

УДК 579.6

ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ *ASPERGILLUS NIGER*

Обзор

Жүрсінәлі Алтынай Бегалықызы^{1,2}

zhursinalialtynai@mail.ru

1 – РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Нур-Султан, Казахстан

2 – Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, г. Нур-Султан, Казахстан

Научный руководитель – Турпанова Рауза Масгутовна доцент, к.с/х.н.

Современный уровень развития биотехнологии позволяет широко использовать микроорганизмы для синтеза антибиотиков, аминокислот, полисахаридов, витаминов, каротиноидов, органических кислот и других веществ. В настоящее время возрастает интерес к биотехнологическому получению ряда химических продуктов и ожидается, что доля этих процессов возрастет с 5 % до 20 % [1].

Гаплоидный мицелиальный гриб *Aspergillus niger* является одним из важнейших микроорганизмов, используемых в биотехнологии. Уже много десятилетий он используется для производства внеклеточных (пищевых) ферментов и органических кислот. Кроме того, *A. niger* широко используется для биотрансформации и переработки отходов. Курсанов Л.И. прозвал *A. niger* «биохимической лягушкой» из-за разнообразия применения его метаболитов. Данный микромицет используется в биотехнологии уже более ста лет.

Многие виды *Aspergillus sp.* имеют важное экономическое значение, которые связаны с их применением в промышленности для производства органических кислот и ферментов: α -амилазы, протеазы, L-аспарагиназы и др. [2].

Первые сообщения о продуцировании грибами органических кислот относятся ко второй половине XIX века. В 1877 году Гамлетом и Пловритом была установлена способность грибов к биосинтезу щавелевой кислоты. В 1891 году немецкий учёный Карл Вамер установил образование щавелевой кислоты у *A. niger* [3].

Среди органических кислот наиболее востребованными являются лимонная, щавелевая, уксусная, глюконовая, молочная, итаконовая и янтарная кислоты.

Учёные США Кэтрин Браун и Джо Харрисон установили, что производство щавелевой кислоты из *Aspergillus niger* возможно при использовании лактозы в качестве источника углерода вместо глюкозы или сахарозы. Использование глюкозы или сахарозы в качестве субстрата при высоких значениях рН приводит к образованию преимущественно глюконовой кислоты. При использовании сыворотки из которой были удалены казеиновые белки и обогащении лактозой гриб образовал большое количество щавелевой кислоты. [4].

Глюконовая кислота широко используется в пищевой, кормовой, фармацевтической, цементной, текстильной и химической промышленности. Потребность в глюконовой кислоте составляет около 50000-60000 тонн в год и растет из года в год.

Много исследований было проведено по улучшению производства глюконовой кислоты из *A. niger* []. В отличие от других кислот эта кислота синтезируется преимущественно внеклеточно. На первом этапе глюкоза окисляется ферментом глюкозооксидазой до D-глюконо-1,5-лактона. Гидролиз лактона до глюконовой кислоты может происходить спонтанно в водном растворе, однако скорость этой реакции значительно возрастает под действием фермента глюконолактоназы. Считается, что оба фермента локализованы снаружи плазматической мембраны, однако недавно было показано, что у *A. niger* присутствует ген, кодирующий и внутриклеточную глюкозооксидазу [].

Образование яблочной кислоты, как и фумаровой, может происходить в митохондриях или в цитоплазме. В цикле трикарбоновых кислот фумаровая кислота под действием фермента фумаразы присоединяет воду и превращается в яблочную. Далее яблочная кислота под действием фермента малатдегидрогеназы окисляется в щавелевоуксусную с образованием НАДН. У грибов предполагается наличие трёх цитоплазматических и одной митохондриальной малатдегидрогиназ. Цитоплазматическая малатдегидрогиназа осуществляет образование яблочной кислоты из щавелевоуксусной, синтезированной в результате фиксации CO₂ цитоплазматической пируваткарбоксилазой. Далее образованный в цитоплазме малат может транспортироваться в митохондрии, окисляться до оксалоацетата и конденсироваться с ацетил-КоА с формированием лимонной кислоты. Продуцирование в среду яблочной кислоты отмечено для грибов *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* и *Rhizopus oryzae* [].

Производство яблочной кислоты из штамма *A. niger* генерируется в твердой среде, содержащей метанол и яблочную кислоту, в процессе адаптации в течение 22 недель. Выход яблочной кислоты был увеличен в 4,45 раза по сравнению с выходом у исходного штамма и из *Penicillium spp.* и *Rhizopus oryzae* [].

В 2019 году ученые Франции с использованием сложных эфиров выделили фенолокислоты из *A. niger*.

Фенолокислоты — производные ароматических углеводов, в молекулах которых атомы водорода бензольного ядра замещены на карбокисильные и гидрокисильные группы. Их иногда рассматривают как ароматические кислоты, в молекулах которых атом водорода бензольного ядра замещен на гидрокисильные группы.

Фенолокислоты обладают бактерицидным действием. Её соли и эфиры широко используют в медицине и ветеринарии как лекарственные препараты. Салициловую кислоту широко используют для производства лекарственных средств, протравных красителей, фунгицидов, пахучих веществ, антисептиков в пищевой промышленности, при консервировании, как реагент для колориметрического определения в растворах железа и меди, как кислотное – основной индикатор при люминесцентном анализе [].

Aspergillus niger также продуцирует итаконовую кислоту благодаря ее универсальному и толерантному характеру в различных средах роста и чрезвычайно высокой способности к накоплению предшественника итаконовой кислоты [].

Итаконовая кислота C₅H₆O₄ является ненасыщенной двухосновной кислотой []. Чтобы повысить уровень его производства необходимо модифицировать геном и оптимизировать среду для культивирования. Уровень производства итаконовой кислоты положительно связан с концентрацией меди в среде. *A. niger* является наиболее устойчивым к меди, особенно в условиях низкого рН, это позволяет использовать медь для увеличения производства итаконовой кислоты у этого вида. Кроме того, ионы меди могут увеличить производство лимонной кислоты [].

Лимонная кислота - кристаллическое вещество белого цвета, натуральный или синтетический антиоксидант. Лимонная кислота - важный продукт обмена веществ в живых организмах, участвует в цикле трикарбоновых кислот и глиоксилатном цикле. Объем мирового рынка лимонной кислоты в 2016 году составил 2,50 млрд. долларов. Ожидается, что высокий спрос на продукт для хранения продуктов питания станет ключевым фактором роста отрасли [].

Aspergillus niger превосходит другие микроорганизмы в промышленном синтезе лимонной кислоты благодаря лучшему выходу продукции. Он может ферментировать различное дешевое сырье и обеспечивает высокую продуктивность. Штаммы этого микроорганизма могут быть улучшены для создания промышленных штаммов для использования в коммерческом производстве с помощью мутагенеза. Различные мутагены, включая излучение, такие как ультрафиолет, рентгеновское и гамма-излучение, и химические вещества, такие как этилметансульфонат и диэтилсульфонат, были использованы для индукции мутаций у *A. niger* [].

В настоящее время основную массу лимонной кислоты производят с помощью определенных штаммов плесневого гриба *Aspergillus niger* [].

Природный биополимер хитин называют продуктом XXI века. Основным источником этого полимера – панцирные ракообразные, насекомые и грибы. Клеточная стенка гриба Aspergillus niger, являющегося продуцентом лимонной кислоты и отходом ее производства, содержит 20–25% хитина.

Aspergillus niger производит 13 500 тонн влажного мицелия в год в качестве побочного продукта при производстве лимонной кислоты, который может стать выгодным источником хитина и хитозана [].

Хитин $(C_8H_{13}NO_5)_n$ – природное соединение из группы азотсодержащих полисахаридов. Химическое название – поли-N-ацетил-D-глюкозо-2-амин, полимер из остатков N-ацетилглюкозамина, скрепленных между собой β -(1,4)-гликозидными связями. Бета-1,3/1,6-глюканы являются природными углеводами, находящимися в стенках клеток дрожжей, бактерий и грибов (в составе двух последних также присутствует основной компонент экзоскелета (кутикулы) членистоногих и ряда других беспозвоночных). Хитин используют также для создания апиrogenных хирургических нитей, контактных линз, искусственной кожи. В медучреждениях с помощью хитина и его производных заживляют ожоги, раны и язвы (время регенерации сокращается на 75%). Хитин и хитозан обладают высокой физиологической активностью. Хитин обладает высокой сорбирующей активностью и способен очищать сточные воды от различных анионов [].

Штаммы группа *Aspergillus niger* способны синтезировать витамины биотин, тиамин, рибофлавин и др.

Aspergillus niger – биохимически активный гриб, некоторые штаммы синтезируют витамины – биотин, В1, В2, антибактериальный препарат фумагиллин для лечения амёбной дизентерии, другие лекарственные средства [].

Aspergillus niger относится к числу наиболее распространенных грибов, ответственных за порчу продуктов и биологическое разрушение материалов, также оказывает существенное влияние на безопасность пищевых продуктов из-за производства микотоксинов.

Известно, что *Aspergillus niger* продуцируют микотоксины охратоксин А, фумонизины В₂, В₄ и В₆, а также многие другие соединения с плохо изученной активностью.

Охратоксин А часто присутствует в продуктах питания. Контаминация продовольственной продукции, например, злаков и продуктов на их основе, кофейных бобов, изюма, вина и виноградного сока, специй и лакрицы, – повсеместное явление во всем мире. Охратоксин А образуется во время хранения урожая [].

Фумонизины – токсины природного происхождения, вырабатываемые некоторыми видами плесневых грибов рода *Fusarium*. Известно множество типов фумонизинов, но наиболее часто в продуктах питания встречаются фумонизины В1, В2 и В3. Впервые фумонизины были обнаружены в 1988 году. Фумонизины могут причинять серьезный вред здоровью скота и других животных. Несмотря на то, что доказательные данные о пагубном влиянии фумонизинов на здоровье человека на данный момент не являются убедительными, есть подозрение, что подверженность воздействию фумонизинов может приводить к развитию ряда серьезных патологий, таких как рак и врожденные дефекты.

В 2017 году в Китайском Национальном центре оценки рисков безопасности пищевых продуктов выявили производство фумонизина В₂ у *Aspergillus niger*. Производство фумонизина из *Aspergillus niger*, который является широко распространенным видом и чрезвычайно важным промышленным организмом, будет иметь очень важные последствия для биотехнологии и особенно безопасности пищевых продуктов. *A. niger* производит фумонизин В2 на средах с большим количеством сахара [].

Ученые Университета Китасато в Японии выявили тенуазоновые кислоты из *Aspergillus niger*. Тенуазоновая кислота - это первые производные итаконовой кислоты, которые имеющие сложноэфирные карбоксильные фрагменты в конце алкильной боковой цепи. *Aspergillus niger* синтезирует 6 видов тенуазоновых кислот от А до F, среди которых кислота С обладает антибиотической активностью.

Тенуазоновая кислота С показали антимикробную активность в отношении *B. subtilis* (зона ингибирования: 10 мм при 50 мг/диск). *Bacillus subtilis* является одним из представителей вида аэробных спорообразующих почвенных бактерий. Все остальные тенуазоновые кислоты не показали зоны ингибирования против микроорганизмов. Таким образом выявлен новый антибиотик, продуцируемый *Aspergillus niger* [].

Aspergillus niger используются для извлечения тяжелых металлов из различных твердых отходов, таких как летучая зола мусоросжигательных установок для сжигания твердых бытовых отходов, отработанные катализаторы, электронные отходы и красный шлам. Активность *Aspergillus niger* была оценена для детоксикации и извлечения металлов Cu, Li, Mn, Al, Co и Ni из отработанных литий-ионных мобильных телефонных батарей в различных условиях. Результаты показали, что при использовании *A. niger* достигается более высокая эффективность удаления тяжелых металлов, чем при химическом выщелачивании [].

Aspergillus niger очень чувствительны к минеральным источникам питания, поэтому возможно использовать специально отобранные штаммы для определения дефицита некоторых элементов в почве (фосфора, калия, меди и др.) и витаминов, что оказалось значительно проще, точнее и быстрее, чем химические анализы.

С практической точки зрения продукция органических кислот грибами рассматривается как один из важнейших факторов в деструкции различных материалов, например книг, исторических памятников и др.

В настоящее время остро стоит проблема загрязнения окружающей среды отходами полимерной природы. В связи с массовым производством упаковочных материалов и их широким использованием во многих областях деятельности человека (промышленности: строительство, агросектор, автопроизводства; бытовой деятельности), происходит чрезмерное накопление синтетических полимерных материалов в окружающей среде, что вызывает необходимость в утилизации данных соединений.

Aspergillus niger в составе сообщества биодеструкторов деформирует аморфную часть полимерсодержащего материала и нарушает его кристалличность. Таким образом, происходит снижение плотности укладки длинной цепи метиленовых групп, которые составляют молекулу полиэтилена, что приводит к снижению прочности и увеличению упругости материала [].

Таким образом, на основании проведенного литературного обзора можно с определенностью сказать, что в настоящее время *Aspergillus niger* является одним из наиболее используемых продуцентов биологически активных веществ в биотехнологической промышленности и его потенциал, еще не раскрыт полностью. *Aspergillus niger* является одним из ключевых организмов, вовлеченных в следующую промышленную революцию: переход от ископаемой экономики к биоэкономике.

Список использованных источников

- . Cairns T.C., Nai C., Meyer V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research // Fungal Biol Biotechnol. – 2018. – Vol. 5. No.13. –P. 1 – 14.
- . Gong W., Cheng Zh., Zhang H., Liu L., Gao P., Wang W. Draft genome sequence of *Aspergillus niger* strain an76 // Genome announcements. - 2016. - Vol. 4. No. 1. - P. 1-2.
- . Кубасов К. К., Берстенёв С. В., Волков Д. В., Жамбакин К. Ж.. Лимонная кислота // Пищевая промышленность. - 2015 – С. 121-153.
- . [Jang J. Y.](#), [Choi Y. H.](#), [Shin T. S.](#), [Kim T. H.](#), [Shin K. S.](#), [Park H. W.](#), [Kim Y. H.](#), [Kim H.](#), [Choi G. J.](#), [Chang K. S.](#), [Cha B.](#), [Kim I. S.](#), [Man A. J.](#), [Kim J. C.](#), Biological Control of meloidogyne incognita by *Aspergillus niger* F22 producing oxalic acid // Plos one. - 2016. - Vol. 11. No. 6. –P. 1-15.
- . [Mu Q.](#), [Yue C. T.](#), [Hu M.](#), [Tian Y.](#) Thermostability improvement of the glucose oxidase from *Aspergillus niger* for efficient gluconic acid production via computational design // International journal of biological macromolecules - 2019. - Vol. 139. - P.1060-1068.
- . [Ramachandran S.](#), [Nair S.](#), [Larroche C.](#), [Pandey A.](#) Gluconic Acid. // Current developments in biotechnology and bioengineering. - 2017. - Vol. 9. - P. 577-599
- . Geyer M., [Onyancha F. M.](#), Nicol W., [Brink H. G.](#) Malic acid production by *Aspergillus oryzae*: : the role of CaCO₃ // [Chemical Engineering Transactions](#). - 2018. - Vol. 70. – P. 1801-1806.
- . [Iyyappana J.](#), [Bharathirajaa B.](#), [Baskarb G.](#), [Jayamuthunagaic J.](#), [Barathkumara S.](#), [Anna R.](#) Malic acid production by chemically induced *Aspergillus niger* MTCC 281 mutant from crude glycerol // [Bioresource technology](#). - 2018. - Vol. 251. - P. 264-267.
- . Oscar L. D., Elise O., Alexandra B., Bruno B., Pierre V., Jean-Claude S., Eric R., Craig B. F., Laurence L., Anne L. Release of phenolic acids from sunflower and rapeseed meals using different carboxylic esters hydrolases from *Aspergillus niger* // [Industrial crops and products](#). - 2019. – Vol. 139. – P. 111-579.
- . Hossain A. H., Li A., Brickwedde A., Wilms L., Caspers M., Overkamp K., Punt P. J. Rewiring a secondary metabolite pathway towards itaconic acid production in *Aspergillus niger* // [Microbial Cell Factories](#). - 2016. – Vol. 15. No. 130. - P. 2-15.
- . [Xu Y.](#), [Zheng Z.](#), [Xu Q.](#), [Yong Q.](#), [Ouyang J.](#) Efficient conversion of inulin to inulooligosaccharides through endoinulinase from *Aspergillus niger* // [journal of agricultural and food chemistry](#). - 2016. – Vol. 64. No. 12. –P.782-790.
- . Straat L. Itaconic acid production in *Aspergillus niger*: PhD thesis. - 2018. – P. 144.
- . [Steiger M. G.](#), [Rassingerab A.](#), [Diethard M.](#), [Michael S.](#) Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger* // [Metabolic engineering](#). – 2018. – Vol. 52. - P. 224-231.
- . [Eugenia P.](#), [Fani. Th. M.](#) Citric acid production from the integration of spanish-style green olive processing wastewaters with white grape pomace by *Aspergillus niger* // [Bioresource technology](#). – 2019. –Vol. 280. - P. 59-69.
- . [Adeoyeab A.O.](#), [Latee A.](#), [Gueguim-Kanac E.B.](#) Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate // [biocatalysis and agricultural biotechnology](#). - 2015. – Vol. 4. - P. 568-574.
- . Dewi R., Nur R. M. Antifungal activity of chitosan on *Aspergillus spp* // international journal of bioengineering and biotechnology. – 2018. – Vol. 2. No. 4. –P. 24-30.
- . Клишанец Е., Лугин В., Литвяк В., Троцкая Т. Хитин-глюкоановый комплекс: получение и свойства // Наука и инновации. – 2016. – Vol. 163. No. 9. – P. 62-68.
- . Кубасов К. К., Берстенёв С. В., Волков Д. В., Жамбакин К. Ж. Лимонная Кислота // Пищевая промышленность. - 2015 – С. 121-153

- . Nielsen K. F., Mogensen J. M., Johansen M., Larsen T. O., Frisvad J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group // *Anal bioanal chem.* -2009. – Vol. 395. – P. 1225–1242.
- . Han X., Jiang H., Xu J., Zhang J., Li F. Dynamic Fumonisin B₂ Production by *Aspergillus niger* // *Toxins.* – 2017. – Vol. 9. – P. 2-11.
- . [Hasegawa Y.](#), [Fukuda T.](#), [Hagimori K.](#), [Tomoda H.](#), [Omura S.](#) Tensyuc Acids, New Antibiotics Produced by *Aspergillus niger* FKI-2342 // [Chemical and pharmaceutical bulletin.](#) -2007. – Vol. 55. - P. 1338-1341.
- . Horeh N. B., Mousavi S. M., Shojaosadati S. A. Bioremediation of valuable metals from spent lithium-ion mobile phone batteries using *Aspergillus niger* // *Journal of power sources.* - 2016. – Vol. 320. -P. 257-266.
- . [Кожухметова Г. А.](#), [Леонтьева А. О.](#), [Сопрунова О. Б.](#) Штамм *aspergillus niger* вкпм f-1331 - биодеструктор полиэтилена // *Едрид.* – 2018. – Vol. 16. No. 218. – P. 1-6.