

Очистка альфа-амилазы, продуцируемой *Aspergillus niger* CNMN FD 06, при глубинном культивировании в присутствии наночастиц TiO₂ и координационного соединения Sr(II) с полидентатным лигандом

А. А. Чилочи^{а,*}, В. П. Бульмага^а, С. Ф. Клапко^б,
С. В. Лаблюк^а, Е. Г. Дворнина^а

^аИнститут микробиологии и биотехнологии Технического университета Молдовы,
MD-2028, г. Кишинев, Молдова

^бМолдавский государственный университет,
MD-2009, г. Кишинев, Молдова

*e-mail: alexandra.ciloci@gmail.com

Поступила в редакцию 06.09.2024

После доработки 15.10.2024

Принята к публикации 18.10.2024

Установлено стимулирующее влияние наночастиц TiO₂ и координационного соединения Sr(II) с полидентатным лигандом на активность амилазы, синтезируемой штаммом микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06 при глубинном культивировании. После очистки гель-фильтрацией на колонке PAD-10 и ионообменной хроматографией на колонке Hi-TrarTMQ отмечено увеличение удельной активности α-амилазы в случае вариантов с добавлением наночастиц TiO₂ и координационного соединения Sr(II) до 15523 и 14656 ед./мг соответственно по сравнению с контрольным вариантом – 12037 ед./мг. Выход α-амилаз после очистки также выше на 31 и 20% соответственно по сравнению с контрольным вариантом. Анализ выделенных белков методом SDS-PAGE выявил наличие в активных фракциях двух полос с кажущейся молекулярной массой, равной 65 и 40 кДа, при этом более обильной является полоса с молекулярной массой 65 кДа в случае препарата, полученного с добавлением координационного соединения Sr(II).

Ключевые слова: активность α-амилазы, грибы *Aspergillus niger*, стимуляторы, очистка, ДСН-электрофорез

УДК 579.66

<https://doi.org/10.52577/eom.2024.60.6.63>

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия произошел быстрый прогресс в коммерциализации грибковых ферментов благодаря их промышленному и биотехнологическому применению. Оптимизация условий ферментации для улучшения биосинтеза является обязательной для достижения увеличения производства промышленных ферментов и включает в себя различные физические и питательные параметры роста. Важнейшими факторами, определяющими биопроцесс, являются период культивирования, температура, рН, аэрация, количество инокулята, источник углерода и азота.

Грибы могут вырабатывать разнообразные внеклеточные ферменты, расщепляющие различные сложные полисахариды. Основными родами нитчатых грибов, способных продуцировать гидролитические ферменты, являются *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*. Виды *Aspergillus* являются продуцентами широкого спектра внеклеточных ферментов, в том числе α-амилазы, которая

представляет интерес во всем мире благодаря широкому применению в пищевой, фармацевтической, текстильной и бумажной промышленности [1–3]. Среди промышленных ферментов ведущее место занимают грибные α-амилазы, поскольку они допускают катализ в широком диапазоне рН и температуры, обладают большей степенью субстратной специфичности, могут нуждаться или не нуждаться в кофакторах и могут катализировать ряд биохимических процессов [4, 5].

Aspergillus niger – микромицет, наиболее часто используемый для промышленного получения внеклеточных амилаз, увеличить выход которого можно как за счет использования питательных сред и промышленных отходов [6–8], так и различными методами, среди которых облучение микромицета электромагнитными волнами [9], стимуляция и регуляция процессов синтеза с использованием координационных соединений переходных металлов [10–12] и другие методы для обеспечения стабильной активности амилазы, такие как модификация белка путем мутагенеза [13, 14].

Установлено также положительное влияние наночастиц на гидролитическую активность микромицетов. Так, наночастицы ZnO (30 нм) и Fe₃O₄ (65–70 нм) увеличили биосинтез внеклеточной протеазы у *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 и *Fusarium gibbosum* CNMN FD 15 [15].

В наших предыдущих исследованиях мутантный штамм *Aspergillus niger* 33–19 CNMN FD 02A, полученный с помощью гамма-облучения, был выбран как продуцент внеклеточной α -амилазы с активностью примерно в 2 раза выше, чем у исходного штамма [14, 16]. В ходе дальнейших исследований на основе культуральной жидкости мутантного штамма микромицета *Aspergillus niger* 33–19 CNMN FD 02A, культивированного в стандартных условиях и под воздействием миллиметрового излучения, выделены и охарактеризованы два препарата α -амилазы. В препарате, полученном при облучении, наблюдалось увеличение активности амилазы на 29,9% по сравнению с контрольным образцом. Эти препараты очищали методами гель-фильтрации и ионообменной хроматографии на колонке Hi-Trar™Q, анализировали пептидный спектр методом SDS-PAGE и в обоих случаях идентифицировали две полосы амилазы с молекулярной массой 66 и 40,5 кДа, а в образце, полученном при облучении, обнаружено появление новой полосы с молекулярной массой 45 кДа [8, 9].

Так, анализируя литературу по теме исследования, можно обнаружить, что оптимизация условий ферментации для улучшенного биосинтеза является обязательной для достижения повышенного производства промышленных ферментов и включает различные физические и пищевые параметры роста. Наиболее важными факторами, определяющими биопроцесс, являются период инкубации, температура, pH, аэрация, количество инокулята, источники углерода и азота. Применение координационных соединений «s» и «d» металлов с полидентатными лигандами и наночастицами в качестве стимуляторов активности фермента также может положительно повлиять на процесс биосинтеза амилазы. Использование ферментеров для пилотного выращивания грибов в контролируемых условиях (аэрация, оптимальная температура и режим pH) имеет важное значение в переработке и улучшении качества ферментов.

В контексте вышеизложенного также представляет интерес исследование новых препаратов внеклеточных амилаз в продвинутой ферментационной культуре штамма-продуцента амилазы *Aspergillus niger* CNMN FD 06 в ферментере. Таким образом, цель работы –

оценка состава амилитических препаратов, полученных при культивировании микромицета в присутствии новых стимуляторов, очистка α -амилазы и анализ полипептидного спектра очищенных фракций методом SDS-PAGE.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микроорганизмы и условия культивирования

Объектом исследования являлся мицелиальный гриб *Aspergillus niger* CNMN FD 06, хранящийся в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии и биотехнологии Технического университета Молдовы.

Культивирование микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06 проводили при температуре 28–30 °C в течение шести суток в лабораторном ферментере с объемом питательной среды 2000 мл следующего состава (г/л): крахмал – 3,0; фасоловая мука – 9,0; пшеничные отруби – 18,0; KН₂РO₄ – 2,0; KCl – 0,5; MgSO₄ – 0,5; pH – 6,2, скорость вращения мешалки – 180–200 об/мин. В качестве посевного материала использовали спорую суспензию плотностью 3×10⁶ спор/мл, которую получали путем промывания стерильной дистиллированной водой культуры, выращенной на косых колонках с малцагаром в течение 12–14 суток. Количество спор определяли микроскопически с помощью счетной камеры Горяева [17].

Выделение фермента

Амилитические препараты (II и III) получали из культуральной жидкости, полученной в результате культивирования штамма *Aspergillus niger* CNMN FD 06 в ферментере Biostat^R A plus (Sartorius, Германия) в присутствии двух стимуляторов (в концентрации 5 мг/л): наночастиц TiO₂ и координационного соединения Sr(II) с полидентатным лигандом – [Sr(L)3][Co(SCN)4] (где L – диметилловый эфир 2,6-пиридиндикарбоновой кислоты). В качестве контроля использовали ферментный препарат, полученный из культуральной жидкости, полученной после культивирования микромицета на средах без стимуляторов [18]. Через 144 часа культивирования культуральную жидкость отделяли от биомассы фильтрацией и центрифугированием в течение 20 минут при 4000–6000 об/мин. Альфа-амилазу выделяли из супернатанта 96% этанолом, охлажденным до –15 °C, в соотношении 1:4, со временем осаждения один час и концентрацией CaCl₂ 0,2%. Осадок центрифугировали в течение 20 минут при 6000 об/мин и высушивали при 20–22 °C.

Извлечение и очистка α -амилазы

Получение экстрактов амилазы. Экстракты получали путем экстракции 3 мл 0,02М буфера Трис-НСl, рН 7,0 из 75 мг каждого из препаратов амилазы: контрольного образца (культивированного в стандартных условиях), двух препаратов, полученных при культивировании в присутствии наночастиц TiO_2 и $[Sr(L)3][Co(SCN)4]$ соответственно, при перемешивании в течение 30 мин. После центрифугирования при 10000 об/мин в течение 5 мин экстракты подвергали очистке.

Определение белка. Белок в экстрактах и в очищенных препаратах (с разбавлением и без разбавления соответственно) определяли методом Лоури, используя бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich) в качестве стандарта [19].

Гель-фильтрационная хроматография (обессоливание) на колонке PAD-10. Экстракт амилазы вводили на две колонки PAD-10 (Amersham Pharmacia Biotech), предварительно уравновешенные 20 мМ трис-НСl, рН 7,0 (для обессоливания) и полученные с высоким содержанием амилазы.

Ионообменная хроматография. α -Амилазу после гель-фильтрации (пик 1) подвергали хроматографии на колонке Hi-TrapQ (5 см) System FPLC (Amersham Pharmacia), уравновешенной 20 мМ трис-НСl рН 7,0. Элюирование не адсорбированного на колонке белка проводили 20 мМ раствором Трис-НСl, рН 7,0, после чего наносили градиент тем же буфером с 0,5 М NaCl. Скорость элюирования составляла 1 мл/мин, собирали фракции по 3 мл.

Определение активности амилазы

Амилолитическую активность определяли по методу, разработанному в [20, 3], с небольшими изменениями, заключающимися в уменьшении объема 1% раствора крахмала и объема образца фермента при сохранении количественного соотношения между этими компонентами (10:5). К 1 мл 1% раствора крахмала (содержащего 10% 0,1М ацетатного буфера рН 4,7) добавляли 0,5 мл образца фермента (с разбавлением или без разбавления). Через 10 мин инкубации при 30 °С из гидролизата брали 0,1 мл образца и смешивали с 10 мл рабочего раствора KI и I₂ (приготовленного путем разбавления 2 мл того же исходного раствора в 98 мл 0,1 N раствора HCl со значением поглощения при 434–450 нм, равным 0,220). Поглощение при 630 нм измеряли, используя в качестве контроля негидролизированный образец крахмала, без добавления фермента.

Определение удельной активности фермента

Удельную активность α -амилазы рассчитывали на миллиграмм белка из ферментного препарата (ед/мг) по следующей формуле: удельная активность = активность фермента/содержание белка.

Электрофорез

Чистоту α -амилазы проверяли с помощью SDS-PAGE (15%), проведенного по методу Лэммли [21]. Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим R-250. Стандартный белок с молекулярной массой 170, 130, 100, 70, 65, 40, 35, 25, 15 кДа использовали в качестве маркеров для определения кажущейся молекулярной массы амилазы в SDS-PAGE.

Статистический анализ

Все эксперименты проводились трижды, результаты представлены как среднее из трех. Уровень значимости составляет $P < 0,05$ [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для очистки экстрактов из трех препаратов амилаз, полученных на основе культуральных жидкостей в результате культивирования микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06 в классических условиях (препарат I – контроль) и в присутствии наночастиц TiO_2 (препарат II) и координационного соединения стронция (препарат III), использовали гель-фильтрацию на колонке PAD-10, уравновешенной 20 мМ трис-НСl буфером (рН 7,0). Пик, полученный после разделения солей, подвергали очистке на колонке Hi-TrapTM Q (5 см), уравновешенной тем же буфером. После элюирования не адсорбированного пика на колонке наносили градиент с буфером В, содержащим 0,5 М NaCl. Увеличение удельной активности α -амилазы наблюдается в случае вариантов (II) и (III) с добавлением TiO_2 и координационного соединения Sr(II) до 15523 и 14656 ед/мг соответственно по сравнению с контрольным вариантом (12037 ед/мг). Выход α -амилаз также выше и составляет 31 и 20% соответственно по сравнению с контрольным вариантом (см. таблицу).

Профиль элюирования α -амилазы и количество белка, автоматически регистрируемое после A280 нм (рис. 1, 2), указывают на наличие ферментативной активности в пике белка, элюируемом с градиентом 0,325 М NaCl, которому также соответствует максимальная активность амилазы 1300 ед/мл во фракции 5 (контрольный образец) и при градиенте 0,45 М NaCl (образец с TiO_2) во фракциях 4 и 5 (1563 и 1062 ед/мл), а также образец с координационным соединением Sr(II) с градиентом 0,5 М NaCl во фракциях 5 и 6 (1108 и 1407 ед/мл).

Таблица. Профиль очистки α -амилазы из амилолитических препаратов *A. niger*, полученных в стандартных условиях (I) и расширенных условиях с добавлением наночастиц TiO_2 (II) и координационного соединения Sr(II) с полидентатным лигандом (III)

Этапы очистки	Активность α - амилаз (Е/мл)			Белки (мг/мл)			Удельная активность (е/мг)			Выход (%)			Степень очистки		
	I*	II**	III***	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Амилолитические препараты (обобщенные экстракты)	3,124	3,247	3,264	1,685	1,195	1235	1,854	2,717	2,642	100	100	100	1	1	1
Гель-фильтрация на колонке PAD-10	1,500	1,620	1,630	0,700	0,549	0,566	2,143	2,951	2,880	41,54	45,94	45,83	1,16	1,09	1,09
Хроматография на колонке HiTrapTMQ	1,300	1,560	1,407	0,108	0,101	0,096	12,037	15,523	14,656	6,47	8,45	7,77	6,49	5,71	5,55

I* – препарат α -амилазы (контроль), II** и III*** – амилолитические препараты при культивировании в присутствии TiO_2 и соединением Sr(II) .

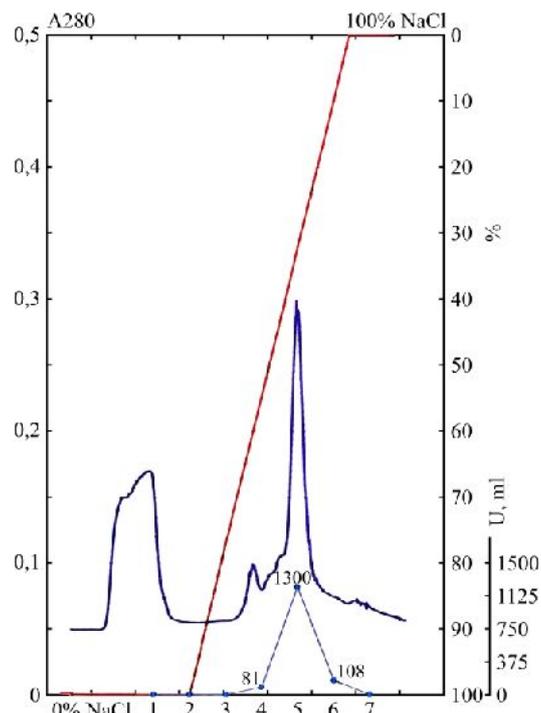


Рис. 1. Очистка α -амилазы из контрольного амилолитического препарата (после обессоливания) методом ионообменной хроматографии на колонке Hi-TrarTM Q (5 см). Скорость элюирования 1 мл/мин. Буфер А: 20 мМ трис-НСl, рН 7,0. Буфер В: А+ 0,5М NaCl. Градиент: % (15 мл) – 100% В (15 мл).

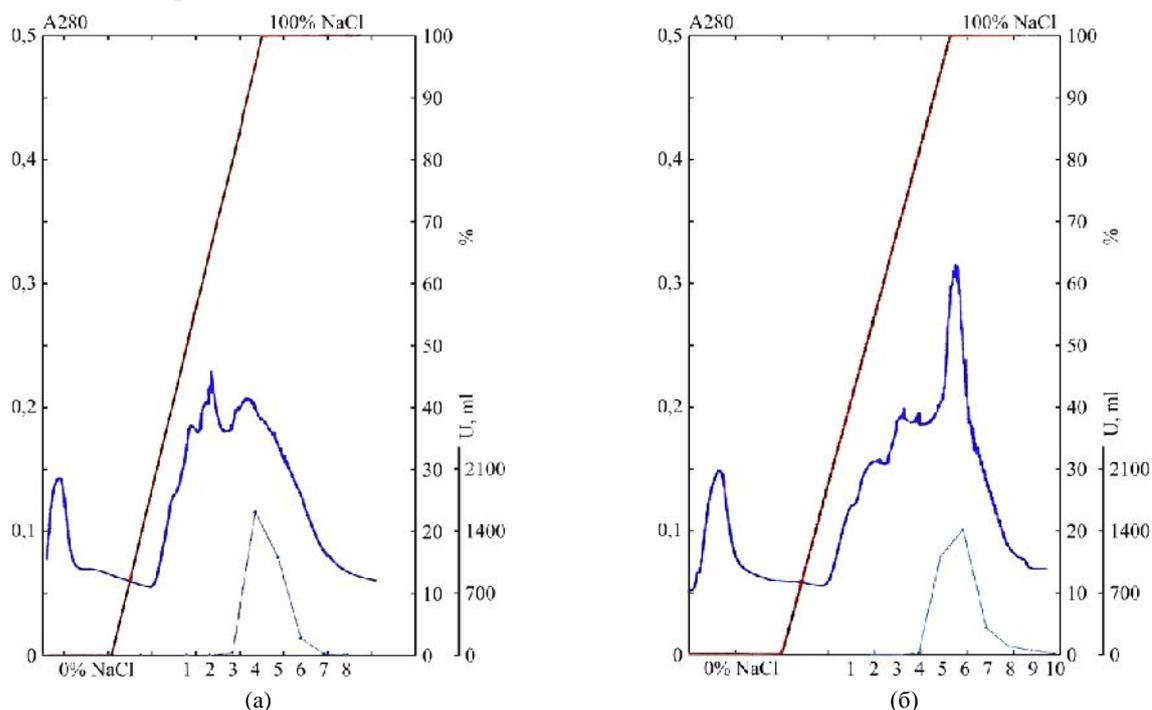


Рис. 2. Очистка α -амилазы из амилолитических препаратов ((а) – с TiO_2) и ((б) – с координационным соединением $\text{Sr}(\text{II})$) после обессоливания методом ионообменной хроматографии на колонке Hi-TrarTM Q (5 см). Скорость элюирования 1 мл/мин. Буфер А: 20 мМ трис-НСl, рН 7,0. Буфер В: А+ 0,5 М NaCl. Градиент: 0% (15 мл) – 100% В (15 мл).

Очищенные активные фракции подвергали SDS-электрофору в полиакриламидном геле и анализировали их полипептидный состав (рис. 3). Для сравнения были также проанализированы образцы суммарных экстрактов (до очистки). Как показал анализ пептидных полос, суммарный экстракт контрольного образца имеет в своем составе около 20 полипептидных фракций с кажущимися молекулярными

массами в диапазоне 15–130 кДа. В очищенной контрольной фракции были обнаружены три полосы с молекулярными массами 40, 65 и 70 кДа. Суммарные экстракты образцов со стимуляторами имеют различное количество полипептидных полос, и после очистки выделяется полоса с молекулярной массой 65 кДа, особенно в случае использования стиму-

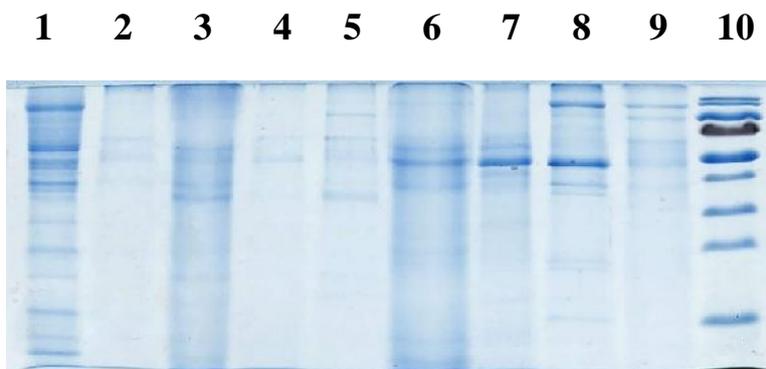


Рис. 3. SDS-PAGE электрофорез амилолитических препаратов, полученных на основе культуры жидкости микромицета *Aspergillus niger* из экстрактов обобщенных и после очистки хроматографическим путем на колонке HiTrapTMQ (5 см): 1 – экстракт контрольной пробы; 2 – очищенная амилаза (фр. 4); 3 и 6 – амилолитические экстракты при культивировании в присутствии соединений TiO_2 и $\text{Sr}(\text{II})$; 4 и 5 – очищенные фракции амилазы (фр. 4 и 5, TiO_2); 7, 8 и 9 – очищенные фракции амилазы (фр. 5 и 6) с соединением $\text{Sr}(\text{II})$; 10 – стандартные белки (170, 130, 100, 70, 65, 40, 35, 25, 15 kDa).

ляции координационным соединением $\text{Sr}(\text{II})$ (с5 и 6, дорожки 7 и 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая растущий во всем мире спрос на ферментные препараты, выявление новых методов повышения амилолитической активности у штамма гриба *Aspergillus niger* и разработка процедур выделения и очистки ферментов представляют повышенный интерес для исследователей. Анализируя литературу по теме исследования, можно обнаружить, что оптимизация условий ферментации для улучшенного биосинтеза является обязательной для достижения повышенного производства промышленных ферментов и включает различные физические и пищевые параметры роста.

Для получения и очистки α -амилазы из различных штаммов грибов и других источников используются различные методы. Выделение амилолитических ферментов из культуральной жидкости и их очистка проводились осаждением ацетоном [6, 23] или этанолом [8, 14, 24]. Для очистки амилаз различные авторы использовали методы очистки путем частичного фракционирования сульфатом аммония и диализа [7, 25–27]. После выделения путем осаждения или мембранного разделения ферменты очищаются хроматографическими методами, включая гель-фильтрацию и анионо-обменную хроматографию [9, 17, 20, 27].

Карим и соавторы использовали питательную среду, содержащую сырой саговый крахмал, для выращивания *Aspergillus flavus* NSH9 [27]. Белки из супернатанта культуры после 5 дней инкубации были фракционно осаждены с использованием сульфата аммония и дальнейшей очистки α -амилазы с помощью анионообменной хроматографии. Два пика белка наблюдались

после анионообменной хроматографии на колонке Amberlit IRA 400 путем элюирования с возрастающей концентрацией NaCl , активность α -амилазы была обнаружена во фракциях, собранных в первом пике белка. При анализе SDS-PAGE активные фракции α -амилазы содержали одну полосу белка с молекулярной массой около 54 кДа. Фермент был очищен в 3,4 раза с выходом 11,73% и удельной активностью 48,10 ед/мг.

α -Амилаза, продуцируемая *Preussia minima*, выделенная из австралийского аборигенного растения *Eremophila longifolia*, была очищена до гомогенности посредством фракционного осаждения ацетоном и гель-фильтрации Sephadex G-200 с последующей ионообменной хроматографией на DEAE-Sephagrose. Очищенная α -амилаза показала молекулярную массу 70 кДа, что было подтверждено зимографией [23].

Шарма и др. выделили препарат α -амилазы из штамма *Bacillus licheniformis* RA31 путем осаждения этанолом и очистки на колонках DEAE-целлюлозы и Sephadex G-100 со степенью очистки в 12,93 раза, выходом 55,52% и удельной активностью 621,93 ед./мг с обнаружением одной полосы на SDS-PAGE (66 кДа) и нативном электрофорезе (68 кДа) [5].

В другом исследовании по оптимизации и масштабированию производства α -амилазы с использованием твердофазной ферментации пищевых жмыхов была проведена частичная очистка α -амилазы из *Aspergillus oryzae* методом фракционирования $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [3] с увеличением выхода на 11,4%.

В наших предыдущих исследованиях была оценена активность α -амилазы двух препаратов, полученных на основе культуральной жидкости штамма микромицета *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02A, выращенного в стандартных условиях и при облучении миллиметровыми волнами. В препарате, полученном при

облучении, наблюдалось увеличение активности амилазы на 29,9% по сравнению с контрольным образцом. После очистки полученных препаратов гель-фильтрацией на колонке PAD 10 и ионообменной хроматографией на колонке Hi-Trar™ Q полипептидный спектр очищенных ферментов анализировали методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. В обоих очищенных препаратах обнаружено наличие двух полипептидных полос с молекулярной массой 66 и 40 кДа, а также появление новой полипептидной полосы с кажущейся молекулярной массой 45 кДа в препарате, полученном при облучении электромагнитными волнами [9].

Полученные в настоящей работе результаты по оценке активности α -амилазы в контрольном образце и в двух препаратах, полученных на основе культуральной жидкости штамма микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06 при культивировании в присутствии двух стимуляторов – наночастиц TiO_2 и координационного соединения Sr(II) с полидентатным лигандом – свидетельствуют о наличии в активных фракциях двух полос: полипептидной полосы с кажущейся молекулярной массой 65 кДа во всех исследованных препаратах, а также менее обильной полосы с молекулярной массой 40 кДа, с явным количественным увеличением полосы с молекулярной массой 65 кДа в случае препарата, полученного с добавлением координационного соединения Sr(II).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно сделать вывод, что при расширенном культивировании в ферментере штамма микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06 установлено стимулирующее действие наночастиц TiO_2 и координационного соединения Sr(II) с полидентатным лигандом на активность амилазы. Отмечено увеличение удельной активности α -амилазы в суммарном экстракте расширенного культивирования (на 45,55 и 42,5% больше по сравнению с контрольным образцом). Увеличение удельной активности α -амилазы после очистки в случае вариантов *A. niger* с добавлением стимуляторов – наночастиц TiO_2 и координационного соединения Sr(II) установлено до 15523 и 14656 Ед/мг соответственно по сравнению с контрольным вариантом (после очистки методом гель-фильтрации на колонке PAD-10 и ионообменной хроматографии на колонке Hi-Trar™Q увеличение удельной активности составляет 12037 ед/мг). Выход α -амилаз после очистки также выше на 31 и 20% соответственно по сравнению с контрольным вариантом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование поддержано исследовательским проектом 20.80009.5007.28 «Разработка новых многофункциональных материалов и эффективных технологий для сельского хозяйства, медицины, техники и системы образования в комплексах металлов «s» и «d» на основе комплексов с полидентатными лигандами», финансируемым NARD (Национальное агентство по исследованиям и разработкам) и исследовательской подпрограммой: 020101 «Инновационные биотехнологические решения для сельского хозяйства, медицины и охраны окружающей среды» (Министерство образования и исследований Республики Молдова). Координирующие соединения были синтезированы и предложены для исследований в соответствии с целями проекта партнерской группой из Института химии МолдГУ, руководимой доктором хабилитат Ионом Булхаком.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hussain, I., Siddique, F., Mahmood, M.S. and Ahmed, S.I., A review of the microbiological aspect of α -amylase production, *Int. J. Agricult. Biol.*, 2013, vol. 15, p. 1029.
2. Patil, A.G., Khan, K., Aishwarya, S., Padyana, S., et al., Fungal amylases and their industrial applications. In: *Industrially Important Fungi for Sustainable Development, Vol. 2. Bioprospecting for Biomeolecules*. Abdel-Azeem, A.M., et al. (eds.). Cham: Springer, 2021, p. 407.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_11
3. Sharma, H., Batra, N. and Singh, J., Purification, characterization and potential detergent industry application of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* RA31, *Ind. J. Exper. Biol.*, 2022, vol. 60, no. 5, p. 331.
4. Prasanna, V.A., Amylase and their applications, *African J. Biotechnol.*, 2005, vol. 4, no. 13, p. 1525.
5. Singh, S., Bali, V., Sharma, L. and Mangla, J., Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry, *Biomed. Res. Int.*, 2014, art. ID 215748.
<https://doi.org/10.1155/2014/215748>
6. Anghelia, C., Sanjaya, A., Aida, A., Tanudjaja, E., et al., Characterization of alfa-amylase from *Aspergillus niger* aggregate F isolated from a fermented Cassava Gatot grown in potato peel waste medium, *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, 2019, vol. 47, no. 3, p. 364.

7. Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Kumar, S.K.S., Muniraj, I., et al., Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes, *BMC Biotechnol.*, 2021, vol. 21, art. ID 33. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00686-7>
8. Far, B.E., Ahmadi, Y., Khosroshahi, A.Y. and Dilmaghani, A., Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives, *Adv. Pharm. Bull.*, 2020, vol. 10, no. 3, p. 350.
9. Ciloci, A., Bivol, C., Stratan, M., Tiurina, J., et al., Action of millimeter-range electromagnetic radiation on polypeptide spectrum of amylolytic preparations from *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02A strain, *Surf. Eng. Appl. Electrochem.*, 2014, vol. 50, p. 78. <https://doi.org/10.3103/S1068375514010049>.
10. Ciloci, A., Bivol, C., Stratan, M., Reva, V., et al., The effect of $[\text{Co}(\text{DH})_2(\text{An})_2]_2[\text{TiF}_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ coordination compound on polypeptide spectrum of amylolytic preparation from *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02A strain, *Analele Univ. Oradea, Fascicula Biologie*, 2012, vol. 19, no. 2, p. 128.
11. Clapco, S., Bivol, C., Ciloci, A., Stratan, M., et al., The effect of some metal complexes of oxime ligand on proteolytic activity of *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 strain, *Analele Univ. Oradea, Fascicula Biologie*, 2013, vol. 20, no. 1, p. 53.
12. Cocu, M., Ciloci, A., Tiurina, J., Labliuc, S., et al., The influence of nickel (II) and copper (II) coordination compounds based on benzoyl acetone S-methyl is thiosemicarbazone on enzymatic activity of micromycete *Aspergillus niger* CNMN FD 10, *Revue Roum. Chim.*, 2012, vol. 57, no. 1, p. 23.
13. Wang, S., Lin, C., Liu, Y., Shen, Z., et al., Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produce by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment, *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, 2016, vol. 7, no. 1, p. 1.
14. Stratan, M., *Biotehnologii de cultivare a tulpinii Aspergillus niger 33-19 CNMN FD 02A-producător de amilaze*. Autoref. tezei de doctor în biologie, Centrul Editoral-Poligrafic al USM, Chișinău, 2011. 30 p.
15. Чилочи, А., Тюрина, Ж., Клапко, С., Дворнина, Е., Лаблюк, С., Влияние наночастиц оксида цинка на физико-химические свойства внеклеточных протеаз микромицета *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15, *Bul. AȘM, Științele vieții*, 2020, №3(342), с. 158.
16. Ciloci, A., Bivol, C., Stratan, M., Reva, V., et al., Production and purification of α -amylase from *Aspergillus niger* CNMN FD 02A mutant form, *Analele Univ. Oradea, Fascicula Biologie*, 2012, vol. 19, no. 1, p. 74.
17. Condruș, V., Sinteza orientată a amilazelor exocelulare la tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 06. Autoref. tezei de doctor în biologie, Tipografia Artpoligraf S:R:L. Chișinău, 2024. 34 p.
18. Ciloci, A., Clapco, S., Condruș, V., Labluc, S., et al., Evaluarea efectului compușilor coordinativi heterometalici ai Ba(II), Sr(II), Ca(II) cu Co(II) și ligand polidentat asupra biosintezei amilazelor la tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 06. In: *Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective*, Ed. 7, 19-20 mai 2023, Bălți. Republic of Moldova: Bons Offices, 2023, p. 279.
19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Faar, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin-Phenol reagents, *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 48, p. 17.
20. Грачева, И.М., Грачев, Ю.П., Мосичев, М.С., Борисенко, Е.Г., и др., *Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов*. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. 240 с.
21. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, p. 680.
22. Максимов, В., *Многофакторный эксперимент в биологии*. М.: МГУ, 1980. 280 с.
23. Zaferanloo, B., Bhattacharjee, S., Ghorbani, M.M., Mahon, P.J., et al., Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS, *BMC Microbiol.*, 2014, vol. 14, art. ID 55.
24. Kamaraj, M. and Subramaniam, D., Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation using cassava, *J. Appl. Biol. Biotechnol.*, 2020, vol. 8, no. 6, p. 82.
25. Asad, W., Asif, M. and Rasool, S.A., Extracellular enzyme production by indigenous thermophilic bacteria: Partial purification and characterization of α -amylase by *Bacillus* sp. Wa21, *Pakistan J. Bot.*, 2011, vol. 43, p. 1045.
26. Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Kumar Das, S., et al., Production and partial purification of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) using solid state fermentation, *Biochem. Res. Int.*, 2014, art. ID 568141.
27. Karim, K.M.R., Husaini, A., Sing, N.N., Sinang, F.M., et al: Purification of an alpha amylase from *Aspergillus flavus* NSH9 and molecular characterization of its nucleotide gene sequence, *3 Biotech.*, 2018, vol. 8, no. 4, p. 204.

Summary

The stimulatory effect of TiO_2 nanoparticles and of the coordination compound of Sr(II) with a polydentate ligand on the amylase activity was established under submerged cultivation of the micromycete strain *Aspergillus niger* CNMN FD 06. After purification by gel-filtration on the column of PAD-10 and the ion exchange chromatography on the Hi-TrapTMQ column, an increase in the specific activity of α -amylase in the case of the variants with the addition of TiO_2 nanoparticles and coordination compound of Sr(II) up to 15523 and 14656 U/mg, respectively, compared to the control version 12037 U/mg. The yield of α -amylases after purification was also higher, with an increase of 31 and 20%, respectively, compared to that of the control variant. The SDS-PAGE analysis of the isolated proteins revealed the presence of two bands in the active fractions with an apparent molecular mass equal to 65 and 40 kDa, with a more abundant band with a molecular mass of 65 kDa in the case of the preparation obtained with the addition of the Sr(II) coordination compound.

Keywords: α -amylase activity, *Aspergillus niger* fungi, stimulants, purification, SDS-PAGE electrophoresis