

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ ШТАММА *Aspergillus niger* Л-4 — ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОДУЦЕНТА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ С ПОМОЩЬЮ ГЕНОМНОГО AFLP-ФИНГЕРПРИНТИНГА

Н.Ю. ШАРОВА<sup>1</sup>, В.И. САФРОНОВА<sup>2</sup>

Лимонная кислота играет важную роль в системе биохимических реакций клеточного дыхания, участвует в окислительных процессах в качестве природного антиоксиданта и синергиста антиоксидантов, ингибируя, вместе с аскорбиновой кислотой, ферментативное действие оксидоредуктаз в растительных тканях. Лимонная кислота служит эффективным средством контроля заражения дрожжевыми и бактериальными патогенными культурами, что используется, например, при силосовании. По свойствам лимонная кислота составляет эффективную альтернативу антимикробным средствам с иным механизмом действия, в частности кормовым антибиотикам, применение которых в Европе запрещено. При этом продукты превращения лимонной кислоты в организме не оказывают отрицательного влияния. Распространенный продуцент лимонной кислоты — микромицет *Aspergillus niger*. В производственном цикле необходим контроль подлинности штаммов-продуцентов, однако идентификация по культурально-морфологическим характеристикам не в полной мере обеспечивает определение индивидуального статуса штамма, в связи с чем для аутентификации выделенных элитных линий этого микромицета мы применили генетическую паспортизацию. Следует отметить, что в 2015 году при масштабном изучении генетического разнообразия штаммов *Aspergillus flavus* было отмечено формирование уникальных AFLP-профилей, однако аспекты практического использования этого феномена не обсуждались (D. Singh с соавт., 2015). Объектом нашего исследования был осмофильный промышленный штамм — продуцент лимонной кислоты *Aspergillus niger* Л-4, полученный с использованием химических мутагенов и УФ-облучения в сочетании с отбором спонтанных вариантов. Целью работы было проведение геномного AFLP-фингерпринтинга этого штамма с использованием 12 различных комбинаций праймеров и создание уникального генетического паспорта культуры. В результате нами впервые для молекулярно-генетической паспортизации промышленного штамма микромицета *A. niger* Л-4 был оптимизирован метод AFLP-фингерпринтинга. Получены AFLP-профили для аутентификации осмофильного промышленного штамма — продуцента лимонной кислоты *A. niger* Л-4. Отобрана оптимальная пара праймеров Mse\_cc GATGAGTCCSTGAGTAACC и Eco\_ac (FAM) GACTGCGTACCAATTAC, которая не зависит от объема носимой пробы и обеспечивает максимальное количество фрагментов ДНК в диапазоне 33,68–593,78 п.н. (89 фрагментов) при соблюдении описанной методики проведения фингерпринтинга и параметров компьютерной обработки результатов. Полученные профили можно использовать для аутентификации штамма *Aspergillus niger* Л-4, взятого из разных источников.

**Ключевые слова:** продуцент лимонной кислоты *Aspergillus niger*, генетическая паспортизация, AFLP-фингерпринтинг.

Лимонная кислота играет важную роль в системе биохимических реакций клеточного дыхания, биологическая значимость которого наиболее весома по сравнению с другими биохимическими процессами в клетках. Она участвует в окислительных процессах в качестве природного антиоксиданта и синергиста антиоксидантов, ингибируя (вместе с аскорбиновой кислотой) ферментативное действие оксидоредуктаз в растительных тканях (1, 2). В частности, лимонная кислота связывает ионы трехвалентного железа в бесцветные комплексы в клубнях картофеля, оказывает положительное влияние на их вкусовые качества. В процессе длительного хранения клубневых культур при низких температурах (–4 °С и –8 °С) количество яблочной, фумаровой и винной кислот снижается, тогда как лимонной кислоты — увеличивается (3). При положительных температурах хранения количество антиоксидантов в растительных тканях недостаточно для замедления окислительных процессов, что вызывает необходимость использования препаратов антиоксидантного действия. Лимонная ки-

слота служит эффективным средством контроля заражения сельскохозяйственной продукции дрожжевыми и бактериальными патогенными культурами (4, 5). Она создает кислую среду для связывания двухвалентных катионов оксидоредуктаз микроорганизмов в хелаты (5), легко наносится и удаляется из семян, используется для их обработки для обезвреживания возбудителей грибных и бактериальных болезней и с целью длительного хранения (6). По своим свойствам лимонная кислота составляет эффективную альтернативу антимикробным средствам с иным механизмом действия, в частности кормовым антибиотикам, использование которых в Европе запрещено. Продукты превращения лимонной кислоты в организме не оказывают отрицательного влияния.

Поскольку лимонная кислота синтезируется клетками всех живых организмов, то в биотехнологическом аспекте в качестве ее универсального поставщика правомочно рассматривать метаболический цикл трикарбонных кислот (ЦТК). Сравнительно большей мобильностью биохимических реакций обладают клетки микроорганизмов. В естественных условиях микробные клетки не синтезируют избытки метаболитов. Однако это может произойти в ответ на изменение условий культивирования или соотношения индукции и репрессии генов в геноме. Вследствие таких изменений направление биохимических процессов (в том числе и в ЦТК) смещается.

Микромицет *Aspergillus niger* — распространенный продуцент лимонной кислоты. Для обеспечения гарантированной стабильности показателей процесса в производственном цикле необходим контроль подлинности штаммов-продуцентов. Для промышленного получения лимонной кислоты созданы высокопродуктивные штаммы *A. niger*, обеспечивающие нормативные технологические показатели (7). Однако только по этому признаку констатировать подлинность штамма невозможно. Идентификация внутри биологического вида по культурально-морфологическим характеристикам не в полной мере обеспечивает определение индивидуального статуса штамма. Селекционным штаммам аспергиллов — продуцентов лимонной кислоты свойственна генетическая однородность. Для сохранения их генофонда необходимо периодически производить выделение чистых культур (элитных линий) из одной типичной конидии или колонии (7). В связи с этим особую актуальность для контроля качества выделенных элитных линий штаммов приобретает генетическая паспортизация. Геномный AFLP (amplified fragments length polymorphism) фингерпринтинг — распространенный метод для детального молекулярно-генетического анализа микроорганизмов. С помощью AFLP-фингерпринтинга был успешно проведен поиск генетических различий между близкородственными штаммами разных таксономических групп, в том числе клубеньковых бактерий (8-12), молочнокислых бактерий (13-16), а также мицелиальных грибов, к примеру родов *Trichoderma* и *Aspergillus* (17-20). AFLP-фингерпринтинг имеет высокую воспроизводимость, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного приема паспортизации микроорганизмов (21). В результате фингерпринтинга у каждого штамма формируется уникальный набор амплифицированных фрагментов ДНК (AFLP-профиль), который может подвергаться компьютерной обработке для сравнения с профилями у других штаммов и использоваться в качестве генетического паспорта. Ранее в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ОСХН РАН (ВКСМ) была выполнена работа по оптимизации протокола AFLP-фингерпринтинга для бактериальных штаммов сельскохозяйственных микроорганизмов (22).

Показано, что изучение культурально-морфологических характери-

стик штаммов *A. niger* не обеспечивает выявление их индивидуальных особенностей (7). Для генотипирования селекционных промышленных штаммов этого вида более эффективным был PCR-метод, а именно RAPD-PCR (random amplification of polymorphic DNA) с универсальными праймерами AS15inv, L 15/AS19 и AA2с, в результате использования которого получили дискретные продукты амплификации участков геномной ДНК (7).

В представляемой работе нами впервые получены AFLP-профили для аутентификации осмофильного промышленного штамма — продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger* Л-4. Отобрана оптимальная пара праймеров Mse\_сс GATGAGTCCTGAGTAACC и Eco\_ас (FAM) GACTGCCGTACCAATTAC, которая обеспечивает максимальное число фрагментов ДНК (89 фрагментов) в диапазоне 33,68-593,78 п.н.

Целью работы было выполнение геномного AFLP-фингерпринтинга коммерческого штамма *Aspergillus niger* Л-4 — продуцента лимонной кислоты с использованием 12 комбинаций праймеров и создание уникального генетического паспорта штамма, который можно использовать для его аутентификации.

**Методика.** Объектом исследований были конидии осмофильного промышленного штамма *Aspergillus niger* Л-4 (коллекция Всероссийского НИИ пищевых добавок).

Для выделения ДНК исследуемый материал переносили в ступку и тщательно гомогенизировали с помощью пестика. Затем замораживали, размораживали, растирали пестиком и снова замораживали, процедуру повторяли 4 раза. К гомогенату добавляли 500 мкл 2× СТАВ буфера (2 % СТАВ, 1,4 М NaCl, 20 мМ EDTA, 100 мМ Трис-HCl, pH 8,0), переносили содержимое в эппендорф (1,5 мкл) и инкубировали 60 мин при температуре 65 °С, периодически встряхивая на вортексе. Экстракцию проводили 2-кратно, используя смесь хлороформа и изоамилового спирта (24:1, v/v). ДНК осаждали равным объемом изопроанола (5 мин при комнатной температуре), отделяли центрифугированием (2 мин, 14000 об/мин), удаляли надосадочную жидкость и подсушивали осадок при комнатной температуре. Далее растворяли осадок в 200 мкл 70 % этанола, центрифугировали 7 с и удаляли спирт. Осадок ДНК подсушивали при комнатной температуре и ресуспендировали в 50 мкл H<sub>2</sub>O(MQ). Полученную ДНК хранили при температуре -20 °С.

Для очистки всей выделенной ДНК проводили ее электрофорез в 1 % агарозном геле. К образцу добавляли λ/HindIII Marker (0,5 мкг/мкл, «Fermentas», США) и краситель для нанесения DNA Gel Loading Dye («Thermo Scientific», США) (1 мкл маркера смешивали с 5 мкл красителя). Электрофорез выполняли в камере Sub Cell GT («Bio-Rad», США) в течение 60 мин при 100 В. Фрагмент геля, содержащий геномную ДНК, вырезали и переносили в эппендорф. Добавляли растворитель агарозы (3 М гуанидинизотиоцианат — GITS, 20 мМ EDTA, 10 мМ Трис-HCl, pH 6,8; Тритон X-100 до концентрации 40 мг/мл) в 3-кратном объеме относительно объема фрагмента геля (общий объем 500 мкл). Пробирки на 5 мин помещали в термостат при температуре 65 °С, периодически перемешивая. Затем в расплавленный фрагмент вносили 40 мкл реактива Silica («Fermentas», США), оставляли на вортексе на 15 мин и центрифугировали 1 мин при 2700 об/мин. После первого центрифугирования надосадочную жидкость сливали, после повторного отбирали супернатант иглой, после третьего выбирали супернатант досуха. Сухой осадок промывали в 250 мкл раствора (25 % этанола, 25 % изопроанола, 100 мМ NaCl, pH 8,8) и центрифугировали 1 мин при 2700 об/мин. Жидкость сливали досуха. Далее про-

мывали в 200 мкл 96 % этанола и аналогичным образом удаляли надосадочную жидкость. Высушивали 10-15 мин до исчезновения запаха спирта и растворяли осадок в 15 мкл элюирующего раствора (10 mM Трис-HCl, pH 8,0). Выдерживали 5 мин при 65 °С, затем на вортексе при комнатной температуре в течение 15 мин и снова 5 мин при 65 °С, после чего центрифугировали 1 мин при 14000 об/мин и отбирали супернатант без осадка в чистые эппендорфы. Для определения концентрации ДНК применяли электрофорез в 1 % агарозном геле: в лунки помещали 3 мкл ДНК и 1 мкл красителя для нанесения. Использовали  $\lambda$ /HindIII Marker (0,5 мкг/мкл; 1 мкл маркера смешивали с 5 мкл красителя). Электрофорез проводили в течение 60 мин при 100 В.

Полученную очищенную геномную ДНК использовали для одновременной реакции рестрикции и лигирования. В состав реакционной смеси входили по 2,5 ед. рестриктаз EcoRI и MseI («Thermo Scientific», США); 2,5 ед. лигазы фага T<sub>4</sub> («Thermo Scientific», США); два олигонуклеотидных адаптера для каждого сайта — для EcoRI (adEco1 CTCGTTAGAC-TGCGTACC и adEco2 AATTGGTACGCAGTCTAC) и для MseI (adMse1 GACGAGAGTCCTGAG и adMse2 TACTCAGGACTCAT), по 5 пмоль каждого; 10 мкл тестируемой ДНК. Реакцию проводили в буфере для лигазы («Thermo Scientific», США) при 37 °С в течение 18 ч.

Для финальной амплификации, результатом которой были геномные фингерпринты, в реакционную смесь (4 мкл), полученную на стадии рестрикции и лигирования, вносили 2,5 мкл 10× буфера для полимеразы, 2,5 мкл 1,5 mM dNTPs, два селективных праймера (по 10 пмоль каждого), один из которых был помечен красителем FAM, 1 ед. Taq ДНК полимеразы («Fermentas», США). Использовали все возможные комбинации праймеров: Mse\_0 GATGAGTCCTGAGTAA, Mse\_c GATGAGTCCTGAGTAAC, Mse\_g GATGAGTCCTGAGTAAG, Mse\_t GA-TGAGTCCTGAGTAAT, Mse\_ct GATGAGTCCTGAGTAACT, Mse\_cc GAT-GAGTCCTGAGTAACC — для сайта MseI; Eco\_0 (FAM) GACTGCGTACCAATT, Eco\_ac (FAM) GAC-TGCGTACCAATTAC — для сайта EcoRI. Амплификацию выполняли в приборе T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Режим ПЦР: 50 °С 5 с, 60 °С 5 с, 70 °С 2 мин, 95 °С 1 мин 30 с; 34 цикла в режиме 94 °С 30 с, 55 °С 30 с, 72 °С 1 мин 30 с; 72 °С 2 мин.

Результаты предварительно оценивали с помощью электрофореза в 3 % агарозном геле. Вносили 3 мкл ДНК с 1 мкл красителя для нанесения. Использовали маркер молекулярных масс GeneRuler 100bp DNA Ladder («Fermentas», США; 0,5 мкг/мкл). Электрофорез проводили в течение 3 ч при 100 В.

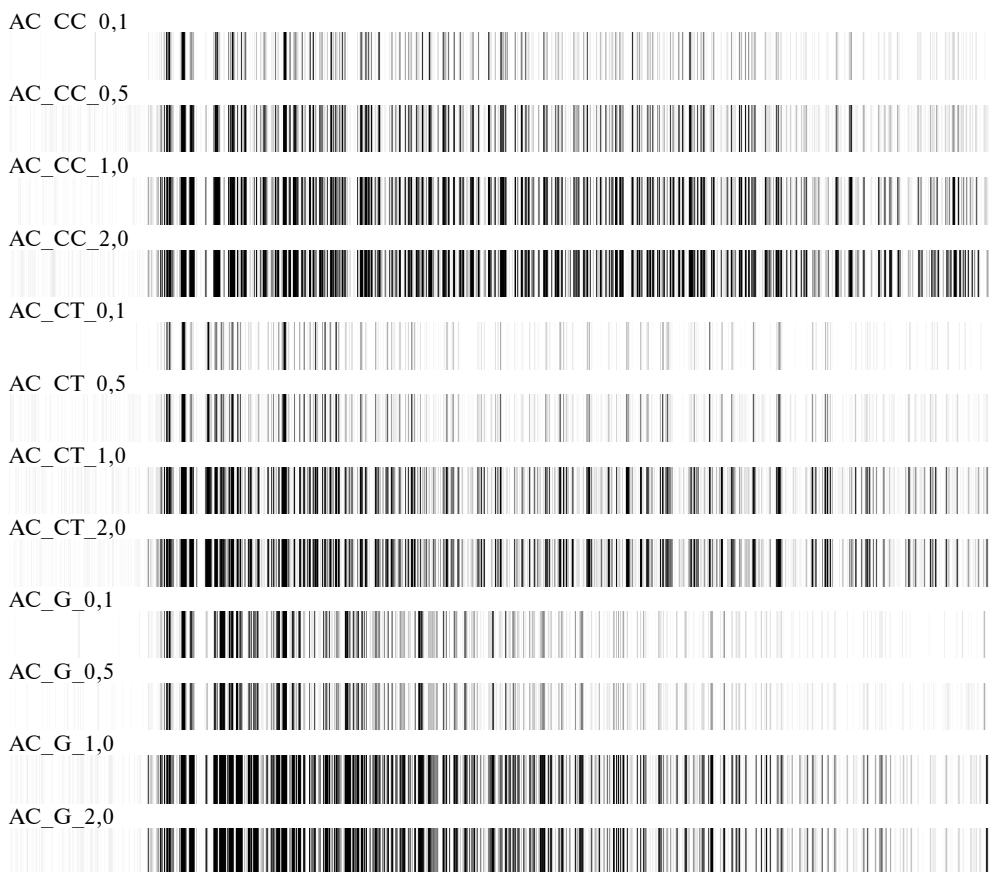
Автоматический капиллярный электрофорез выполняли на генетическом анализаторе ABI3500xl («Applied Biosystems», США). Использовали интегральный маркер молекулярных масс GeneScan-600 LIZ Size Standard («Applied Biosystems», США). Вносили по 0,1; 0,5; 1,0 и 2,0 мкл образца тестируемой ДНК. После электрофоретического разделения фрагментов полученные файлы обрабатывали с помощью программы BIONUMERICS 7.5 («Applied Maths», США).

*Результаты.* Изучаемый штамм Л-4 выделен после комбинированного мутагенного воздействия 1,4-бис-диазоацетилбутана (13 % раствор в течение 3 ч) и УФ-облучения в дозе 3,3 тыс. эрг/мм на исходный штамм *A. niger* Л-1 (коллекция Всероссийского НИИ пищевых добавок) (23). Штамм образует лимонную кислоту в количестве не менее 10 г · дм<sup>-3</sup> · сут<sup>-1</sup> на среде с мелассой, обладает высокой кислотообразующей способностью при ферментации сахарозо-минеральной среды (не менее 16 г · дм<sup>-3</sup> · сут<sup>-1</sup>)

и среды на основе гидролизатов кукурузного, картофельного, пшеничного, ржаного или соргового крахмала (не менее  $18 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$ ). Штамм под-держивается культивированием на сусло-агаре (пересев 1 раз в год), кроме того, в виде сухих конидий с остаточной влажностью 10 % (срок хранения 9 мес) при 16–20 °С, а также в виде сухих конидий с остаточной влажностью 10 % и спорулирующего мицелия при температуре от –18 до –20 °С с периодичностью посева 2 года. Долгосрочное хранение штамма осуществляется при –80 °С в уникальной научной установке (УНУ) «Станция низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов» («Liconic Instruments», Лихтенштейн) в коллекции ВКСМ (24).

На основании предварительной оценки профилей, полученных с использованием 12 комбинаций праймеров, для дальнейшей работы выбрали три наиболее результативные пары, которые генерировали максимальное число фрагментов ДНК: Mse\_ct GATGAGTCCTGAGTAACT и Eco\_ac (FAM) GACTGCGTACCAATTAC; Mse\_cc GATGAGTCCTGAGTAACT и Eco\_ac (FAM) GACTGCGTACCAATTAC; Mse\_g GATGAGTCCTGAGTAACT и Eco\_ac (FAM) GACTGCGTACCAATTAC.

Результаты автоматического капиллярного электрофореза, проведенного на генетическом анализаторе ABI3500xl, представлены на рисунке, формализованные результаты анализа (по размерам амплифицированных фрагментов для каждого варианта) суммированы в таблице.



**AFLP-профили ДНК штамма *Aspergillus niger* Л-4, полученные методом автоматического капиллярного электрофореза при использовании трех наиболее результативных пар праймеров: AC\_CC; AC\_CT и AC\_G — соответственно пары праймеров Mse\_cc/Eco\_ac, Mse\_ct/Eco\_ac и Mse\_g/Eco\_ac; 0,1; 0,5; 1,0 и 2,0 — объем вносимой пробы тестируемой ДНК, мкл.**

Формализованные результаты AFLP-фингерпринтинга для штамма *Aspergillus niger* Л-4 в виде размеров амплифицированных фрагментов для трех наиболее результативных пар праймеров

Фрагмент, п.н.	Mse cc/Eco ac		Mse ct/Eco ac		Mse g/Eco ac	
	AC CC 0,1	AC CC 2,0	AC CT 0,1	AC CT 2,0	AC G 0,1	AC G 2,0
593,78	1	1	1	1	1	1
590,69	1	1	1	1	1	1
588,22	1	1	1	1	1	1
580,43	1	1	1	1	1	1
578,20	1	1	0	1	1	1
573,78	1	1	1	1	1	1
571,43	1	1	1	1	1	1
569,00	1	1	1	1	1	1
565,78	1	1	1	1	1	1
562,58	1	1	0	0	1	1
556,26	1	1	0	0	1	1
549,43	1	1	0	0	1	1
545,95	1	1	0	0	1	1
543,39	1	1	0	0	1	1
540,70	1	1	0	0	1	1
534,38	1	1	1	1	1	1
528,60	1	1	1	1	1	1
522,89	1	1	1	1	1	1
518,91	1	1	0	0	1	1
517,94	1	1	1	1	1	1
516,98	1	1	1	1	1	1
515,58	1	1	1	1	1	1
509,15	1	1	1	1	1	1
497,64	1	1	1	1	1	1
493,11	1	1	1	1	1	1
489,14	1	1	1	1	1	1
486,67	1	1	0	0	1	1
483,85	1	1	1	1	1	1
482,60	1	1	1	1	1	1
478,11	1	1	1	1	1	1
471,57	1	1	0	1	1	1
468,29	1	1	0	1	1	1
465,09	1	1	0	0	1	1
461,17	1	1	0	0	1	1
457,84	1	1	1	1	1	1
453,14	1	1	0	0	1	1
449,77	1	1	0	0	1	1
443,78	1	1	1	1	1	1
439,16	1	1	0	0	1	1
435,39	1	1	1	1	1	1
429,90	1	1	0	0	1	1
424,21	1	1	1	1	1	1
418,49	1	1	1	1	1	1
417,20	1	1	0	0	1	1
415,40	1	1	0	0	1	1
409,27	1	1	0	0	1	1
399,10	1	1	0	0	1	1
392,88	1	1	0	0	1	1
388,44	1	1	0	1	1	1
384,48	1	1	1	1	1	1
375,76	1	1	0	0	1	1
356,98	1	1	0	0	1	1
346,87	1	1	0	0	1	1
339,88	1	1	0	0	1	1
334,86	1	1	0	0	1	1
326,17	1	1	0	0	1	1
320,14	1	1	1	1	1	1
318,12	1	1	0	0	1	1
316,96	1	1	0	0	1	1
316,00	1	1	0	0	1	1
313,58	1	1	0	0	1	1
310,47	1	1	0	0	1	1
298,28	1	1	0	0	1	1
285,23	1	1	0	0	1	1
273,72	1	1	0	0	1	1
268,38	1	1	1	1	1	1
263,05	1	1	0	0	1	1
256,30	1	1	0	1	1	1
252,72	1	1	1	1	1	1

					Продолжение таблицы	
250,88	1	1	0	0	1	1
247,40	1	1	0	0	1	1
244,32	1	1	0	0	1	1
238,09	1	1	1	1	1	1
230,24	1	1	0	1	1	1
219,86	1	1	1	1	1	1
217,75	1	1	0	0	1	1
216,46	1	1	1	1	1	1
212,77	1	1	1	1	1	1
192,39	1	1	0	0	1	1
183,90	1	1	0	0	1	1
172,12	1	1	1	1	1	1
152,41	1	1	0	1	1	1
141,73	1	1	1	1	1	1
130,64	1	1	1	1	1	1
117,54	1	1	1	1	1	1
116,81	1	1	1	1	1	1
53,37	1	1	1	1	0	0
34,85	1	1	0	0	0	0
33,68	1	1	0	0	0	0

Примечание. AC\_СС, AC\_СТ и AC\_G — соответственно 1-я, 2-я и 3-я пары праймеров Mse\_сc/Eco\_ас, Mse\_ct/Eco\_ас и Mse\_g/Eco\_ас соответственно; 0,1 и 2,0 — объем вносимой пробы, мкл.

Можно видеть, что оптимальная пара праймеров для изученной культуры — Mse\_сc GATGAGTCCTGAGTAACC и Eco\_ас (FAM) GAC-TGCGTACCAATTAC, которая обеспечивает максимальное число фрагментов ДНК в диапазоне 33,68-593,78 п.н. (89 фрагментов) при соблюдении описанной методики проведения фингерпринтинга и параметров компьютерной обработки результатов. AFLP-профили с использованием выбранной пары не зависят от объема вносимой пробы. Следует отметить, что в 2015 году при масштабном изучении генетического разнообразия штаммов *Aspergillus flavus* было отмечено формирование ими уникальных AFLP-профилей, однако аспекты практического использования этого феномена не обсуждались (25).

Таким образом, впервые для молекулярно-генетической паспортизации промышленного штамма микромицета *Aspergillus niger* Л-4 оптимизирован и применен метод AFLP-фингерпринтинга. Полученные AFLP-профили можно использовать для аутентификации штамма *Aspergillus niger* Л-4, взятого из разных источников, при условии проведения сравнительного анализа по месту выполнения представляемого исследования. Разработанный метод может быть использован для получения генетических паспортов у других штаммов *Aspergillus*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sapers G.M., Miller R. Heated ascorbic/citric acid solution as browning inhibitor for pre-peeled potatoes. J. Food Sci., 1995, 63: 762-766 (doi: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb06223.x).
2. Limbo S., Piergiovanni L. Shelf life of minimally processed potatoes. Part 1. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acids on enzymatic browning. Postharvest Biology and Technology, 2006, 39(3): 254.
3. Wichrowska D., Rogozińska I., Pawelzik E. Concentrations of some organic acids in potato tubers depending on weed control method, cultivar and storage conditions. Polish J. of Environ. Stud., 2009, 18(3): 487-491.
4. Ananou S., Maqueda M., Martinez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E. Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology, 2007, 45: 19-23.
5. Nielsen M.K., Arneborg N. The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. Food Microbiology, 2007, 24: 101-105 (doi: 10.1016/j.fm.2006.03.005).
6. Пермитина Г.В., Верёвкин Е.Л. Способ получения концентрированного раствора хелата железа и хелат железа. Патент 2278868 РФ, МПК 51 C07F15/02, C07C229/16, C07C227/16, C05D9/02. Заявл. 18.02.2005. Опубл. 27.06.2006.

7. Никифорова Т.А., Мушников Л.Н., Львова Е.Б. Основы микробного синтеза лимонной кислоты. СПб, 2005.
8. Willems A., Doignon-Bourcier F., Coopman R., Hoste B., de Lajudie P., Gillis M. AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. *System. Appl. Microbiol.*, 2000, 23: 137-147 (doi: 10.1016/S0723-2020(00)80055-7).
9. Wdowiak-Wróbel S., Małek W. Genomic diversity of *Astragalus cicer* microsymbionts revealed by AFLP fingerprinting. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2005, 51: 369-378.
10. Safronova V., Chizhevskaya E., Bullitta S., Andronov E., Belimov A., Charles T.C., Lindström K. Presence of a novel 16S-23S rRNA gene intergenic spacer insert in *Bradyrhizobium canariense* strains. *FEMS Microbiol. Letters*, 2007, 269: 207-212.
11. Aserse A.A., Räsänen L.A., Assefa F., Hailemariam A., Lindström K. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2012, 35: 120-131 (doi: 10.1016/j.syapm.2011.11.005).
12. Safronova V.I., Kimeklis A.K., Chizhevskaya E.P., Belimov A.A., Andronov E.E., Pinaev A.G., Pukhaev A.R., Popov K.P., Tikhonovich I.A. Genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the relic species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 105: 389-399 (doi: 10.1007/s10482-013-0089-9).
13. Mahmood T., Masud T., Imran M., Ahmed I., Khalid N. Selection and characterization of probiotic culture of *Streptococcus thermophilus* from Dahi. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2013, 64(4): 494-501 (doi: 10.3109/09637486.2012.749840).
14. Li Y., Canchaya C., Fang F., Raftis E., Ryan K.A., van Pijkeren J.-P., van Sinderen D., O'Toole P.W. Distribution of megaplasmids in *Lactobacillus salivarius* and other lactobacilli. *J. Bacteriol.*, 2007, 189(1): 6128-6139 (doi: 10.1128/JB.00447-07).
15. Kudo Y., Oki K., Watanabe K. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii* subsp. nov., isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, 62: 2643-2649 (doi: 10.1099/ijs.0.037051-0).
16. Martínez-Peca M.D., Castro-Escarpulli G., Aguilera-Arreola M.G. *Lactobacillus* species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study. *BMC Infect. Dis.*, 2013, 13: 189-197 (doi: 10.1186/1471-2334-13-189).
17. Kathuria S., Sharma C., Singh P.K., Agarwal P., Agarwal K., Hagen F., Meis J.F., Chowdhary A. Molecular epidemiology and in-vitro antifungal susceptibility of *Aspergillus terreus* species complex isolates in Delhi, India: Evidence of genetic diversity by amplified fragment length polymorphism and microsatellite typing. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118997 (doi: 10.1371/journal.pone.0118997).
18. Chiotta M.L., Reynoso M.M., Torres A.M., Combina M., Chulze S.N. Molecular characterization and toxicogenetic profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from the main grape-growing regions in Argentina. *J. Appl. Microbiol.*, 2011, 110(2): 445-454 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04898.x).
19. Xia X., Lie T.K., Qian X., Zheng Z., Huang Y., Shen Y. Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. *Microb. Ecol.*, 2011, 61(3): 619-625 (doi: 10.1007/s00248-010-9770-y).
20. Larralde-Corona C.P., Santiago-Mena M.R., Sifuentes-Rincón A.M., Rodríguez-Luna I.C., Rodríguez-Pérez M.A., Shirai K., Narváez-Zapata J.A. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 80(1): 167-177 (doi: 10.1007/s00253-008-1532-0).
21. Paun O., Schönswetter P. Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. *Methods Mol. Biol.*, 2012, 862: 75-87 (doi: 10.1007/978-1-61779-609-8\_7).
22. Сафронова В.И., Чижевская Е.П., Андронов Е.Е. Разработка методики молекулярно-генетической паспортизации штаммов сельскохозяйственных микроорганизмов с помощью AFLP-фингерпринтинга. *Сельскохозяйственная биология*, 2012, 6: 116-121.
23. Ермакова В.П., Шербакова Е.Я., Василинец И.М., Финько В.М., Шушкевич Т.Н. Патент 975799 РФ, МКИ C12N 15/00, C 12P 7/48 Штамм гриба *Aspergillus niger* Л-4 — продуцент лимонной кислоты. Заявл. 13.06.80. Оpubл. 23.11.82.
24. Safronova V., Tikhonovich I. Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long-term authorized depositing of commercial microbial strains. In: *Microbes in applied research: current advances and challenges* /A. Mendez-Vilas (ed.). World Scientific Publishing Co., Singapore, 2012: 331-334 (doi: 10.1142/9789814405041\_0066).
25. Singh D., Radhakrishnan T., Kumar V., Bagwan N.B., Basu M.S., Dobaria J.R., Mishra G.P., Chanda S.V. Molecular characterisation of *Aspergillus flavus* isolates from peanut fields in India using AFLP. *Braz. J. Microbiol.*, 2015, 46(3): 673-682 (doi: 10.1590/S1517-838246320131115).



## ALFP-FINGERPRINTING FOR PASPORTIZATION OF *Aspergillus niger* L-4, THE CITRIC ACID COMMERCIAL PRODUCER

N.Yu. Sharova<sup>1</sup>, V.I. Safronova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute for Food Additives, Federal Agency of Scientific Organizations, 55, Liteinyi prosp., St. Petersburg, 191014 Russia, e-mail natalya\_sharova1@mail.ru;

<sup>2</sup>All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia

Received January 11, 2016

doi: 10.15389/agrobiology.2016.2.204eng

### Abstract

Citric acid plays an important role in cellular respiration, and participates in oxidation processes as a natural antioxidant and synergist antioxidant, inhibiting plant oxidoreductase, together with ascorbic acid. Citric acid is effective against eukaryotic and bacterial pathogens, and can be used in ensilaging. Citric acid is an antimicrobial agent alternative to fodder antibiotics prohibited in European countries. It is metabolized in plants, animals and humans with no adverse effect. *Aspergillus niger* is the citric acid common producer. So far as cultural and morphological features are not enough to confirm strain authenticity essential for effective commercial product manufacturing, we used genetic pasportization of the strain. Note, in 2015 in wide range genetic study of *Aspergillus flavus* diversity the specific ALFP patterns were found though their practical aspects were not discussed (D. Singh et al., 2015). Herein, we studied osmophilic commercial strain *Aspergillus niger* L-4, the citric acid producer derived due to chemical and UV mutagenesis and spontaneous mutations, using optimized AFLP-fingerprinting with 12 different primers. Specific AFLP patterns were obtained for *Aspergillus niger* L-4 authentication. Mse\_cc GATGAGTCCTGAGTAACC and Eco\_ac (FAM) GACTGCGTACCAATAC primers were shown to be optimal providing maximum number of DNA fragments in the range of 33.68 to 593.78 bp (89 pieces) subject to the described method of fingerprinting and computer processing. The primers are effective regardless of sample volume. The resulting profiles can be used to authenticate the strain *Aspergillus niger* L-4 from different sources.

Keywords: *Aspergillus niger*, citric acid producer, genetic profiling, AFLP-fingerprinting.

### Научные собрания

#### КАЛЕНДАРЬ МЕЖДУНАРОДНЫХ КОНФЕРЕНЦИЙ:

- 2<sup>nd</sup> Livestock Nutrition Conference, July 21-22, 2015 Brisbane, Australia
- 4<sup>th</sup> Aquaculture Conference, September 29- October 01, 2016 London, UK
- 2<sup>nd</sup> Aquaculture Conference, July 11-13, 2016 Kuala Lumpur, Malaysia
- Dairy Conference, June 30-July 02, 2016 New Orleans, USA
- 4<sup>th</sup> Veterinary Conference, November 14-16, 2016 Atlanta, USA
- 3<sup>rd</sup> Veterinary Conference, August 18-20, 2016 London, UK
- 2<sup>nd</sup> Veterinary Conference, October 26-28, 2015 Hyderabad, India
- Global Feed Events IFIF, India
- World Conference on Innovative Animal Nutrition and Feeding, Hungary
- FIAAP International Conference, Germany
- FIAAP International Conference, Thailand
- 17<sup>th</sup> International Conference on Animal Science and Veterinary Medicine, Switzerland
- 1<sup>st</sup> World Conference on Innovative Animal Nutrition and Feeding/WIANF2015, Hungary
- Veterinary Conference, Sri Lanka
- The 13<sup>th</sup> Conference of The Egyptian Society For Cattle Diseases, Egypt
- American Association of Bovine Practitioners 48th Annual Conference, USA
- Federation of Asian Small Animal Veterinary Association Congress 2016, Malaysia
- Livestock Philippines International Conference, Philippines
- International Conference on Feed Efficiency in Swine — ICFES 2015, USA
- International Conference Russian Livestock and Poultry in the New Environmental, Russia
- 12<sup>th</sup> International Conference on Goats, Turkey
- 24<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Ireland
- X International Rangeland Congress, Canada
- Precision Dairy Farming, Netherlands

Информация: <http://www.conferenceseries.com/animal-husbandry.php>