

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 6, Number 324 (2017), 176 – 182

Y. M. Dyo, A. K. Tursunova, O. V. Chebonenko, A. Zh. Amirkulova, O. A. Sapko,  
A. Y. Elchibekova, A. B. Mukhametkali, A. T. Zhaparova A. Sh. Utarbaveva

M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.  
E-mail: a.utar@mail.ru

**ENZYME ACTIVITY OF CELLULAR EXTRACTS  
OF TRANSPLASTOMIC STRAINS OF *Chlamydomonas* CARRIED  
WITH GENETIC INSERTS *St-gluB* AND *St-ghta2***

**Abstract.** The use of modern genetic engineering methods for the production of biofungicidal preparations based on microalgae is a new and topical direction with a great perspective along with widely used microbial recombinant preparations. Hydrolytic enzymes are part of a complex system of plant protective response to the effects of pathogens. It is proved that the activity of chitinases increases significantly when the plant interacts with the pathogen. The aim of the study was to determine the level of enzymatic activity of recombinant *St-gluB* and *St-ghtA2* in cell extracts of transplastic *Chlamydomonas* strains and optimize the conditions for cultivation of promising transformants. The level of enzymatic activity of recombinant *St-gluB* and *St-ghtA2* in cell extracts of transplastic *Chlamydomonas* strains was determined and conditions for cultivation of promising transformants were optimized. As a result of the studies of enzyme activity, 8 transformants *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72-4 with *St-gluB* insert and 4 with *St-ghtA2* insert showed that the extracts from lyophilized biomass, which are subject to finer purification, are more active than the coarse cellular extracts. Based on the obtained data on the activity of recombinant enzymes, the two most promising transformed strains – *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 - CH1 and GB4 – were selected.

**Keywords:** *Chlamydomonas*, microalgae, recombinant PR2, PR3 proteins, enzymatic activity, cellular extracts.

УДК 577.21: 581.19: 632.938

Ю. М. Дё, А. К. Турсунова, О. В. Чебоненко, А. Ж. Амиркулова, О. А. Сапко,  
А. Ю. Ельчибекова, А. Б. Мухаметкали, А. Т. Жапарова, А. Ш. Утарбаева

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина» КН МОН РК,  
Алматы, Казахстан

**ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТОВ  
ТРАНСПЛАСТОМНЫХ ШТАММОВ *Chlamydomonas*,  
НЕСУЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВСТАВКИ *St-gluB* И *St-ghta2***

**Аннотация.** Использование современных генно-инженерных методов для получения биофунгицидных препаратов на основе микроводорослей является новым актуальным направлением, имеющим большую перспективу наряду с широко используемыми микробными рекомбинантными препаратами. Гидролитические ферменты являются частью сложной системы механизма защитного ответа растений на воздействие патогенов. Доказано, что активность хитиназ значительно возрастает при взаимодействии растения с патогеном. Целью исследования было определить уровень ферментативной активности рекомбинантных *St-gluB* и *St-ghtA2* в клеточных экстрактах транспластомных штаммов *Chlamydomonas* и оптимизировать условия культивирования перспективных трансформантов. Определен уровень ферментативной активности рекомбинантных *St-gluB* и *St-ghtA2* в клеточных экстрактах транспластомных штаммов *Chlamydomonas* и оптимизи-

рованы условия культивирования перспективных трансформантов. В результате проведенных исследований ферментативной активности 8 трансформантов *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 – 4 со вставкой *St-gluB* и 4 со вставкой *St-chtA2* было показано, что наибольшей активностью обладают экстракты из лиофилизированной биомассы, подверженные более тонкой очистке, по сравнению с грубыми клеточными экстрактами. На основании полученных данных об активности рекомбинантных ферментов, были отобраны 2 наиболее перспективных трансформированных штамма – *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 – CH1 и GB4.

**Ключевые слова:** *Chlamydomonas*, микроводоросли, рекомбинантные PR2, PR3 белки ферментативная активность, клеточные экстракты.

Фундаментальные исследования в области формирования естественного иммунитета растений сфокусированы главным образом на одном из основных направлений по борьбе с фунгальными патогенами – получении ГМО растений картофеля с приобретенной путем встраивания генов различных классов хитиназ и глюканаз устойчивостью к фунгальным патогенам [1, 2], а также перенос гена  $\beta$ -1,3-глюканазы картофеля в другие растения [3]. Указанная стратегия основана на том, что PR-белки растений (хитиназы и  $\beta$ -1,3-глюканазы) играют важную защитную роль в фитоиммунном ответе на действие патогена [4, 5].

Гидролитические ферменты являются частью сложной системы механизма защитного ответа растений на воздействие патогенов. Доказано, что активность хитиназ значительно возрастает при взаимодействии растения с патогеном [6]. Участие хитиназ (ЕС 3.2.1.14) и  $\beta$ -1,3-глюканаз (ЕС 3.2.1.39) в защитном ответе подтверждается данными о том, что очищенные препараты растительных хитиназ способны в сочетании с действием  $\beta$ -1,3-глюканаз разрушать изолированные клеточные стенки гриба и значительно ингибировать *in vitro* рост патогенных грибов [7, 8].

Некоторые изоформы гидролитических ферментов могут накапливаться конститутивно, однако, при заражении их уровень возрастает в несколько раз [9] и индуцируется координировано [10] – это составляет важную часть защитной реакции растений, направленной на угнетение роста грибов.

Хитиназы широко распространены среди живых организмов и обнаруживаются в грибах, бактериях, растениях и животных [11]. Они делятся на семейства согласно классификации по схожести их аминокислотной последовательности [12]. Хитиноподобные ферменты также делятся по характеру ферментативного действия на субстрат. Эндохитиназы идентифицируются как ферменты, катализирующие случайное расщепление внутренних точек полимера хитина. Экзохитиназы катализируют массивное выделение ацетилхитобиозы или N-ацетилглюкозамина из не восстанавливающих концов хитина и таким образом относятся к хитобиозидазам и  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазам соответственно [13, 14].

Хитиназы демонстрируют различные функции в различных организмах. В бактериях они чаще всего вовлечены в процесс обмена веществ, в то время, как в дрожжах и некоторых грибах они преимущественно задействованы в процессе морфогенеза. У животных и растений хитиназы играют основную роль в защите организма от атаки патогена [15].

Индукция синтеза PR-белков при инфицировании вирусами, бактериями и грибами является одним из основных механизмов защиты растений от фитопатогенов. В этой связи, особое внимание уделяют гидролитическим ферментам – хитиназам и  $\beta$ -1,3-глюканазам, защитная роль которых составляет важную часть в семействах PR-белков [16].

Использование современных генно-инженерных методов для получения биофунгицидных препаратов на основе микроводорослей является новым актуальным направлением, имеющим большую перспективу наряду с широко используемыми микробными рекомбинантными препаратами. Необходимость разработки способов повышения устойчивости к патогенам на основе современных молекулярно-биологических и биохимических подходов – выявления молекулярных и биохимических механизмов участия PR-белков в формировании устойчивости к патогенам и разработки на их основе биологических средств защиты очевидна и несомненна.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования служили транспластомные штаммы полученные в результате проведенной ранее трансформации клеток двух идентичных клонов микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 с применением двух типов плазмидного вектора *pSR Sap1* – несущего ген *St-gluB* и *St-chtA2* было получено 8 трансформантов – 4 со вставкой *St-gluB* и 4 со вставкой *St-chtA2*.

Экстракцию активных компонентов проводили четырьмя различными методами, из лиофилизированной, нативной и влажной биомассы, а также нативного супернатанта (культуральной жидкости).

**Э к т р а к ц и я 1.** *Приготовление грубого экстракта и выделение фракции растворимых протеинов.* Культуру *C. Reinhardtii* выращивали до оптической плотности 2–3 при 750 нм, далее проводили сбор биомассы путем центрифугирования при 8000 g в течение 10 минут. Клетки ресуспендировали в 20 mM Na-Pi буфере ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH доводили до 6,9 с помощью NaOH) до концентрации 100-кратного объема культуры. В отдельных случаях к клеточному экстракту добавляли ингибитор протеазы. Далее клетки разрушали тройным циклом охлаждения в жидком азоте с последующим нагреванием до 37°C и встряхиванием на вортексе в течение 10 секунд. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали при 21 000 g в течение 5 минут (либо 3000 g в течение 20 минут в случае когда объем не превышает 2 мл) и супернатант (соответствующий грубому экстракту) отбирался для последующих работ. Для более полного удаления клеточных остатков и фракции нерастворимых протеинов грубый экстракт подвергали последующему центрифугированию при 100 000 g в течение 1 часа.

**Э к т р а к ц и я 2.** *Преципитация сульфатом аммония.* Образцы фракции растворимых протеинов перемешивались на льду с медленным введением сульфата аммония до достижения желаемой концентрации. Перемешивание продолжали в течение 30 минут. Далее раствор центрифугировали при 3000 g в течение 30 минут. Осадок ресуспендировали в меньшем объеме 20 mM Na-Pi буфера и использовали для дальнейших исследований. Супернатант поэтапно обрабатывали градиентной концентрацией сульфата аммония аналогично описанному выше методу [17].

**Э к т р а к ц и я 3.** *Трис-буферная экстракция белков.* При экстракции белков широко применяют различные буферные смеси с определенными значениями pH среды, органические растворители, а также неионные детергенты разрушающие гидрофобные взаимодействия между белками и липидами, и между белковыми молекулами. В данном методе использовался 0,2 M трис-буфер с 0,1 M раствором соляной кислоты [18].

Леофилизиованная биомасса, использовалась для экстракции активных компонентов с использованием методов, описанных выше – приготовлением грубого экстракта и преципитации сульфатом аммония. Используемые в качестве контроля экстракты *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72, несущего пустую вставку (empty) были получены из леофилизиованной биомассы клона.

Определение уровня хитиназной активности проводили по протоколу, предложенному производителем набора для определения хитиназной активности флуориметрическим методом (Sigma Aldrich, Chitinase Assay Kit, Fluorimetric, CN CS1030) с использованием трех различных субстратов для чувствительного и специфичного определения хитиназной активности: 4-метилумбеллиферил N,N'- $\beta$ -D-хитобиозид – субстрат для детекции экзохитиназной (хитобиозидазной) активности; 4-метилумбеллиферил N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминид – субстрат для для детекции экзохитиназной ( $\beta$ -N-глюкозаминидазной) активности; 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D- N,N', N''-триацилхитотриоза – субстрат для детекции эндохитиназной активности в пяти биологических повторностях. Флуориметрию образцов проводили при возбуждении 360 нм и эмиссии при 450 нм. Определение единицы активности (Ед.акт.): Одна единица хитиназной активности равняется 1 ммоль 4-метилумбеллиферона из соответствующего субстрата в минуту при pH 5.0 при 37 °C [19].

Определение уровня ферментативной активности глюканазы проводили методами, принятыми для анализа экзо-глюканазных препаратов: проведение ферментативной реакции в пробирках и колориметрическое детектирование редуцирующих сахаров, освобождающихся при ферментации субстрата  $\beta$ -глюкана. Детектирование проводили с использованием колориметрических методов. Реакцию расщепления глюкана проводили при pH 4,7 (ацетатный буфер) и температуре 50°C. Для индикации продуктов ферментации использовали фотоколориметрические методы с ДНС [20]. Детерминирование активности рекомбинантной глюканазы проводили прямым сравнением изменения оптической плотности препарата и контролей за счет образования редуцирующих сахаров, без выражения активности в международных единицах. В качестве контроля использовался стандартный препарат  $\beta$ -глюканазы, полученной из культуры *Trichoderma reesei*.

**Результаты и их обсуждение.** Определение уровня ферментативной активности клеточных экстрактов проводили раздельно для установления хитиназной и глюканазной активности

препаратов. В качестве дополнительного контроля с целью исключения нативной ферментативной активности, все экстракты, полученные из транспластомных штаммов, тестировались на наличие хитиназной и глюканазной активности вне зависимости от характера генетической вставки.

Хитиназа катализирует гидролитическое расщепление  $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидных связей, представленных в биополимерах N-ацетилглюкозамина, чаще всего хитина. Схема и результаты определения уровня хитиназной активности препаратов, полученных из биомассы исследованных трансформантов, приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты расчета ферментативной (хитиназной) активности фракционных препаратов

Фракция	Ед. акт. /мл								
	СН1	СН2	СН3	СН4	GB1	GB2	GB3	GB4	TN72 blank
Э1ВБ	0,0213	0,0163	0,0151	0,0116	0,0089	0,0080	0,0087	0,0107	0,0011
Э2ВБ	0,0332	0,0206	0,0183	0,0139	0,0126	0,0123	0,0126	0,0130	0,0020
Э3ВБ	0,0178	0,0154	0,0148	0,0114	0,0078	0,0074	0,0079	0,0101	0,0007
Э1Л	0,0242	0,0196	0,0172	0,0120	0,0109	0,0111	0,0111	0,0118	0,0014
Э2Л	0,0264	0,0201	0,0176	0,0137	0,0117	0,0113	0,0114	0,0122	0,0018
Э3Л	0,0210	0,0189	0,0174	0,0133	0,0120	0,0117	0,0115	0,0124	0,0017
НБ	0,0114	0,0089	0,0104	0,0093	0,0007	0,0092	0,0096	0,0099	0,0002
НСН	0,0011	0,0007	0,0005	0,0002	0,0002	0,0004	0,0005	0,0005	0,0001

Из приведенных в таблице данных, очевидно, что наибольшей величиной хитиназной активности – 0,0332 ед. акт./мл – обладает фракция Э2ВБ биомассы СН1, а наименьшей – 0,0001 ед. акт./мл – контрольная фракция НСН биомассы TN72 blank.

Также показано, что фракции, полученные из биомассы трансформированных микроводорослей, несущие ген *St-chtA2* обладают наибольшей величиной хитиназной активности, по сравнению с экстракционными фракциями из биомассы трансформантов, несущих вставку *St-gluB*.

Использованная методика определения глюканазной активности позволяет проводить прямое сравнение уровня содержания редуцирующих сахаров, как продуктов распада ферментного субстрата в образце, поскольку их содержание прямо пропорционально активности фермента ( $\beta$ -1,3-глюканазы) в среде. В таблице 2 приведены результаты фотоэлектрокалориметрического анализа содержания редуцирующих сахаров в фракционных образцах.

В результате детекции редуцирующих сахаров в исследуемых образцах, было показано, что наибольшей глюканазной активностью обладает фракция Э2ВБ из биомассы клона GB4, а наименьшей – фракция НСН из биомассы TN72 blank. Также было показано, что наиболее выраженной глюканазной активностью обладают фракции, полученные из биомассы трансформированных микроводорослей, несущих вставку *St-gluB*.

Таблица 2 – Результаты фотоэлектрокалориметрического анализа содержания редуцирующих сахаров в фракционных образцах

Фракция	Глюканазная активность								
	Типы трансформантов								
	СН1	СН2	СН3	СН4	GB1	GB2	GB3	GB4	TN72 blank
Э1ВБ	0,103	0,087	0,074	0,045	0,225	0,196	0,218	0,352	0,015
Э2ВБ	0,124	0,106	0,091	0,069	0,261	0,318	0,324	0,416	0,022
Э3ВБ	0,085	0,076	0,052	0,034	0,211	0,185	0,197	0,327	0,007
Э1Л	0,092	0,078	0,063	0,036	0,218	0,188	0,209	0,338	0,019
Э2Л	0,099	0,081	0,068	0,039	0,222	0,192	0,211	0,344	0,024
Э3Л	0,067	0,046	0,034	0,021	0,199	0,182	0,202	0,321	0,019
НБ	0,042	0,031	0,02	0,016	0,184	0,166	0,179	0,224	0,005
НСН	0,025	0,017	0,013	0,009	0,167	0,154	0,165	0,118	0,004

На основании полученных данных об активности рекомбинантных ферментов, были отобраны 2 наиболее перспективных трансформированных штамма – *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 – CH1 и GB4.

Оптимизация условий культивирования перспективных трансформантов *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72.

Таблица 3 – Условия проведения оптимизации условий культивирования транспластомных штаммов *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 - CH1 и GL4

Показатель	Вар 1	Вар 2	Вар 3	Вар 4	Вар 5	Вар 6	Вар 7	Вар 8
Состав среды	HSM TAP	HSM TAP	HSM TAP	HSM TAP	HSM TAP	HSM TAP	HSM TAP	HSM TAP
Свет	30 люкс	40 люкс	50 люкс	60 люкс	70 люкс	80 люкс	90 люкс	100 люкс
Продувание воздухом	+ –	+ –	+ –	+ –	+ –	+ –	+ –	+ –
Температура культивирования	21°C	21°C	21°C	21°C	21°C	21°C	21°C	21°C
Объем инокулята	0.5 л 2 мл	0.5 л 2 мл	0.5 л 2 мл	0.5 л 2 мл	0.5 л 2 мл	0.5 л 2 мл	0.5 л 2 мл	0.5 л 2 мл
Тип биореактора	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4

Проведение вторичной оптимизации условий культивирования перспективных трансформантов *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 в лабораторных условиях осуществлялось путем подбора оптимального режима освещения на фоне *Const.* температуры культивирования и качественного состава питательной среды, с учетом наиболее рентабельной схемы культивирования микроводорослей в лабораторных условиях, выбранной ранее.

В результате подбора оптимальной конструкции биореактора было показано, что культивирование периодической суспензионной культуры в стерильных пластиковых пакетах является наиболее приемлемым и соответствующим цели данного проекта.

Проведенная оптимизация и масштабирование условий культивирования 2 перспективных транспластомных штаммов *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 – CH1 и GB4 показали, что оптимальными условиями культивирования для указанных трансформантов являются:

- питательная среда TAP;
- постоянное освещение мощностью 30–50 люкс;
- температура 21°C;
- продувание стерильным воздухом 1 л/мин.

Таким образом, стратегия стимулирования приобретенного иммунитета путем применения рекомбинантных ферментов, синтезированных в трансформированных клетках *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 является перспективной и логически обоснованной.

В результате проведенных исследований ферментативной активности 8 трансформантов *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 – 4 со вставкой *St-gluB* и 4 со вставкой *St-chtA2* было показано, что наибольшей активностью обладают экстракты из лиофилизированной биомассы, подверженные более тонкой очистке, по сравнению с грубыми клеточными экстрактами.

Результаты данных исследований послужили научной основой для первого этапа разработки лабораторного регламента производства принципиально новых эффективных биофунгицидных препаратов – формирование наиболее стратегически приемлемой для Казахстана модели производства биофунгицидных препаратов, которая в случае успешного проведения процесса масштабирования будет обладать достоверно высоким биотехнологическим потенциалом и конкурентоспособностью, обеспечивающих высокую продуктивность и стрессоустойчивость картофеля, одной из основных продовольственных культур Казахстана.

Источник финансирования исследований. По гранту 2720/ГФ4 «Разработка технологии получения биофунгицидных препаратов путем трансформации пластома микроводоросли *Chlamydomonas* генами защитного ответа картофеля».

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Raham S.K., Rinaldi S., Ikuo N., Masahiro M. Production of transgenic potato exhibiting enhanced resistance to fungal infections and herbicide applications // *Plant Biotechnol.* – 2008. – Vol. 2. – P. 13-20.
- [2] Chye M., Zhao K., He Z., Ramalingam S., Fung K. An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato // *Planta.* – 2005. – Vol. 220. – P. 717-730.
- [3] Wrobel-Kwiatkowska M., Lorenc-Kukula K., Starzycki M., Oszmianski J., Kepczynka E., Szopa J. Expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi // *Physiological and Molecular Plant Pathology.* – 2004. – Vol. 65. – P. 245-256.
- [4] Balasurbramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sathivel N. Plant  $\beta$ -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi // *Biotechnol Lett.* – 2012. – Vol. 34. – P. 1983-1990.
- [5] Cletus J., Balasurbramanian V., Vashisht D., Sathivel N. Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance // *Biotechnol Lett.* – 2013. – Vol. 35. – P. 1719-1732.
- [6] Boller T. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: Kosuge T., Nester E.W. (eds) // *Plant-Microbe Interactions Macmillan, Molecular and Genetic Perspectives, New York.* – 1987. – Vol. 2. – P. 385-413.
- [7] Arlorio M., Ludwig A., Boller T., Bonfante P. Inhibition of fungal growth by plant chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. A morphological study // *Protoplasma.* – 1992. – Vol. 171. – P. 34-43.
- [8] Mauch F., Mauch-Mani B., Boller T. Antifungal hydrolases in pea tissue II Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase // *Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 88. – P. 936-942.
- [9] Kombrink E., Schroder M., Halbrock K., Several "Pathogenesis-related" proteins in potato are  $\beta$ -1,3-glucanases and chitinases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – Vol. 85. – P. 782-786.
- [10] Zhu Y., Maher E.A., Masoud S., Dixon R.A., Lamb C.J. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco // *Biotechnology.* – 1994. – Vol. 12. – P. 807-812.
- [11] Kasprzewska, A. Plant Chitinases – Regulation and Function // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 8. – 809-824 (2003).
- [12] Henrisat, B., New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // *Biochem. J.* – 280. – 309-316 (1991).
- [13] Tronsmo, A., and Harman, G.E., Detection and quantification of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. // *Anal. Biochem.* – 208. – 74-79 (1993).
- [14] Sahai A.S., and Manocha M.S., chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction // *FEMS Microbiol., Rev.* – 11. – 317-338 (1993).
- [15] Malaguarnera, L., et.al., Interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages // *J. Clin. Lab. Anal.* – 19. – 128-132 (2005).
- [16] Van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T., Conejero V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1994. – Vol. 12. – P. 245-264.
- [17] Onaga S., Chinen K., Taira T., Highly thermostable chitinase from pineapple: cloning, expression, and enzymatic properties. // *Proc. Biochem.* – 2012. – Vol. 46. – P. 695-700.
- [18] Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – Изд. 3. – М.: Медицина, 1998.
- [19] Huang, G.H. et.al., Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins // *J. Biol. Chem.* – 270. – 2198-2202 (1995).
- [20] Nichols E.J., Bchman J.M., Hadwiger L.A. Glycosidic enzyme activity in pea tissue and pea-Fusarium solani interactions // *Plant Physiol.* – 1980. – Vol. 66. – P. 199-204.

## REFERENCES

- [1] Raham S.K., Rinaldi S., Ikuo N., Masahiro M. Production of transgenic potato exhibiting enhanced resistance to fungal infections and herbicide applications // *Plant Biotechnol.* 2008. Vol. 2. P. 13-20.
- [2] Chye M., Zhao K., He Z., Ramalingam S., Fung K. An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato // *Planta.* 2005. Vol. 220. P. 717-730.
- [3] Wrobel-Kwiatkowska M., Lorenc-Kukula K., Starzycki M., Oszmianski J., Kepczynka E., Szopa J. Expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi // *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 2004. Vol. 65. P. 245-256.
- [4] Balasurbramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sathivel N. Plant  $\beta$ -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi // *Biotechnol Lett.* 2012. Vol. 34. P. 1983-1990.
- [5] Cletus J., Balasurbramanian V., Vashisht D., Sathivel N. Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance // *Biotechnol Lett.* 2013. Vol. 35. P. 1719-1732.
- [6] Boller T. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: Kosuge T., Nester E.W. (eds) // *Plant-Microbe Interactions Macmillan, Molecular and Genetic Perspectives, New York.* 1987. Vol. 2. P. 385-413.
- [7] Arlorio M., Ludwig A., Boller T., Bonfante P. Inhibition of fungal growth by plant chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. A morphological study // *Protoplasma.* 1992. Vol. 171. P. 34-43.
- [8] Mauch F., Mauch-Mani B., Boller T. Antifungal hydrolases in pea tissue II Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase // *Plant Physiol.* 1998. Vol. 88. P. 936-942.
- [9] Kombrink E., Schroder M., Halbrock K., Several "Pathogenesis-related" proteins in potato are  $\beta$ -1,3-glucanases and chitinases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 782-786.
- [10] Zhu Y., Maher E.A., Masoud S., Dixon R.A., Lamb C.J. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco // *Biotechnology.* 1994. Vol. 12. P. 807-812.
- [11] Kasprzewska, A. Plant Chitinases – Regulation and Function // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8. 809-824 (2003).

- [12] Henrisat, B., New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // Biochem. J. 280. 309-316 (1991).
- [13] Tronsmo, A., and Harman, G.E., Detection and quantification of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, chitobiosidase and endochitinase in solutions and on gels. // Anal. Biochem. 208. 74-79 (1993).
- [14] Sahai A.S., and Manocha M.S., chitinases of fungi and plants: their involmenment in morphogenesis and host-parasite interaction // FEMS Microbiol., Rev. 11. 317-338 (1993).
- [15] Malaguarnera, L., et.al., Interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages // J. Clin. Lab. Anal. 19. 128-132 (2005).
- [16] Van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T., Conejero V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins // Plant Mol. Biol. Rep. 1994. Vol. 12. P. 245-264.
- [17] Onaga S., Chinen K., Taira T., Highly thermostable chitinase from pineapple: cloning, expression, and enzymatic properties. // Proc. Biochem. 2012. Vol. 46. P. 695-700.
- [18] Berezov T.T., Korovkin B.F. Biologicheskaja himija. Izd. 3. M.: Medicina, 1998.
- [19] Huang, G.H. et.al., Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins // J. Biol. Chem. 270. 2198-2202 (1995).
- [20] Nichols E.J., Behman J.M., Hadwiger L.A. Glycosidic enzyme activity in pea tissue and pea-Fusarium solani interactions // Plant Physiol. 1980. Vol. 66. P. 199-204.

**Ю. М. Дё, А. К. Турсунова, О. В. Чебоненко, А. Ж. Амиркулова, О. А. Сапко,  
А. Ю. Ельчибекова, А. Б. Мухаметкали, А. Т. Жапарова, А. Ш. Утарбаева**

ҚР БҒМ ҒК «М. Ә. Айтқожин атындағы Молекулалық биология және биохимия институты»,  
Алматы, Қазақстан

***St-gluB* ЖӘНЕ *St-ghta2* ГЕНЕТИКАЛЫҚ ҚОЙЫЛЫМДАРЫН КӨТЕРУШІ  
*Chlamydomonas* ТРАНСПЛАСТОМДЫ ШТАММДАРДЫҢ ЖАСУШАЛЫҚ  
ЭКСТРАКТТАРЫНЫҢ ФЕРМЕНТАТИВТІК БЕЛСЕНДІЛІГІ**

**Аннотация.** Микробалдырлар негізінде биофунгицидті препараттар алу үшін заманауи генді-инженерлік әдістерді қолдану кең қолданылатын микробты рекомбинантты препараттармен қатар тұратын перспективті жана өзекті бағыт болып табылады. Гидролитикалық ферменттер өсімдіктердің патогендер әсеріне жауабы механизмнің күрделі жүйесінің бір бөлігі. Өсімдіктің патогенмен өзара әсері болғанда хитиназалардың белсенділігінің әлдеқайда артатындығы дәлелденген. Зерттеудің мақсаты *Chlamydomonas* трансплатомды штамдарының жасуша экстракттарындағы рекомбинантты *St-gluB* және *St-ghtA2* –лардың ферментативтік белсенділігін анықтап, перспективті трансформанттардың культивирлеу жағдайларын оптимизациялау болды. *F. Solani*-ға қатысты антифунгальді белсенділікке не фракциялардың препаративті саны алынды. *Chlamydomonas* трансплатомды штамдарының жасуша экстракттарындағы рекомбинантты *St-gluB* және *St-ghtA2*-лардың ферментативтік белсенділігі анықталды және перспективті трансформанттарды культивирлеу жағдайлары оптимизацияланды. 8 *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 трансформанттарына – 4 *St-gluB* ендірілген және 4 *St-ghtA2* ендірілген трансформанттардың ферментативті белсенділігін анықтау үшін жүргізілген зерттеулер нәтижесінде қатты жасушалық экстракттармен салыстырғанда нәзік тазалауға ұшыраған лиофилизирленген биомассадан алынған экстракттар жоғары белсенділікке не екендігі көрсетілді. Рекомбинантты ферменттер белсенділігі жайлы алынған мәліметтер негізінде 2 перспективтілігі жоғары трансформантты штамдар – *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72 – CH1 және GB4 таңдалып алынды.