

**ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА  $\alpha$ -АМИЛАЗЫ И ПРОТЕАЗЫ ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *FUSARIUM GRAMINEARUM*****В.А. Кузовлев, Э.О. Абайлдаев\*, К.О. Шарипов, А.А. Хакимжанов**

Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина КН МОН РК, ул. Досмухамедова, 86, г. Алматы, 050012, Казахстан

\*abaildayevaset@gmail.com

**АБСТРАКТ**

Одним из современных подходов в повышении устойчивости злаковых культур к грибковым болезням является изучение гидролитических ферментов патогенов и их белковых ингибиторов в зерне. В последнее время протеазы и амилазы рассматривают как одни из важных факторов патогенности грибов. Для получения этих ферментов фитопатогенный гриб *F. graminearum* выращивали твердофазным способом (solid state fermentation, SSF) с использованием пшеничных отрубей. Максимальное накопление ферментов при внесении  $2,0 \times 10^6$  конидий/мл происходило на 8 день культивирования гриба. Методом аффинной хроматографии были очищены экстрацеллюлярная протеаза и  $\alpha$ -амилаза с молекулярным весом 25 и 29 кДа, соответственно. С помощью специфических ингибиторов установлена принадлежность очищенной протеазы к сериновому трипсин подобному ферменту. По данным изоэлектрофокусирования  $\alpha$ -амилаза состояла из 4-х изоферментов с сильно кислыми значениями pI 3,0-3,5. Определены pH, температурный оптимумы и термостабильность ферментов. Полученные данные для  $\alpha$ -амилазы и протеазы *F. graminearum* приводятся впервые. Результаты исследования могут быть использованы в поиске специфических ингибиторов амилаз и протеаз в зерне, как защитных белков, для их применения в оценке устойчивости сортов пшеницы к грибному поражению.

**Ключевые слова:** *F. graminearum*,  $\alpha$ -амилаза, трипсин подобная протеаза, очистка, физико-химические свойства.

**ВВЕДЕНИЕ**

Фитопатогенные грибы способны продуцировать экстрацеллюлярные ферменты, такие как эндоглюканаза, хитиназа, ксиланаза, целлюлаза, липаза,  $\alpha$ -амилаза, протеаза и ряд других. Эти гидролазы разлагают полимерные вещества объектов, на которых паразитирует гриб, обеспечивая его питание, рост и развитие. Было замечено, что повышенный синтез тех или иных ферментов патогеном в условиях *in vitro* во многом зависит от природы имеющихся в среде полимеров [1]. Так, протеазы лучше синтезируются при наличии в питательной среде белковых субстратов (индукторов), например, таких как казеин, желатин, белки зерна (клейковина), белковые гидролизаты, отруби [2]. Кроме того, уровень протеаз зависит от pH, температуры, наличия и концентрации нитратов и сахаров [3]. Часто в литературе имеются противоречивые сведения по этому вопросу, что указывает на сложную многофакторную регуляцию синтеза и секреции ферментов даже в контролируемых условиях культивирования.

Микроскопические грибы эволюционно адаптировались усваивать различные источники белка, благодаря способности вырабатывать разнообразные протеолитические ферменты, многие из которых секретируются в среду [4]. Внеклеточные протеазы грибов в основном серинового типа и представлены семействами субтилизина и трипсина [5]. Они относятся к щелочным ферментам с молекулярной массой 25-40 кДа. Некоторые исследования свидетельствуют о существовании корреляции между сериновыми (трипсиновыми) протеазами и патогенностью грибов [6]. В дальнейшем эта гипотеза была развита другими работами, где показано участие сериновых протеаз в лизисе клеточных стенок и защитных PR (pathogenesis related) белков растения-хозяина [7].

$\alpha$ -Амилаза – ключевой фермент превращения (гидролиза) крахмала. Некоторые виды *Aspergillus*, *Rhizopus*,

*Streptomyces* являются хорошими источниками фермента. Среди них наиболее известен *Aspergillus niger*, как первый микробный суперпродуцент  $\alpha$ -амилазы [8]. Синтез и секреция фермента сильно зависят от условий культивирования и питательной среды. Для многих почвенных изолятов грибов и *A. niger* была показана высокая активность экстрацеллюлярной  $\alpha$ -амилазы при использовании крахмалистого сырья, в частности, рисовых и пшеничных отрубей в качестве углеродного источника. Оптимум действия грибных ферментов лежит в кислой и нейтральной области pH, а молекулярный вес колеблется, в основном, в диапазоне от 40 до 60 кДа [9]. Амилолитические ферменты фитопатогенов рода *Fusarium* относительно слабо изучены. Имеются лишь некоторые сведения по свойствам *F. verticillioides* и *F. solani* [10, 11].

Представители нитчатых грибов рода *Fusarium* поражают в основном зерновые культуры. Эта проблема актуальна для многих регионов мира, в т. ч. и Казахстана, где фузариозы широко распространены, причиняя большой урон урожаю. Одними из основных гидролитических ферментов этих грибов являются  $\alpha$ -амилазы и протеазы, переводящие запасные нерастворимые полимеры крахмал и протеин в легкоусвояемые вещества – сахара и аминокислоты [12]. Проблема фузариозного зерна весьма злободневна, поскольку такое зерно полностью не пригодно для употребления в пищу из-за присутствия трихотененов, включая дезоксиниваленол (ДОН), ниваленол (НИВ) и их ацетилированные производные 15-ацетил дезоксиниваленол (15-АДОН), 3-ацетил дезоксиниваленол (3-АДОН) [13]. Анализ литературных данных показывает, что в настоящее время  $\alpha$ -амилазы и протеазы фитопатогенов и их ингибиторы из зерна, в связи с большой теоретической и практической значимостью, интенсивно изучаются во всем мире. Использование этих защитных белков-ингибиторов в тестировании сортов пшеницы на устойчивость к грибному поражению представляется ак-

туальным и перспективным.

Цель настоящего исследования - подбор условий культивирования гриба *F. graminearum* с высокой продукцией  $\alpha$ -амилазы и сериновой протеазы, их очистка и определение некоторых физико-химических свойств. Данная работа является необходимым этапом для поиска, идентификации и применения специфических белковых ингибиторов изучаемых ферментов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследований** – фитопатогенный гриб *F. graminearum* (штамм FRKM 0142), полученный из Республиканской коллекции микроорганизмов.

### Культивирование гриба *F. graminearum* и отбор проб

Для лабораторного культивирования гриба использовали 500 мл колбы с двумя вариантами твердофазной питательной среды (ПС): 1 – 6 колб с пшеничными отрубями (12 г), 2 – 6 колб отруби с добавлением 0,36 г пшеничного глютена (Sigma-Aldrich, США). В колбы заливали по 12 мл минерального раствора, содержащего 0,15 г  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,025 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 мг  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  с pH 5,5. Среды перемешивали, стерилизовали 25 мин при 120°C и после охлаждения инокулировали конидиями *F. graminearum* в концентрации  $6,0 \times 10^6$  в 3 мл 0,01 % Tween 80. Выращивание вели в течение 12 дней и с интервалом в 2 суток проводили забор проб. К 1,5 г отобранного образца добавляли 7,5 мл дистиллированной воды, инкубировали 10 мин и измеряли pH. После этого добавляли 0,375 мл 1 М Tris-HCl pH 7,0, перемешивали и инкубировали 1 ч. Смесь центрифугировали 20 мин при 10000×g и полученную надосадочную жидкость фильтровали на нитроцеллюлозном фильтре с диаметром пор 0,2 мкм. Образцы обессоливали на колонке Centri Pure P-25 (Serva, Германия) с 0,01 М Tris-HCl pH 7,0 и хранили при -20°C до использования.

### Получение проростков пшеницы и экстракция $\alpha$ -амилазы.

Получение проростков пшеницы проводили, как описано ранее [14] при  $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 5 суток. Зерно стерилизовали 5% перекисью водорода в течение 15 мин, промывали водой и гомогенизировали в 0,05 М Na-ацетатном буфере (pH 5,0), при соотношении 1:3. Гомогенат инкубировали при 4°C в течение 2 ч и центрифугировали при 10000×g в течение 15 мин. После этого экстракт прогревали при 70°C 10 мин для инактивирования  $\beta$ -амилазы и центрифугировали при 10000×g 15 мин [15]. Экстракт хранили при -20°C до использования.

### Определение активности $\alpha$ -амилазы и протеазы

Амилазную активность определяли йод-крахмальным методом [16]. Контрольная реакционная смесь содержала 0,3 мл воды, 0,1 мл 0,5М ацетатного буфера pH 5,0, 0,1 мл зернового экстракта, 0,5 мл 0,02 % растворимого картофельного крахмала (Sigma, США) в 0,05 М Na-ацетатном буфере pH 5,0, 0,8 мл 10 % уксусной кислотой и 0,2 мл 0,2 %  $\text{I}_2$  в 2 % KI. Опытная реакционная смесь содержала все указанные выше компоненты за исключением уксусной кислоты и 0,2 мл 0,2 %  $\text{I}_2$  в 2 % KI. Инкубацию реакционной смеси проводили от 5 до 30 мин при 30°C. Реакцию останавливали добавлением 0,8 мл 10% уксусной

кислоты и 0,2 мл 0,2 %  $\text{I}_2$  в 2% KI. За единицу  $\alpha$ -амилазной активности принимали разницу в оптической плотности между контролем и опытом при длине волны  $\lambda=620$  нм в 1 мл реакционной смеси за 1 ч.

Неспецифическую протеазную активность определяли согласно методу в нашей модификации [17]. Контрольная реакционная смесь содержала 0,3 мл воды, 0,1 мл 0,5 М Tris-HCl pH 7,8, 0,1 мл 0,5 мл 0,5 % гемоглобина (Sigma, США) в 0,05 М Tris-HCl pH 7,8, 1 мл 10 % ТХУ. Опытная реакционная смесь содержала все указанные выше компоненты за исключением ТХУ. Инкубирование проводили в течение 2 ч при 40°C. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 10 % ТХУ. После центрифугирования при 5000×g в течение 30 мин измеряли оптическую плотность при  $\lambda=280$  нм. За 1 единицу протеазной активности принимали разницу в оптической плотности между опытом и контролем в 1 мл реакционной смеси за 1 ч.

Эксперименты и измерения ферментной активности проводились в трех повторностях. Данные графиков и таблицы представлены средними арифметическими значениями и их стандартными отклонениями.

### Определение влажной биомассы мицелия

Определение влажной биомассы мицелия проводили методом взвешивания [18]. В колбы (30 шт.) объемом 500 мл помещали по 12 г пшеничных отрубей размером 0,5-1 мм. В другие колбы (30 шт.) вносили 12 г пшеничных отрубей и 360 мг пшеничного глютена (Sigma; США). В среды с отрубями без глютена и с глютенем добавляли 12 мл солевого раствора ( $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  - 0.15г/100мл,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.025 г/100мл,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 1мг/100мл с pH 5.5). Среды гомогенно распределяли перемешиванием отрубей стеклянной палочкой и стерилизовали 25 мин при 120°C. После охлаждения инокулировали конидиями *F. graminearum* в количестве  $6,0 \times 10^6$  в 3 мл 0,01 % Tween 80. Колбы со средой взвешивали для определения исходной массы. Инкубацию проводили в термостате при 30°C в темноте 12 суток. Через каждые 2 суток колбы со средой взвешивали для определения их массы. Разницу в росте биомассы мицелия определяли как разницу в весе между исходной и экспериментальной колбой. Данные на графике и в таблице представлены средними арифметическими значениями и их стандартными отклонениями. Остаток среды в колбах с мицелием использовали для осаждения белков сульфатом аммония.

### Осаждение белков сульфатом аммония

Питательные среды из 30 колб с общей массой 200 г инкубировали 2 ч при 4°C в 1 л 0,05 М Na-ацетатного буфера, pH 5,0 и центрифугировали 15 мин при 3000×g. Белок из надосадочной жидкости объемом 0,75 л осаждали сульфатом аммония в пределах насыщения до 80 % 24 ч при 4°C и центрифугировали 30 мин при 3000×g. Диализованный против 0,01 М Tris-HCl с pH 7,0 белок (суммарно около 80 мл) хранили при -20°C для дальнейшей очистки ферментов.

### Очистка $\alpha$ -амилазы

Очистку  $\alpha$ -амилазы гриба *F. graminearum* проводили на  $\beta$ -cyclodextrin-Sepharose (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции производителя [19, 20]. На колонку размером (1,0×5 см) с аффинным сорбентом (5 мл), урав-

новешенной 0,05 М Na-ацетатным буфером, pH 5,5 с 2 mM CaCl<sub>2</sub> наносили 1 мл белка после осаждения сульфатом аммония и диализа. Связывание  $\alpha$ -амилазы с аффинным сорбентом вели в течение 30 мин, после чего колонку промывали стартовым буфером для удаления неспецифических белков.  $\alpha$ -Амилазу элюировали 7 mM  $\beta$ -циклодекстрином. Фракции (2 мл) с амилазной активностью объединяли, обессоливали на колонке Centri Pure P-25 и концентрировали на ультрафильтрационной ячейке Amicon (Millipore, США) на мембране UM 10. Хроматографию вели со скоростью потока 25 мл/час при 4 °С. Очистку  $\alpha$ -амилазы гриба *F. graminearum* проводили 6 раз. Фермент хранили при -20° С до использования.

#### Очистка протеазы

Очистку протеазы гриба *F. graminearum* проводили на benzamidin-Sepharose (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции производителя (instructions 71-5020-61 AC) [20]. Колонку (1,0×5 см) с аффинным сорбентом (5 мл) уравновешивали 0,05 М Tris-HCl буфером, pH 7,8 и наносили 1 мл белка после осаждения сульфатом аммония и диализа. Связывание протеазы с аффинным сорбентом вели в течение 30 мин, после чего колонку промывали 0,05 М Na-ацетатным буфером, pH 5,5 с 0,5 М NaCl для удаления неспецифических белков. Протеазу элюировали 40 mM уксусной кислотой, которую быстро нейтрализовали 0,2 М NaOH до pH 7,0. Фракции (2 мл) с протеазной активностью объединяли, обессоливали и концентрировали. Хроматографию вели со скоростью потока 25 мл/час при 4 °С. Очистку протеазы гриба *F. graminearum* проводили 6 раз. Фермент хранили при -20° С до использования.

#### Действие класс-специфических ингибиторов на очищенную протеазу

Протеазу инкубировали 30 мин при комнатной температуре со следующими ингибиторами: E-64 (N-[N-(L-3-транс-карбоксиян-2-карбонил)-L-лейцил] агматин, 10 мкМ; пепстатин А, 10 мкМ; ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид), 1 мМ; ДФП (диизопропилфторфосфат), 1 мМ; ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), 2 мМ; соевый трипсиновый ингибитор (Sigma-Aldrich, США), 0,1 мМ. После этого активность протеазы определяли по методу, как было описано выше. За 100 % принимали активность фермента без добавления ингибиторов.

#### Электрофорез и изоэлектрофокусирование ферментов

Денатурирующий электрофорез белков в ПААГ с додецилсульфатом натрия (ДДС-Na<sub>2</sub>) проводили на приборе TV100Y (Scie-plas, Англия) в пластинах 12% ПАГ размером 100×80×1мм по методу Лэммли. После электрофореза пластины фиксировали в 12,5% ТХУ 1 ч и окрашивали 0,15 % кумасси бриллиантовым голубым G-250. Для определения молекулярного веса (М. в.) использовали белки-маркеры (Serva, Германия).

Нативное ИЭФ  $\alpha$ -амилазы проводили в пластине 6% ПАГ размером 90×120×1 мм с 1% Servalat pH 3-10 (Serva, Германия) при 500 В в течение 5 ч в камере для электрофореза Multiphor II (GE Healthcare, Швеция). По окончании ИЭФ гели инкубировали в 1 % растворе крахмала в течение 1 ч при 4°С с последующим проявлением зон активности фермента раствором I<sub>2</sub>/KI. Для ИЭФ исполь-

зовали  $\alpha$ -амилазу из *Bacillus licheniformis*, *Human saliva* (Sigma, США) и из прорастающего (5 суток) зерна пшеницы, а в качестве маркеров рI - набор белков (Serva, Германия). Нативный электрофорез  $\alpha$ -амилазы проводили в стеклянных трубках 7,5% ПААГ в трис-глициновой буферной системе при 500 В в течение 1,5 ч по методу [16]. После электрофореза гели окрашивали таким же способом, как и в случае ИЭФ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение и применение твердофазной ферментации (solid state fermentation, SSF) и погружного способа культивирования (submerged fermentation, SMF) в настоящее время вызывает значительный интерес у ученых и практиков [21, 22, 23]. Для высокого продуцирования ферментов грибами важное значение имеет подбор подходящей питательной среды культивирования.

С целью получения  $\alpha$ -амилазы и протеазы гриба *F. graminearum*, в нашей работе для твердофазного культивирования был использован компонентный состав среды Чапек-Докс с некоторой модификацией. Из состава был исключен нитрат натрия, а 3 % сахара была заменена на 1 % глюкозу. По некоторым данным нитраты и относительно высокие концентрации сахаров могут выступать в качестве репрессоров синтеза некоторых гидролаз, в т. ч. амилаз и протеаз [24, 25]. Таким образом, базовая минеральная среда включала 1,5 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 г FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O на 100 мл воды с добавлением 1 г глюкозы. Количество вносимого инокулюма в одну колбу в конечной концентрации – 6,0×10<sup>6</sup> в 3 мл 0,01% Tween 80. В качестве субстрата и индуктора ферментов были использованы пшеничные отруби и глютен.

В первом эксперименте исследована динамика роста массы мицелия и изменения pH среды в период одного цикла культивирования *F. graminearum* на твердофазной среде. Из представленных данных четко прослеживалась связь накопления биомассы с увеличением pH с максимумом к концу культивирования – на 10-12 сутки (рисунок

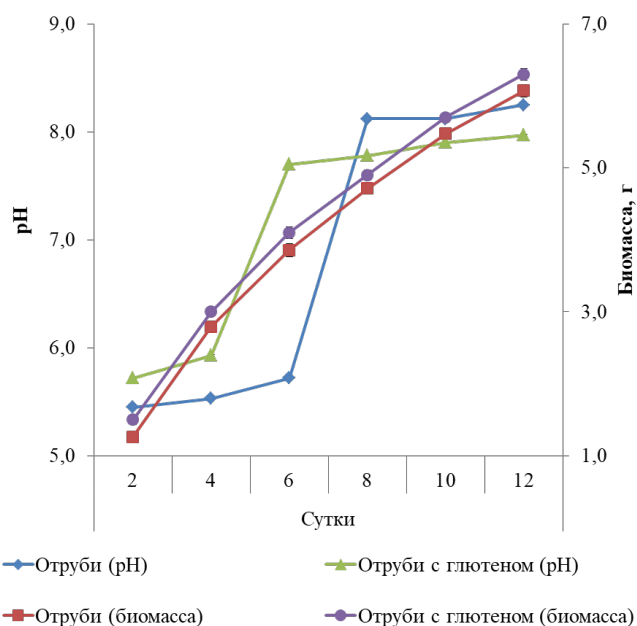


Рисунок 1 - Изменение pH и биомассы *F. graminearum*, культивируемого на твердофазной среде

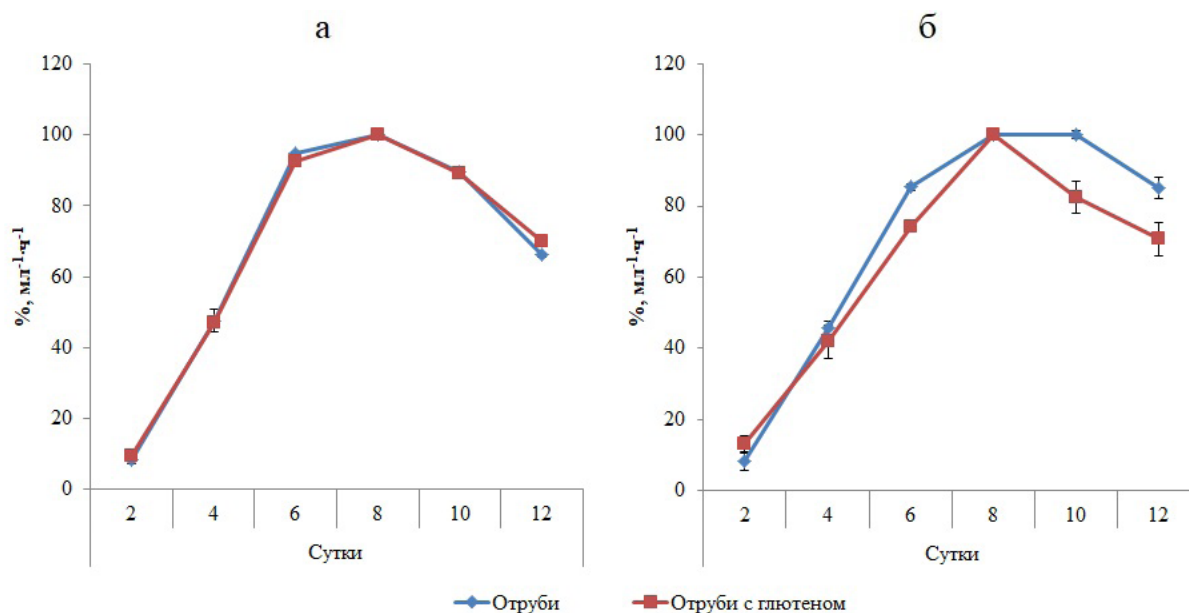


Рисунок 2 - Влияние субстратов на активность  $\alpha$ -амилазы (а) и протеазы (б) *F. graminearum*

1). При этом характер изменчивости рН в двух вариантах субстрата несколько отличался. В варианте с отрубями резкий рост рН наблюдался на 6 сутки, а в варианте с добавлением глютена – позже, на 8 сутки.

В следующем эксперименте исследовалась динамика продуцирования грибом *F. graminearum*  $\alpha$ -амилазы и протеазы в период культивирования. Амилазная активность достигала максимума на 8 сутки, а протеазная – на 8 (отруби+глютен) и 10 (отруби) сутки, после чего постепенно снижалась (рисунок 2). В целом, добавка в ПС глютена хоть и не значительно (10-15%), но повышала продуцирование грибом обоих ферментов. Таким образом, как сами пшеничные отруби, так и их сочетание с пшеничным глютенем хорошо усваиваются грибом и являются эффективным индуктором синтеза и секреции  $\alpha$ -амилазы и протеазы.

После выполненного аналитического варианта, где были оптимизированы режимы культивирования *F. graminearum*, была проведена наработка препаративного количества  $\alpha$ -амилазы и протеазы. Питательные среды из-под гриба, выращенного на отрубях с глютенем, собранные из 30 колб объединяли, добавляли Na-ацетатный буфер рН 5,0 до конечной концентрации 0,05 М и инкубировали в течение 2 ч с постоянным перемешиванием при 4°C. Затем центрифугированием удаляли отруби и глютен, а белки надосадочной жидкости осаждали и концентрировали сульфатом аммония, как было описано выше.  $\alpha$ -Амилазу очищали методом аффинной хроматографии на  $\beta$ -циклодекстрин-сефарозе, а протеазу – на бензамидин-сефарозе. Хроматографическая очистка ферментов представлена на рисунке 3. Выбор этих методов не случаен, так как данные лиганды высокоспецифичны к изучаемым ферментам. Следует также отметить, что бензамидин является синтетическим ингибитором сериновых протеаз, в частности, трипсина и подобных ему ферментов, а бензамидин-сефароза применяется для аффинной хроматографии этих белков [26, 27, 28].

Для выяснения природы очищенной протеазы использовали класс-специфические ингибиторы. Из представ-

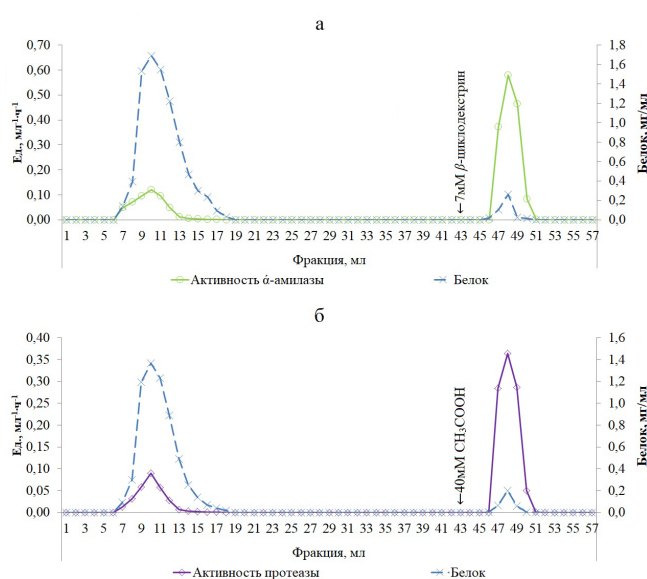


Рисунок 3 - Очистка  $\alpha$ -амилазы (а) и протеазы (б) *F. graminearum* аффинной хроматографией на  $\beta$ -циклодекстрин-сефарозе и бензамидин-сефарозе

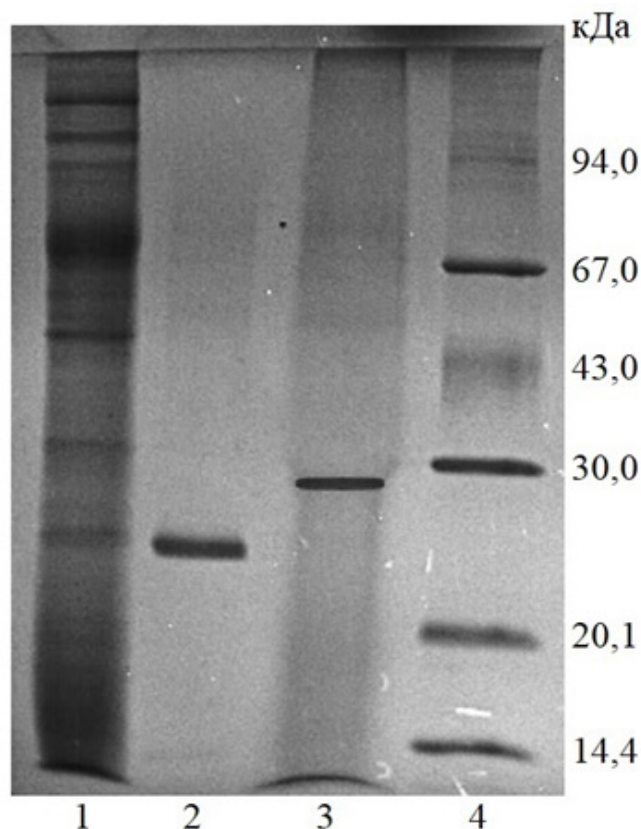
ленных данных (таблица 1) видно, что Е-64, пепстатин А и ЭДТА не оказывали ингибирующего действия на активность фермента. В то же время как ингибиторы сериновых протеаз ФМСФ и ДФП, а также трипсиновый ингибитор из сои в значительной мере подавляли фермент. Следовательно, очищенную на бензамидин-сефарозе протеазу гриба *F. graminearum* можно отнести к сериновым трипсин подобным протеазам.

По данным денатурирующего ДДС-электрофореза М. в. очищенной  $\alpha$ -амилазы составлял  $\sim 29$  кДа, а протеазы  $\sim 25$  кДа (рисунок 4). При этом другие белки практически не обнаруживались, т.е. ферменты были очищены до гомогенного состояния. Таким образом, оба фермента гриба имели небольшую массу. Если для сериновых протеаз из разных источников это характерно, то относительно малый вес  $\alpha$ -амилазы можно отнести к одной из особенностей этого фермента у *F. graminearum*.

Известно, что  $\alpha$ -амилаза у многих организмов суще-

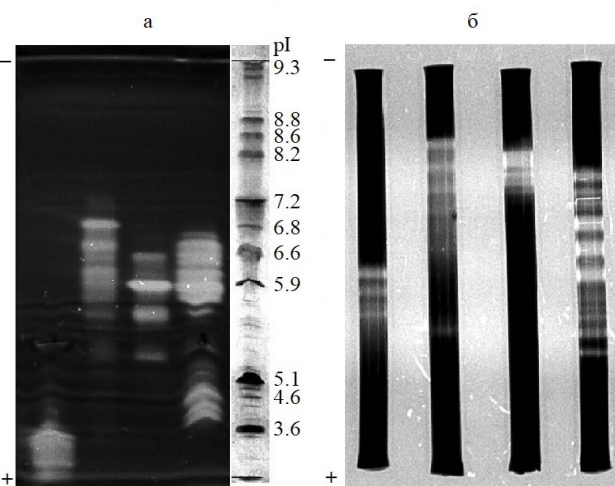
Таблица 1 - Действие ингибиторов протеаз на очищенную протеазу *F. graminearum*

Ингибитор	Специфичность действия	Концентрация	Ингибирование (%)
Е-64	Цистеиновые протеазы	10 мкМ	0
Пепстатин А	Аспартильные протеазы	10 мкМ	0
ФМСФ	Сериновые протеазы	1 мМ	85,2 ± 2,08
ДФП	Сериновые протеазы	1 мМ	93,6 ± 1,07
ЭДТА	Металлопротеазы	2 мМ	0
Соевый трипсиновый ингибитор	Сериновые трипсин подобные ферменты	0,1 мМ	90,1 ± 1,84

1 - исходный грубый белок из *F. graminearum*, 2 - очищенная протеаза, 3 - очищенная  $\alpha$ -амилаза, 4 - белки-маркеры М.в.Рисунок 4 - ДДС-электрофорез очищенной  $\alpha$ -амилазы и протеазы

ствуется как мультифермент и представлена множественными молекулярными формами. В связи с этим значительный интерес представляло изучение в сравнительном плане изоферментного состава  $\alpha$ -амилазы фитопатогена *F. graminearum* с ферментами из других источников. Из представленных ИЭФ профилей хорошо видно, что  $\alpha$ -амилаза гриба состоит из 3-4 близко лежащих изоформ, локализованных в сильно кислой области геля с рН 3,0-3,5 (рисунок 5, а). Эта уникальная особенность изоферментов  $\alpha$ -амилазы *F. graminearum* (сильно кислые рI) заметно контрастировала с ферментом из других источников. Изоферменты  $\alpha$ -амилазы *Bacillus licheniformis*, *Human saliva* и прорастающего (5 суток) зерна пшеницы в основном имели слабокислые и нейтральные изоэлектрические точки. Количественный состав изоферментов был уточнен нативным электрофорезом и насчитывал 4 компонента, 3 из которых мажорные и 1 минорный (рисунок 5, б).

Одними из наиболее важных физико-химических свойств ферментов являются рН, температурный опти-

1 -  $\alpha$ -амилаза *F. graminearum*, 2 -  $\alpha$ -амилаза *Bacillus licheniformis*, 3 -  $\alpha$ -амилаза *Human saliva*, 4 -  $\alpha$ -амилаза *Triticum aestivum*, 5 - белки-маркеры рIРисунок 5 - Изоэлектрофокусирование (а) и нативный электрофорез (б)  $\alpha$ -амилазы из разных источников

мумы действия и термостабильность. Для определения оптимума рН очищенной  $\alpha$ -амилазы и трипсиновой протеазы гриба использовали буферы со значениями рН от 3,0 до 11,0. В кислой области (рН 3-6) использовался ацетатный буфер, а для области рН 7,0-11,0 применяли Tris-HCl буфер. Оптимум действия  $\alpha$ -амилазы находился в области рН 5,0-6,0, а протеазы в районе рН 7,0-8,0 (рисунок 6, а). Температурный оптимум действия протеазы и  $\alpha$ -амилазы соответствовал 40 и 50°C. Для изучения термостабильности ферментные образцы прогревали при повышенных температурах от 40 до 80°C в течение 10 мин. Контролем служили ферменты без тепловой обработки. Трипсин подобная протеаза оказалась термолабильной и начинала, хоть и незначительно, терять активность уже при 50°C (рисунок 6, б). Активность  $\alpha$ -амилазы в этих же условиях, наоборот, заметно стимулировалась. При 70°C активность обоих ферментов значительно снижалась, причем в большей степени у протеазы. Дальнейшее повышение температуры до 80°C приводило к полной инактивации ферментов.

Многие представители рода *Fusarium* являются опасными патогенами зерновых культур. Среди этих грибов *F. graminearum* занимает особое место, поскольку отличается высокой агрессивностью за счет выработки ряда сильных токсинов, угнетающих рост растений и снижающих качество зерна. Другим фактором патогенности грибов, как показано в последнее время, являются протеазы и  $\alpha$ -амилазы, в связи с чем их изучение становится

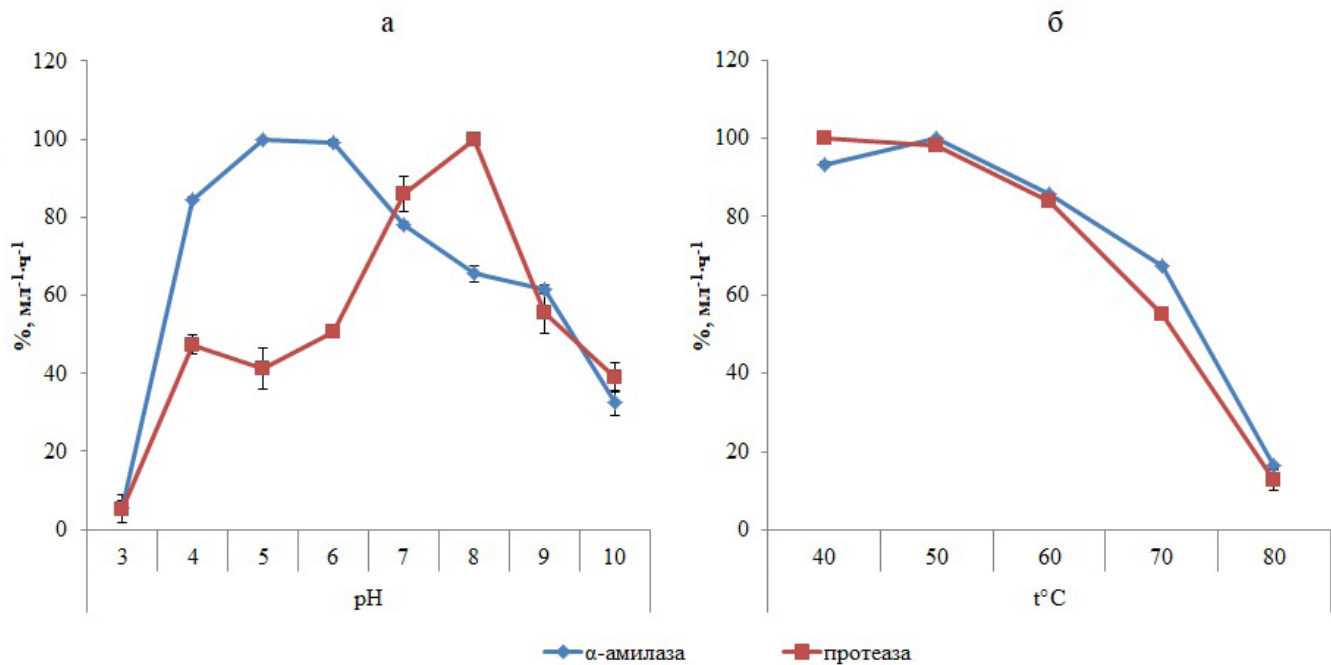


Рисунок 6 - pH-оптимум (а) и термостабильность (б)  $\alpha$ -амилазы и протеазы *F. graminearum*

актуальным. Следует отметить, что в отличие от бактерий, млекопитающих и растений, эти гидролазы у фитопатогенных грибов менее изучены.

Как известно, существует множество питательных сред, используемых при культивировании грибов. Среди них имеются варианты, специально разработанные под конкретные цели, например, для получения тех или иных субстанций, имеющих практическое значение. Однако, универсальных протоколов сред для продуцирования  $\alpha$ -амилазы и протеаз фитопатогенными грибами при научных исследованиях не имеется, поэтому для каждого вида ПС и режимы культивирования подбираются индивидуально.

Обзор литературы по продукции  $\alpha$ -амилазы и протеазы грибами показал существенно большую эффективность твердофазного ферментирования с использованием пшеничных отрубей по сравнению с погружным способом в жидкой ПС [29, 30, 31]. Обзор литературы в целом показал, что чаще всего используются среды Чапек-Докс и картофельно-декстрозная, однако при этом многими не учитывается наличие в их составе значительного количества сахарозы и нитратов [32, 33, 34]. Между тем, хорошо известно, что эти вещества могут выступать в качестве индукторов генов и подавлять синтез ряда гидролитических ферментов, в т. ч.  $\alpha$ -амилазы и протеаз путем катаболитной репрессии. Иными словами, накопление этих белков в культуре во многом регулируется метаболически [35, 36, 37].

В данной работе при культивировании гриба *F. graminearum* этот факт был учтен и сахароза, а также нитрат были исключены. Использование отрубей и глютен в ПС было вызвано также и необходимостью присутствия углеводного (крахмал), белкового питания и одновременно индуктора синтеза и секреции ферментов. Применение твердофазного способа выращивания на отрубях позволило наработать  $\alpha$ -амилазы и протеазы в течение 8-10 дневного срока культивирования гриба.

Для очистки грибных амилаз и протеаз во многих ис-

следованиях использовались методы гельфильтрации и ионообменной хроматографии, довольно длительные, трудоемкие и сопровождающиеся значительными потерями фермента [38, 39, 40, 41]. В данной работе была применена одностадийная и быстрая очистка на биоспецифических аффинных лигандах. Высокая степень очистки позволила установить молекулярный вес ферментов и основные физико-химические свойства, необходимые для проявления их активности и взаимодействия со специфическими белками-ингибиторами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе подобрана оптимальная твердофазная среда для получения  $\alpha$ -амилазы и трипсиновой протеазы гриба *F. graminearum* на основе пшеничных отрубей и модифицированного минерального состава ПС Чапек-Докс. Максимальная продукция ферментов происходила на 8 сутки культивирования. Методом аффинной хроматографии оба фермента были очищены до гомогенного состояния. С помощью специфических ингибиторов установлена принадлежность очищенной протеазы к сериновому трипсин подобному ферменту. Согласно ДДС-электрофорезу М. в.  $\alpha$ -амилазы составлял 29 кДа, а протеазы - 25 кДа. Нативным электрофорезом и ИЭФ установлен изоферментный состав  $\alpha$ -амилазы (4 компонента) с рI в кислой области pH 3,0-3,5. Определены pH-, температурный оптимумы действия и термостабильность ферментов.

Данные по культивированию *F. graminearum*, очистке и физико-химическим свойствам  $\alpha$ -амилазы и трипсиновой протеазы, секретируемых грибом являются новыми и пополняют накопленные сведения по грибным гидролитическим ферментам.

## Финансирование

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках бюджетной программы 217 «Развитие науки» и подпрограммы 101 «Программно-целевое финансирование субъектов научной и/или научно-технической деятельности за счет

средств республиканского бюджета», OR11465447, договор № 337 от 07 июля 2021 года.

## ЛИТЕРАТУРА

- Pessôa, M. G., Paulino, B. N., Mano, M., Neri-Numa, I. A., Molina, G., & Pastore, G. M. *Fusarium* species - a promising tool box for industrial biotechnology // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2017. Vol. 101(9). - P. 3493–3511. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8255-z>
- Sajeed Ali, S., & Vidhale, N. N. Protease production by *Fusarium oxysporum* in solid- state fermentation using rice bran // *Am. J. Microbiol. Res.* - 2013. Vol. 1(3). - P. 45–47. <https://doi.org/10.12691/ajmr-1-3-2>
- Gupta, V. K., Kubicek, C. P., Berrin, J. G., Wilson, D. W., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E., & Ezeji, T. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass // *Trends Biochem. Sci.* - 2016. Vol. 41(7). - P. 633–645. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.006>
- Lowe, R. G. T., McCorkelle, O., Bleackley, M., Collins, C., Faou, P., Mathivanan, S., & Anderson, M. Extracellular peptidases of the cereal pathogen *Fusarium graminearum* // *Front. Plant Sci.* - 2015. Vol. 6(962). - P. 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00962>
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J., & Barrett, A. J. MEROPS: the peptidase database // *Nucleic Acids Res.* - 2008. Vol. 36 (Database issue). - P. 320-325. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm954>
- Dubovenko, A. G., Dunaevsky, Y. E., Belozersky, M. A., Oppert, B., Lord, J. C., & Elpidina, E. N. Trypsin-like proteins of the fungi as possible markers of pathogenicity // *Fungal Biol.* - 2010. Vol. 114(2-3). - P. 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2009.11.004>
- Chandrasekaran, M., Thangavelu, B., Chun, S. C., & Sathiyabama, M. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity // *J. Gen. Plant Pathol.* - 2016. Vol. 82(5). - P. 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0672-9>
- Saranraj, P., Stella, D. Fungal amylase—a review // *Int J Microbiol Res.* -2013. Vol. 4(2). - P. 203–211. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2013.4.2.75170>
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampootheri, K.M., Soccol, C.R., & Pandey, A.  $\alpha$ -Amylases from microbial sources – an overview on recent developments // *Food Technol. Biotechnol.* -2006. Vol. 44(2). - P. 173–184. <https://hrcak.srce.hr/file/161876>
- Valaparla, V.K. Characterization and partial purification studies on  $\alpha$ -amylase activity by *Fusarium verticillioides* // *Int. J. Biotechnol. Biochem.* - 2018. Vol. 14(3). - P. 225-240. [https://www.ripublication.com/ijbb18/ijbbv14n3\\_08.pdf](https://www.ripublication.com/ijbb18/ijbbv14n3_08.pdf)
- Bakri, Y., Jawhar, M., & Arabi, M. I. E. Enhanced amylase production by *Fusarium solani* in solid state fermentation // *Pak. J. Sci. Ind. Res. B: Biol. Sci.* - 2014. Vol. 57(3). - P. 123-128. <https://doi.org/10.52763/PJSIR.BIOL.SCI.57.3.2014.123.128>
- Eggert, K., Rawel, H. M., & Pawelzik, E. In vitro degradation of wheat gluten fractions by *Fusarium graminearum* proteases // *Eur. Food Res. Technol.* - 2011. Vol. 233(4). - P. 697-705. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1566-x>
- Del Ponte, E. M., Moreira, G. M., Ward, T. J., O'Donnell, K., Nicolli, C. P., Machado, F. J., Duffeck, M. R., Alves, K. S., Tessmann, D. J., Waalwijk, C., van der Lee, T., Zhang, H., Chulze, S. N., Stenglein, S. A., Pan, D., Vero, S., Vaillancourt, L. J., Schmale, D. G., 3rd, Esker, P. D., Moretti, A., Logrieco, A. F., Kistler, H. C., Bergstrom, G. C., Viljoen, A, Rose, L. J., van Coller G.J., Lee, T. *Fusarium graminearum* species complex: a bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotypes // *Phytopathol.* -2022. Vol. 112(4). - P. 741–751. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-21-0277-RVW>
- Caruso, C., Chilosi, G., Caporale, C., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P., & Buonocore, V. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum* // *Plant Sci.* - 1999. Vol. 140(1). - P. 87–97. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00199-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00199-X)
- Khakimzhanov, A.A., Kuzovlev, V.A., Abaildayev, A.O. Chitinases of wheat seedling and their biochemical properties // *Asian J. Agric. Biol.* - 2021. Vol. 2021(3). - P. 1-12. <https://doi.org/10.35495/ajab.2020.05.303>
- Firn R. D. On the secretion of  $\alpha$ -amylase by barley aleurone layers after incubation in gibberellic acid // *Planta.* -1975. Vol. 125(3). - P. 227–233. <https://doi.org/10.1007/BF00385599>
- Pekkarinen, A., Mannonen, L., Jones, B. L., Niku-Paavola, M.-L.. Production of Proteases by *Fusarium* Species Grown on Barley Grains and in Media Containing Cereal Proteins // *J. Cereal Sci.* - 2000. Vol. 31(3). - P. 253–261. <https://doi.org/10.1006/jcers.2000.0305>
- Manan, M.A., Webb, C. Estimation of growth in solid state fermentation: a review // *Malays. J. Microbiol.* -2018. Vol. 14(1). - P. 61-69. <https://doi.org/10.21161/mjm.96616>
- Sundberg, L., Porath, J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes // *J. Chromatogr.* - 1974. Vol. 90(1). - P. 87–98. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)94777-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)94777-6)
- Ben Elarbi, M., Khemiri, H., Jridi, T., & Ben Hamida, J. Purification and characterization of alpha-amylase from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germinating seeds // *C. R. - Biol.* - 2009. Vol. 332(5). - P. 426–432. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2009.01.002>
- Yafetto L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis // *Heliyon.* - 2022. Vol 8(3). - P. 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>
- Hyseni, B., Aytakin, A.Ö., Nikerel, E. Solid state fermentation for enzyme production for food industry // *J. microbiol., biotechnol. food sci.* - 2018. Vol 7(6). - P. 615–622. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.7.6.615-622>
- Jovanović, M., Vučurović, D., Dodić, S., Bajić, B., Dodić, J., Vlajkov V, Jevtić-Mučibabić, R. Simulation model comparison of submerged and solid-state hydrolytic enzymes

- production from wheat chaff // *Rom. Biotechnol. Lett.* – 2020 Vol 25(5). - P. 1938–1948. <https://doi.org/10.25083/rbl/25.5/1938.1948>
24. Fortelius, C., Markkanen, P. Nutritional regulation of proteinase production in the fungus, *Tritirachium album* // *J. Ind. Microbiol.* - 2000. Vol. 24(6). - P. 369–373. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000012>
25. Farooq, M.A., Ali, S., Hassan, A.H., Tahir, H.M., Mumtaz, S., Mumtaz, S. Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: a review // *Arch. Microbiol.* - 2021. Vol. 203. - P. 1281-1292. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>
26. Andrews, J.M., Roman, D.P. Jr, Bing, D.H. Inhibition of four human serine proteases by substituted benzamidines // *J. Med. Chem.* – 1978. - Vol. 21(12). – P. 1202-1207. <https://doi.org/10.1021/jm00210a006>
27. Nakamura, K., Suzuki, T., Hasegawa, M., Katoa, Y., Sasaki, H., Inouye, K. Characterization of *p*-aminobenzamidinium-based sorbent and its use for high-performance affinity chromatography of trypsin-like proteases // *J. Chromatography A.* – 2003. - Vol. 1009(1-2). - P. 133–139. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00569-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00569-7)
28. De-Simone, S.G., Correa-Netto, C.C., Antunes, O.A., De-Alencastro, R.B., Silva, F.P.Jr. Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two *p*-aminobenzamidinium-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms // *J. Chromatography B.* – 2005. - Vol. 822(1-2). - P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.04.018>
29. Da Rosa-Garzon, N. G., Laure, H. J., Rosa, J. C., & Cabral, H. *Fusarium oxysporum* cultured with complex nitrogen sources can degrade agricultural residues: Evidence from analysis of secreted enzymes and intracellular proteome // *Renew. Energy.* – 2019. Vol. 133, - P. 941–950. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.10.100>
30. Mojumdar, A., Deka, J. Recycling agro-industrial waste to produce amylase and characterizing amylase–gold nanoparticle composite // *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* – 2019. Vol. 8(S1). - P. 263–269. <https://doi.org/10.1007/s40093-019-00298-4>
31. Rozanov, A.S., Shekhovtsov, S.V., Bogacheva, N.V., Pershina, E.G., Ryapolova, A.V., Bytyak, D.S., Peltek, S.E. Production of subtilisin proteases in bacteria and yeast. // *Vavilovskii Zhurnal Genet. Selektcii.* – 2021. Vol. 25(1). - P. 125–134. <https://doi.org/10.18699/VJ21.015>
32. Kikot, G.E., Hours, R.A., Alconada, T.M. Extracellular enzymes of *Fusarium graminearum* isolates // *Braz. Arch. Biol. Technol.* – 2010. Vol. 53(4). - P. 779-783. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132010000400005>
33. Novelli, P.K., Barros, M.M., Fleuri, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. // *Food Chem.* – 2016. Vol. 198(1). - P. 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.089>
34. Benabda, O., M'hir, S., Kasmi, M., Mnif, W., Hamdi, M. Optimization of Protease and Amylase Production by *Rhizopus oryzae* Cultivated on Bread Waste Using Solid-State Fermentation // *J. Chem.* – 2019. Vol. 2019(3738181), - P. 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/3738181>
35. Ertan İnceoğlu, F., Balkan, B., & Yarkin, Z. (2014). Determination of the effects of initial glucose on the production of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium* sp. under solid-state and submerged fermentation // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* – 2014. Vol. 28(1). - P. 96–101. <https://doi.org/10.1080/013102818.2014.901670>
36. da Silva, R.R., de Freitas Cabral, T.P., Rodrigues, A., Cabral, H. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation // *Braz. J. Microbiol.* – 2013. Vol. 44(1). - P. 235–243. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000100034>
37. Escaramboni, B., Garnica, B. C., Abe, M. M., Palmieri, D. A., Fernández Núñez, E. G., de Oliva Neto, P. Food waste as a feedstock for fungal biosynthesis of amylases and proteases // *Waste and Biomass Valorization.* – 2021. Vol. 13(1). - P. 213–226. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01511-0>
38. Kumar, D., Yadav, K. K., Muthukumar, M., & Garg, N. Production and characterization of alpha-amylase from mango kernel by *Fusarium solani* NAIMCC-F-02956 using submerged fermentation. // *J. Environ. Biol.* – 2013. Vol. 34(6). - P. 1053–1058. <https://www.researchgate.net/publication/260369769>
39. Amin, M., Bhatti, H.N., Pervin, F. Production, partial purification and thermal characterization of  $\beta$ -amylase from *Fusarium solani* in solid state fermentation // *J. Chem. Soc. Pak.* – 2008. Vol. 30(3). - P. 480-485. <https://www.researchgate.net/publication/286559979>
40. Rodríguez, K.L., Higuera, B.L., & Martínez, S.T. Induction of proteases secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi in the presence of carnation root cell walls. biochemical characterization of a serine protease // *J. Plant Pathol.* – 2017. Vol. 99(3). - P. 609–617. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3984>
41. Fawzi, E.M. Production and purification of  $\beta$ -glucosidase and protease by *Fusarium proliferatum* NRRL 26517 grown on *Ficus nitida* wastes // *Ann. Microbiol.* - 2003. Vol. 53(4). - P. 463-476. <https://www.researchgate.net/publication/237193179>

## REFERENCES

- Pessôa, M. G., Paulino, B. N., Mano, M., Neri-Numa, I. A., Molina, G., & Pastore, G. M. *Fusarium* species - a promising tool box for industrial biotechnology // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2017. Vol. 101(9). - P. 3493–3511. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8255-z>
- Sajeed Ali, S., & Vidhale, N. N. Protease production by *Fusarium oxysporum* in solid- state fermentation using rice bran // *Am. J. Microbiol. Res.* - 2013. Vol. 1(3). - P. 45–47. <https://doi.org/10.12691/ajmr-1-3-2>
- Gupta, V. K., Kubicek, C. P., Berrin, J. G., Wilson, D. W., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E., & Ezeji, T. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass // *Trends Biochem. Sci.* - 2016. Vol. 41(7). - P. 633–645. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.006>
- Lowe, R. G. T., McCorkelle, O., Bleackley, M., Collins, C., Faou, P., Mathivanan, S., & Anderson, M. Extracellular



- peptidases of the cereal pathogen *Fusarium graminearum* // *Front. Plant Sci.* - 2015. Vol. 6(962). - P. 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00962>
5. Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J., & Barrett, A. J. MEROPS: the peptidase database // *Nucleic Acids Res.* - 2008. Vol. 36 (Database issue). - P. 320-325. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm954>
6. Dubovenko, A. G., Dunaevsky, Y. E., Belozersky, M. A., Oppert, B., Lord, J. C., & Elpidina, E. N. Trypsin-like proteins of the fungi as possible markers of pathogenicity // *Fungal Biol.* - 2010. Vol. 114(2-3). - P. 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2009.11.004>
7. Chandrasekaran, M., Thangavelu, B., Chun, S. C., & Sathiyabama, M. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity // *J. Gen. Plant Pathol.* - 2016. Vol. 82(5). - P. 233-239. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0672-9>
8. Saranraj, P., Stella, D. Fungal amylase—a review // *Int J Microbiol Res.* -2013. Vol. 4(2). - P. 203-211. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2013.4.2.75170>
9. Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., & Pandey, A.  $\alpha$ -Amylases from microbial sources – an overview on recent developments // *Food Technol. Biotechnol.* -2006. Vol. 44(2). - P. 173-184. <https://hrcak.srce.hr/file/161876>
10. Valaparla, V.K. Characterization and partial purification studies on  $\alpha$ -amylase activity by *Fusarium verticillioides* // *Int. J. Biotechnol. Biochem.* - 2018. Vol. 14(3). - P. 225-240. [https://www.ripublication.com/ijbb18/ijbbv14n3\\_08.pdf](https://www.ripublication.com/ijbb18/ijbbv14n3_08.pdf)
11. Bakri, Y., Jawhar, M., & Arabi, M. I. E. Enhanced amylase production by *Fusarium solani* in solid state fermentation // *Pak. J. Sci. Ind. Res. B: Biol. Sci.* - 2014. Vol. 57(3). - P. 123-128. <https://doi.org/10.52763/PJSIR.BIOL.SCI.57.3.2014.123.128>
12. Eggert, K., Rawel, H. M., & Pawelzik, E. In vitro degradation of wheat gluten fractions by *Fusarium graminearum* proteases // *Eur. Food Res. Technol.* - 2011. Vol. 233(4). - P. 697-705. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1566-x>
13. Del Ponte, E. M., Moreira, G. M., Ward, T. J., O'Donnell, K., Nicolli, C. P., Machado, F. J., Duffeck, M. R., Alves, K. S., Tessmann, D. J., Waalwijk, C., van der Lee, T., Zhang, H., Chulze, S. N., Stenglein, S. A., Pan, D., Vero, S., Vaillancourt, L. J., Schmale, D. G., 3rd, Esker, P. D., Moretti, A., Logrieco, A. F., Kistler, H. C., Bergstrom, G. C., Viljoen, A., Rose, L. J., van Coller G.J., Lee, T. *Fusarium graminearum* species complex: a bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotypes // *Phytopathol.* -2022. Vol. 112(4). - P. 741-751. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-21-0277-RVW>
14. Caruso, C., Chilosi, G., Caporale, C., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P., & Buonocore, V. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum* // *Plant Sci.* - 1999. Vol. 140(1). - P. 87-97. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00199-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00199-X)
15. Khakimzhanov, A.A., Kuzovlev, V.A., Abaildayev, A.O. Chitinases of wheat seedling and their biochemical properties // *Asian J. Agric. Biol.* - 2021. Vol. 2021(3). - P. 1-12. <https://doi.org/10.35495/ajab.2020.05.303>
16. Firn R. D. On the secretion of  $\alpha$ -amylase by barley aleurone layers after incubation in gibberellic acid // *Planta.* -1975. Vol. 125(3). - P. 227-233. <https://doi.org/10.1007/BF00385599>
17. Pekkarinen, A., Mannonen, L., Jones, B. L., Niku-Paavola, M.-L.. Production of Proteases by *Fusarium* Species Grown on Barley Grains and in Media Containing Cereal Proteins // *J. Cereal Sci.* - 2000. Vol. 31(3). - P. 253-261. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2000.0305>
18. Manan, M.A., Webb, C. Estimation of growth in solid state fermentation: a review // *Malays. J. Microbiol.* -2018. Vol. 14(1). - P. 61-69. <https://doi.org/10.21161/mjm.96616>
19. Sundberg, L., Porath, J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes // *J. Chromatogr.* - 1974. Vol. 90(1). - P. 87-98. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)94777-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)94777-6)
20. Ben Elarbi, M., Khemiri, H., Jridi, T., & Ben Hamida, J. Purification and characterization of alpha-amylase from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germinating seeds // *C. R. - Biol.* - 2009. Vol. 332(5). - P. 426-432. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2009.01.002>
21. Yafetto L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis // *Heliyon.* - 2022. Vol 8(3). - P. 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>
22. Hyseni, B., Aytakin, A.Ö., Nikerel, E. Solid state fermentation for enzyme production for food industry // *J. microbiol., biotechnol. food sci.* - 2018. Vol 7(6). - P. 615-622. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.7.6.615-622>
23. Jovanović, M., Vučurović, D., Dodić, S., Bajić, B., Dodić, J., Vlajkov V, Jevtić-Mučibabić, R. Simulation model comparison of submerged and solid-state hydrolytic enzymes production from wheat chaff // *Rom. Biotechnol. Lett.* - 2020 Vol 25(5). - P. 1938-1948. <https://doi.org/10.25083/rbl/25.5/1938.1948>
24. Fortelius, C., Markkanen, P. Nutritional regulation of proteinase production in the fungus, *Tritirachium album* // *J. Ind. Microbiol.* - 2000. Vol. 24(6). - P. 369-373. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000012>
25. Farooq, M.A., Ali, S., Hassan, A.H., Tahir, H.M., Mumtaz, S., Mumtaz, S. Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: a review // *Arch. Microbiol.* - 2021. Vol. 203. - P. 1281-1292. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>
26. Andrews, J.M., Roman, D.P. Jr, Bing, D.H. Inhibition of four human serine proteases by substituted benzamidines // *J. Med. Chem.* - 1978. - Vol. 21(12). - P. 1202-1207. <https://doi.org/10.1021/jm00210a006>
27. Nakamura, K., Suzuki, T., Hasegawa, M., Katoa, Y., Sasaki, H., Inouye, K. Characterization of *p*-aminobenzamidine-based sorbent and its use for high-performance affinity chromatography of trypsin-like proteases

- // *J. Chromatography A*. – 2003. – Vol. 1009(1-2). – P. 133–139. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00569-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00569-7)
28. De-Simone, S.G., Correa-Netto, C.C., Antunes, O.A., De-Alencastro, R.B., Silva, F.P.Jr. Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two *p*-aminobenzamidine-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms // *J. Chromatography B*. – 2005. – Vol. 822(1-2). – P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chromb.2005.04.018>
29. Da Rosa-Garzon, N. G., Laure, H. J., Rosa, J. C., & Cabral, H. *Fusarium oxysporum* cultured with complex nitrogen sources can degrade agricultural residues: Evidence from analysis of secreted enzymes and intracellular proteome // *Renew. Energy*. – 2019. Vol. 133, – P. 941–950. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.10.100>
30. Mojumdar, A., Deka, J. Recycling agro-industrial waste to produce amylase and characterizing amylase–gold nanoparticle composite // *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* – 2019. Vol. 8(S1). – P. 263–269. <https://doi.org/10.1007/s40093-019-00298-4>
31. Rozanov, A.S., Shekhovtsov, S.V., Bogacheva, N.V., Pershina, E.G., Ryapolova, A.V., Bytyak, D.S., Peltek, S.E. Production of subtilisin proteases in bacteria and yeast. // *Vavilovskii Zhurnal Genet. Seleksii*. – 2021. Vol. 25(1). – P. 125–134. <https://doi.org/10.18699/VJ21.015>
32. Kikot, G.E., Hours, R.A., Alconada, T.M. Extracellular enzymes of *Fusarium graminearum* isolates // *Braz. Arch. Biol. Technol.* – 2010. Vol. 53(4). – P. 779–783. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132010000400005>
33. Novelli, P.K., Barros, M.M., Fleuri, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. // *Food Chem.* – 2016. Vol. 198(1). – P. 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.089>
34. Benabda, O., M'hir, S., Kasmi, M., Mnif, W., Hamdi, M. Optimization of Protease and Amylase Production by *Rhizopus oryzae* Cultivated on Bread Waste Using Solid-State Fermentation // *J. Chem.* – 2019. Vol. 2019(3738181), – P. 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/3738181>
35. Ertan İnceoğlu, F., Balkan, B., & Yarkin, Z. (2014). Determination of the effects of initial glucose on the production of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium* sp. under solid-state and submerged fermentation // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* – 2014. Vol. 28(1). – P. 96–101. <https://doi.org/10.1080/013102818.2014.901670>
36. da Silva, R.R., de Freitas Cabral, T.P., Rodrigues, A., Cabral, H. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation // *Braz. J. Microbiol.* – 2013. Vol. 44(1). – P. 235–243. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000100034>
37. Escaramboni, B., Garnica, B. C., Abe, M. M., Palmieri, D. A., Fernández Núñez, E. G., de Oliva Neto, P. Food waste as a feedstock for fungal biosynthesis of amylases and proteases // *Waste and Biomass Valorization*. – 2021. Vol. 13(1). – P. 213–226. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01511-0>
38. Kumar, D., Yadav, K. K., Muthukumar, M., & Garg, N. Production and characterization of alpha-amylase from mango kernel by *Fusarium solani* NAIMCC-F-02956 using submerged fermentation. // *J. Environ. Biol.* – 2013. Vol. 34(6). – P. 1053–1058. <https://www.researchgate.net/publication/260369769>
39. Amin, M., Bhatti, H.N., Pervin, F. Production, partial purification and thermal characterization of  $\beta$ -amylase from *Fusarium solani* in solid state fermentation // *J. Chem. Soc. Pak.* – 2008. Vol. 30(3). – P. 480–485. <https://www.researchgate.net/publication/286559979>
40. Rodríguez, K.L., Higuera, B.L., & Martínez, S.T. Induction of proteases secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi in the presence of carnation root cell walls. biochemical characterization of a serine protease // *J. Plant Pathol.* – 2017. Vol. 99(3). – P. 609–617. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3984>
41. Fawzi, E.M. Production and purification of  $\beta$ -glucosidase and protease by *Fusarium proliferatum* NRRL 26517 grown on *Ficus nitida* wastes // *Ann. Microbiol.* – 2003. Vol. 53(4). – P. 463–476. <https://www.researchgate.net/publication/237193179>

## ФИТОПАТОГЕНДІ *FUSARIUM GRAMINEARUM* САҢЫРАУҚҰЛАҒЫНЫҢ А-АМИЛАЗАСЫ МЕН ПРОТЕАЗАСЫН ТАЗАРТУ ЖӘНЕ СИПАТТАУ

В.А. Кузовлев, Ә.О. Абайлдаев\*, К.О. Шарипов, А.А. Хакімжанов

ҚР БҒМ ҒК М. Ә. Айтхожин атындағы Молекулалық биология және биохимия институты, Досмұхамедов көшесі, 86, 050012, Алматы қ., Қазақстан

\*[abaildayevaset@gmail.com](mailto:abaildayevaset@gmail.com)

### АНДАТПА

Дәнді дақылдардың саңырауқұлақ ауруларына төзімділігін арттырудың заманауи тәсілдерінің бірі-қоздырғыштардың дигестивті ферменттерін және олардың астықтағы ақуыз ингибиторларын зерттеу. Соңғы уақытта саңырауқұлақтардың патогенділігінің маңызды факторларының бірі ретінде протеазалары мен амилазаларын қарастырады. Бұл ферменттерді алу үшін фитопатогенді *F. graminearum* саңырауқұлағын бидай кебегін пайдаланып, қатты фазалық әдіспен (қатты күйінде ашыту, ҚКА) өсірілді. Ферменттердің максималды өнімі саңырауқұлақ  $2,0 \times 10^6$  конидий/мл инокуляциясы кезінде өсімінің 8-күнінде болды. Аффиндік хроматография әдісімен молекулалық массалары тиісінше 25 және 29 кДа экстрацеллюлярлы протеаза және  $\alpha$ -амилаза тазартылды. Арнайы ингибиторлардың көмегімен тазартылған протеазаның сирин трипсиніне ұқсас ферментке жататындығы анықталды. Изоэлектрлікфокустеу деректері бойынша  $\alpha$ -амилаза қышқылдығы күшті рІ 3,0-3,5 болатын 4 изоферменттен тұрды. Ферменттердің рН, температуралық оптимумы және термотұрақтылығы анықталды. *F. graminearum*  $\alpha$ -амилазасы мен протеазасы үшін алынған деректер алғаш рет келтірілген. Зерттеу нәтижелерін астықтың амилазалары мен протеазаларының арнайы ингибиторларын, қорғаныш ақуыздары ретінде іздеуде, бидай сұрыптарының саңырауқұлақпен зақымданғандағы төзімділігін бағалауда қолдануға болады.

**Түйіндік сөздер:** *F. graminearum*,  $\alpha$ -амилаза, трипсинге ұқсас протеаза, тазарту, физико-химиялық қасиеттері.

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF $\alpha$ -AMYLASE AND PROTEASE OF THE PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *FUSARIUM GRAMINEARUM*

V.A. Kuzovlev, A.O. Abaildayev\*, K.O. Sharipov, Khakimzhanov A.A.

M.A. Aitkhozhin's institute of molecular biology and biochemistry CS MES RK, Dosmukhamedov st., 86, Almaty, 050012, Kazakhstan

\*[abaildayevaset@gmail.com](mailto:abaildayevaset@gmail.com)

### ABSTRACT

One of the modern approaches in increasing the resistance of cereal crops to fungal diseases is the study of digestive enzymes of pathogens and their protein inhibitors in grain. Recently, proteases and amylases have been considered as some of the important pathogenicity factors of fungi. To obtain these enzymes, the phytopathogenic fungus *F. graminearum* was grown by solid state fermentation (SSF) using wheat bran. The maximum accumulation of enzymes at the addition of  $2,0 \times 10^6$  conidia/ml occurred on day 8th of cultivation of the fungus. Extracellular protease and  $\alpha$ -amylase with molecular weight 25 and 29 kDa, respectively, were purified by affinity chromatography. Using specific inhibitors, the purified protease was found to belong to the serine trypsin-like enzyme. According to isoelectric focusing data,  $\alpha$ -amylase consisted of 4 isoenzymes with strongly acidic pI of 3.0-3.5. The pH, temperature optimum, and thermostability of the enzymes were determined. The data obtained for  $\alpha$ -amylase and trypsin of *F. graminearum* are presented for the first time. The results of the study can be used in the search for specific inhibitors of amylases and proteases in grain as protective proteins for their application in estimation of wheat varieties resistance to fungal attack.

**Keywords:** *F. graminearum*,  $\alpha$ -amylase, trypsin-like protease, purification, physicochemical properties.