

Zdzisław ILCZUK, Jan FIEDUREK

**Selekcja i mutagenizacja grzybów niższych
w kierunku zwiększonej aktywności amylolitycznej ***

Селекция и мутагенизация низших грибов в направлении увеличения
амилолитической активности

Selection and Mutagenization of Lower Fungi Towards an Increased Amylolytic
Activity

Grzyby niższe, a zwłaszcza przedstawiciele rodzaju *Aspergillus*, znane są z wysokich uzdolnień do syntezy amylaz, dzięki którym od dawna znajdują wielorakie zastosowania praktyczne. Przykładem jednego z najstarszych jest użytkowanie ich na Dalekim Wschodzie zamiast słodu przy wyrobie wódki z ryżu oraz przy sporządzaniu specjalnych sosów sojowych. Obecnie amylazy grzybowe stały się ważnym czynnikiem służącym do otrzymywania ze skrobi zbożowej (zwłaszcza kukurydzianej) glukozy lub syropów glukozowych jako środka słodzącego, który skutecznie konkuruje dziś na rynkach światowych z sacharozą. Amylazy pleśniowe odgrywają też coraz większą rolę w przemyśle przetwórstwa owocowo-warzywnego, koncentratów spożywczych, piekarskim, gorzelnicznym, browarniczym, a także tekstylnym i papierniczym.

Podczas doboru aktywnych amylolitycznie kultur pleśni szerokie zastosowanie znajduje dziś mutagenizacja połączona z selekcją szczepów o zwiększonej zdolności do syntezy amylaz (4, 11, 12, 14). Pewną niedogodność tej metody stanowi konieczność przebadania znacznych ilości zmutowanych kultur, z których zwykle niewielka tylko część wykazuje korzystne zmiany. Tą uciążliwość techniki mutagenizacyjnej można jednak w znacznej mierze przewyciężyć poprzez wprowadzenie hodowli

* Praca wykonana w ramach problemu MR.II.17.

próbekowych i wstępną ocenę szczepów na podstawie przybliżonego, ale szybkiego, określenia ich aktywności enzymatycznej (9, 10). Sposób ten z powodzeniem zastosowano w niniejszej pracy, zarówno w odniesieniu do selekcji kultur wyjściowych, jak i uzyskanych przy ich udziale mutantów.

BADANIA WŁASNE

Doboru aktywnego amylolitycznie szczepu pleśni dokonano w drodze selekcji spośród 102 kultur, należących do 16 gatunków, z których część pochodziła z kolekcji własnej, pozostałe — ze zbiorów obcych (tab. 1). Wstępnej oceny aktywności amylolitycznej dokonywano na podstawie wyników syntezy amylaz przez grzyby hodowane w próbkach na wytrząsarce (200 obr./min.). Do tego celu stosowano dwa rodzaje podłoży: 1) 10% wyciąg otrąb pszennych, sporządzany przez wylugowanie 100 g otrąb w objętości 1000 ml wody destylowanej w ciągu 30 min. przy nadciśnieniu 0,75 atm.; po oddzieleniu drogą filtracji części stałych, wyciąg rozcieńczano wodą destylowaną w stosunku 1:1 i uzupełniano dodatkiem soli: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,7%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1%), K_2HPO_4 (0,1%) i CaCl_2 (0,1%); 2) pożywkę syntetyczną złożoną z roztworu soli (jak w pożywce nr 1) z dodatkiem 5% skrobi „Analar” firmy BDH (Anglia). Po ustaleniu w obu podłożach odczynu wyjściowego na poziomie pH 6,0, rozlewano je w ilościach po 12 ml do probówek o średnicy 25 cm. Aktywność amylolityczną oznaczano w płynach pochodzących po 4 dniach inkubacji szczepów metodą dyfuzji płytkowej. W tym celu do „studzienek” wyciętych w warstwie agaru na płytkach Petriego, zawierającego 1% skrobi w buforze McIlvaina, wprowadzano 0,05 ml płynu pochodzącego. Po upływie 18 godz. inkubacji w temp. 35°C i wywołaniu ich roztworem jodu dokonywano pomiaru średnicy stref rozkładu skrobi zgodnie z metodą podaną przez Dingle'a i in. (3). Na tej podstawie dokonywano też oceny ogólnej aktywności amylolitycznej wg Hampel i Szajer (8) w oparciu o wzór:

$$A = \pi \cdot h (\tau_x^2 - \tau_0^2) \cdot c$$

w którym: A oznacza ogólną aktywność amylolityczną jako mg rozłożonej skrobi; h — grubość warstwy agaru; τ_0 — promień podstawy studzienki; τ_x — promień strefy dyfuzji enzymu do agaru; c — zawartość skrobi w 1 mm³ podłoża w mg.

Indukcji mutantów najaktywniejszego amylolitycznie szczepu *A. niger* C dokonywano w trojaki sposób, działając na jego konidia: 1) promieniami UV i roztworem nitrozometylomocznika (NMM); 2) promieniami UV i etylenoiminą (EI); 3) akrylawiną. W pierwszym i drugim przypadku zawiesiny konidiów pleśni (o gęstości 2—3×10⁶/ml) po wyklóceniu z roztworem Tween 80 poddawano najpierw działaniu promieni UV w dawce 4,8×10³ erg/mm², a następnie traktowano bądź EI w rozcieńczeniu 1:400 w ciągu 4 godz., bądź też 1% roztworem NMM przez 2 godz. Po przerwaniu działania mutagenów chemicznych, określano stopień przeżywalności konidiów. W przypadku mutantów uzyskiwanych pod wpływem promieni UV i NMM część zawiesiny konidiów (w ilości 5 ml) po zadziałaniu obu mutagenami używano do zaszczepienia płynnej pożywki Czapeka (15 ml w kolbkach Erlenmeyera o pojemności 100 ml), którą następnie inkubowano na wytrząsarce (200 obr./min.) w ciągu 48 godz. Wykiełkowane po tym czasie konidia oddzielano od nie wykazujących oznak rozwoju na sączku G-2. Przesącz, po 10-krotnym rozcieńczeniu, wy-

siewano na płytki Petriego z agarem brzeczkowym. Z kolonii, wyrastających w ilości około 0,01% w stosunku do liczby konidiów w zawiesinie wyjściowej, izolowano poszczególne szczepy. W przypadku mutantów akryflawinowych zastosowano technikę indukcji opartą na metodzie podanej przez Zacharowa i in. (16). Mianowicie zawiesiny konidiów o gęstości $1,2 \times 10^7$, po rozcieńczeniu w stosunku 1:10 000, wysiewano na brzeczkę agarową, zawierającą akryflawinę w stężeniach 10 lub 100 $\mu\text{g/ml}$ i inkubowano do pojawienia się kolonii (48—72 godz.). Wyrosłe kolonie poddawane były ocenie pod względem aktywności amylolitycznej.

Mutanty o najwyższej aktywności amylolitycznej, wyselekcjonowane na podstawie hodowli probówkowych, poddano dokładniejszej ocenie w hodowlach wytrząsanych, które przeprowadzono w kolbach płaskodennych o pojemności 500 ml, zawierających po 100 ml pożywki nr 1. Po 5 dniach inkubacji w temp. 30°C na wytrząsarce poruszającej się z szybkością 220 obr./min. w płynie pohodowlanym oznaczano: całkowitą aktywność amylolityczną oraz aktywność glukoamylazy.

W celu określenia całkowitej aktywności amylolitycznej, roztwór pohodowlany rozcieńczano w taki sposób, aby zawarta w nim ilość białka mieściła się w przedziale 100—300 $\mu\text{g/ml}$. Pół mililitra takiego roztworu inkubowano przez 10 min. w temp. 25°C z 3 ml substratu, który stanowił 1% roztwór skrobi rozpuszczalnej, uzyskany przez zagotowanie jej w buforze octanowym (0,15 M) o pH 4,5 i zawierający 1% NaCl oraz 1 μM CaCl_2 . Po zakończeniu inkubacji w roztworze oznaczano zawartość cukrów redukcyjnych metodą Samogyi-Nelsona (15). Za jednostkę aktywności enzymatycznej przyjęto taką ilość enzymu, która uwalnia 1 mg ekwiwalentu redukującego (przeliczonego na glukozę), powstającego pod wpływem działania 1 ml płynu hodowlanego w warunkach reakcji.

Aktywność glukoamylazy oznaczano metodą Bergmeyera i Bernta (2), inkubując substrat skrobiowy z enzymem rozcieńczonym analogicznie jak przy oznaczaniu całkowitej aktywności amylazowej oraz w takich samych warunkach reakcji. Jako jednostkę aktywności enzymatycznej glukoamylazy przyjęto taką ilość enzymu, która jest niezbędna do uwolnienia 1 mg glukozy przez 1 ml płynu pohodowlanego w warunkach reakcji.

WYNIKI I DYSKUSJA

Spośród 102 szczepów pleśni, należących do 16 różnych gatunków, tylko u przedstawicieli 7 gatunków można było stwierdzić istnienie aktywności amylolitycznej (tab. 1). Najlepsze wyniki pod względem syntezy amylaz osiągnął szczep *A. niger* C.

Jak wynika z danych tab. 2, wszystkie z 15 najaktywniej syntetyzujących amylazy szczepów pleśni wytwarzają je o wiele efektywniej na wyciągu z otrąb pszennych, uzupełnionych dodatkiem soli mineralnych, niż na pożywce syntetycznej z dodatkiem skrobi. W tym ostatnim przypadku niższym aktywnościom amylolitycznym towarzyszy bardzo silne zakwaszenie podłoża, w granicach pH 2,2—1,7. Fakt ten przypuszczalnie stanowi główną przyczynę słabszej na podłożu syntetycznym syntezy enzymów hydrolizujących skrobię, ponieważ na ogół α -amylazę charakteryzuje znaczna wrażliwość na oddziaływanie środowiska kwaśnego (1, 5,

6, 7, 13, 14). Wyciąg z otrąb pszennych okazał się pod tym względem o wiele bardziej odpowiedni, gdyż jego kwasowość nie ulegała w trakcie hodowli aż tak daleko idącym zmianom, osiągając wartości końcowe pH w granicach 3,4—5,9.

Do badań nad indukcją i selekcją aktywnych amylolitycznie mutantów wybrano szczep *A. niger* C, który osiągnął najlepsze wyniki pod względem syntezy amylaz. Jego konidia traktowano akryflawiną oraz promieniami UV łącznie z EI i promieniami UV z NMM. W pierwszym przypadku poziom przeżywalności konidiów był najwyższy i wyniósł 20,8% przy stężeniu akryflawiny w podłożu wynoszącym 100 µg/ml oraz 39,2% przy stężeniu 10 µg/ml. Znacznie mniejszy odsetek przeżycia wystąpił u konidiów potraktowanych promieniami UV+EI i UV+NMM. W tych przypadkach wahał się on w przedziale 0,63—1,75%.

Spośród kolonii wyrosłych po zadziałaniu mutagenami sprawdzono wstępnie (tzn. metodą hodowli probówkowych) pod względem aktywności amylolitycznej po 100 klonów z każdej z trzech serii mutagenizacji.

Tab. 1. Wyniki oceny aktywności amylolitycznej szczepów pleśni należących do różnych gatunków metodą mikrohodowli probówkowych i testu płytkowego
The results of amylolytical activity of moulds strains estimated by the method of microcultivation in tubes and plate assay

Lp. No.	Gatunek grzyba Species of fungus	Liczba przebadanych szczepów Number of examined strains	Szczep naj- aktywniejszy w obrębie gatunku Strain most active with- in a species	Pochodzenie szczepu naj- aktywniej- szego ^a Origin of most active strain ^a	Aktywność amylolityczna jakoś Amylolytic activity as:	
					wielkość śred- nicy dyfuzji enzymów w mm diameter of enzymes diffu- sion zone in mm	skrobia rozłożona przez 1 ml płynu pohodzonego w mg starch hydrolyzed by 1 ml of postcul- ture liquid in mg
1.	<i>Alternaria radicina</i>	2	-	CCM	0	0
2.	<i>A. solani</i>	1	-	CCM	0	0
3.	<i>Aspergillus awamori</i>	2	337-5	KPMT	18	122,5
4.	<i>A. flavipes</i>	1	-	IPF	0	0
5.	<i>A. fumigatus</i>	3	614	IPP	10	16,9
6.	<i>A. nidulans</i>	2	1y	KPMT	17	105,9
7.	<i>A. niger</i>	77	C	KPMT	20	158,2
8.	<i>A. oryzae</i>	2	353-3	KPMT	15	75,8
9.	<i>A. terreus</i>	2	-	CCM	0	0
10.	<i>A. ventii</i>	2	-	IPF	15	75,8
11.	<i>Botrytis cinerea</i>	1	-	IPF	0	0
12.	<i>Eurothecium verrucaria</i>	1	-	CCM	0	0
13.	<i>Neurospora sitophila</i>	2	-	KPMT	0	0
14.	<i>Penicillium notatum</i>	2	I	IPF	18	122,5
15.	<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	1	-	SFP	0	0
16.	<i>Trichothecium roseum</i>	1	-	CCM	0	0

* KPMT — Kolekcja Pracowni Mikrobiologii Technicznej UMCS; IPF — Instytut Przemysłu Fermentacyjnego, Warszawa; CCM — Czechoslovak Collection of Microorganisms, Brno; SFP — Swedish Forest Products Research Laboratory, Stockholm.

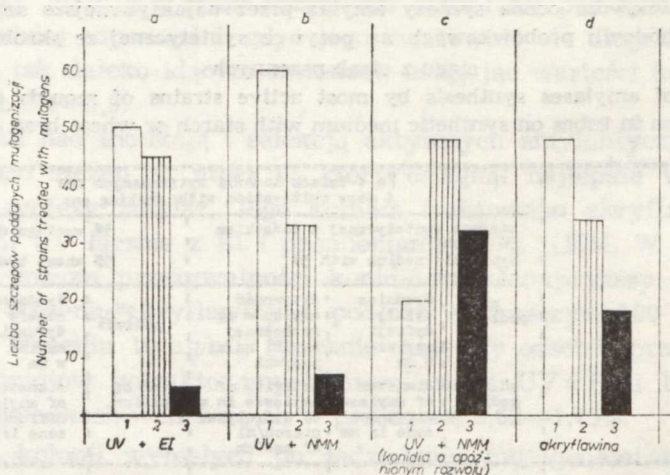
Tab. 2. Porównawcza ocena syntezy amylaz przez najaktywniejsze szczepy pleśni podczas ich hodowli probówkowych na pożywce syntetycznej ze skrobią i na wyciągu z otrąb pszennych

Comparison of amylases synthesis by most active strains of moulds during their incubation in tubes on synthetic medium with starch or wheat bran extract

L.p. No.	Szczep Strain	Po 4 dniach hodowli wytrząsanych na: 4 days cultivation with shaking on:					
		pożywce syntetycznej z dodatkiem 5% skrobi synthetic medium with 5% of starch			5% wyciągu otrąb pszennych 5% wheat bran extract		
		pH podłoża	średnica strefy dyfuzji amylazy w mm	aktywność amylazy w mg rozłożonej skrobi na ml pożywki	pH podłoża	średnica strefy dyfuzji amylazy w mm	aktywność amylazy w mg rozłożonej skrobi na ml pożywki
		pH of medium	diameter of amylase diffusion zone in mm	activity of amylases in mg of hydrolysed starch/ml of medium	pH of medium	diameter of amylase diffusion zone in mm	activity of amylases in mg hydrolysed starch/ml of medium
1.	<i>Aspergillus niger</i> 10	1,7	11	26,8	5,1	19	139,8
2.	<i>A. niger</i> 33/	1,9	13	49,4	5,9	19	139,8
3.	<i>A. niger</i> C	1,8	15	75,8	4,2	20	150,2
4.	<i>A. niger</i> I ₁₃	1,9	14	62,2	4,4	19	139,8
5.	<i>A. niger</i> K ₉	1,7	13	49,4	5,4	19	139,8
6.	<i>A. niger</i> 4b	1,8	14	62,2	4,2	19	139,8
7.	<i>A. niger</i> C-17	1,7	16	90,4	4,0	19	139,8
8.	<i>A. niger</i> L ₁	2,0	18	122,5	5,1	19	139,8
9.	<i>A. niger</i> L ₂	2,0	16	90,4	5,0	19	139,8
10.	<i>A. niger</i> L	2,0	15	75,8	4,1	19	139,8
11.	<i>A. niger</i> I	1,9	14	62,2	5,4	19	139,8
12.	<i>A. awamori</i> 337-5	1,8	13	49,4	5,0	18	122,5
13.	<i>A. awamori</i> 339-5	1,8	12	37,7	4,5	17	105,9
14.	<i>A. nidulans</i> Iy	2,2	15	75,8	3,9	17	105,9
15.	<i>Penicillium notatum</i> I	2,0	13	49,4	3,4	18	122,5

W przypadku indukcji mutantów przy użyciu UV+NMM dodatkowo przebadano dalszych 100 kultur, które wyhodowane zostały z konidiów nie wykiełkowanych po pierwszych dwu dobach hodowli na pożywce minimalnej. Łącznie więc przebadano 400 kultur poddanych zabiegom mutagenizacyjnym.

Na ryc. 1 zestawiono graficznie wyniki wstępnej oceny aktywności amylolitycznej przebadanych kultur. Stwierdzono, że działanie UV+EI (ryc. 1a), oraz UV+NMM (ryc. 1b) powoduje zbliżone efekty mutagenizacyjne, które charakteryzują się przewagą (50—60%) powstawania szczepów mniej aktywnych niż rodzicielski i znaczną ilością form nie zmniejszonych (35—45%) oraz stosunkowo niewielką liczbą mutantów o aktywności amylolitycznej większej niż u szczepu rodzicielskiego (5—7%). W dość istotny sposób różnią się jednak od tych wyniki uzyskane przy udziale szczepów wyrosłych z konidiów o opóźnionym rozwoju, to jest nie kiełkujących w czasie dwudobowej hodowli na pożywce minimalnej. Wówczas bardzo wydatnie wzrosła liczba mutantów aktywnych amyloli-



Ryc. 1. Podział zmutagenizowanych szczepów *A. niger* w uzależnieniu od średnicy stref dyfuzji enzymów amylolitycznych do podłoża agarowego; 1 — 17—19 mm, 2 — 20 mm (wielkość strefy szczepu wyjściowego), 3 — 21—22 mm

Distribution of *A. niger* mutagenized strains according to the size of zone of amylolytic enzymes diffusion to agar medium; 1 — 17—19 mm, 2 — 20 mm (size of zone characteristic of parental strain), 3 — 21—22 mm

tycznie (do ponad 30%) przy równoczesnym spadku (zaledwie do 20%) mutantów „minusowych” (ryc. 1c). Potwierdza to nasze wcześniejsze obserwacje, poczynione w związku z doskonaleniem metod otrzymywania mutantów *A. niger* aktywnych pektynolitycznie (10), kiedy to wśród konidiów nie wykazujących po 2 dniach hodowli na pożywce minimalnej objawów rozwoju, wystąpił podobny efekt wzrostu liczby szczepów o zwiększonej syntezie pektynaz. Można sądzić, że kultury powstałe z konidiów o opóźnionym czasie kiełkowania (niezależnie od tego, iż część z nich stanowią zapewne mutanty auksotroficzne) należą prawdopodobnie do form o dogłębnie naruszonym aparacie genetyczno-biochemicznym.

Dobre efekty mutagenizacji uzyskano również przy użyciu akryflawiny (ryc. 1d). Odsetek mutantów o większej niż u szczepu rodzicielskiego aktywności amylolitycznej wyniósł w tym przypadku 18%. Być może, iż jest to następstwem odmiennego nieco sposobu działania tego mutagenu. W odróżnieniu bowiem od poprzednio wymienionych, których wpływ na konidia szczepu *A. niger* C miał charakter czasowego tylko oddziaływania, poprzedzającego ich późniejszy wysiew, w przypadku akryflawiny wywierany jest jej permanentny wpływ na rozwijającą się w ciągu co najmniej 48 godz. grzybnię pleśni.

Na podstawie wstępnej oceny aktywności amylolitycznej spośród 400 przebadanych szczepów, wyrosłych po zadziałaniu poszczególnymi mu-

tagenami, wyselekcjonowano ostatecznie 10 kultur, tzn. wszystkie te, które osiągnęły maksymalną wielkość średnicy strefy dyfuzji enzymu, wynoszącą 22 mm. Ich zdolności do syntezy amylaz określono dokładniej w drodze 5-dobowych hodowli wytrząsanych w kolbach półlitrowych. W płynach pohodowlanych tych kultur oznaczono całkowitą aktywność amyrolityczną na podstawie powstającej pod działaniem wytworzonych enzymów sumy cukrów redukujących oraz aktywność glukoamylazy na podstawie ilości powstałej w mieszaninie reagującej glukozy.

Tab. 3. Synteza amylaz przez 10 najaktywniejszych mutantów *Aspergillus niger*, hodowanych na wytrząsarce w kolbach z wyciągiem otrąb pszennych
The synthesis of amylases by 10 most active *Aspergillus niger* mutants cultivated on wheat bran extract

L.p. No.	Mutanty A. niger	Rodzaj użytego mutagenu	Całkowita aktywność amyrolityczna Total amyolytic activity in:		Aktywność glukoamylazy Activity of glucoamylase	
			w mg cukrów redukujących na ml płynu po- hodowlanego/10 minut mg of reducing sugars/ml post- -culture liqui- d/10 min.	do szczepu rodzicielskiego #0 per cent of parental strain activity	w mg uwolnionej glukozy na ml/10 min. mg of released glucose/ml postcultural liquid/10 min.	do szczepu rodzicielskiego #0 per cent of parental strain activity
1.	0	-	35,5	100,0	48,8	100,0
2.	1	akryflawina	117,5	123,1	90,6	185,6
3.	3	akryflawina	117,4	112,4	69,7	142,8
4.	11	akryflawina	117,5	123,1	90,5	185,4
5.	13	akryflawina	117,5	123,0	83,7	171,5
6.	45	akryflawina	119,1	120,5	76,7	157,2
7.	57	UV + B1	119,6	125,3	74,2	152,0
8.	98	UV + B1	102,9	107,7	72,8	149,2
9.	47 ^a	UV + NIK	117,5	123,0	73,1	149,8
10.	78 ^a	UV + NIK	105,3	110,5	73,2	150,0
11.	51	UV + NIK	88,2	92,3	48,9	100,2

- * Szczepy uzyskane z konidiów o opóźnionym rozwoju.
- * Strains obtained from spores with delayed growth.

Sądząc z uzyskanych wyników (tab. 3), zastosowana przez nas metoda wstępnej selekcji mutantów aktywnych amyrolitycznie w oparciu o mikrohodowle próbowkowe może być w pełni uznana za wiarygodną. Wśród 10 przebadanych szczepów tylko jeden (*A. niger* 51) nie potwierdził wzrostu swojej aktywności w stosunku do szczepu wyjściowego. W pozostałych przypadkach całkowita aktywność amyrolityczna była wyższa w porównaniu z kontrolą w granicach od ponad 7 do powyżej 25%. Jeszcze większe przyrosty wystąpiły w odniesieniu do glukoamylazy, której aktywność wzrosła u mutantów od niemal 50 do ponad 85%. Glukoamylaza okazała się więc u szczepów *A. niger* enzymem nie tylko przeważającym w kompleksie amylaz, ale także bardziej podatnym na indukcję.

Jest również godne odnotowania, iż spośród użytych przez nas mutagenów zdecydowanie najlepszym okazała się akrylawina, zarówno w sensie ilościowym (5 mutantów aktywnych wśród 10 wyselekcjonowanych), jak i pod względem stopnia wzrostu aktywności enzymatycznej (tab. 3).

Uzyskane wyniki aktywacji amylolitycznej są porównywalne z efektami, jakie osiągnęli Nevalainen i Palva (14) w odniesieniu do szczepu *A. awamori* NRRL 3112. W pierwszym etapie mutagenizacji, działając na konidia tego szczepu nitrozometyloguanidyną lub siarczanem etylu, autorzy ci wyodrębnili z 500 kolonii 2 mutanty, których aktywności α -amylazy w warunkach hodowli wytrząsanych wzrosły o 22—24%, zaś glukoamylazy — o 18—33%.

PISMIENNICTWO

1. Andrzejczuk-Hybel J. i współprac.: Glucoamylase Synthesis by *Aspergillus awamori* NRRL 3112 in the Microtechnical Scale. *Acta Aliment. Polon.* **4**, 381—389 (1978).
2. Bergmeyer H. U., Bernt E.: D-glucose Determination with Glucose Oxidase and Peroxidase, [w:] *Methods of Enzymatic Analysis*, Acad. Press Inc., New York—San Francisco—London 1974.
3. Dingle J., Reid W. W., Solomons G. L.: The Enzymic Degradation of Pectin and Other Polysaccharides. II. Application of the "Cup-plate" Assay to the Estimation of Enzymes. *J. Sci. Food Agric.* **4**, 149—155 (1953).
4. Eswaran S., Nga B. N.: Methods of Screening of Amylase-producing Mutants in *Aspergillus niger*. *J. Appl. Bacteriol.* **45**, 287—289 (1978).
5. Fieniksowa R. W., Jermoszyna G. K.: Kisloustojcziwost' α -amylazy raznogo proischozhdienija. *Prikl. Bioch. Mikrobiol.* **5**, 137—140 (1969).
6. Fieniksowa R. W., Jermoszyna G. K.: Charakteristika amiloliticzskogo kompleksa i kislotnaja inaktivacija α -amylazy plesniewych gribow. *Prikl. Biochim. Mikrobiol.* **6**, 58—61 (1970).
7. Grigorow W. S., Zieriebcow A. N., Pankratow A. I.: Kislotnaja inaktivacija amilaz w kulturnoj zydкости i mycelii *Aspergillus awamori*. *Fierm. Spirt. Prom-st* nr 2, 22—24 (1976).
8. Hampel B., Szajer Cz.: Estimation of the Cellulolytic Activity of Soil Fungi with the Agar-plate Technique. *Polish Journ. Soil Sci.* **1**, 137—146 (1968).
9. Ilczuk Z., Fiedurek J.: Metoda szybkiej oceny aktywności pektynolitycznej mutantów *Aspergillus niger*. *Przem. Ferm. Rolny* **21**, 20—22 (1977).
10. Ilczuk Z., Fiedurek J.: Gewinnung pektinolytisch aktiver Mutanten von *Aspergillus niger*. *Zeitschrift für Allg. Mikrobiol.* **20**, 523—526 (1980).
11. Kwesitadze G. I., i współprac.: Sztamm *Aspergillus niger* 147-A — producent kisloustojcziwój α -amylazy i gljukoamylazy. Pat. ZSRR nr 659.617 wyd. 30 IV 1979.
12. Kwesitadze G. I. i współprac.: Sielekcija mikroskopiczeskich gribow obrazujuszczich kislotostabilnuju α -amylazu i gliukoamylazu. *Mikrobiologija* **50**, 807—812 (1981).

13. Lasater G. D., Smith M. B.: High Potency Glucoamylase and α -amylase Enzyme System by Cultivation of *Aspergillus niger*. Pat. angielski nr 2 016 476 A, wyd. 28 XI 1978.
14. Nevalainen M. H., Palva E. T.: Improvement of Amyloglucosidase Production of *Aspergillus awamori* by Mutagenic Treatments. J. Chem. Tech. Biotechnol. **29**, 390—395 (1979).
15. Samogyi M.: Notes on Sugar Determination. J. Biol. Chem. **195**, 10—23 (1952).
16. Zacharow I. A. i współprac.: Mutacyjonnyj process u gribow. Izd. Nauka, Leningrad 1980.

РЕЗЮМЕ

На основе предварительной оценки 102 культур низших грибов, проведенной методом пробирочной культуры и пластинчатого теста, был выделен штамм *Aspergillus niger* C, наиболее активный в синтезе амилаз. Его конидии были подвергнуты мутагенизации при помощи лучей УФ с этиленимином или нитрозометиломочевинной или же путем воздействия акрифлавина. Предварительно проверили при помощи пробирочно-пластинчатого метода изменение амилолитической активности 400 культур, полученных после мутагенизации штаммов. Выбранные наиболее активные штаммы (в количестве 10) тщательно исследовали во встряхиваемых культурах; при этом установили увеличение у них полной амилолитической активности на 7,7—25,5% и глюкоамилазы на 49,8—85,6%. Самым эффективным мутагеном оказался акрифлавин.

SUMMARY

On the basis of an initial estimation of 102 cultures of lower fungi made by means of tube cultures method and plate assay, *Aspergillus niger* C strain has been selected as the most active in the synthesis of amylases. Its conidia were mutagenized by means of UV rays, together with ethyleneimine or nitrozomethylurea, or by treating with acriflavine. Among the strains grown after mutagenization, 400 cultures were initially checked by means of test-tube-plate method, as regards changes in amylolytic activity. 10 most active mutants selected in this way were examined more thoroughly in shaken cultures. It was found that total amylolytic activity of the mutants increased by 7.7 to 25.5%, whereas glucoamylase — by 49.8 to 85.6%. Acriflavine appeared to be the most active mutagen.

