



## Амилаза нийлэгжүүлэгч бактерийн мутант омог гарган авсан дүн

Б.Наранчимэг, Х.Алтанцэцэг, Б.Урантүлхүүр \*

Мал аж ахуй, биотехнологийн сургууль, ХААИС, Улаанбаатар, Монгол Улс

\*Холбоо барих хаяг: [urantulkhuur.b@mul.s.edu.mn](mailto:urantulkhuur.b@mul.s.edu.mn)

### ХУРААНГУЙ

Амилаза нь үйлдвэрлэлийн олон салбарт (цардуул задлах, талх нарийн боов, исгэлт, биотүши, угаалгын нунтаг, цаас, нэхмэл гэх мэт) өргөнөөр хэрэглэгддэг фермент тул түүнийг нийлэгжүүлэгч бичил биетний өсгөврийг байгалийн эх үүсвэрээс ялган авч, идэвхийг нь сайжруулах явдал биотехнологийн салбарт чухал ач холбогдолтой юм. Мутагенезийн аргаар бичил биетний биологийн идэвхтэй бодисын нийлэгжилтийг сайжруулснаар ферментийн бэлдмэл гарган авах боломжтой болно. Судалгаагаар Монгол орны биосферээс ялган авсан цардуул задлах идэвхтэй бактерийн цэвэр өсгөврийн амилаза ферментийн идэвхийг субстратаар өдөөх болон мутагенезийн аргаар сайжруулахыг зорив. Хөрснөөс ялган авсан цардуул задлах идэвхтэй цэвэр өсгөврүүдийг (*Bacillus* sp. 1, 2, 3) нүүрс-усны эх үүсвэрээр зөвхөн цардуул агуулсан (10 г/л) тэжээлт орчинд өсгөвөрлөх замаар амилаза ферментийн идэвхийг нэмэгдүүлэх туршилт хийж үр дүнг үндэслэн хамгийн идэвхтэй нэг өсгөврийг сонгон шалгаруулж, хэт ягаан туяа, этидиум бромид, хэт ягаан туяа, этидиум бромид гэсэн дарааллаар зориудын мутагенезид 4 үе шаттайгаар оруулав. Субстратаар өдөөхөд бактерийн амилаза ферментийн идэвх анхдагч өсгөврийнхөөс 50-58 хувиар нэмэгдсэн. *Bacillus* sp. 2 өсгөврийг сонгон шалгаруулж, мутагенезид оруулахад амилаза ферментийн идэвх нь I шатны мутагенезээр: 0,305, II-оор: 0,514, III-аар: 0,579, IV-өөр: 0,592 н/мл болж нэмэгдэв. Бидний судалгааны үр дүнд байгалийн анхдагч өсгөврийн (*Bacillus* sp. 2) амилаза ферментийн идэвх 0,138-аас 0,592 н/мл хүртэл буюу 4,3 дахин нэмэгдсэн байна.

**ТҮЛХҮҮР ҮГ:** *Bacillus* sp., субстратын өдөөлт, UV-мутагенез, EtBr- мутангенез

### ОРШИЛ

Байгал дээрх бичил биетнүүд нь өөрийн уламжлалт хяналтын системээрээ арилжааны чухал метаболитуудыг маш бага хэмжээгээр нийлэгжүүлдэг. Хэдийгээр тэдгээр метаболитын гарцыг өсгөвөрлөлтийн нөхцлийг нь оновчлох замаар нэмэгдүүлж болох ч бүтээмж нь эцэстээ организмын геномоор хянагддаг [1]. Тодорхой ферментийн нийлэгжилтийг нэмэгдүүлэхэд субстратаар өдөөх аргыг өргөнөөр ашигладаг. Өдөөлт бол ферментийн нийлэгжилтийг нэмэгдүүлэх нөлөө бүхий бодисын солилцооны хяналтын механизм юм. Бичил биетнийг үржүүлэх тэжээлт орчны найрлагад

тухайн ферментийн задалдаг субстратыг оруулж өгснөөр эс амьдрахын тулд уг ферментийг нийлэгжүүлж эхэлдэг. Энэхүү механизм нь эсийг өөрт шаардлагагүй фермент нийлэгжүүлэхээс хамгаалдаг учир чухал ач холбогдолтой юм. Жишээ нь:  $\beta$ -галактозадаза фермент зөвхөн субстрат (лактоз эсвэл галактоз) байгаа нөхцөлд л нийлэгждэг [2]. Эсийг зөвхөн тухайн ферментийн задалдаг субстрат бүхий орчинд удаан хугацааны туршид олон дахин өсгөвөрлөхөд фермент нийлэгжих идэвх нь нэмэгддэг байна [3]. Үйлдвэрлэлд ашиглах тодорхой метаболитыг нийлэгжүүлэх өндөр

идэвхтэй мутант омгийг сонгодог зориудын мутагенез болон генийн инженерчлэлийн аргуудыг ашиглан гарган авч байна [4]. Мутац бол ДНХ-ийн молекулын азотлог суурийн дараалал дахь байнгын өөрчлөлт юм. Мутацийн үр дүн нь ерөнхийдөө тухайн генээр тодорхойлогдсон эцсийн бүтээгдэхүүний өөрчлөлт байдаг [5]. Бичил биетнийг зориудаар мутагенезид оруулахад хэрэглэгддэг гол хэрэгсэл нь химийн мутаген, хэт ягаан туяа зэрэг юм [6]. Хэт ягаан туяа (250 нм) нь нэг полинуклеотидын хэлхээн дэх зэргэлдээ хоёр пиримидиний үлдэгдлийн (ихэвчлэн тиминий димер гэдэг боловч бас цитозинд илрэх боломжтой) хооронд холбоо үүсгэдэг. Үүнийг пиримидиний димер гэнэ. Хэт ягаан туяа мөн пиримидиний димерүүдийн хооронд ковалент холбоог үүсгэх боломжтой. Эдгээр холбоонууд нь ДНХ-ийн бүтцийг гажуудуулж, улмаар ДНХ-ийн репликаци, транскрипцийг дарангуйлдаг байна [5]. Этидиум бромид ДНХ-ийн сууриудтай урвалд орж, тэдний дунд инсерцлэгдсэнээр кодын хүрээний шилжилтийг бий болгодог [7]. Амилазаг

ургамал, амьтан, микроорганизмоос гаргаж авах боломжтой ч *Bacillus*-ийн төрлийн бактерийн амилаза нь өнөө цагийн үйлдвэрлэлийн хэрэгцээ шаардлагыг хангаж байна [8]. Ялангуяа түүний мутант омгийн амилаза ферментийн идэвх байгалийн омгоосоо хэд дахин нэмэгдэж байгааг олон судалгаа харуулдаг. *Bacillus amyloliquefaciens* UNG-16-ийг этилметансульфонат болон хэт ягаан туяа үйлчилж мутацид оруулахад мутант омог анхныхаас 1.4 дахин илүү ( $102.78 \pm 2.22$  н/мл) идэвхтэй амилаза нийлэгжүүлсэн байна [9]. *Bacillus licheniformis*-ийг хэт ягаан туяа (UV) болон нитрозогуанидинаар (NTG) ээлжлэн үйлчлүүлж анхны омгоос 12 дахин их (788 н/мл) идэвхтэй амилаза нийлэгжүүлдэг мутант омог гарган авчээ [10]. Идэвх нь 341.7 н/мл байсан мөөгөнцрийн *Aspergillus fumigatus* NTCC1222-ийг этил метил сульфонат болон этидиум бромидоор (EMS-EtBr) үйлчилж 814.1 н/мл идэвхтэй амилаза нийлэгжүүлдэг мутант омог гарган авсан байна [11].

## СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН, АРГА ЗҮЙ

Судалгаанд Монгол орны хөрснөөс ялган авсан, цардуул задлах идэвхтэй 3 цэвэр өсгөвөр (*Bacillus* sp. 1, 2, 3), хяналтаар *Bacillus amyloliquefaciens* (ATCC 23350, American tissue culture collection), химийн мутагенээр: этидиум бромид (ethidium bromide, 100 мг/мл, 200 мг/мл), физик мутагенээр: UV ламп (38 ватт, 250 нм) ашиглав. Цардуулт индукцийн шингэн тэжээлт орчны найрлага: (г/л) уусдаг цардуул 10, пептон 6,  $MgSO_4$  0.5, KCl 0.5 байв. 20 мл-ийн Шилэн хуруу шилэнд 5 мл тэжээлт орчин хийж 121 °C-т 15 минут ариутгаад хөргөж, Петрийн аяга дахь бактерийн өсгөврөөс авч суулган термостатад 37°C-т 48 цаг өсгөвөрлөж эсийн суспенз бэлтгэв [12]. Судалгааг ХААИС-ийн МААБС-ийн Биосинтезийн болон Геномиксийн лабораторит 2016-2017 онд хийж гүйцэтгэсэн.

**Амилаза ферментийн идэвх тодорхойлох**  
Өсгөвөрлөсөн эсийн суспензийг 5000 эргэлтэд 10 минут центрифугдээд эсээс нь салгаж супернатантыг ферментийн уусмал болгон ашиглав. 0.1 мл ферментийн уусмалыг 0.1 мл цардуулын уусмалтай (1% цардуул цитратын буферт) хольж 45°C-т 30 минут инкубацилаад 0.6 мл ДНС-ын хүчлийн (3,5-dinitrosalicylic acid) уусмал нэмж 5 минут буцалгаад мөстэй усанд хөргөв. Дараа нь 4.2 мл нэрмэл усаар шингэлээд спектрофотометрийн 540 нм долгионы уртад гэрлийн шингээлтийг хяналтын эсрэг хэмжив [13]. Ферментийн идэвх тодорхойлох шинжилгээг дээж бүрт 3 удаа гүйцэтгэж, хариуг дунджаар нь авсан. Хүснэгтэд  $\pm$  тэмдгээр дундаж утгын стандарт хазайлтыг тэмдэглэв. Амилаза ферментийн идэвхийн нэг нэгж нь 45°C температурт нэг минутад ферментийн ялгаруулах мМоль глюкозын тоотой тэнцүү байна.

### Субстратаар өдөөх аргаар идэвхийг дээшлүүлэх

Амилаза нь субстратаараа өдөөгдөн нийлэгждэг фермент юм. Бичил биетний амьдарч буй орчинд цардуул агуулсан түүхий эд байсан нөхцөлд л тухайн бичил биетэн цардуул задлагч ферментийг нийлэгжүүлнэ. Энэхүү онолын үндэслэлд тулгуурлан цардуул задлах идэвхтэй *Bacillus sp.* 1, 2, 3-ийг цардуулт индукцийн тэжээлт орчинд нэг жилийн туршид сар тутамд шинээр шилжүүлэн суулгаж өсгөвөрлөх замаар цардуул задлах идэвхийг нь тогтворжуулах, дээшлүүлэх, судалгаа хийв. Бактерийн өсгөврүүдийн цардуулын гидролизын бүс хамгийн томтой хувилбарыг шинэ тэжээлт

орчинд суулгах замаар хоёр сар тутамд амилаза ферментийн идэвхийг тодорхойлов [14]. Судалгааны дүнг үндэслэн цардуул задлах хамгийн идэвхтэй *Bacillus sp.* 2-ийг цаашдын селекцийн судалгаанд сонгон шалгаруулав.

### Мутагенезийн аргаар идэвхийг нь сайжруулах

Бактерийн омгийн амилаза фермент нийлэгжүүлэх идэвхийг нэмэгдүүлэх зорилгоор физикийн мутагенээс хэт ягаан туяа (UV ray) болон химийн мутагенээс этидиум бромид (EtBr)-ийг сонгон үйлчлүүлэв. Мутагенезийг 1-р бүдүүвчийн дагуу гүйцэтгэсэн.



1-р бүдүүвч. Бактерийн эсийг мутагенезид оруулсан дараалал

**Бактерийн эсийг мутагенезид бэлтгэх:** 5 мл эсийн суспензийг 5000 эргэлт/мин-аар 10 минут центфугдээд супернатантыг асгаж, эсийг 5 мл физиологийн уусмалд хийж  $10^{-5}$  хүртэл шингэрүүлэв.

**I шатны мутагенези-Хэт ягаан туяагаар үйлчлүүлэх:** Эсийн шингэрүүлсэн суспензаас 10 мл авч ариутгасан Петрийн аяганд хийж UV гэрлийн доор 6 см зайд байрлуулан 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 минут тутамд 0.5 мл-ийг авч цардуултай хатуу тэжээлт орчинд шилжүүлэн  $37^{\circ}\text{C}$ -т 24 цаг өсгөвөрлөв. Ургасан колониудаас цардуулын гидролизын бүс хамгийн томтой нэг колонийг авч 5 мл цардуултай шингэн тэжээлт орчинд дахин  $37^{\circ}\text{C}$ -т 24 цаг өсгөвөрлөөд амилаза ферментийн идэвх тодорхойлов. *Bacillus sp.* 2

өсгөврийг хяналтаар авч харьцуулан жишсэн. Ферментийн идэвхээр хамгийн өндөр хувилбарыг (M1) дараагийн процесст оруулав.

**II шатны мутагенези-Этидиум бромидоор үйлчлүүлэх:** 14 ш 1.5 мл-ийн тубэд 0.5 мл бактерийн суспензаас центрфугээр эсийг салган авч дээр нь 0.5 мл этидиум бромидын 100 ба 200 мг/мл концентрацитай уусмалыг (нэрмэл усанд бэтггэсэн) хийгээд  $37^{\circ}\text{C}$ -т 30-150 минут байлгаад 5000 эргэлт/мин-аар 5 мин центрфугдэв. Супернатантыг асгаж эсийг 0.5 мл давсны уусмалаар 3 удаа угааж, дахин 0.5 мл давсны уусмалд хийгээд түүнээс 0.2 мл-ийг авч цардуултай хатуу тэжээлт орчинд шилжүүлэн  $37^{\circ}\text{C}$ -т 24 цаг өсгөвөрлөв. Ургасан колониудаас цардуулын гидролизын

бүс хамгийн томтой нэг колонийг авч 5 мл шингэн орчинд дахин 37°C-т 24 цаг өсгөвөрлөөд амилаза ферментийн идэвх тодорхойлов. “M1” өсгөврийг хяналтаар авч харьцуулан жишив. Ферментийн идэвхээр хамгийн өндөр хувилбарыг (M2) дараагийн процесст оруулав.

**III шатны мутагенези-Хэт ягаан туяагаар үйлчлүүлэх:** I шатны мутагенезитэй адил нөхцөлд хэт ягаан туяагаар 20-35 мин

үйлчлүүлсэн. “M2” өсгөврийг хяналтаар авч харьцуулан жишив. Ферментийн идэвхээр хамгийн өндөр хувилбарыг (M3) дараагийн процесст оруулав.

**IV шатны мутагенези-Этидиум брмидоор үйлчлүүлэх:** II шатны мутагенезитэй адил нөхцөлд этидиум бромидын 200 мг/мл уусмалаар 30-90 мин үйлчлүүлэв. “M3” өсгөврийг хяналтаар авч харьцуулан жишив.

## СУДАЛГААНЫ ҮР ДҮН

Судалгаагаар өөрийн орны биосферээс цэвэршүүлэн ялгаж авсан цардуул задлагч идэвхтэй бактерийн цэвэр өсгөврийн амилаза фермент нийлэгжүүлэх идэвхийг субстратаар өдөөх болон мутагенезийн аргаар үе шаттайгаар сайжруулж, сонгон шалгаруулав.

**Субстратаар өдөөх аргаар амилаза нийлэгжүүлэх идэвхийг дээшлүүлсэн дүн**  
Цардуул задлах идэвх бүхий цэвэр өсгөврүүдийг (*Bacillus sp.* 1, 2, 3) нүүрс-усны

эх булгаар дан ганц цардуул агуулсан (10 мг/мл) тэжээлт орчинд удаан хугацаанд сэлгээн суулгалт хийхэд бактерийн цардуул задлах шинж чанар тогтвортой хадгалагдаад зогсохгүй 2 сар тутамд 0.001-0.017 нэгжээр цардуул задлах идэвх нь нэмэгдэж, нэг жилийн дараа анхдагч өсгөврийнхөөс 50-58 хувиар нэмэгдэв (хүснэгт 1).

Хүснэгт 1

№	Өсгөврийн нэр, дугаар	Сонгосон өсгөврүүдийн амилаза ферментийн идэвх (н/мл)						
		Цардуултай орчинд өсгөвөрлөсөн хугацаа (сараар)						
		0	2	4	6	8	10	12
1	<i>Bacillus sp.</i> 1	0.006±2	0.006±1	0.007±3	0.007±5	0.008±1	0.009±5	0.009±2
2	<i>Bacillus sp.</i> 2	0.138±1	0.154±1	0.168±3	0.185±1	0.202±3	0.208±2	0.218±1
3	<i>Bacillus sp.</i> 3	<b>0.031±3</b>	0.033±2	0.038±1	0.040±4	0.043±6	0.045±2	0.047±1

Субстратаар өдөөх аргаар фермент нийлэгжүүлэх идэвхийг дээшлүүлэх нь цаг хугацаа маш их шаардсан, үр дүн багатай арга боловч байгалийн эх үүсвэрээс ялгасан бичил биетний бодисын солилцооны үйл ажиллагааг тогтвортой болгож, мутагенезийн процесст оруулах бэлтгэл шат болгон ашиглагддаг микробиологийн шинжлэх ухааны классик арга юм [14]. Судалгааны дүнг үндэслэн цардуул задлах хамгийн идэвхтэй *Bacillus sp.* 2 өсгөврийг цаашдын селекцийн ажилд сонгон шалгаруулав.

**Мутагенезийн аргаар амилаза нийлэгжүүлэх идэвхийг дээшлүүлсэн дүн**

Цардуул задлагч идэвхээр хамгийн өндөр *Bacillus sp.* 2 өсгөврийг мутагенезийн аргаар амилаза фермент нийлэгжүүлэх идэвхийг нь сайжруулахын тулд физикийн ба химийн мутагенээр үе шат дараалуулан үйлчлүүлж,

үе шат болгонд хамгийн идэвхтэйг сонгон дараагийн шатны мутагенезид оруулах замаар судалгааг хийв.

**I шатны мутагенези- Хэт ягаан туяагаар үйлчлүүлсэн дүн (UV, 38 ватт, 250 нм)**

Селекцийн судалгааны I үе шатанд хэт ягаан туяаны 38 вт, 250 нм долгионы уртад, үйлчлүүлэх хугацааны 7 хувилбарт, тус бүр 3 давталттай авч амилаза ферментийн идэвхийн нэг нэгжийг 45°C температурт нэг минутад ферментийн ялгаруулах глюкозын мМоль-оор тодорхойлов. Бактерийн эсэд хэт ягаан туяагаар үйлчлүүлсэн хугацаа нэмэгдэхэд эсийн амьдрах чадвар аажмаар буурсаар 40 минутад бүх эс үхсэн байна. Хэт ягаан туяагаар 25 минут үйлчлүүлэхэд амилаза ферментийн идэвх хамгийн өндөр (0.305 н/мл) гарсан бол 30 минут үйлчлүүлэхэд идэвх нь даруй хоёр дахин

буурч байв. Эндээс үзэхэд хэд ягаан туяаны үйлчлэл тодорхой хугацаанд ферментийн нийлэгжилтэнд эерэгээр нөлөөлж байна

(Хүснэгт 2). Энэхүү хувилбарыг “M1” гэж нэрлэн дараагийн шатны судалгаанд оруулахаар сонгон шалгаруулав.

Хүснэгт 2

I шатны мутагенезийн дүн				
№	Үйлчлүүлсэн хугацаа (мин)	Амьд үлдсэн эсийн тоо	Амьд үлдсэн эс (хувиар)	Амилаза ферментийн идэвх (н/мл)
0	0 ( <i>Bacillus sp. 2</i> )	78	100	0.218±2
1	5	70	90	0.231±1
2	10	53	68	0.221±1
3	15	44	57	0.184±3
4	20	32	42	0.213±4
5	<b>25 (M1)</b>	24	31	<b>0.305±1</b>
6	30	14	19	0.174±3
7	35	5	7	0.143±1
8	40	0	0	0

### II шатны мутагенези – Этидиум бромидоор үйлчлүүлсэн дүн (100 мг/мл, 200 мг/мл)

“M1” мутантыг этидиум бромидын 100 ба 200 мкл/мл концентрацитай уусмалд хугацааны 7 хувилбарт тус бүр 3 давталттайгаар үйлчлүүлэв. Хугацаа нэмэгдэх тутам амьд үлдсэн эсийн тоо огцом буурч, 100 мг/мл концентацитай уусмалд 120 мин, 200 мг/мл-

тай уусмалд 105 мин байлгахад бүх эс үхсэн байна. Этидиум бромидын 200 мкл/мл-ийн уусмалаар 30 минут үйлчлүүлсэн хувилбар хамгийн өндөр дүн үзүүлэв (хүснэгт 3). Энэхүү хувилбарыг “M2” гэж нэрлэн дараагийн шатны судалгаанд оруулахаар сонгон шалгаруулав.

Хүснэгт 3

II шатны мутагенезийн дүн					
№	Үйлчлүүлсэн хугацаа (мин)	Этидиум бромидын концентраци (мг/мл)	Амьд үлдсэн эсийн тоо	Амьд үлдсэн эс (хувиар)	Амилаза ферментийн (н/мл)
0	0 (M1)	0	85	100	0.305±2
1	30	100	61	71	0.367±4
2	45	100	56	65	0.341±2
3	60	100	46	54	0.488±4
4	75	100	32	37	0.504±1
5	90	100	19	22	0.437±5
6	105	100	7	8	0.156±3
7	120	100	0	0	0
<b>8</b>	<b>30 (M2)</b>	<b>200</b>	<b>57</b>	<b>67</b>	<b>0.514±2</b>
9	45	200	36	42	0.489±3
10	60	200	14	16	0.378±4
11	75	200	9	10	0.463±1
12	90	200	3	4	0.095±1
13	105	200	0	0	0
14	120	200	0	0	0

### III шатны мутагенези - Хэт ягаан туяагаар үйлчлүүлсэн дүн (38 ватт, 250 нм)

Хугацааг 4 хувилбараар сонгож “M2” хувилбарыг дахин хэт ягаан туяагаар I шатны

мутагенезийн адил үйлчлүүлэхэд 20 мин үйлчлүүлсэн хувилбарын ферментийн идэвх хамгийн өндөр байв (Хүснэгт 4). Энэхүү

хувилбарыг “М3” гэж нэрлэн дараагийн шатны судалгаанд оруулахаар сонгон шалгаруулав.

Хүснэгт 4

III шатны мутагенезийн дүн				
№	Үйлчлэх хугацаа (мин)	Амьд үлдсэн эсийн тоо	Амьд үлдсэн эс (хувиар)	Амилаза ферментийн (н/мл)
0	0 (M2)	87	100	0.514±2
<b>1</b>	<b>20 (M3)</b>	69	79	<b>0.579±2</b>
2	25	49	56	0.501±1
3	30	22	25	0.512±2
4	35	13	14	0.509±3

#### IV шатны мутагенези - Этидиум бромидоор үйлчлүүлсэн дүн (200 мг/мл)

Селекцийн судалгааны III үе шатны хамгийн өндөр идэвхтэй хувилбар “М3”-ийг дахин 200 мг/мл концентрацитай этидиум бромидын уусмалд хийж 37°C-т хугацааны 5 хувилбараар байлгахад 30 минут үйлчлүүлсэн

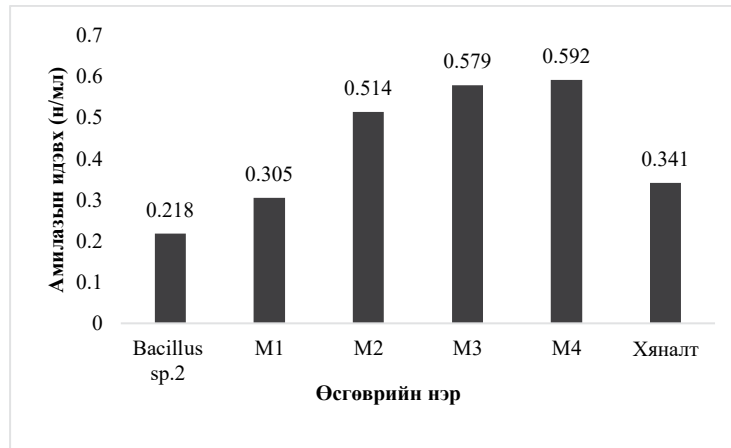
дээж хамгийн өндөр дүн үзүүлэв (хүснэгт 5). Энэхүү хувилбарыг “М4” гэж нэрлэн дараагийн шатны судалгаанд оруулахаар сонгон шалгаруулж дахин хэт ягаан туяагаар үйлчлүүлэхэд амилаза фермент нийлэгжүүлэх идэвх нэмэгдээгүй болно. Үүгээр мутагенезийн ажиллагааг дуусгав.

Хүснэгт 5

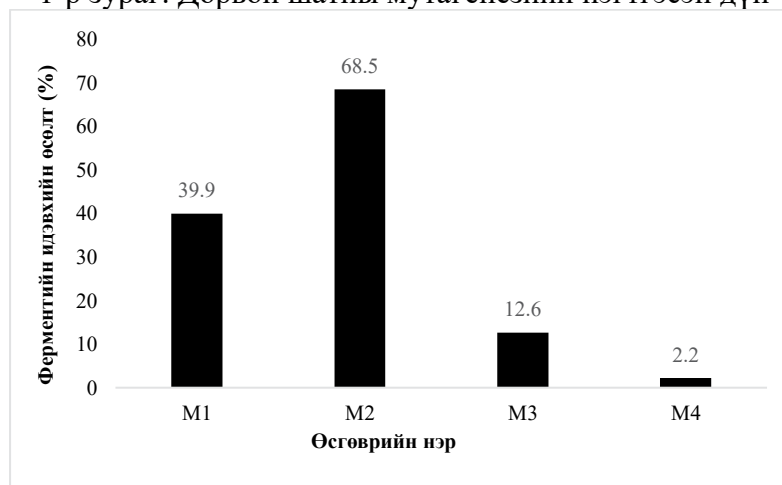
IV шатны мутагенезийн дүн					
№	Үйлчлүүлсэн хугацаа (мин)	Этидиум бромидын концентраци (мг/мл)	Амьд үлдсэн эсийн тоо	Амьд үлдсэн эс (хувиар)	Амилаза ферментийн (н/мл)
0	0 (M3)	0	91	100	0.579±2
<b>1</b>	<b>30 (M4)</b>	<b>200</b>	<b>56</b>	<b>61</b>	<b>0.592±1</b>
2	45	200	34	37	0.527±4
3	60	200	19	20	0.492±1
4	75	200	7	7	0.516±1
5	90	200	2	0.2	0.216±3

Нийт 4 үе шатны селекцийн судалгааны дүнд анхны цэвэр өсгөврийн амилаза фермент нийлэгжүүлэх идэвх (0.218 н/мл) нь 2,7 дахин нэмэгдсэн (0,592 н/мл) байна (1 ба 2-р зураг).

Харин хяналтын *Bacillus amyloliquefaciens*-тай харьцуулахад 1,7 дахин илүү идэвхтэй байна.



1-р зураг. Дөрвөн шатны мутагенезийн нэгтгэсэн дүн



2-р зураг. Ферментийн идэвхийн өсөлт

## ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Гадаад орны олон судлаачид цардуул задлагч идэвхтэй бичил биетний омог гарган авсан байна. Бид Монгол орны эрс тэс уур амьсгал, экологийн орчноос амилаза фермент нийлэгжүүлэгч бичил биетний цэвэр өсгөвөр ялган авч, биотехнологийн аргаар цардуул задлах өндөр идэвхтэй мутант омог гарган авахыг зорив. Бичил биетний ферментийн нийлэгжилтийг нэмэгдүүлэхэд субстратаар өдөөх аргыг судлаачид өргөнөөр ашигладаг. *Microbacterium sp.* OU01-ийн хитозаназа (chitosanase) ферментийн идэвхийг субстратаар өдөөх, тэжээлт орчны найрлага, өсгөвөрлөх нөхцлийг оновчтой болгох замаар 3.6 н/мл-ээс 118 н/мл хүртэл эрс нэмэгдүүлжээ [3]. Головлена нар целлюлоз задлагч халуунсаг актиномицет *Actinomyces diastaticus* 7-г фильтрийн цаастай орчинд 3 жил өсгөвөрлөхөд целлюлоз задлагч идэвх нь

25-30 хувиар дээшилсэн гэжээ [15]. Бид хөрснөөс ялган авсан, цардуул задлагч идэвхтэй *Bacillus sp.*-ийн 3 цэвэр өсгөврийг (1, 2, 3) цардуулт индукцийн тэжээлт орчинд нэг жилийн хугацаанд, олон дахин шилжүүлэн өсгөвөрлөхөд амилаза фермент нийлэгжүүлэх идэвх тогтворжоод зогсохгүй *Bacillus sp.* 1-ийн амилаза фермент нийлэгжүүлэх идэвх 0.006-аас 0.009, *Bacillus sp.* 2-ийнх 0.138-аас 0.218, *Bacillus sp.* 3-ийнх 0.031-ээс 0.047 н/мл болж нэмэгдэж байгаа нь бусад судлаачын үр дүнтэй ойролцоо байна [14]. Орчин үед бичил биетний селекцийн судалгаанд амьд организмын удамшилын материалд өөрчлөлт оруулдаг хими, физикийн мутагенийг өргөнөөр ашиглаж байна. Хэт ягаан туяа нь өндөр бүтээмжтэй омог гарган авах хамгийн тохиромжтой мутагенд тооцогддог. Энэ нь бүх төрлийн хос

суурийн өөрчлөлтийг хамардаг бөгөөд примидиний димерүүдийн өндөр харьцааг бий болгодог байна. Этидиум бромид нь бактерийн ДНХ-ийн сууриудтай урвалд орж, тэдний дунд инсерцлэгдэнэ. Инсерцийн дүнд ДНХ илүү уян хатан болж улмаар кодын хүрээний шилжилт бий болно. Энэ нь ДНХ-ийн репликац болон транскрипцид нөлөөлдөг болохыг тэмдэглэжээ [16]. Ashraf нар *Bacillus licheniformis*-ийн омгийг хэт ягаан туяа (UV) болон нитрозогуанидин (NTG) зэргээр ээлжлэн үйлчилж анхны омгоос 12 дахин их буюу 788 н/мл идэвхтэй амилаза нийлэгжүүлдэг мутант омог гарган авчээ [8]. Kumar нарын судлаачид *Bacillus sp.* FME 2 омгийг хэт ягаан туяа болон этидиум бромидоор үйлчлүүлсэн мутант омог глюкоамилаза ферментийг байгалийн омгоосоо 3 дахин илүү нийлэгжүүлсэн байна [17]. Raju, Divakar нар *Bacillus cereus*-ийн омгийг хэт ягаан туяа болон этидиум бромидоор үйлчлүүлж фибринолитик протеазын нийлэгжилтийг нь нэмэгдүүлжээ. Тэд этидиум бромидыг фибринолитик протеазын нийлэгжилтийг нэмэгдүүлэхэд хамгийн сайн, үр дүнтэй нөлөөлж байгааг баталсан байна [18]. Ashraf нарын судалгаагаар *Bacillus sp.*-ийн бактерийн эсийг хэт ягаан туяагаар 5-35 минут хугацаагаар үйлчлүүлэхэд хугацаа өнгөрөх тусам амьд үлдсэн эсийн тоо буурсаар 30 дахь минутад бүх эс үхсэн [10] бол Soliman нарын судалгаагаар адил төрлийн бактерийн эсүүд хэт ягаан туяаны үйлчлэлд 40 минут болоод үхсэн байна. *Bacillus sp.*-ийн бактерийг Этидиум бромидын 75 мг/мл, 150 мг/мл концентрацитай уусмалаар 30-120 минут үйлчлүүлэхэд 120 дахь минутад эсүүд бүгд үхсэн байна. 150 мг/мл концентрацитай уусмалаар үйлчлүүлэхэд амьд үлдсэн эсийн тооны бууралт илүү огцом байсан гэжээ [16]. Бидний судалгаагаар бактерийн эсэд хэт ягаан туяагаар үйлчлүүлсэн хугацаа нэмэгдэхэд эсийн амьдрах чадвар аажмаар буурсаар 40 минутад бүх эс үхсэн байна. Харин этидиум бромидын уусмалаар бактерийн эсэд үйлчлүүлсэн хугацаа нэмэгдэх тутам амьд үлдсэн эсийн тоо огцом буурч, 100 мг/мл концентацитай уусмалд 120

мин, 200 мг/мл-тэй уусмалд 105 мин байлгахад бүх эс үхсэн. Этидиум бромидоор үйлчлүүлсэн хугацаа нэмэгдэхийн хэрээр амьд үлдсэн эсийн тоо 200 мг/мл концентрацитай уусмалынх нь 100 мг/мл-тэйгээс илүү огцом багасаж байлаа. Бактерийн эсийг хэд хэдэн үе шаттайгаар мутагенезид оруулахад эхний үе шатанд ферментийн идэвх сүүлийн үе шатныхаас илүү хувиар дээшилж байсныг зарим судлаачид тэмдэглэсэн байна. Жишээ нь хэт ягаан туяа (UV), нитросогуанидинаар (NTG) ээлжлэн үйлчлүүлэх замаар хэд хэдэн үе шаттайгаар мутагенезид оруулахад I үе шатанд амилаза фермент нийлэгжүүлэх идэвх 416-аас 524 н/мл болж 25.9 хувиар нэмэгдсэн бол IV үе шатанд 700-аас 788 н/мл болж 12.6 хувиар нэмэгджээ [10]. Манай судалгаагаар бактерийн өсгөврийг эхний удаа хэт ягаан туяагаар үйлчлүүлэхэд амилаза фермент нийлэгжүүлэх идэвх 39.9 хувиар нэмэгдэж байсан бол хоёр дахь удаагийн үйлчлэлээр өсөлт 12.6 хувь болж багассан байна. Мөн этидиум бромидын эхний удаагийн үйлчлэлээр фермент нийлэгжүүлэх идэвх 68.5 хувиар нэмэгдсэн байхад хоёр дахь удаагийн үйлчлэлээр дөнгөж 2.2 хувийн өсөлттэй байлаа. Бактерийн фермент нийлэгжүүлэх идэвхийг дээшлүүлэхэд химийн мутаген нь физик мутагенээс илүү үр дүнтэй нөлөө үзүүлж байгааг Suribabu нар судалгаандаа дурджээ. Тэд бактерийн эсийг хэт ягаан туяагаар үйлчлүүлэхэд амилаза фермент нийлэгжүүлэх идэвх нь 3000-4000 н/мл болсон бол химийн мутагенээр үйлчлүүлэхэд идэвх нь 3000-4300 болж нэмэгдсэн байна. [7]. Бидний судалгаагаар физик мутагенийн үйлчлэлээр ферментийн идэвх 39.9 хувиар нэмэгдсэн байхад химийн мутагений үйлчлэлээр 68.5 хувиар нэмэгдсэн байна. Энэхүү судалгааны үр дүнд 0.138 н/мл идэвхтэй байсан *Bacillus sp.* 2 өсгөврийн амилаза ферментийн идэвх субстратаар өдөөсний дараа 0.218 н/мл, мутагенезийн аргаар идэвхийг нь сайжруулсны дараа 0.592 н/мл буюу анхны омгоосоо 4.3 дахин нэмэгдсэн нь бусад судлаачдын судалгааны үр дүнтэй дүйж байна.



## ДҮГНЭЛТ

1. Хөрснөөс ялган авсан, цардуул задлагч идэвхтэй, *Bacillus spp.* 1, 2, 3-ийг цардуулт индукцийн тэжээлт орчинд нэг жилийн хугацаанд, олон дахин шилжүүлэн өсгөвөрлөхөд *Bacillus spp.* 1-ийн амилаза ферментийн идэвх 50.0, 2-ийнх 57.9, 3-ийнх 51.6 хувиар нэмэгдэв.
2. Судалгааны дүнг үндэслэн цардуул задлах хамгийн идэвхтэй *Bacillus spp.* 2-ийг цаашдын селекцийн судалгаанд сонгон шалгаруулж хэт ягаан туяа, этидиум бромид, хэт ягаан туяа, этидиум бромид гэсэн дарааллаар зориудын мутагенезид 4 үе шаттайгаар оруулахад амилаза ферментийн идэвх нь I шатны мутагенезээр:0.305, II-оор :0.514, III-аар:0.579, IV-өөр:0.592 н/мл болж нэмэгдлээ.
3. Бактерийн эсийг хэд хэдэн үе шаттайгаар мутагенезид оруулахад эхний үе шатанд ферментийн идэвх сүүлийн үе шатныхаас илүү хувиар дээшилж байв.
4. Химийн мутаген нь ферментийн идэвхийг дээшлүүлэхэд физик мутагенээс илүү үр дүнтэй нөлөө үзүүлж байна.
5. *Bacillus spp.* 2 өсгөврийн амилаза ферментийн идэвх бидний судалгааны ажлын үр дүнд 0.138-аас 0.592 н/мл хүртэл буюу 4.3 дахин нэмэгдсэн. Харин хяналтын *Bacillus amyloliquefaciens*-тай харьцуулахад 1.7 дахин илүү идэвхтэй байна.

## АШИГЛАСАН ХЭВЛЭЛИЙН ЖАГСААЛТ

- [1] Stanbury A., Whitaker. Hall SJ. 1995. Fermentation Technology' Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press, Oxford, 1-24
- [2] W G Hale., Venetia A Saunders., J P Margham. 2005. Collins Dictionary of Biology. 3rd ed, London
- [3] Yuying Sun., Baoqin Han., Wanshun Liu., JiquanZhang., Xingshuang Gao. 2007. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium sp.* OU0. Bioresource Technology, Volume 98, Issue 8, Pages 1548-1553
- [4] Singh S., Dutt D., Tyagi CH., Upadhyaya JS. 2010. Bio-conventional bleaching of wheat straw soda-AQ pulp with crude xylanases from SH-1 NTCC-1163 and SH-2 NTCC-1164 strains of *Coprinellus disseminatus* to mitigate AOX generation. New Biotechnology, 28(1): 47-57
- [5] Mohammad B., Habibi Najafi., Parnian Pezeshki. 2013. Bacterial mutation; types, mechanisms and mutant detection methods: A review. European Scientific Journal, /SPECIAL/ edition vol.4 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431
- [6] Jose L., Adrio and Arnold L., Demain. 2005. Genetic improvement of processes yielding microbial products. Department of Biotechnology. Puleva Biotech, S.A, Granada, Spain
- [7] Suribabu, K., Lalitha, G.T., Hemalatha, K.P.J. 2014. Strain improvement of *Brevi Bacillus borostelensis* R1 for optimization of  $\alpha$ -amylase production by mutagens. J. Microb. Biochem. Technol, 6(3): 123-127
- [8] Yuguo. Z., U. C. Jianwei and L. I. Xiaoquin. 1993. Technology conditions of alpha amylase fermentation from hydrolyzate. Shipin Yu Fajiang Gongue, 6:17-21
- [9] Yoneda, Y and Maruo, B. 1975. Mutation of *Bacillus subtilis* Causing Hyperproduction of  $\alpha$ -Amylase and Protease, and Its Synergistic Effect. Journal of Bacteriology, 124, 48-54
- [10] Hamad Ashraf., Ikram-Ul-Hag., Qadeer, M.A. and Javed Iqbal. 2001. Screening of *Bacillus licheniformis* mutants for improved production of alpha amylase. Pak. J.Bt. 33
- [11] Shalini Singh., Sanamdeep Singh., Jyoti Mangla. 2016. Physical and Chemical Mutation for Enhanced Alpha-Amylase Production by *Aspergillus fumigatus* NTCC1222 under Solid State Fermentation Conditions Using Agri-Residue Waste.

- Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences, 6, 22-26
- [12] Aneja, K.R. 2002. Experiments in Microbiology. Plant Pathology, Tissue culture and Mushroom Production technology. New age international (P) Ltd., Publishers, 169-171
- [13] Bernfeld, P. 1955. Amylases: alpha and beta methods. Enzymol. 1: 149-158.
- [14] Алтанцэцэг, Х. 1997. Сүрлийг уурагжуулах целлюлоз задлагч дээд ба доод мөөгний идэвхтэй омог гаргах. ХАА-н ухаанаар дэд докторын зэрэг горилсон бүтээл, УБ, 79-89 х
- [15] Головлена Л.А. 1982. Разложение лигнина грибными культурами. Микроб, т.51,с.543
- [16] Effat A.M. Soliman., O.I.M. El-Hamshary and Reem S.M. Batayyib. 2016. Enhancement of Protease Production of Some *Bacillus spp.* Isolated from Various Regions in Jeddah City. Int.J.Curr.Microbiol. App.Sci 5(5): 619-635
- [17] Kumar, G.S., Chandra, M.R.G.S., Sujana, Y.N., Reddy, B.R., Choi, Y.L. 2009. Enhanced production and partial purification of glucoamylase from mutated *Bacillus sp.* FME. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 52(5): 412-418.
- [18] Raju, E.V.N., Divakar, G. 2013. *Bacillus Cereus* GD 55 Strain Improvement by Physical and Chemical Mutagenesis for Enhanced Production of Fibrinolytic Protease. IJPSR, 4(5):81-93.

## Screening of bacterial mutants for improved production of amylase

Naranchimeg B., Altantsetseg Kh., Urantulkhuur B.\*

School of Animal Science and Biotechnology, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

\*Corresponding author: urantulkhuur.b@muls.edu.mn

### ABSTRACT

*Amylase is one of the most widely used enzymes in many industrial sectors (starch decomposition, bakery, fermentation, biofuel, detergent, paper, textile, etc.), thus isolating pure cultures of amylase producing microorganisms from natural sources and improving their activity is important in biotechnology. Enzyme preparations with high activity can be obtained only by improved synthesis of biologically active substances of microorganisms by mutagenesis. In the present investigation was enhanced the amylase productivity of some Bacillus sp. (assigned as 1,2,3) isolated from soil sample by substrate induction and mutagenesis. 3 isolates are subcultured in the medium with starch (10 mg/ml) as only carbon source, to improve amylase production. Enzyme activity of parental strains increased 50-58% by substrate induction. The highest productive strain (Bacillus sp. 2) screened and selected. Then it was subjected to 4 period mutagenesis using UV irradiation and ethidium bromide. Amylase activity of Bacillus sp. 2 increased after first period of mutagenesis to:0.305, second:0.514, third:0.579 and fourth:0.592 U/ml. In the result our experiment, amylase activity of parental strain increased from 0.138 to 0.592 U/ml, which means 4.3 times more enzyme.*

**KEYWORDS:** *Bacillus sp.*, substrate induction, UV-mutation, EtBr mutation