

NEWS**OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN****SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 313 (2016), 153 – 158

**QUANTITATIVE CHANGE AND HORMONAL REGULATION OF
 α -AMYLASE INHIBITOR IN THE WHEAT GRAINS****B. Tilegen, Zh. D. Beskempirova, A. Dalelhankhyzy,
N. S. Mamytova, V. A. Kuzovlev, A. A. Khakimzhanov**M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: a.khakimzhanov@mail.ru**Keywords:** wheat grain, proteinaceous inhibitor, α -amylase, germination, maturation.

Abstract. An important enzyme in the grain cereal α -amylase is largely determined by its biological and technological quality. In the dormant seeds usually α -amylase level is very low. Upon germination of grain enzyme activity increases many times in connection with the mobilization of the reserve starch for the development of the seedling. In the regulation of the activity of α -amylase are important inhibitors of carbohydrate, protein and phospholipid nature. Among the proteinaceous inhibitors of endogenous (grain) α -amylase the most characterized bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor of barley (BASI). This inhibitor is there in wheat grain (WASI), but it is still little known.

The aim was to study the changes of the proteinaceous inhibitor during grains germination and maturity, as well as the regulation of its activity phytohormones. We used whole grains, as well as model objects for studying the influence of hormones - isolated embryo and aleurone layer. The inhibitory activity was determined spectrophotometrically.

As a result of the peculiarities of changes in α -amylase inhibitor during the ripening and germination of wheat grains. The maturation period is a synthesis and accumulation inhibitor and during germination - its inactivation. It is found that ABA stimulates synthesis inhibitor in the aleurone layer and suppresses its GA. In the embryos synthesis of inhibitor was not observed. The activity of α -amylase and its proteinaceous inhibitor inversely correlated in germinating and ripening grains. The data obtained can be used in biochemistry and enzymology of the grains

УДК 581.19:633.1

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ И ГОРМОНАЛЬНАЯ
РЕГУЛЯЦИЯ ИНГИБИТОРА α -АМИЛАЗЫ В ЗЕРНЕ ПШЕНИЦЫ****Б. Тилеген, Ж. Д. Бескемпирова, А. Далелханкызы,
Н. С. Мамытова, В. А. Кузовлев, А. А. Хакимжанов**

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

Ключевые слова: зерно пшеницы, белковый ингибитор, α -амилаза, прорастание, созревание.

Аннотация. Важным ферментом в зерне злаковых является α -амилаза, во многом определяющая его биологическое и технологическое качество. В покоящемся семени, как правило, уровень α -амилазы очень низкий. При прорастании зерна активность фермента возрастает многократно в связи с мобилизацией резервного крахмала для развития проростка. В регуляции активности α -амилазы важную роль играют ингибиторы углеводной, фосфолипидной и белковой природы. Среди белковых ингибиторов эндогенной (зерновой) α -амилазы наиболее охарактеризован бифункциональный α -амилаза/субтилизин ингибитор ячменя (BASI). Подобный ингибитор существует в зерне пшеницы (WASI), однако он до сих пор остается малоизученным.

Целью работы явилось изучение изменчивости белка-ингибитора в периоды прорастания и созревания зерна, а также регуляция его активности фитогормонами. В работе использовали целые зерновки, а в качестве модельных объектов при изучении влияния гормонов - изолированные зародыши и алейроновый слой. Ингибиторную активность определяли спектрофотометрическим методом.

В результате выявлены особенности изменения ингибитора α -амилазы при созревании и прорастании зерновок пшеницы. В период созревания происходит синтез и накопление ингибитора, а при прорастании – его инактивация. Установлено, что АБК стимулирует синтез ингибитора в алейроновом слое, а ГК его подавляет. В зародышах синтез ингибитора не наблюдался. Активность α -амилазы и ее белкового ингибитора обратно коррелировали в прорастающем и созревающем зерне. Полученные данные могут быть использованы в энзимологии и биохимии зерна.

Введение. В зерновках злаковых синтезируются и накапливаются разнообразные белковые ингибиторы (БИ) протеаз и амилаз. Эти белки принято подразделять на основе их структуры и способности ингибировать определенные классы ферментов. К настоящему времени лучше всего исследованы ингибиторы сериновых протеаз, многие из которых имеют больше чем один ингибиторный домен. Эти белкам уделяется пристальное внимание в связи с их важной ролью в защите растений от патогенов [1,2]. Сравнительно меньше сведений об ингибиторах α -амилазы. Среди этих ингибиторов большой интерес вызывают бифункциональные «двуголовые» ингибиторы (БФИ) двух различных, не связанных между собой ферментов – растительной α -амилазы и сериновой протеазы субтилизина *Bacillus subtilis*. Впервые они выделены из зерна ячменя, а затем из других злаковых и имеют молекулярный вес около 20 кД [3, 4]. В настоящее время дискутируется вопрос об участии БФИ в регулировании активности ферmenta при прорастании [5, 6].

В проведенной нами недавно работе даны некоторые физико-химические характеристики БИ из зерна пшеницы [7]. Установлено, что ингибитор способен избирательно подавлять α -амилазу «прорастания» (α -Ами1). Несмотря на определенные успехи, индукция синтеза, регуляция и функционирование белкового ингибитора α -амилазы/субтилизина в зерне пшеницы остаются слабо изученными.

В настоящей работе исследовано изменение активности ингибитора в периоды прорастания и созревания зерна, а также его регуляция фитогормонами.

Методы исследования. Объектом исследования служило зерно пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов Акмола, Астана и Шортанды.

Для получения экстракта зерна гомогенизировали 0,05 М ацетатным буфером pH 5,0, содержащим 1 mM CaCl₂ в соотношении 1:3. После 1 часа настаивания при +4°C смесь центрифugировали при 8000 об/мин 15 мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве источника α -амилазы и ее ингибитора. При необходимости удаления амилаз супернатант прогревали при 80°C в течение 10 мин, затем резко охлаждали, центрифугировали и осадок отбрасывали. Потери ингибиторной активности в результате данной процедуры минимальны.

Определение ингибиторной активности проводили при pH-8,0 (50 mM фосфатный буфер) с добавлением 1 mM CaCl₂. Уровень ингибирования определяли по уменьшению активности α -амилазы, которую измеряли по методу [8]. К малому объему ингибитора с ферментом (по 20 мкл), соответственно разбавленных, добавляли 1 мл буфера. Смесь инкубировали 15 мин при 30°C, добавляли 1 мл β -лимит декстрозы (0,6 мг/мл) и инкубировали еще 15 мин. Контролем служили варианты без ингибитора. Реакцию останавливали добавлением 4 мл йодного раствора (0,005% J₂ / 0,05% KJ). Измерение окраски проводили при 540 нм. Ингибиторную активность выражали следующим образом: 1 ед. активности = 0,01 разницы между экстинкцией контроля (амилазная активность без ингибитора) и опыта (амилазная активность с ингибитором) на 1 мл/ч.

Результаты исследования

Зерновки пшеницы сорта Астана замачивали на 1 час в воде, стерилизовали в 5% H₂O₂ 10 мин, промывали дистиллированной водой и прорашивали при 25°C в течение 6 дней. Часть проросших семян ежедневно отбирали для анализа на ингибиторную активность. Перед измерением экстракти прогревали при 80°C 10 мин для удаления α и β -амилаз, сильно мешающих определению ингибитора в образце. Ингибитор стабилизировали введением в экстракт до прогрева 20 mM CaCl₂.

К 1-му дню проращивания активность БИ составила около 80% от таковой покоящегося зерна (рисунок 1). По мере прорастания активность постепенно снижалась и к 4 дню полностью исчезала. В 5- и 6-суточных проростках ингибиторная активность не обнаруживалась. Содержание ингибитора обратно коррелировало с активностью α -амилазы, резкий прирост которой наблюдался с 3-го дня. Полученные данные указывают на достаточно быструю инактивацию БИ при прорастании, что предполагает участие в этом процессе эндогенных факторов, например, протеаз, доноров SH-групп, хелаторов 2-валентных металлов, изменение pH и др.

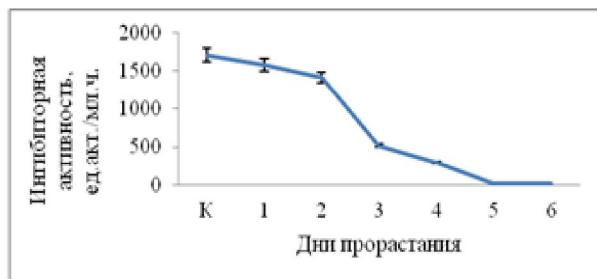


Рисунок 1 – Изменение активности ингибитора в прорастающих зерновках

Для выяснения возможной роли протеолитических ферментов в деградации БИ, нами исследовалось прямое действие трипсина и папаина – типичных представителей сериновых и тиоловых протеаз.

Данные эксперимента представлены на рисунке 2, из которого видна достаточно быстрая инактивация ингибитора в присутствии обеих протеаз, особенно в варианте с трипсином.

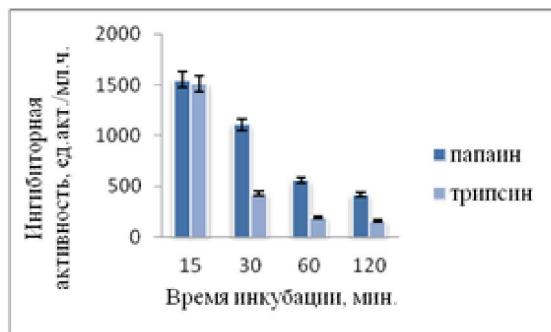


Рисунок 2 – Действие протеаз на активность ингибитора

Хорошо известно, что в прорастающих зерновках наряду с другими гидролазами запасных полимеров в алейроновых клетках обильно синтезируются протеазы. Не исключено, что среди них есть ферменты, ответственные за протеолиз и инактивацию белкового ингибитора α -амилазы. С физиологической точки зрения этот процесс весьма логичен, поскольку в прорастающих зерновках очевидно отпадает надобность в подобных белках-тормозителях.

Исследовано количественное содержание ингибитора эндогенной α -амилазы в период созревания зерновок 3-х сортов - Акмола, Астана и Шортанды. Зерновки отбирали на 18, 23, 26, 31 и 38 дней после цветения (ДПЦ), фиксировали в жидком азоте и хранили при -20°C до использования. Для определения ингибиторной активности экстракты из зерна прогревали при 80°C 10 мин, а для измерения амилазной активности использовали не прогретые экстракты.

Существенных сортовых различий в изменении амилазной активности и белка-ингибитора не было отмечено. Для созревающих зерновок, также как и прорастающих характерна обратная корреляция амилазной и ингибиторной активности (рисунок 3).

Однако здесь активность БИ по мере созревания зерна, прогрессивно возрастала, достигая максимума к полной спелости, в то время как амилазная активность, наоборот, убывала. В образцах зерна ингибитор отчетливо появлялся, начиная с 26 ДПЦ (молочно-восковая спелость).

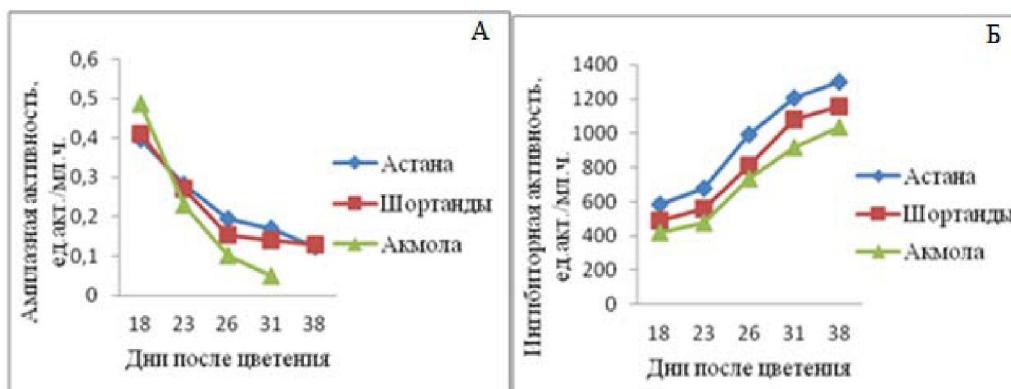


Рисунок 3 – Изменение амилазной (А) и ингибиторной (Б) активности в созревающих зерновках пшеницы

Главными гормонами, оперирующими в семенах злаковых на протяжении всего онтогенеза, являются АБК и ГК. Роль двух гормонов в регулировании ингибитора изучали на зрелых изолированных зародышах и половинках зерна без зародышей. Эти эксперименты позволили также точно установить место локализации синтеза БИ в зерновке пшеницы, который может происходить в период созревания. Половинки зерна замачивали в воде и оставляли инкубироваться 3 дня при +8°C. После этого их пересаживали на следующие варианты: 1- дистиллированная вода (контроль); 2 - ГК 5 мкМ; 3 - АБК 10 мкМ и продолжали инкубировать еще 2 дня при 25°C. По окончании эксперимента получали экстракти, в которых определяли ингибиторную активность.

На диаграммах рисунка 4 видно, что АБК стимулирует образование ингибитора в алейроне, а ГК его подавляет. Следовательно, два гормона действуют на ингибитор разнонаправленно. Повышение концентрации АБК выше 10 мкМ не приводило к увеличению ингибиторной активности. Аналогичные эксперименты проведены на зародышах, вычлененных из наклонувшихся в течение 20 ч зерновок. В отличие от алейрона в изолированных зародышах синтез ингибитора не наблюдался.

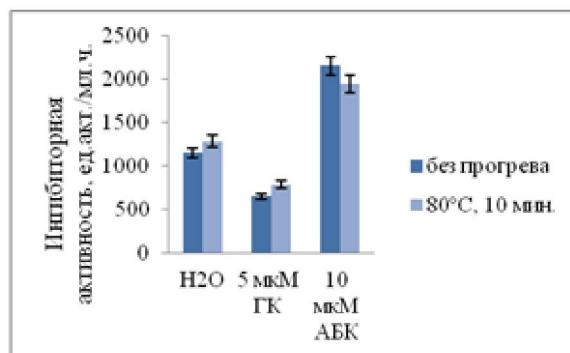


Рисунок 4 – Влияние гормонов ГК и АБК на активность ингибитора

Обсуждение результатов

Таким образом, показано, что в созревающих зерновках происходит синтез и накопление ингибитора α -амилазы, а при прорастании – его инактивация. При этом уровни активности фермента и ингибитора обратно коррелировали между собой. При созревании синтез ингибитора начинался в фазе молочно-восковой спелости, а максимальное его содержание достигалось к полной спелости зерна. Синтез БИ индуцировался в беззародышевых половинках зерна (алейрон) обработкой АБК, т.е. эти клетки компетентны за синтез данного белка. Данные по локализации синтеза БИ хорошо согласуются с результатами распределения этого белка в различных частях спелой зерновки, где нами показано их присутствие в эндосперме и алейроновом слое [7]. Наши данные также показали, что ингибитор не синтезируется в прорастающем зародыше зрелого зерна пшеницы в отличие от такого ячменя [9].

Выявленные особенности в гормональной регуляции и тканевой специфичности синтеза ингибитора позволяют объяснить изменения этого белка при созревании и прорастании зерна. Как известно, в период созревания гормональный баланс смещается в сторону увеличения АБК, в процессе же перехода из покоя в прорастание начинает превалировать ГК.

Известно, что пшеничная α -амилаза полиморфна и представлена 2-мя основными группами изоферментов, с низкими и высокими значениями изоэлектрических точек (ИЭТ). Для прорастания зерна особую значимость имеют изоформы с высокими ИЭТ - α -амилаза «прорастания». Обычно они обильно синтезируются *de novo* в прорастающих зерновках. Однако эти изоферменты могут синтезироваться и в период позднего созревания под воздействием неблагоприятных условий (дожди, повышенная влажность), что приводит к резкому ухудшению качества зерна. Это негативное явление получило название «предуборочное прорастание» (PHS) и часто встречается в Северных регионах нашей страны.

В связи с вышесказанным и учитывая, что ингибитор синтезируется в алейроне созревающей зерновки, возникает вопрос, может ли иметь место его взаимодействие с α -амилазой «прорастания» и, таким образом, нейтрализация нежелательного фермента. Если это так, то ингибитор может выступать в качестве эндогенного фактора устойчивости пшеницы к предуборочному прорастанию.

Источник финансирования исследований. Министерство образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Валуева Т.А., Мосолов В.В. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений // Успехи биологической химии. 2002. Т.42. С.193-216.
- [2] Gorganovic S. A review: Biological and technological functions of barley seed pathogenesis-related proteins (PRs) // J. Inst. Brew. 2009. V.115. P.334-360.
- [3] Silano V. Alpha-amylase inhibitors. In: Kruger JE, Lineback D, Stauffer CE (Eds.), Enzymes and their roles in cereal technology. - St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1987. P.141-199.
- [4] Svenson B., Fukuda K., Nielsen P., Bonsager B. Proteinaceous α -amylase inhibitors // Biochim. Biophys. Acta. 2004. P.145-156.
- [5] Täufel A., Böhm H., Flamme W. Protein inhibitors of alpha-amylase in mature and germinating grain of rye (*Secale cereale*) // J. of cereal science. 1997. V.25. P.267-273.
- [6] Yamagata H., Kunimatsu K., Kamasaka H., Kuramoto T., Iwasaki T. Rice bifunctional α -amylase / subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998. V.62, №5. P.978-985.
- [7] Хакимжанов А.А., Кузовлев В.А., Мамытова Н.С., Фурсов О.В. Очистка и некоторые свойства ингибитора эндогенной α -амилазы зерна пшеницы // Известия НАН РК, Серия биологическая и медицинская. 2014. №5. С.44-48.
- [8] Weselake P.J., MacGregor A.W., Hill R.D. An endogenous α -amylase inhibitor in Barley kernels // Plant Physiol. 1983. V.72. P.809-812.
- [9] Robertson M., Walker-Simmons M., Munro D., Hill R.D. Induction of α -amylase inhibitor synthesis in barley embryos and Young seedlings by abscisic acid and dehydration stress // Plant Physiol. 1989. V.91. P.415-420.

REFERENCES

- [1] Valueva T.A., Masolov V.V. The role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant protection // Uspekhi Biological Chemistry. 2002. V.42. p.193-216. (in Russ.).
- [2] Gorganovic S. A review: Biological and technological functions of barley seed pathogenesis-related proteins (PRs) // J. Inst. Brew. 2009. V.115. P.334-360.
- [3] Silano V. Alpha-amylase inhibitors. In: Kruger JE, Lineback D, Stauffer CE (Eds.), Enzymes and their roles in cereal technology. - St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1987. p.141-199.
- [4] Svenson B., Fukuda K., Nielsen P., Bonsager B. Proteinaceous α -amylase inhibitors // Biochim. Biophys. Acta. 2004. P.145-156.
- [5] Täufel A., Böhm H., Flamme W. Protein inhibitors of alpha-amylase in mature and germinating grain of rye (*Secale cereale*) // J. of cereal science. 1997. V.25. P.267-273.
- [6] Yamagata H., Kunimatsu K., Kamasaka H., Kuramoto T., Iwasaki T. Rice bifunctional α -amylase / subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998. V.62, №5. P.978-985.
- [7] Khakimzhanov A.A., Kuzovlev V.A., Mamytova N.S., Fursov O.V. Purification and some properties of the endogenous inhibitor of α -amylase of wheat // News of NAS RK. Series of biological and medical. 2014. №5. P. 44-48. (in Russ.).
- [8] Weselake P.J., MacGregor A.W., Hill R.D. An endogenous α -amylase inhibitor in Barley kernels // Plant Physiol. 1983. V.72. P.809-812.
- [9] Robertson M., Walker-Simmons M., Munro D., Hill R.D. Induction of α -amylase inhibitor synthesis in barley embryos and Young seedlings by abscisic acid and dehydration stress // Plant Physiol. 1989. V.91. P.415-420.

БИДАЙ ДӘНІНДЕГІ α -АМИЛАЗА ИНГИБИТОРЫНЫҢ САНДЫҚ ӨЗГЕРІСІ ЖӘНЕ ГОРМОНАЛДЫ РЕТТЕЛУІ

Б. Тілеген, Ж. Д. Бескемпірова, А. Даалелханқызы, Н. С. Мамытова, В. А. Кузовлев, А. А. Хакімжанов

КР БФМ ФК М. А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимии институты,
Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: бидай дәні, акуыздық ингибитор, α -амилаза, өну, пісіп жетілу.

Аннотация. Астықтұқымдастар дәндерінің биологиялық және технологиялық қасиетін анықтайдын маңызды фермент - α -амилаза болып табылады. Негізінен тыныштық күйдегі бидай дәндерінде α -амилазаның деңгейі ете төмен болады. Осу кезінде ескіннің, дамуы үшін, қорлық крахмалдың мобилизациясына байланысты ферменттің белсенделілігі бірнеше есе өседі. α -Амилазаның белсенделілігінің реттелуі үшін көмірсұлы, фосфолипидті және акуызды табигаттағы ингибиторлар маңызды рөл атқарады. Эндогенді (дәндік) α -амилазаның акуызды ингибиторларының ішіндегі ең көп сипатталғаны арпа ингибиторы -бифункциональды α -амилаза/субтилизин (BASI). Осыған ұксас ингибитор бидай дәндерінде де кездеседі (WASI), алайда ол осы күнге дейін аз зерттелген.

Жұмыстың мақсаты - дәндердің өсуі және пісіп-жетілу кезеңдеріндегі акуызды ингибитордың өзгерістерін, сонымен қоса олардың фитогармондармен реттелуін зерттеу болып табылады. Жұмыста бүтін дәндер, гормондардың әсерін зерттеу үшін модельді объект ретінде жеке бөлініп алынған ұрықтар мен алайрон қабаты пайдаланылды. Ингибитордың белсенделілігін спектрофотометриялық әдіспен анықтады.

Зерттеу нәтижесінде бидай дәндерінің өсу және пісіп-жетілу кезеңдеріндегі α -амилаза ингибиторының өзгерісінің ерекшеліктері анықталды. Пісіп-жетілу кезеңінде ингибитордың синтезі және жинақталуы жүрсө, ал өсу кезінде – оның инактивациясы іске асады. АБҚ алайрон қабатындағы ингибитор синтезінің жүруіне ықпал етсе, ГҚ оны керсінше басады. Ұрықтарда ингибитордың синтезі байқалмады. Осу және пісіп-жетілу кезеңдерінде α -амилазаның және акуызды ингибитордың белсенделіліктері кері корреляция көрсетті. Алынған нәтижелер дәндер биохимиясы және энзимологиясында пайдаланылуы мүмкін.