

**N E W S**

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 313 (2016), 29 – 34

## **OPTIMIZATION OF LECTINS EXTRACTION FROM BEAN CALLUS CULTURE**

**E. D. Djangalina, B. A. Zhumabayeva, Z. G. Aytasheva, Zh. T. Zhulpuhar**

Al-Farabi Kazakh National University,  
SRI of Biology and Biotechnology Problems MES RK, Almaty, Kazakhstan.  
E-mail: ErikaDzhangalina@kaznu.kz

**Key words:** bean, lectin, callus culture, extraction.

**Abstract.** Nowadays there is a strict need to search for new sources of nutrient and anti-nutrient protein compounds. It is important to determine influence of these activities on different cell models, to write new biotechnological methods and use all of them in different fields of medicine and agriculture. Legumes (especially common beans) have a lot of proteins in their structure, i.e. lectins and proteinase inhibitors. On a basis of lectins plenty of pharmacological products, goods for diagnostic purposes and plants protectors are produced. Lectins which are obtained from legumes manage different functions, i.e. participate in processes of parting cells and tissues and thanks to increasing amount in isolated plant tissues initiate processes of morphogenesis *in vitro*.

According to this comparative analysis of lectin content in callus tissues has been provided. All samples are different from each other in morphogenetic activity. Also, a method of lectin extraction, which we improved, can be offered as an alternative way to obtain lectins from legumes. For the first time positive impact of hormone and physical factors on accumulation of lectins in callus tissues was discovered. Biotechnological, modified, adjusted to studied species schemes of lectins extraction were created. Dependence of lectin amount on morphological type of callus tissue, media compounds and conditions of cultivating was stated. New method of lectin extraction from common beans cell biomass was described. Conditions of homogenization of plant tissues and lectin extraction by changing doses of buffer and callus weight were improved.

This research demonstrates that callus cultures might be used as alternative and extra special source of common beans' lectins. Regulation of conditions by changing hormone components in media, temperature of cultivation and improvement parameters of extraction can help enrich current biotechnological methods of common beans supplements extraction in hopes to use all of them in different ways.

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛЕКТИНОВ ИЗ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ФАСОЛИ

Э. Д. Джангалина, Б. А. Жумабаева, З. Г. Айташева, Ж. Т. Зулпухар

Казахский национальный университет им. аль-Фараби,  
НИИ Проблем биологии и биотехнологии МОН РК, Алматы, Казахстан

**Ключевые слова:** фасоль, лектины, каллусные культуры, экстракция.

**Аннотация.** Последние годы возникает необходимость поиска новых источников получения питательных и антипитательных белковых компонентов для исследования их действия на различных клеточных моделях, разработке биотехнологических подходов их выделения и дальнейшего использования в различных отраслях медицины и сельского хозяйства. Зернобобовые культуры, в частности фасоль, наиболее богаты белками, в том числе лектиными и ингибиторами протеиназ. На основе лектинов выпускаются различные фармакологические препараты, диагностикумы, средства защиты растений. Лектины бобовых выполняют различные функции, например, участвуют в процессах дифференциации клеток и тканей, индуцируют процессы морфогенеза *in vitro* за счет увеличение их содержания в изолированных тканях растений.

В этой связи проведен сравнительный анализ содержания лектинов в каллусных тканях сортобразцов фасоли, различающихся по морфогенетической активности. Оптимизирована методика их выделения, которая может быть предложена в качестве альтернативного пути получения лектинов фасоли. Впервые установлено положительное влияние гормональных и физических факторов на накопление лектинов в каллусных тканях фасоли. Разработаны модифицированные, адаптированные к изучаемым сортобразцам, биотехнологические схемы выделения лектинов из каллусных культур. Установлена зависимость уровня содержания лектинов от морфологического типа каллусной ткани, состава питательной среды, условий культивирования. Разработана методика выделения лектинов из клеточной биомассы фасоли. Оптимизированы условия гомогенизации растительных тканей и экстракции лектинов, путем изменения соотношения буфера и объема навески каллусов.

Проведенные исследования показывают, что каллусные культуры могут быть дополнительным и альтернативным источником получения лектинов фасоли. Регулирование режимов культивирования путем изменения гормонального состава питательной среды, температуры культивирования и оптимизация параметров экстракции будут способствовать развитию биотехнологических подходов получения и других биологически активных веществ фасоли с целью дальнейшего их использования в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства.

**Введение.** В настоящее время проблемы повышения урожайности растений и сохранения плодородия почв на основе сокращения применения агрохимикатов и их замены на биологические препараты и средства защиты растений приобретает все большую актуальность и перспективность. В последнее время все шире стало развиваться направление по получению биопрепаратов растительного происхождения на основе белковых компонентов растений, в том числе лектинов. Фасоль является культурой с высокой активностью лектинов, которые наряду с характерной способностью специфического связывания с углеводами, принимают особое участие в делении клеток [1]. Предполагается, что они могут играть существенную роль в морфофизиологических процессах у растений, участвовать в межклеточных взаимодействиях, присущих дифференциации клеток и тканей, индуцировать процессы соматического эмбриогенеза за счет увеличение их содержания в изолированных тканях растений [2, 3].

Цель данной работы определение содержание лектинов в каллусных тканях фасоли и оптимизация условий их выделения.

**Методы исследований.** Для получения каллусных культур использовали сортобразцы фасоли местной, российской и зарубежной селекции. Для получения различных типов каллусов экспланты культивировали на среде Мурасиге-Скуга, содержащей в качестве индукторов каллусогенеза ауксины (2,4-Д, НУК) и цитокинины (кинетин). Концентрация ауксинов варьировалась в пределах 2-8 мг/л, цитокининов составляла 0,25 мг/л. Для получения растворимых лектинов каллусную ткань в количестве 90-100 мг растирали в 0,9М NaCl, оставляли на 60-75 минут при

$4^{\circ}\text{C}$ , периодически перемешивая, а затем центрифугировали 20 минут при 4000 g. Осадок отмывали половинным от исходного объемом кислоты, супернатанты объединяли. После нейтрализации щелочью до pH 7.0 супернатант центрифугировали при 6000 g 10 минут и использовали для анализа. Для оптимизации технологии выделения лектинов из каллусной ткани проводили подбор соотношения количества навески каллусов и объема буфера и времени элюирования лектинов. Высаливание белка осуществляли сульфатом аммония в концентрации 60 и 70% для подбора оптимальной концентрации, вызывающей полное выпадения белка. Неочищенный белок собирают на фильтр и растворяют в десятикратном (по объему) количестве дистиллированной воды, с последующим диализом в течение 48 ч при  $10^{\circ}\text{C}$  против буферной смеси (0,1M ацетатный буфер, pH-6.8). Содержание лектинов определяли после экстракции и диализа путем взвешивания и рассчитывали в мг на 100 г сырой массы каллуса.

### Результаты исследования

В предыдущих исследованиях было показано, что наиболее оптимальной средой для индукции процесса каллусогенеза изучаемых сортообразцов фасоли является модифицированная среда Мурасиге-Скуга [4]. Для получения различных морфологических типов каллусов экспланты культивировали на питательных средах, содержащих 2-8 мг/л ауксинов (2,4-Д или НУК) и 0,25 мг/л кинетина. Показано, что частота формирования морфогенного каллуса зависела от типа и концентрации фитогормонов. При использовании в качестве индуктора НУК частота каллусогенеза не превышала 60%, а доля морфогенных каллусов составляла не более 15%. При концентрации 2,4-Д 2 мг/л выход морфогенного каллуса для всех сортообразцов был наибольшим и варьировал от 80% до 87%. Увеличение концентрации 2,4-Д сопровождалось снижением частоты образования морфогенных каллусов. Концентрация 2,4-Д 8 мг/л оказалась летальной для каллусных культур фасоли. Предполагается, что при высоких концентрациях 2,4-Д сильно увеличивается скорость образования этилена, и уменьшается скорость растяжения клеток. Вероятно, у двудольных растений подавление роста высокими концентрациями ауксина опосредовано, их действием на синтез этилена [5].

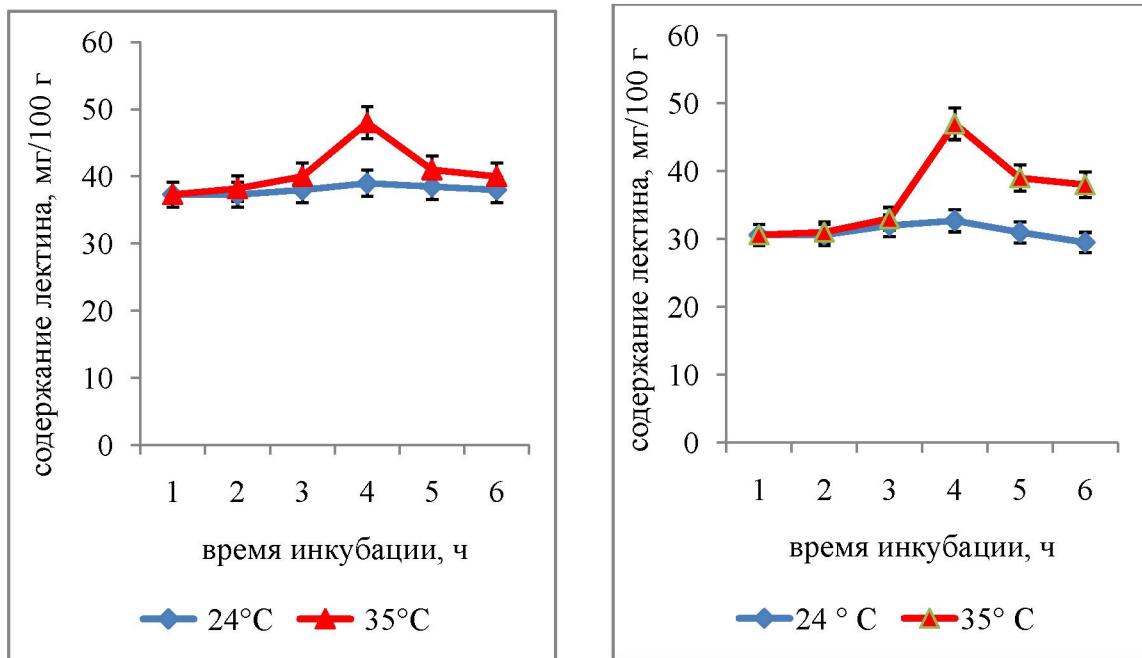
Анализ экстрактов из каллусных культур сортообразцов фасоли показал их вариабельность по содержанию лектина. Концентрация лектинов в морфогенных каллусах была значительно выше и варьировала в пределах от 37,3 мг/100 г сырой массы у сорта «Журавушка» до 26,0 мг/100 г у сортообразца «Камелия» (таблица 1). Неморфогенная каллусная ткань характеризуется низким содержанием лектинов у всех исследованных сортов, которое составляло 18,4 -25,2 мг/100 г сырой массы. Предполагается, что такие резкие различия между морфогенными и неморфогенными каллусами по содержанию лектинов вероятно связаны с гормональным составом питательной среды, поскольку морфогенный тип каллуса формировался на средах с НУК и низкими концентрациями 2,4-Д. Из литературных данных известно, что синтез лектинов регулируется абсцизовой кислотой, а высокие концентрации 2,4-Д снижают содержание АБК [6, 7].

Таблица 1 – Содержание лектинов в каллусной ткани фасоли (мг/100 г сырой массы)

Сортообразец	Морфогенный тип каллуса	Неморфогенный тип каллуса
«Журавушка»	$37,3 \pm 1,8$	$25,2 \pm 1,6$
«Ред Гойя»	$30,6 \pm 1,1$	$20,3 \pm 1,9$
«Камелия»	$26,0 \pm 5,6$	$18,4 \pm 1,4$
«Актатти»	$34,0 \pm 1,3$	$21,7 \pm 1,3$

Индукцию образования АБК и следовательно повышение содержания лектинов в каллусной культуре могут вызывать различные стрессовые факторы. В связи с этим, следующим этапом работы было изучение влияния температуры на синтез лектинов в каллусной ткани фасоли. Одна часть клеточной биомассы морфогенных каллусов культивировалась при комнатной температуре  $24^{\circ}\text{C}$ , другая при повышенной -  $35^{\circ}\text{C}$ . Динамику накопления лектинов в каллусной биомассе определяли в течение 6 часов при указанной температуре.

Температурный стресс вызывал сильное повышение содержания лектина в каллусной ткани, которое к 4 ч экспозиции для разных сортообразцов почти на 30-50% превышало значения контрольного варианта (рисунок). Этому предшествовал 2-часовой лаг-период в накоплении лектина, который обусловлен адаптацией каллусных культур к повышенным температурам.



Сортобразец «Журавушка» Сортобразец «Ред Гойя»

Влияние температуры культивирования на содержание лектина в каллусных культурах фасоли

Эти результаты можно объяснить тем, что даже кратковременное стрессирующее действие высокой температуры вызывает перестройку гормональной системы растений. Например, у простокров пшеницы и гороха установлено, что тепловой шок индуцирует целый каскад многоступенчатых изменений гормональной системы, который запускается выбросом ИУК из пула ее коньюгатов, выполняющего роль стрессового сигнала и инициирующего синтез этилена. В результате синтеза этилена в последующем снижаются уровень ИУК и увеличивается уровень АБК. Полученные данные согласуются с ранее полученными результатами других исследователей по регуляции синтеза лектинов путем индукции образования АБК под действием стресс факторов [8, 9]. Этот факт позволяет предположить участие гормонов стресса в регуляции синтеза лектинов фасоли.

Таким образом, содержание лектинов в каллусных культурах фасоли можно регулировать путем кратковременного повышения температуры культивирования, что позволяет предположить об участии гормонов стресса в регуляции синтеза лектинов фасоли *in vitro*.

Дальнейшие исследования были направлены на оптимизацию условий выделения лектинов из каллусной биомассы фасоли, которая заключалась в изменении соотношения буфера и объема навески каллусов при экстракции и подборе времени элюирования лектинов. Установлено, что соотношение количества навески каллусов и объема буфера 1:5 является оптимальным. Время элюирования лектинов из каллусов может составлять не более 1,5-2,0-часов, в то время как при использовании семян вымывание лектинов рекомендуется проводить в течение 3-3,5 часов, листьев и стеблей – 2,0-2,5 часа. Осаждение белка лучше проводить в следующих режимах: температура центрифугирования не должна превышать 3-4°C, скорость центрифугирования 4000 g в течение 20 минут. Данную операцию для каллусов достаточно проводить однократно. Высаливание белка осуществляли сульфатом аммония в концентрации 60 и 70% для подбора оптимальной концентрации, вызывающей полное выпадение белка. Установлено, что при концентрации сульфата аммония 70% наблюдается наибольший выход лектинов. Неочищенный белок собирают на

фильтр и растворяют в десятикратном (по объему) количестве дистиллированной воды, с последующим диализом в течение 48 ч при 10°C против буферной смеси (0,1M ацетатный буфер, pH-6.8). Этапы и условия выделения лектинов из каллусной биомассы фасоли приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Этапы выделения лектинов из каллусной биомассы фасоли

Параметры и этапы	Характеристика
Тип каллусной ткани:	Морфогенный*
Соотношение массы навески и объема буфера:	1:5*
Экстракция лектинов:	Объем навески: 90-100 мг
	Буфер: 0,9M NaCl
	Время экстракции: 1,5-2 часа*
Осаждение белка:	Температура: 3-4 °C
	Скорость: 4000 g
	Продолжительность: 20 мин.
	Повторность: однократно*
Высаливание белка:	70% сульфат аммония*
Диализ:	Продолжительность: 48 часов
	Температура: 10 °C
	Буфер: 0,1M ацетатный, pH-6.8

\* Параметры оптимизации.

Таким образом, проведенные исследования показали, что каллусные культуры могут быть дополнительным и альтернативным источником получения лектинов фасоли. Регулирование режимов культивирования путем изменения гормонального состава питательной среды, температуры культивирования и оптимизация параметров экстракции будут способствовать развитию биотехнологических подходов получения и других биологически активных веществ фасоли с целью дальнейшего их использования в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Wati, K.R., Theppakorn, T., Benjakul, S. and Rawdkuen, S. Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds // Process Biochemistry 44. – 2009. - P.1307-1314.
- [2] Лубянова А. Р., Фатхутдинова Р. А., Безрукова М. В., Шакирова Ф. М Рост стимулирующий и защитный эффекты фитогемагглютинина на растения фасоли // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2009. - Вип. 1 (16). - С. 39-44.
- [3] Бабопі А.В. Індукційні лектини і устойчивість растений к патогенним організмам і абіотичним стресам // Біохімія. - 2008. - Т. 73, вип. 7. - С. 1007-1022.
- [4] Жумабаєва Б.А., Джанғалина Э.Д., Айташева З.Г., Жигитбекова А.Д. Морфогенетические особенности каллусных культур фасоли обыкновенной // Вестник КазНУ. Серия Экологическая. – 2012. - № 3(35). – С.113-117.
- [5] Новикова Г. В., Носов А. В., Степанченко Н. С., Фоменков А. А., Мамаева А. С., Мошков И. Е. Пролиферация клеток растений и ее регуляторы // Физиология растений. – 2013. - Т.60, № 4. - С.529-536.
- [6] Raikhel N.V., Lee H.-I., Broekaert W.F. Structure and function of chitin-binding proteins // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. - 1993. - V. 44. - P. 591-615.
- [7] El Houssine Bouiamrine, Mohamed Diouri, Rachid EL Halimi, Lahcen Chilasse Callus growth and plant regeneration in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) immature embryos under abscisic acid (ABA) treatment // International Journal of Biosciences IJB. – 2013. - Vol. 3, № 2, P. 87-98.
- [8] Cammue B., Broekaert W., Kellens J., et al. Stress-induced accumulation of wheat germ agglutinin and abscisic acid in roots of wheat seedlings // Plant Physiol. -1989. -V.91. -P.1432-1435.
- [9] Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C. et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more // Molecular Plant. - 2008. - V. 1, № 2. - P. 198-217.

REFERENCES

- [1] Wati, K.R., Theppakorn, T., Benjakul, S. and Rawdkuen, S. Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds Process Biochemistry 44, 2009, 1307-1314 (in Eng.).
- [2] Lubyanova A.R., Fatchutdinova R.A., Bezrukova M. V., Shakirova F.M., Growth stimulating and protective effect of FHA on bean plants Vestnik Charkov National Agriculture University. Series Biology, 2009, № 1 (16), 39-44 (in Russ.)
- [3] Babosha A.V. Inducible lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress Biochemistry, 2008, V. 73, №. 7, 1007-1022 (in Russ.).
- [4] Zhumabayeva B.A., Djangalina E.D., Aytasheva Z.G., Zhigitbekova A.D. Morphogenetic characteristics of bean callus cultures News of NAS RK. Series Biological and Medical, 2012, № 3(35), 113-117 (in Russ.).
- [5] Novikova G.B., Nosov A.V., Stepanchenko N.S., Fomenkov A.A., Mamayeva A.S., Moshkov I.E. *Proliferation of plant cell and its regulation* Plant Physiology, 2013, T.60, № 4, 529-536 (in Russ.).
- [6] Raikhel N.V., Lee H.-I., Broekaert W.F. Structure and function of chitin-binding proteins Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 1993, V. 44, 591-615 (in Eng.).
- [7] El Houssine Bouiamrine, Mohamed Diouri, Rachid EL Halimi, Lahcen Chilla Callus growth and plant regeneration in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) immature embryos under abscisic acid (ABA) treatment International Journal of Biosciences IJB, 2013, Vol. 3, № 2, 87-98 (in Eng.).
- [8] Cammue B., Broekaert W., Kellens J., et al. Stress-induced accumulation of wheat germ agglutinin and abscisic acid in roots of wheat seedlings Plant Physiol, 1989, V.91, 1432-1435 (in Eng.).
- [9] Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C. et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more, Molecular Plant, 2008, V. 1, № 2, 198-217 (in Eng.).

**БҮРШАҚТЫҢ КАЛЛУСТЫ ДАҚЫЛДАРЫНАН ЛЕКТИНДЕРДІҢ  
БӨЛІНІП ШЫҒУ ШАРТТАРЫН ОҢТАЙЛАНДЫРЫУ**

**Э. Д. Джангалина, Б. А. Жумабаева, З. Г. Айтапеева, Ж. Т. Зұлпұхар**

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті,  
Биология және биотехнология мәселелері ФЗИ ҚР БФМ, Алматы, Қазақстан

**Тірек сөздер:** бұршак, лектиндар, каллус дақылы, экстракция.

**Аннотация.** Соңғы жылдарды қоректік және қоректік емес белоктар компоненттерін алудың жана көзде-рін табу қажеттілігі туды, ол олардың әртүрлі клеткалар моделіне әсерін зерттеу, оларды бөліп шығарудың биотехнологиялық жолын өндесу және болашакта медицина мен ауыл шаруашылық салаларында пайдалану үшін қажет. Әңді-бұршакты дақылдар, әсіресе, үрмебұршак белоктарға, сонымен қатар лектиндер мен протеиназ ингибиторларына біршама бай. Лектиндер негізінде түрлі фармакологиялық препараттар, диагности-кумдар, өсімдіктердің қорғау құралдары шығарылады. Үрмебұршактардың лектиндері түрлі қызмет атқарады, сонымен қатар клеткалар мен ұлпалардың дифференциация үдерісіне қатысып, *in vitro* жағдайындағы өсімдіктер тіндерінде морфогенез үдерісін лектин құрамын арттыру есебінен ынталандырады.

Бұл зерттеуде үрмебұршак сортулғілерінің морфогенетикалық белсенделілігімен ерекшеленетін, каллустық ұлпалардағы лектиндердің салыстырмалы талдауы жүргізілген. Олардың бөліп алу әдістемесі оңтайлан-дырылған, бұршак лектиннің алудың альтернативты жолы ретінде ұсынуға болатыны қарастырылған. Алғаш рет гормоналды және физикалық факторлардың үрмебұршактың каллустық ұлпадағы лектиндер жиынтығына оң әсері анықталған. Зерттелінуші сорт ұлгілеріне арнайы модификацияланған, бейімделген, каллустық дақылдардан лектин бөліп алудың биотехнологиялық жолы құрастырылған. Лектин құрамының деңгейінің каллус ұлпаларының морфологиялық типіне, қоректік органдың құрамына, дақылдау шарттарына тәуелділігі анықталған. Үрмебұршак клеткалық биомассасынан лектинді бөлініп алу әдістемесі жасалынған. Өсімдік ұлпаларының гомогенизациялық шарттары және лектин экстракциясы, буфер мен каллус көлемінің ара қатынастарын өзгерту жолымен оңтайландырылған.

Сонымен, жүргізілген зерттеулер үрмебұршак каллус дақылдары лектин белогын бөліп алудағы қосымша және альтернативты көзі бола алатынын көрсетті. Дақылдау режимдерін қоректік органдың гормональді құрамының өзгерту жолымен реттеу, дақылдау температурасы мен экстракция параметрлерін оңтайландыру үрмебұршактан биологиялық белсендей басқа да заттарды биотехнологиялық тұрғыдан бөліп алуға және оны алдағы уақытта ауыл шаруашылығы мен өнеркәсіптің түрлі салаларында қолдауға ықпал етеді.

Поступила 02.02.2016 г.