

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ НА СОХРАНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS NIGER* – ПРОДУЦЕНТА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

© Т.В. Выборнова*, А.А. Корнев**

*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок, Российская Федерация, 191014, г. Санкт-Петербург, пр. Литейный, д. 55.

**Санкт Петербургский национальный исследовательский академический университет РАН, Российская Федерация, 194021, г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д.8, корп. 3, лит. А.

*Изучено влияние электрического воздействия на сохранение жизнеспособности мицелиальных грибов на примере микромицета *Aspergillus niger*. Объектом исследования являлся селекционированный в ФГБНУ ВНИИПД штамм *A.niger* ВКПМ F-171 – промышленный продуцент лимонной кислоты. Электропорацию культуральной жидкости гриба проводили через 72 ч после засева питательной среды с использованием электропораторов с генераторами экспоненциальной и квадратичной волн. Выбраны условия электропорации культуральной жидкости с использованием генератора квадратичной волны и установлены параметры электропорации, не приводящие к потере жизнеспособности гриба-продуцента. При выбранных параметрах электропорации массовая концентрация органических кислот в культуральной жидкости повышается на 12,1%. Полученные данные в дальнейшем могут быть использованы для трансформации макромолекул в клетку *A.niger* методом электропорации.*

*Ключевые слова: продуцент лимонной кислоты, *Aspergillus niger*, культуральная жидкость, электрическое воздействие, электропорация, жизнеспособность.*

Формат цитирования: Выборнова Т.В., Корнев А.А. Исследование влияния электропорации на сохранение жизнеспособности микромицета *Aspergillus niger* – продуцента лимонной кислоты // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7, N 3. 54–59. DOI: 10/21285/2227-2925-2017-7-3-54-59

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ELECTROPORATION ON THE PRESERVATION OF VITALITY OF *ASPERGILLUS NIGER* MICROMYCETE – A PRODUCER OF CITRIC ACID

© T.V. Vybornova*, A. A. Kornev**

* All-Russian Scientific-Research Institute of Food Additives, 55, Liteyni Ave., St. Petersburg, 191014, Russian Federation

**St. Petersburg National Research Academic University of Russian Academy of Sciences, 8/3, A, Khlopin St., St. Petersburg, 194021, Russian Federation

*The influence of electrical impact on the preservation of the vitality of mycelial fungi on the example of *Aspergillus niger* micromycete was studied. The object of the study was the *A. niger* VKPM F-171 strain, an industrial citric acid producer, which was select-ed at the FGBNU VNIIPD. Electroporation of the fungus culture liquid was carried out during 72 hours after seeding of the nutrient medium using electroporators with generators of exponential and quadratic waves. Using a quadratic wave generator, the electro-poration conditions of the culture liquid were selected and elec-troporation parameters established; this did not lead to any loss of vitality of the producer fungus. Using the chosen electro-poration parameters, the mass concentration of organic acids in the culture liquid is increased by 12.1%. The data obtained can be used for future transformation of macromolecules into the *A. niger* cell by means of electroporation.*

*Keywords: citric acid producer, *Aspergillus niger*, culture liquid, electric impact, electroporation, viability*

For citation: Vybornova T.V., Kornev A. A. Research into the electroporation influence on the viability preservation of the micromycete *Aspergillus niger*, citric acid producer. *Izvestia Vuzov. Prikladnaya Khimija i Biotekhnologiya* [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. 2017, vol. 7, no. 3, pp. 54–59 (in Russian). DOI: 10/21285/2227-2925-2017-7-3-54-59

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в молекулярной биологии для многих методов исследования необходимо, чтобы чужеродные гены, белки или другие молекулы были введены в клетку через мембрану. Разрабатывается много методов трансформации ДНК и других молекул в клетки. Одним из таких методов является электропорация – наиболее простая, высокоэффективная и воспроизводимая технология введения молекул (нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, красители) и вирусных частиц в широкий круг прокариотических и эукариотических клеток. В этом методе электрическое поле высокой интенсивности временно нарушает липидный бислой мембраны, что позволяет обеспечить поступление молекул в клетку из окружающей среды. Физической основой техники электропорации является обратимое повышение проницаемости клеточных мембран, достигаемое посредством действия на клетки короткими импульсами электрического поля высокой напряженности [1, 2].

Многочисленные исследования продемонстрировали, что электропорация может успешно использоваться для введения ДНК и других молекул в различные типы клеток, таких как клетки животных, дрожжей, бактерий, протопласты растений и грибов. Так, с помощью электропорации успешно проведена доставка ДНК с флуоресцентным геном репортера в мозговую ткань мыши [3]. Довольно часто электропорация используется для трансформации макромолекул в клетки дрожжей, особенно *Sacharomyces cerevisiae* [4]. Первым трансформированным грибом была *Trichoderma harzanium*, первой трансформированной бактерией – *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [4]. Известно применение электропорации в исследованиях с плесневыми грибами *Fusarium fugikuroi* [5], *Aspergillus niger* van Tieghem ATCC 20739 [6] и др. Целью работы являлось исследование влияния электропорации на сохранение жизнеспособности микромицета *A. niger* - продуцента лимонной кислоты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования являлся селекционированный в ФГБНУ ВНИИПД промышленный продуцент лимонной кислоты гриб *A. niger* штамм ВКПМ F-171 [7].

Глубинное культивирование *A. niger* осуществляли периодическим способом по технологии концентрированных сред на сахарозо-минеральной среде с исходной массовой концентрацией ферментируемых сахаров 150 г/дм³ в качалочных колбах вместимостью 750 см³ в условиях шейкера-инкубатора Multitron фирмы INFOS (Швейцария) при температуре 30–32 °С в течение 5-ти сут. Состав питательной среды, г / дм³: сахара кристаллическая – 50 (на стадии получения посевного мицелия) и 150 (на стадии ферментации); NH₄NO₃ – 2,5; MgSO₄ × 7H₂O – 0,25; KH₂PO₄ – 0,16 [8, 9].

Оценку сохранения жизнеспособности культуры *A. niger* в контрольных и опытных образцах после электропорации осуществляли с помощью высева культуральной жидкости на чашки Петри с сусло-агаром концентрацией 7 ° Б глубинным способом в соответствии с инструкцией¹.

Электропорацию культуральной жидкости проводили через 72 ч после засева питательной среды инокулюмом с использованием электропораторов с генераторами экспоненциальной (ВТХ ЕСМ 630 Electroporation System) и квадратичной (ВТХ ЕСМ 830 Electroporation System) волн. Для электропорации использовали кюветы ВТХ Electroporation Cuvettes plus 0,4 см. В каждую кювету вносили 1 см³ культуральной жидкости *A. niger*.

В экспериментах с использованием прибора, генерирующего экспоненциальную волну, варьировали значения электрического напряжения от 500 В до 2500 В, электрического сопротивления от 25 Ом до 1600 Ом, электрической емкости от 25 мкФ до 50 мкФ. Длительность электрического воздействия рассчитывалась прибором и находилась в диапазоне от 400 мкс до 600 мкс.

В экспериментах с использованием прибора, генерирующего квадратичную волну, ва-

¹ Инструкция по биологическому и химическому контролю производства пищевой лимонной кислоты / ВНИИПАКК: под ред. А.В. Галкина, Т.А. Никифоровой. СПб., 1997. 288 с.

Galkin A.V., Nikiforova T.A. *Instruktsiya po biologicheskomu i khimicheskomu kontrolyu proizvodstva pishchevoi limonnoi kisloty* [The instruction on biological and chemical control of food citric acid production]. St. Petersburg, 1997, 228 p.

рьировали значения электрического напряжения от 100 В до 3000 В и длительности электрического воздействия на культуру гриба-продуцента в диапазоне от 1 мс до 5000 мс. Использовали 1 импульс воздействия.

Массовую концентрацию органических кислот определяли титрованием [10].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате исследований по оценке сохранения жизнеспособности гриба

A. niger после электропорации на приборе с генератором экспоненциальной волны ВТХ ЕСМ 630 установлена возможность использования максимального значения электрического напряжения 2500 В, значений электрического сопротивления до 1500 Ом и емкости до 50 мкФ при которых не происходит негативного влияния электрического воздействия на рост гриба. Через 24 ч после высева культуральной жидкости на сусло-агаровую среду в опытных образцах наблюдается рост колоний *A. niger*, зависящий от заданных параметров электропорации. Превышение значения электрического сопротивления 1500 Ом приводило к полной гибели гриба (рисунок).

Определение массовой концентрации органических кислот в культуральной жидкости продуцента после электропорации показало, что данный показатель находился на уровне

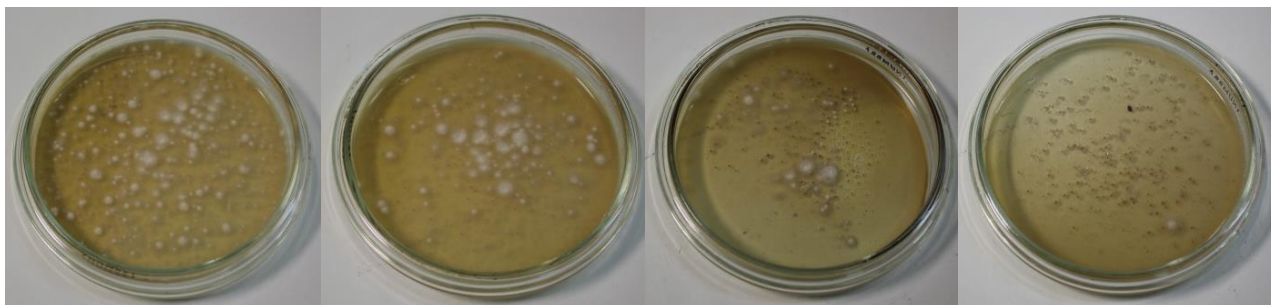
контрольного образца и составлял в контрольном варианте в среднем 46,9 г/дм³, в опытном варианте 46,5 г/дм³.

Использование электропоратора с генератором экспоненциальной волны ВТХ ЕСМ 630 не дает возможности изменять длительность воздействия электрического импульса. Поэтому дальнейшие исследования проводили на электропораторе с генератором квадратичной волны ВТХ ЕСМ 830.

Установлена прямая зависимость жизнеспособности гриба *A. niger* от электрического напряжения и времени воздействия электрического импульса (табл. 1).

Как показывают результаты исследований, для квадратичной волны возможно использование максимального электрического напряжения 3000 В, но при длительности воздействия электрического импульса, не превышающей 10 мс, или невысокого электрического напряжения 100 В, но при более длительном воздействии на грибную культуру (до 2000 мс) данным электрическим напряжением.

Установлено, что при увеличении длительности воздействия электрического импульса на *A. niger* до 1000 мс при электрическом напряжении 100 В происходит повышенная в среднем на 12,1% по сравнению с контролем элиминация органических кислот из клеток продуцента (табл. 2).



1

2

3

4

Рост гриба *Aspergillus niger* при различных параметрах электропорации с использованием экспоненциальной волны:

- 1 – электрическое сопротивление не более 1000 Ом, электрическая емкость до 50 мкФ;
- 2 – электрическое сопротивление от 1000 до 1500 Ом, электрическая емкость до 25 мкФ;
- 3 – электрическое сопротивление от 1000 до 1500 Ом, электрическая емкость выше 25 мкФ;
- 4 – электрическое сопротивление выше 1500 Ом, электрическая емкость до 50 мкФ

***Aspergillus niger* growth under different parameters of electroporation with exponential wave:**

- 1 – electric resistance under 1000 Ohm, capacity under 50 μ F;
- 2 – electric resistance 1000–1500 Ohm, capacity under 25 μ F;
- 3 – electric resistance 1000–1500 Ohm, capacity over 25 μ F;
- 4 – electric resistance over 1500 Ohm, capacity under 50 μ F

Таблица 1

Оценка жизнеспособности гриба *Aspergillus niger* на чашках Петри после электропорации с использованием квадратичной волны

Table 1

Viability of Aspergillus niger on Petri dish after electroporation with quadratic wave

Электрическое напряжение, В	Длительность электрического воздействия, мс	Рост гриба <i>Aspergillus niger</i> через	
		24 ч	48 ч
100	1000	+++	+++
100	2000	++	+++
250	10	+++	+++
250	100	+++	+++
500	1	++	+++
500	10	+	++
500	50	–	+
500	300	–	+
500	1000	–	–
500	5000	–	–
1000	10	+++	+++
1500	10	+++	+++
2000	10	++	+++
2500	120	–	+
3000	10	++	+++
3000	100	–	+

Примечание: «+++» рост идентичен контролю; «++» – неравномерный рост; «+» – начало роста; «–» – роста нет.

Таблица 2

Массовая концентрация органических кислот в культуральной жидкости гриба *Aspergillus niger* при различных параметрах электропорации (квадратичная волна)

Table 2

Mass concentration of organic acids in Aspergillus niger culture liquid under different parameters of electroporation (quadratic wave)

Варианты	Параметры электропорации	Массовая концентрация органических кислот,	
		г / дм ³	% к контролю
Контроль	–	74,4±0,7	100,0
Опыт 1	E =250 В τ =10 мс	76,7±0,4	103,1±0,5
Опыт 2	E =250 В τ =100 мс	80,8±1,0	108,6±1,3
Опыт 3	E =100 В τ =1000 мс	83,4±0,7	112,1±0,9
Опыт 4	E =1000 В τ =10 мс	78,3±0,4	105,4±0,5

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований выбраны условия электропорации культуральной жидкости *A. niger* с использованием прибора ВТХ ЕСМ 830, генерирующего квадратичную волну, и установлены параметры электропорации, не приводящие к потере жизнеспособности микромицета *A. niger* - продуцента

лимонной кислоты, а именно, электрическое напряжение – 100 В, длительность электрического воздействия – 1000 мс.

Установлено, что при использовании электрических импульсов квадратичной волны при выбранных параметрах происходит, по видимому, за счет повышения проницаемости клеточной стенки гриба, повышенная элими-

нация органических кислот из клетки по сравнению с контрольным вариантом в среднем на 12,1%.

Полученные данные могут быть использованы в дальнейшем для трансформации макромолекул в клетку гриба *A. niger* методом электропорации.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. по проекту 25.2.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Weaver G.C. Electroporation Theory: Concepts and Mechanisms // *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1995. P. 1–26.
2. Rols M.P. Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 423. P. 19–33.
3. Saito T., Nakatsuji N. Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. // *Dev. Biol.* 2001. V. 240 (1). P. 237–246.
4. Rivera A.L., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. Genetic transformation of cells using physical methods // *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*. 2014. V. 5, N. 4. P. 237–242.
5. García-Martínez J., Brunk M., Avalos J., Terpitz U. The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination // *Scientific Reports*. 2015. V. 5. Article 7798. DOI:10.1038/srep07798.
6. Ozeki K., Kyoya F., Hizume K., Kanda A., Hamachi M. and Nunokawa Y. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation // General Research Laboratory, Ozeki Corporation, 4-9 Imazu Deraike cho, Nishinomiya-shi, Hyogo 663, Japan Received June 27, 1994. P. 2224–2227.
7. Пат. № 975799, СССР, МКИ⁵ С 12 N 15/00, С 12 Р 7/48. Штамм гриба *Aspergillus niger* Л-4 – продуцент лимонной кислоты / В.П. Ермакова, Е.Я. Щербакова, И.М. Василюнец, В.М. Финько; заявитель и патентообладатель ЛНИИПП. № 2955606; заявл. 13.06.1980, опубл. 23.11.1982, Бюл. N 43.
8. Пат. № 2428481, Российская Федерация, МПК С 12 Р 7/48. Способ получения лимонной кислоты / Т.В. Выборнова, Т.А. Никифорова, В.П. Комов, Л.Б. Пиотровский, М.А. Думнина, Е.В. Литасова; заявитель и патентообладатель ГУ ВНИИПАКК. № 2010112411; заявл. 30.03.2010, опубл. 10.09.2011. Бюл. № 25.
9. Никифорова Т.А., Мушникова Л.Н., Львова Е.Б. Основы микробного синтеза лимонной кислоты. СПб.: ЗАО «Полиграфическое предприятие № 3», 2005. 180 с.
10. Муратова Е.И., Зюзина О.В., Шуняева О.Б. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов. Тамбов: Изд-во Тамбовского государственного технического университета, 2007. 80 с.

REFERENCES

1. Weaver G.C. Electroporation Theory: Concepts and Mechanisms. In: *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1995, pp. 1–26.
2. Rols M.P. Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues. *Methods Mol. Biol.* 2008, vol. 423, pp. 19–33.
3. Saito T., Nakatsuji N. Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Dev. Biol.* 2001, vol. 240, no. 1, pp. 237–246.
4. Rivera A.L., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. Genetic transformation of cells using physical methods. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*. 2014, vol. 5, no. 4, pp. 237–242.
5. García-Martínez J., Brunk M., Avalos J., Terpitz U. The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination. *Scientific Reports*. 2015, vol. 5, article 7798. doi:10.1038/srep07798
6. Ozeki K., Kyoya F., Hizume K., Kanda A., Hamachi M., Nunokawa Y. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation. General Research Laboratory, Ozeki Corporation, 4-9 Imazu Deraike cho, Nishinomiya – shi, Hyogo 663, Japan Received June 27, 1994, pp. 2224–2227.
7. Ermakova V.P. [et al.] *Shtamm griba Aspergillus niger L-4 – produtsent limonnoi kisloty* [The fungus *Aspergillus niger* strain L-4 as a producer of citric acid]. Patent USSR, no. 975799, 1982.
8. Vybornova T.V. [et al.] *Sposob polucheniya limonnoi kisloty* [A method for producing citric acid]. Patent RF, no. 2428481, 2011.
9. Nikiforova T.A., Mushnikova L.N., L'vova E.B. *Osnovy mikrobnogo sinteza limonnoi kisloty* [Basis of citric acid microbial synthesis]. St. Petersburg: Poligraficheskoe predpriyatie no. 3 Publ., 2005, 180 p.
10. Muratova E.I., Zyuzina O.V., Shunyaeva O.B. *Biotehnologiya organicheskikh kislot i*

belkovykh preparatov [Biotechnology of organic acids and proteinaceous preparations]. Tambov:

Publishing house of Tambov State Technical University, 2007, 80 p.

Критерии авторства

Выборнова Т.В., Корнев А.А. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Выборнова Т.В., Корнев А.А. имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Contribution

Vybornova T.V., Kornev A.A. carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. Vybornova T.V., Kornev A.A. have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ
Принадлежность к организации

Татьяна В. Выборнова
Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок
Научный сотрудник
vniipakk55@mail.ru

Антон А. Корнев
Санкт-Петербургский академический университет РАН
М.н.с.
nmd_ry@mail.ru

AUTHORS' INDEX
Affiliations

Tatiana V. Vybornova
All-Russian Scientific Research
Institute of Food Additives
Researcher
vniipakk55@mail.ru

Anton A. Kornev
St. Petersburg National Research Academic
University of the Russian Academy of Sciences
Research assistant
nmd_ry@mail.ru

Поступила 28.10.2016

Received 28.10.2016