

Ә.О. Абайлдаев*, В.А. Кузовлев, А.А. Хакимжанов

Институт молекулярной биологии и биохимии имени М.А. Айтхожина КН МОН РК, Алматы, Казахстан

*Автор для корреспонденции: abaydayevaset@gmail.com

Оптимизация питательной среды для продукции протеазы фитопатогенным грибом *Fusarium graminearum* и характеристика фермента

Одним из современных направлений повышения устойчивости злаковых культур к грибковым болезням является изучение гидролитических пищеварительных ферментов патогенов и их белковых ингибиторов в зерне. В данном исследовании определена оптимальная питательная среда для получения протеазы фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum*, содержащая 1 % глюкозу и 1 % дрожжевой экстракт в качестве индуктора синтеза фермента. Период культивирования гриба при внесении $3,8 \times 10^6$ конидий/100 мл составляет 12–14 дней, при котором синтез протеазы максимальный. Методом аффинной (биоспецифической) хроматографии из наработанного в препаративном количестве КФ очищена экстрацеллюлярная сериновая трипсиноподобная протеаза, представленная по данным ДДС-электрофореза двумя белками с М.в. 24 и 27 кДа. Установлены основные физико-химические свойства фермента, важные для проявления активности и взаимодействия с белковыми ингибиторами — pH и температурный оптимумы, термостабильность, чувствительность к ионам металлов. Эти характеристики для трипсиновой протеазы *F. graminearum* приводятся впервые. Результаты исследования могут быть использованы в поиске специфических ингибиторов протеаз в зерне, как защитных белков, для их применения в оценке устойчивости сортов пшеницы к грибному поражению.

Ключевые слова: *Fusarium graminearum*, оптимизация питательной среды, культуральный фильтрат, трипсиноподобная протеаза, очистка, физико-химические свойства.

Введение

Фитопатогенные грибы способны продуцировать экстрацеллюлярные ферменты, такие как эндоглюканаза, хитиназа, ксиланаза, α -амилаза, целлюлаза, липаза, протеаза и ряд других. Эти гидролазы разлагают полимерные вещества объектов, на которых паразитирует грибок, 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 (ПС) белковых субстратов (индукторов), например, таких как казеин, желатин, белки зерна (клейковина). В других работах была показана продукция протеаз в среде с добавлением белковых гидролизатов (например, казеинового, дрожжевого), а также в присутствии соевой, кукурузной муки и солода [2]. Кроме того, уровень протеаз зависит от pH, температуры, наличия и концентрации нитратов и сахаров [3]. Часто в литературе приводятся противоречивые сведения по этому вопросу, что указывает на сложную многофакторную регуляцию синтеза и секреции ферментов даже в контролируемых условиях культивирования *in vitro*.

Микроскопические грибы эволюционно адаптировались усваивать различные источники белка, благодаря способности вырабатывать разнообразные протеолитические ферменты, многие из которых секретируются в среду [4]. Протеазы делятся на шесть основных классов — серин, цистеин, тренин, аспарагин, глутамин и металлопротеазы, в зависимости от присутствия функциональных групп в активном центре. Внеклеточные протеазы грибов в основном серинового типа и представлены се-

мействами субтилизина и трипсина [5]. 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].

Представители 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 пищеварительных ферментов этих грибов являются протеазы, переводящие запасной нерастворимый протеин в легкоусвояемые вещества [8]. Вместе с тем, в зерне злаковых содержатся разнообразные белковые ингибиторы экзогенных ферментов, в т.ч. патогенных грибов. Эти белки относятся к компонентам защитной системы (иммунитета) растений, поскольку они подавляют активность пищеварительных (дигестивных) ферментов и препятствуют росту патогенов [9]. Например, в зерне ячменя установлено наличие ингибиторов сериновых протеаз, содержание которых у разных сортов существенно варьировало [10]. Для пшеницы таких сведений практически нет, между тем проблема фузариозного зерна весьма злободневна, поскольку такое зерно полностью не пригодно для употребления в пищу из-за присутствия опасных токсинов (дезоксиниваленол и др.) [11].

Анализ литературных данных показывает, что в настоящее время 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 актуальным и перспективным.

Цель настоящего исследования — подбор условий культивирования гриба *Fusarium graminearum* с высокой продукцией протеаз, очистка сериновой протеазы из культуральной жидкости и определение некоторых физико-химических свойств фермента. Данная работа является необходимым этапом для поиска, идентификации и применения специфических белковых ингибиторов протеаз.

Материалы и методы исследования

Объект исследований — фитопатогенный гриб *F.graminearum* (штамм F-RKM0142), полученный из Республиканской коллекции микроорганизмов.

Культивирование гриба F. graminearum и получение КФ

Мицелий гриба *F. graminearum* пассировали в пробирки со скошенной агаризованной средой Чапек-Докс (Sigma-Aldrich, США) в стерильных условиях в ламинарном шкафу Airstreamduo AC2-468 (ESCO, Сингапур) и культивировали при температуре 30 °С в течение 10 дней. Затем делали смывы и производили подсчет конидий в камере Горяева. Конидии в количестве $2,2 \times 10^6$ /мл (или $3,8 \times 10^6$ /мл) вносили в 500 мл колбы с модифицированной жидкой ПС Чапек-Докс объемом 100 мл и культивировали при 24 °С в течение 21 дня на шейкере (120 об/мин). Отделение культуральной жидкости от мицелия и спор проводили в течение 30 мин центрифугированием при 3000 g. Супернатант пропускали через бумажный фильтр с красной лентой, полученный культуральный фильтрат (КФ) хранили при –20 °С до использования.

Количественное определение глюкозы

Для количественного определения глюкозы к 0,1 мл КФ (разведенному в 20 раз) добавляли 0,9 мл H₂O и 1 мл 3,5-динитросалициловой кислоты. Реакционную смесь выдерживали в кипящей водяной бане 10 мин и резко охлаждали. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм. Количество глюкозы определяли по калибровочной кривой и выражали в мг/100 мл.

Определение активности протеазы

Для определения активности протеазы к 0,1 мл ферментного образца добавляли 0,1 мл 0,5 М фосфатного буфера рН 7,6, 0,3 мл H₂O и 0,5 мл 1 % бычьего гемоглобина. Смесь инкубировали 4 ч при 37 °С от 1 до 4 ч в зависимости от активности фермента. После инкубации добавляли 1 мл 10 % ТХУ, смесь выдерживали 20 мин при +4 °С и центрифугировали со скоростью 8000 g 15 мин. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Ultrospec II (GE Healthcare, Швеция) при длине волны 280 нм. Активность фермента выражали в ед. активности на 1 мл в ч. За 1 единицу принимали такое количество фермента в образце, которое при гидролизе субстрата вызывает увеличение оптической плотности раствора на 0,01 [12].

Очистка трипсиноподобной протеазы

Белки из КФ, полученного в результате нескольких циклов культивирования гриба, осаждали при 0 °С сульфатом аммония в пределах насыщения от 20 до 80 %. После 30 мин центрифугирования

при 3000 об/мин осадок диализовали против 25 мМ Na-фосфатного буфера pH 7,0 в течение ночи при 4 °С. Полученный после центрифугирования супернатант использовали в качестве источника ферментов.

Для очистки трипсиновой протеазы использовали аффинную хроматографию на иммобилизованном ингибиторе трипсина сои (Sigma-Aldrich, США) по методу [13]. Ковалентную пришивку ингибитора к CNBr-активированной сефарозе 4В (GE Healthcare, Швеция) проводили по прилагаемой прописи. Смола уравнивали 0,05 М Na-фосфатным буфером pH 7,6. Хроматографию вели при температуре 4 °С в колонке размером 1,2×6 см на хроматографической системе низкого давления LCC 100 (Pharmacia, Швеция). Связавшийся фермент десорбировали раствором 50 мМ уксусной кислоты. В собранных белковых фракциях pH быстро доводили до значения 7,0–8,0 раствором 0,2 М NaOH. Фракции с протеазой объединяли и концентрировали на ячейке Amicon 50, фильтр UM-10 (Millipore, США).

Электрофорез белков

Электрофорез белков в ПАГ в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия (ДДС-Na₂) проводили на приборе TV100Y (Scie-Plas, Англия) в пластинах 12 % ПАГ размером 100×80×1 мм по методу Лэммли [14]. После электрофореза пластины ПАГ фиксировали в 12,5 % ТХУ 1 час и окрашивали 0,15 % кумасси бриллиантовым голубым G-250. Для определения молекулярного веса использовали белки-маркеры (Pharmacia, Швеция).

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

Результаты исследования и их обсуждение

*Оптимизация питательной среды для продукции протеазы грибом *F. graminearum**

С целью получения протеаз гриба *F. graminearum* в нашей работе для погруженного культивирования был использован минеральный состав среды Чапек-Докс с некоторой модификацией. Из состава был исключен нитрат натрия, а трехпроцентная сахароза была заменена на однопроцентную глюкозу. По некоторым данным, нитраты и относительно высокие концентрации сахаров могут выступать в качестве репрессоров синтеза некоторых гидролаз, в т.ч. и протеаз [15]. Таким образом, базовая среда включала 1,5 г КН₂РO₄, 0,25 г MgSO₄·7H₂O, 0,01 г FeSO₄·7H₂O и 1 г глюкозы на 100 мл воды. Все эксперименты были проведены в одинаковых условиях температуры 24 °С на качалке со скоростью вращения 120 об./мин и с 12 ч режимом освещения. Культивирование вели в течение 21-го дня в 3-х повторностях, пробы для анализа ферментной активности отбирались через каждые 3 дня.

В первом эксперименте исследована зависимость динамики роста массы мицелия от изменения концентрации глюкозы и значения pH среды в период цикла культивирования гриба *F. graminearum* на модифицированной среде Чапек-Докс. При этом четко прослеживалось накопление биомассы с увеличением pH и снижением количества глюкозы в культуральной жидкости. Максимальная масса мицелия наблюдалась к концу культивирования — на 18-й и 21-й дни (рис. 1).

В следующем эксперименте исследовалось влияние различных белковых добавок (индукторов) — 1 % казеина по Гамарстену, 1 % желатина из рыб и 1 % дрожжевого экстракта на активность секретируемой грибом протеазы. Пробы культуральной жидкости отфильтровывали, обессоливали на колонке CentryPureP10 (Serva, Германия) и хранили при –20 °С до измерения. В результате были получены следующие данные. Наибольшая протеазная активность наблюдалась в варианте культивирования гриба в среде с добавлением 1 % дрожжевого экстракта (рис. 2). Казеин и желатин не оказывали существенного влияния на уровень накопления протеазы. Таким образом, дрожжевой экстракт легче усваивается грибом и является более эффективным индуктором синтеза фермента. Максимальная активность протеазы (более 35 % по сравнению с другими добавками) наблюдалась на 18-й день культивирования, затем происходило снижение ферментной активности.

Исследовано также влияние добавок углеводного источника — глюкозы на активность протеазы. В эксперименте использовали две среды с 1 % дрожжевым экстрактом. В опытном варианте в среду добавляли 1 % глюкозу, в контрольном варианте сахар отсутствовал. В результате наибольшая протеазная активность была отмечена для варианта среды с 1 % дрожжевым экстрактом и 1 % глюкозой на 15–18-е сутки культивирования — почти в 2,5 раза выше по сравнению с контролем (рис. 3). Следует отметить, что при повышении концентрации глюкозы до 2–3 % усиливался рост гриба, однако синтез протеаз возрастал незначительно (не более 10–15 %).

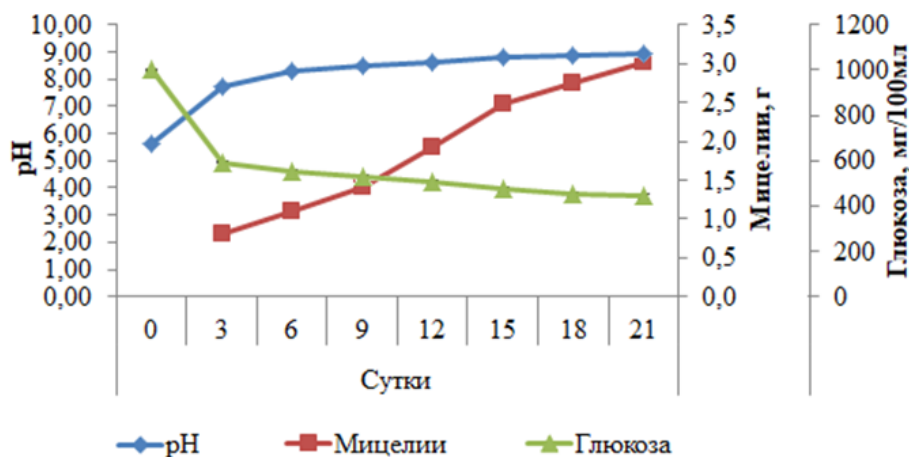


Рисунок 1. Изменение pH, концентрации глюкозы и массы мицелия в культуре гриба *F. graminearum*

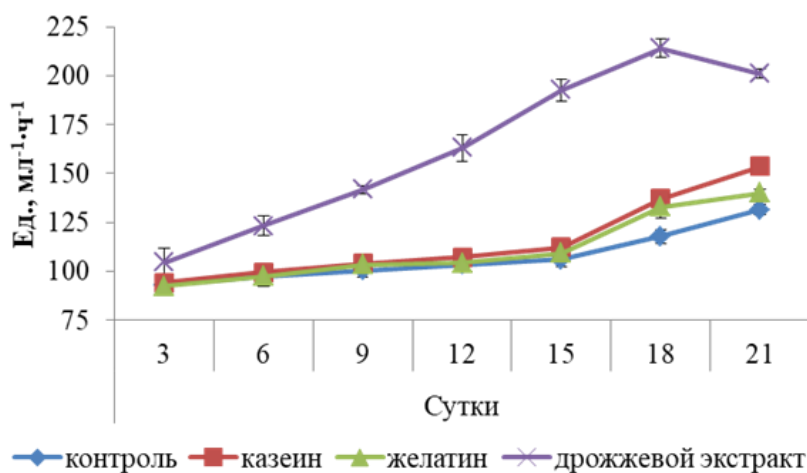


Рисунок 2. Изменение активности протеазы в культуре гриба *F. graminearum* в присутствии различных белковых индукторов

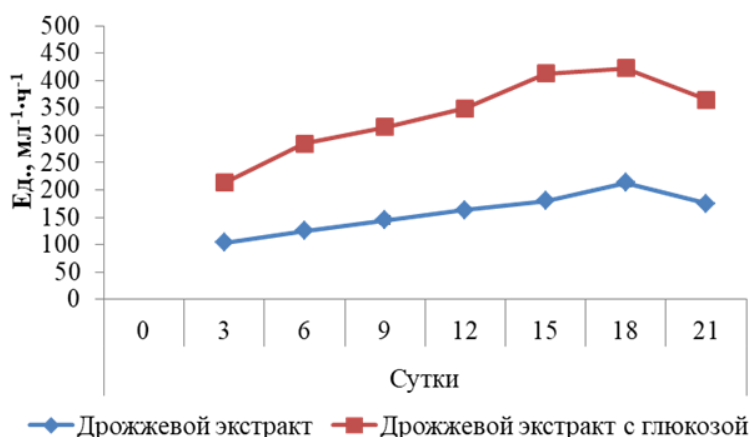


Рисунок 3. Изменение активности протеазы в культуре гриба *F. graminearum* в присутствии дрожжевого экстракта с глюкозой и без глюкозы

Важным фактором роста грибной культуры является количество используемого инокулюма. В связи с этим исследовано влияние разных дозировок конидий *F. graminearum*, вносимых в среду, на продуцирование протеазы. Установлено, что внесение конидий в большем количестве

($3,8 \times 10^6$ /100 мл) способствовало увеличению продукции протеаз на 20 % по сравнению с дозой $2,2 \times 10^6$ /100 мл. В первом случае максимум фермента приходился на 12-й, а во втором позднее — на 18-й день культивирования гриба (рис. 4). Дальнейшее повышение вносимой дозы инокулята в ПС является нецелесообразным в связи со сложностью его наработки.

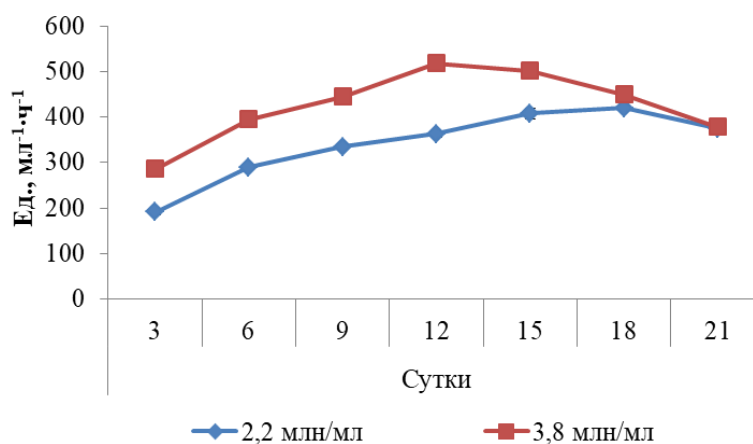
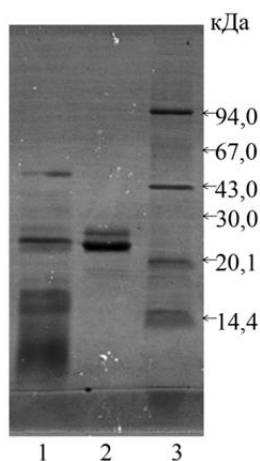


Рисунок 4. Изменение активности протеазы в культуре гриба *F. graminearum* при внесении в среду конидий в количестве $2,2 \times 10^6$ /мл и $3,8 \times 10^6$ /мл

Очистка трипсиноподобной протеазы из КФ гриба *F. graminearum* и определение некоторых физико-химических свойств фермента

После выполненного аналитического варианта, где были оптимизированы режимы культивирования гриба *F. graminearum*, была проведена наработка препаративного количества протеазы. Предварительно белки КФ, собранного после нескольких циклов культивирования, осаждали и концентрировали сульфатом аммония в пределах насыщения от 20 до 80 %. Как отмечалось выше, грибы синтезируют в основном протеазы серинового типа (трипсин и субтилизин подобные). Для очистки трипсиновой протеазы использовали аффинную (биоспецифичную) хроматографию на ингибиторе трипсина сои, ковалентно связанном с CNBr-активированной сефарозой 4В. По данным ДДС-электрофореза, очищенная трипсиноподобная протеаза была представлена двумя белковыми полосами с М.в. около 24 и 27 кДа (рис. 5). При этом присутствие других белков практически не обнаружилось.



1 — белки КФ; 2 — очищенная трипсиноподобная протеаза после аффинной хроматографии; 3 — белки-маркеры М.в.

Рисунок 5. ДДС-электрофорез трипсиноподобной протеазы гриба *F. graminearum*

Определение физико-химических свойств трипсиноподобной протеазы гриба F. graminearum

Одними из наиболее важных физико-химических свойств ферментов являются рН и температурный оптимумы действия, а также термостабильность. Для определения оптимума рН очищенной сериновой 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 трис-буфер. Данные показали, что оптимум действия протеазы находился в районе рН 7,0–8,0 (рис. 6, а). В целом, фермент был малоактивен при кислых значениях рН, но проявлял заметную активность в нейтральной и щелочной средах, вплоть до значения 10,0. Температурный оптимум действия протеазы соответствовал 40–50 °С. Для изучения термостабильности ферментные образцы прогревали при повышенных значениях температуры от 40 до 80 °С в течение 10 мин. Контролем служили ферменты без тепловой обработки. Трипсиноподобная протеаза оказалась термолабильной и полностью инактивировалась при 60 °С (рис. 6, б).

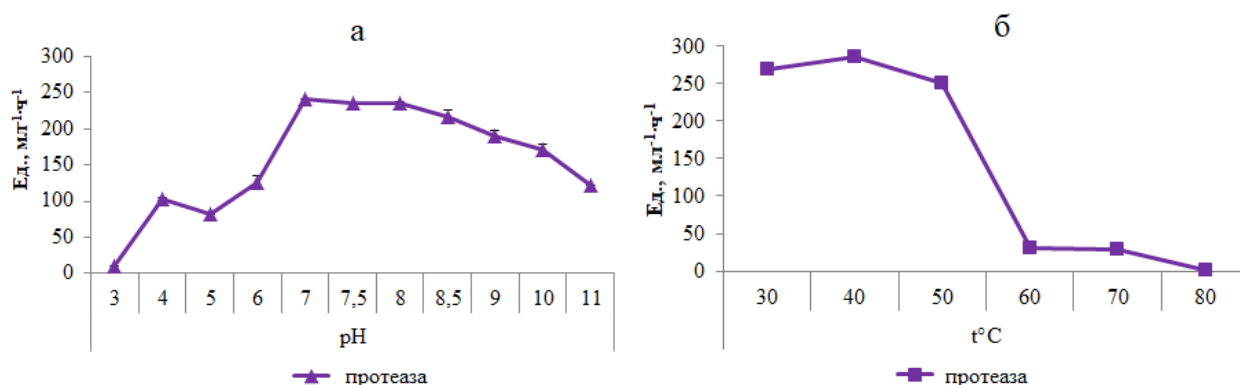


Рисунок 6. рН-оптимум (а) и термостабильность (б) трипсиноподобной протеазы

Изучено влияние двухвалентных ионов металлов на активность трипсиновой протеазы гриба. В присутствии катионов Mg^{2+} и Ca^{2+} в концентрации 1 мМ протеазная активность практически не изменялась относительно контроля (отсутствие металлов), тогда как ионы Cu^{2+} и Mn^{2+} значительно снижали уровень фермента, особенно при 10 мМ концентрации (см. табл.).

Т а б л и ц а

Влияние ионов металлов на активность трипсиноподобной протеазы гриба *F. graminearum*

Ионы металлов	Концентрация, мМ	Остаточная активность, %
Mg^{2+}	1	97±1,77
	10	93±1,73
Ca^{2+}	1	94±1,74
	10	89±1,89
Mn^{2+}	1	81±1,91
	10	42±1,32
Cu^{2+}	1	72±1,81
	10	22±1,42
Ba^{2+}	1	92±1,82
	10	87±1,67

Катионы Ba^{2+} оказывали слабое ингибирующее действие на протеазу. Таким образом, очищенная трипсиновая протеаза гриба проявляет существенные различия в чувствительности к наличию двухвалентных металлов в среде.

Многие представители рода *Fusarium* являются опасными патогенами зерновых культур. Среди этих грибов *F. graminearum* занимает особое место, поскольку отличается особой агрессивностью за счет высокой выработки ряда сильных токсинов, угнетающих рост растений и снижающих качество зерна. Другим фактором патогенности грибов, как показано в последнее время, являются протеазы, в связи с чем их изучение становится актуальным. Следует отметить, что, в отличие от бактерий и млекопитающих, грибные протеазы гораздо менее изучены.

Как известно, существует множество питательных сред, используемых при культивировании грибов. Среди них имеются варианты, специально разработанные под конкретные цели, например, для хранения и поддержания мицелиев, получения макро- и микроконидий, спор, наработки вторичных соединений, токсинов, белков и т.д., имеющих практическое значение. Однако универсальных протоколов питательных сред для продуцирования протеаз фитопатогенными грибами при научных исследованиях не существует, поэтому для каждого вида ПС и режимы культивирования подбираются индивидуально.

Анализ литературы, в целом, показывает, что чаще всего используется среда Чапека и реже Армстронга, однако при этом многими не учитывается наличие в их составе значительного количества сахарозы и нитратов. Между тем хорошо известно, что эти вещества (эффекторы) могут подавлять синтез ряда гидролитических ферментов, в т. ч. и протеаз путем катаболитной репрессии. Иными словами, накопление этих белков в культуре регулируется метаболически. В данной работе при культивировании гриба *F. graminearum* этот факт был учтен, и концентрация углевода была уменьшена до 1 %, а нитрат был вообще исключен. Добавление в ПС 1 % дрожжевого экстракта было обосновано необходимостью присутствия азотного питания и одновременно белкового индуктора синтеза и секреции протеаз. В этом отношении дрожжевой экстракт оказался более подходящим по сравнению с казеином и желатином. Внесение повышенной дозы инокулята ($3,8 \times 10^6$ конидий/100 мл) способствовало, с одной стороны, заметному укорочению срока культивирования гриба, с другой — меньшим потерям активности фермента ввиду его относительной термолабильности и способности к автолизу.

Важными представляются данные по взаимосвязи изменения рН, концентрации глюкозы и роста биомассы в культуре гриба. Четко прослеживаемые закономерности дают возможность использования этих параметров для косвенной и быстрой оценки уровня накопления протеазы в среде, поскольку измерение рН и количества глюкозы гораздо проще и быстрее, чем определение ферментной активности.

Для очистки грибных протеаз в большинстве исследований используются методы гельфильтрации и ионообменной хроматографии, довольно длительные, трудоемкие и сопровождающиеся значительными потерями фермента. В данной работе была применена более эффективная аффинная хроматография на ингибиторе трипсина сои — лиганде, высокоспецифичном для трипсиноподобных белков. Высокая степень очистки позволила установить молекулярный вес фермента и основные физико-химические свойства, необходимые для проявления его активности и взаимодействия со специфическими белками-ингибиторами.

Заключение

В результате исследований подобрана оптимальная среда для получения протеазы гриба *F. graminearum* на основе модифицированного минерального состава ПС Чапек-Докс с добавлением 1 % глюкозы и 1 % дрожжевого экстракта в качестве источника белка и индуктора синтеза фермента. Период культивирования гриба при внесении $3,8 \times 10^6$ конидий/100 мл составляет 12–14 дней, при котором секреция протеазы максимальная. Внешние условия культивирования: температура 24 °С, 12 ч режим освещения, скорость вращения качалки 120 об/мин. С помощью аффинной (биоспецифической) хроматографии из накопленного КФ была получена высокоочищенная сериновая трипсиноподобная протеаза с М.в. 24 и 27 кДа. Даны характеристики физико-химических свойств фермента — оптимумы действия, термостабильность, чувствительность к действию ионов металлов.

Оптимизация состава ПС и вносимых компонентов (глюкозы и дрожжевого экстракта), а также концентрация инокулята обоснованы отдельными экспериментами. Данные по очистке и физико-химическим свойствам трипсиновой протеазы, секретлируемой грибом *F. graminearum* являются новыми и пополняют накопленные сведения по грибным протеолитическим ферментам.

Разработанные методы культивирования гриба и очистки трипсиновой протеазы могут быть использованы для поиска и идентификации их специфических ингибиторов в зерне пшеницы.

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», ОР11465447, договор № 337 от 07 июля 2021 года.

References

- 1 Pessôa, M.G., Paulino, B.N., Mano, M., Neri-Numa, I.A., Molina, G., & Pastore, G.M. (2017). *Fusarium* species—a promising tool box for industrial biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101 (9); 3493–3511. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8255-z>
- 2 Sajeed Ali, S., & Vidhale, N.N. (2013). Protease production by *Fusarium oxysporum* in solid-state fermentation using rice bran. *Am. J. Microbiol. Res.*, 1 (3); 45–47. <https://doi.org/10.12691/ajmr-1-3-2>
- 3 Gupta, V.K., Kubicek, C.P., Berrin, J.G., Wilson, D.W., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E., & Ezeji, T. (2016). Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. *Trends Biochem. Sci.*, 41 (7); 633–645. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.006>
- 4 Lowe, R.G.T., McCorkelle, O., Bleackley, M., Collins, C., Faou, P., Mathivanan, S., & Anderson, M. (2015). Extracellular peptidases of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Front. Plant Sci.*, 6 (962); 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. (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 36 (Database issue); 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. (2010). Trypsin-like proteins of the fungi as possible markers of pathogenicity. *Fungal Biol.*, 114 (2–3); 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2009.11.004>
- 7 Chandrasekaran, M., Thangavelu, B., Chun, S.C., & Sathiyabama, M. (2016). Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. *J. Gen. Plant Pathol.*, 82 (5); 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0672-9>
- 8 Eggert, K., Rawel, H.M., & Pawelzik, E. (2011). In vitro degradation of wheat gluten fractions by *Fusarium graminearum* proteases. *Eur. Food Res. Technol.*, 233 (4); 697–705. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1566-x>
- 9 Mosolov, V.V., & Valueva, T.A. (2005). Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 41 (3); 227–246. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0040-6>
- 10 Pekkarinen, A.I., Longstaff, C., & Jones, B.L. (2007). Kinetics of the inhibition of *Fusarium* serine proteinases by barley (*Hordeum vulgare* L.) inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (7); 2736–2742. <https://doi.org/10.1021/jf0631777>
- 11 Ortega, L.M., Kikot, G.E., Astoreca, A.L., & Alconada, T.M. (2013). Screening of *Fusarium graminearum* isolates for enzymes extracellular and deoxynivalenol production. *J. Mycol.*, 2013 (358140); 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/358140>
- 12 Tsuchida, O., Yamagata, Y., Ishizuka, T., Arai, T., Yamada, J.-I., Takeuchi, M., & Ichishima, E. (1986). An alkaline proteinase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Curr. Microbiol.*, 14 (1); 7–12. <https://doi.org/10.1007/bf01568094>
- 13 Ibrahim-Granet, O., & Bertrand, O. (1996). Separation of proteases: old and new approaches. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 684 (1–2), 239–263. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(96\)00102-8](https://doi.org/10.1016/0378-4347(96)00102-8)
- 14 Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227 (5259); 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- 15 Fortelius, C., & Markkanen, P. (2000). Nutritional regulation of proteinase production in the fungus, *Tritirachium album*. *J. Ind. Microbiol.*, 24 (6), 369–373. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000012>

Ә.О. Абайлдаев, В.А. Кузовлев, А.А. Хакимжанов

Фитопатогенді *Fusarium graminearum* саңырауқұлағының протеазасын өндіру үшін қоректік ортаны оңтайландыру және ферменттің сипаттамасы

Дәнді дақылдардың саңырауқұлақ ауруларына төзімділігін арттырудың заманауи бағыттарының бірі — патогендердің гидролитикалық аскорыту ферменттерін және олардың астықтағы ақуыз ингибиторларын зерттеу. Бұл зерттеуде фермент синтезінің индукторы ретінде 1 % глюкоза мен 1 % ашытқы сығындысынан тұратын *Fusarium graminearum* фитопатогендік саңырауқұлағының протеазасын алу үшін оңтайлы қоректік орта анықталған. $3,8 \times 10^6$ конидий/100 мл енгізу кезінде саңырауқұлақты өсіру кезеңі 12–14 күнді құрайды, бұл кезде протеаза синтезі максималды болады. Ұсынылған ДДС-электрофорез деректері бойынша 24 М.в және 27 кДа екі ақуыздан аффиндік (биоарнайылығы) хроматография әдісімен препараттық мөлшерде алынған ФК-дан экстрацеллюлярлы серинді трипсин тәрізді протеаза тазартылды. Белсенділік пен белок ингибиторларымен әрекеттесу үшін маңызды ферменттің негізгі физика-химиялық қасиеттері, яғни рН және температураның оптималдылығы, термиялық тұрақтылық және металл иондарына сезімталдылығы анықталды. *F. graminearum* трипсин протеазасына арналған бұл сипаттамалар алғаш рет келтірілген. Зерттеу нәтижелерін бидай сорттарының саңырауқұлақ инфекциясына төзімділігін бағалауда қолдану үшін қорғаныс белоктары ретінде дәндегі протеазалардың ерекше ингибиторларын іздеуде пайдалануға болады.

Кілт сөздер: *Fusarium graminearum*, қоректік ортаны оңтайландыру, дақылдық сүзгі, трипсин тәрізді протеаза, тазарту, физика-химиялық қасиеттер.

A.O. Abaildayev, V.A. Kuzovlev, A.A. Khakimzhanov

Optimization of the culture media for protease production by phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum* and characterization of the enzyme

One of the modern directions of increasing the resistance of cereal crops to fungal diseases is the study of hydrolytic digestive enzymes of pathogens and their protein inhibitors in grain. In this study, the optimal nutrient media for obtaining the protease of the phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum* containing 1 % of glucose and 1 % of yeast extract as an inducer of enzyme synthesis is determined. The cultivation period of the fungus with the inoculation of 3.8×10^6 conidia / 100 ml is 12–14 days, at which the synthesis of protease is maximum. By affinity (biospecific) chromatography, extracellular serine trypsin-like protease is purified from the accumulated preparative amount of cultural filtrate, represented by two proteins with MW-24 and 27-kDa according to SDS electrophoresis data. The main physicochemical properties of the enzyme important for its activity and interaction with protein inhibitors — pH and temperature optima, thermal stability, sensitivity to metal ions, are established. These characteristics for the trypsin protease of *F. graminearum* are given for the first time. The study results can be used in the search for specific protease inhibitors in grain as protective proteins for their use in assessing the resistance of wheat varieties to fungal attacks.

Keywords: *Fusarium graminearum*, nutrient media optimization, culture filtrate, trypsin-like protease, purification, physicochemical properties.