effect of Cultural and Nutritional Variations on Certain Exo-Enzymes Secreted by Fungi. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **2**, 42—48 (1973).
13. Szczerbakowa E. I.: Izmienciwost' i sielekcija *Aspergillus niger* — producenta limonnoj kisloty pod wlijanijem chemiczeskich mutagenow. *Tr. Leningr. Naucz.-Issl. In-ta Piszcz. Prom.* **1**, 3—15 (1971).
14. Tchaga S., Ivanova D., Camburova S., Dontcheva T., Popov Ch.: Possibilities for Submerged Cultivation of *Aspergillus niger* — a Pectolytic Enzyme Producer. *Scient. Works of Canning Res. Inst. Plovdiv* **9**, 227—234 (1973).
15. Tchaga S., Camburova S., Dontcheva T., Popov Ch., Ivanova D.: Optimum Pectolytic Enzyme Synthesis on *Aspergillus niger* Strain. *Scient. Works of Canning Res. Inst., Plovdiv* **9**, 235—246 (1973).

РЕЗЮМЕ

Мутант *Aspergillus niger* 349 синтезировал в условиях встряхиваемой культуры максимальное количество пектиназ типа ПГ на субстрате из свежковичного жома с добавлением минеральных солей. Изменение исходной реакции субстрата с pH 6,1—6,3 до pH 4,9—5,0 вызывало почти двоекратный рост пектинолитической активности этих культур.

В результате мутагенизации штамма *A. niger* 349 проведенной при помощи Н-нитрозометилмочевины и ультрафиолетовых лучей, получено всего 252 культуры; их пектинолитическую активность мы определяли на основе упрощенных

селекционных тестов. Из выделенных таким образом 53 наиболее активных мутантов 3 характеризовались наивысшими приростами синтеза ПГ, которые для поверхностной культуры колебались от 22,4 до 125,3%, а для встряхиваемой культуры — от 17,4 до 57,0%.

SUMMARY

The mutant *Aspergillus niger* 349 produced maximal amounts of pectinases of type PG under conditions of shaken culture in the medium of beet pulp with mineral salts added. The change in the initial pH 6.1—6.3 to pH 4.9—5.0 resulted in almost a double increase in pectinolytic activity of the cultures studied.

Mutagenization of the strain *A. niger* 349, carried out by using N-nitrosomethylurea and UV irradiation, resulted in obtaining a total of 252 cultures, the pectinolytic activity of which was initially determined. Among 53 most active mutants selected in this way, three were characterized by the highest increase in PG synthesis, which, under conditions of surface culture ranged from 22.4 to 125.3%, whereas in shaken cultures from 17.4 to 57.0%.

