

А. А. ХАКИМЖАНОВ, В. А. КУЗОВЛЕВ, Н. С. МАМЫТОВА, О. В. ФУРСОВ

(РГП «Институт молекулярной биологии и биологии им. М. А. Айтхожина» КН МОН РК,
Алматы, Казахстан. E-mail: a.khakhimzhanov@mail.ru)

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ИНГИБИТОРА ЭНДОГЕННОЙ α -АМИЛАЗЫ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

Аннотация. Из зерна пшеницы очищен белковый ингибитор эндогенной α -амилазы. Ингибитор строго инактивировал α -амилазу прорастания (группа Ами1) и практически не действовал на изоферменты α -Ами2. Молекулярный вес белка соответствовал 21 кД, а изоэлектрическая точка – 7,0. Белок обладал относительно высокой термостабильностью и оптимумом действия при pH 7,8-8,0.

Ключевые слова: пшеница, α -амилаза, изоферменты, белковый ингибитор.

Тірек сөздер: бидай, α -амилаза, изоферменттер, ақуыздық ингибитор.

Keywords: wheat, α -amylase, isoenzymes, proteinaceous inhibitor.

Зерновки злаковых содержат разнообразные ингибиторы амилаз белковой природы. Большинство из них активны в отношении экзогенных α -амилаз (бактерий, насекомых и млекопитающих). Белковые ингибиторы против собственных (эндогенных) α -амилаз малочисленны и исследованы сравнительно меньше. Первую группу ингибиторов принято относить к компонентам защитной системы растений. Физиологическая роль ингибиторов второй группы, по-видимому, заключается в регулировании активности эндогенного фермента в периоды созревания и прорастания зерна [1–3].

Среди ингибиторов зерновых α -амилаз наиболее известен бифункциональный α -амилаза/субтилизинингибитор, впервые открытый в зерне ячменя (BASI) [4, 5]. Ингибитор способен подавлять активность как α -амилазы II ячменя, так и сериновой протеазы микроорганизмов. В дальнейшем подобные BASI ингибиторы были обнаружены в семенах некоторых других злаковых [6]. В настоящее время интенсивно изучаются функционирование и регуляция этих белков.

α -Амилаза зерна злаковых весьма полиморфна и представлена двумя основными группами: α -Ами1с рI в районе 5,8 и α -Ами2с рI около 4,5. Изоферменты двух групп отличаются по степени аффинности к катионам кальция, чувствительности к pH и повышенной температуре [7, 8]. В гидролизе крахмала принципиальную важность имеет α -амилаза прорастания (Ами1), выполняющая роль ферментов первичной атаки гранул. Повышенная активность α -амилазы, вследствие повреждения зерна предуборочным прорастанием, значительно снижает качество муки и хлеба [9]. В связи с этим, исследование ингибиторов как естественных регуляторов зерновой α -амилазы представляется весьма важным.

В нашей работе из зерна пшеницы получен высокоочищенный препарат белкового ингибитора эндогенной α -амилазы и изучен ряд его физико-химических свойств.

Материалы и методы

Ингибитор α -амилазы из зерна пшеницы очищали методом, описанным для выделения ячменного ингибитора [5] с некоторой модификацией. Схема очистки ингибитора включала 3 основные стадии: осаждение растворимых белков зернового экстракта сульфатом аммония, ионообменную хроматографию на DEAE-Sephacryl (Pharmacia), гель-фильтрацию на Toyapearl HW-50 (Toya-Soda) с последующим концентрированием на ячейке Amicon (фильтр UM-10).

Ингибиторную активность определяли по изменению уровня активности α -амилазы в присутствии и отсутствии ингибитора и выражали следующим образом: 1 единица активности = 0,01 разницы между экстинкцией контроля (амилазная активность без ингибитора) и опыта (амилазная активность с ингибитором) на 1 мл/ч [4].

Очистку α -амилазы из проросшего зерна пшеницы и ее разделение на группы изоферментов α -Ами1 и α -Ами2 проводили с помощью методов, приведенным в работе [7].

ДС-электрофорез белков в ходе очистки ингибитора осуществляли в пластинах 10% ПАГ в системе Лэммли. Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) ингибитора проводили в пластине 5% ПАГ в диапазоне амфолитов pH 3-10 (Sigma) при напряжении 600 V.

Результаты и обсуждение

Для выделения и изучения свойств ингибитора из зерна пшеницы была использована 3-х стадийная очистка, включавшая осаждение белка зернового экстракта сульфатом аммония (30-70%), ионообменную и гель-хроматографию. На рисунках 1 и 2 представлены ДС-электрофорези ИЭФ ингибитора пшеницы в ходе его очистки. Молекулярный вес белка соответствовал 21 кД, а изоэлектрическая точка – 7,0.

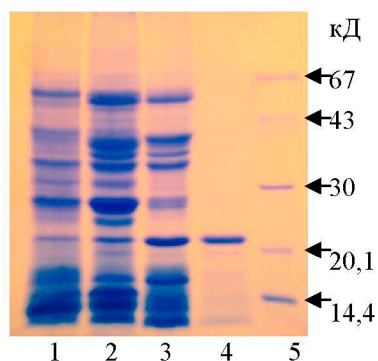


Рисунок 1 – ДС-электрофорез ингибитора α -амилазы зерна пшеницы в ходе его очистки:
1 – белок экстракта зерна; 2 – после осаждения сульфатом аммония; 3 – после ионообменной хроматографии;
4 – после гель-хроматографии (очищенный ингибитор); 5 – белки-маркеры м.в.

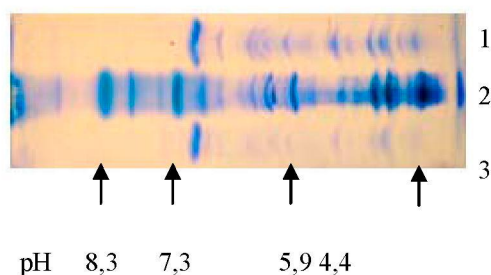


Рисунок 2 – ИЭФ ингибитора из целого зерна и отрубей пшеницы:
1 – ингибитор, очищенный из зерна; 2 – отрубей; 3 – белки-маркеры pI.

Исследовано действие ингибитора на две группы изоформ пшеничной α -амилазы Ами1 и Ами2 (рисунок 3). Оказалось, что ингибитор был высоко специфичен и способен к подавлению активности только изоферментов с высокими pI (α -Ами1). Выделенный ингибитор не проявлял активность против ряда α -амилаз микробного и животного происхождения.

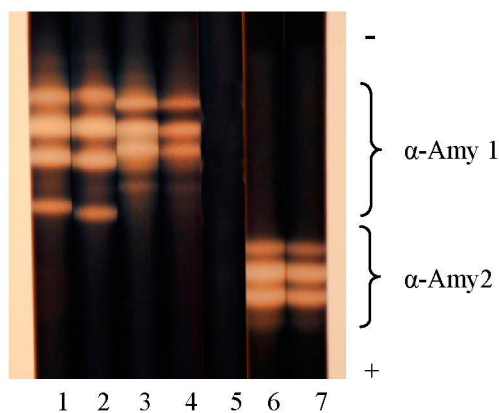


Рисунок 3 – Действие ингибитора на изоферменты пшеничной α -амилазы:
1 – 5 концентрации ингибитора 0, 10, 20, 30 и 50 мкг/мл, соответственно;
6, 7 – концентрации ингибитора 0 и 50 мкг/мл, концентрация фермента – 30 мкг/мл.
Время прединкубирования фермента с ингибитором – 30 минут

Полученные данные указывают на близкое сходство физико-химических свойств и специфичности действия на пшеничную α -амилазу выделенного нами белка с ингибитором ячменя BASI. В дальнейшем исследовалось влияние pH среды и высокой температуры на активность ингибитора и стабильность комплекса ингибитор-фермент (группа α -Ами1).

Было обнаружено, что ингибитор наиболее активен в слабощелочной среде (в области pH 7,8-8,0), при значениях pH 5,2 его активность падала практически до нуля, особенно в условиях тепловой обработки. Однако, при pH 8,0 ингибитор проявлял очень высокую термостабильность, не теряя своей активности даже при температуре 90°C в течение 10 минут (таблица 1). Этот факт следует особо отметить, поскольку ранее сообщалось об относительной термолабильности родственного белка – BASI [4]. С другой стороны, имеются данные о высокой термоустойчивости ряда других, близких по свойствам ингибиторных белков, например, ингибитора 0.19 α -амилазы зерна пшеницы, трипсинного ингибитора Куница из папайи [11, 12].

Таблица 1 – Действие высокой температуры на активность ингибитора

| Вариант | Ингибиторная активность (ед. акт./мл.час) | % подавления ингибиторной активности |
|--------------|---|--------------------------------------|
| Контроль | 3990 | 0 |
| 70°C, 10 мин | 3810 | 4,5 |
| 80°C, 10 мин | 3950 | 1,1 |
| 90°C, 10 мин | 3980 | 0,3 |

Как и сам ингибитор, его комплекс с ферментом также был достаточно устойчив и не распался полностью при температуре 65°C в течение 15 мин (таблица 2). Столь высокая стабильность данного комплекса, по-видимому, объясняется весьма близкими pH ингибитора и изоформа α -Ами1, а также наличием атома кальция в структуре фермента, повышающими взаимную аффинность обоих компонентов комплекса.

Таблица 2 – Термостабильность фермент-ингибиторного комплекса

| Вариант | Амилазная активность (ед. акт./мл.час) | % распада комплекса фермент-ингибитор |
|--------------|--|---------------------------------------|
| Контроль | 3460 | 0 |
| 65°C, 5 мин | 3510 | 1,4 |
| 65°C, 10 мин | 4340 | 20,3 |
| 65°C, 15 мин | 5570 | 37,9 |

Таблица 3 – Содержание ингибитора в различных частях семени

| Источник | Ингибиторная активность, (ед. акт./мг белка) |
|------------------------------|--|
| Зерно пшеницы | 2680 |
| Пшеничные отруби (фракция 1) | 1980 |
| Пшеничные отруби (фракция 2) | 2330 |
| Пшеничная мука | 2700 |
| Зерно ячменя | 7010 |

Исследована локализация и распределение ингибиторной активности в различных частях зерновки пшеницы. Для анализа ингибиторной активности использовались целые зерна, фракция отрубей с оболочками и алейроном, фракция отрубей с зародышами, щитками, субалейроновый слой, а также мука эндосперма. Из данных таблицы 3 видно, что ингибитор присутствует повсеместно, однако его удельная активность была наиболее высока в эндосперме. Для сравнения мы также определили ингибиторную активность в зерне ячменя. Оказалось, что по содержанию ингибитора ячмень превосходит пшеницу более чем в два раза. Но, не смотря на это, зерно пшеницы также является хорошим источником ингибитора зерновой α -амилазы.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Silano V. Alpha-amylase inhibitors // In: Kruger JE, Lineback D, Stauffer CE (Eds.), Enzymes and their roles in Cereal Technology, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. – 1987. – P. 141-199.
- 2 Svenson B., Fukuda K., Nielsen P., Bonsager B. Proteinaceous α -amylase inhibitors // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – P.145-156.
- 3 Gorjanovich S. A Review: biological and technological function of barley seed pathogenesis-related proteins // J. Inst. Brew. – 2009. – Vol. 115(4). – P. 334-360.

- 4 Weselake P.J., MacGregor A.W., Hill R.D. An endogenous α -amylase inhibitor in Barley kernels // *Plant Physiol.* – 1983. – Vol. 72. – P. 809-812.
- 5 Mundy J., Svendsen I.B., Hejgaard J. Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. I. Isolation and characterization // *Carlsberg Res. Commun.* – 1983. – Vol. 48. – P. 81-90.
- 6 Weselake P.J., MacGregor A.W., Hill R.D. Endogenous alpha-amylase inhibitor in various cereals // *Cereal Chem.* – 1985. – Vol. 62(2). – P.120-123.
- 7 Fursov O.V., Khaydarova J.S., Darkanbaev T.B. Purification, separation and some properties of α -amylase components of germinating wheat grains // *Biochem. Physiol. Pflanzen.* – 1986. – Vol. 81. – P. 177-787.
- 8 Muralikrishna M., Nirmala M. Cereal α -amylase – an overview // *Carbohydrate polymers.* – 2005. – Vol. 60. – P. 163-173.
- 9 Kruger J.E. Enzymes of sprouted grain and possible technological significance // In Bushuk W. and Rasper V. (ed.) *Wheat: Production, properties and quality.* – Glasgow, UK. 1994. – P. 143-153.
- 10 Oneda H., Lee S., Inoye K. Inhibitory effect of 0.19 alpha-amylase inhibitor from wheat kernel on the activity of porcine alpha-amylase and its thermal stability // *J. Biochem.* – 2004. – Vol. 135(3). – P. 421-427.
- 11 Azarkan M., Dibiani R., Goormaghtigh E., Raussens V., Baeyens-Volant D. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – P. 1063-1072.

REFERENCES

- 1 Silano V. In: Kruger JE, Lineback D, Stauffer CE (Eds.), *Enzymes and their roles in Cereal Technology*, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. 1987. 141-199.
- 2 Svenson B., Fukuda K., Nielsen P., Bonsager B. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. 145-156.
- 3 Gorjanovich S. J. *Inst. Brew.* 2009. 115(4). 334-360.
- 4 Weselake P.J., MacGregor A.W., Hill R.D. *Plant Physiol.* 1983. 72. 809-812.
- 5 Mundy J., Svendsen I.B., Hejgaard J. Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. I. Isolation an characterization. *Carlsberg Res. Commun.* 1983. 48. 81-90.
- 6 Weselake P.J., MacGregor A.W., Hill R.D. *Cereal Chem.* 1985. 62(2). 120-123.
- 7 Fursov O.V., Khaydarova J.S., Darkanbaev T.B. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 1986. 81. 177-787.
- 8 Muralikrishna M., Nirmala M. *Carbohydrate polymers.* 2005. 60. 163-173.
- 9 Kruger J.E. In Bushuk W. and Rasper V. (ed.) *Wheat: Production, properties and quality.* Glasgow, UK. 1994. 143-153.
- 10 Azarkan M., Dibiani R., Goormaghtigh E., Raussens V., Baeyens-Volant D. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. 1063-1072.
- 11 Oneda H., Lee S., Inoye K. *J. Biochem.* 2004. 135(3).421-427.

Резюме

A. A. Хакімжанов, В. А. Кузовлев, Н. С. Мамытова, В. Фурсов

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

БИДАЙ ДӘНІНДЕГІ ЭНДОГЕНДІ α -АМИЛАЗА ИНГИБИТОРЫНЫҢ КЕЙБІР ҚАСИЕТТЕРІ ЖӘНЕ ОНЫ ТАЗАЛАУ

Бидай дәнінен эндогенді α -амилазаның ақуызды ингибиторы тазартылып алынды. Ингибитор өсу (Ами1 тобы) α -амилазасын қатан түрде инактивирлеген және Ами2 изоферментіне мүлдем әсер етпеген. Ақуыздың молекулалық салмағы 21кД, ал изоэлектрлі нүктесі – 7,0 сәйкес. Ақуыз жоғары термотұрақтылыққа ие және әсер ету оптимумы рН 7,8- 8,0 тең.

Тірек сөздер: бидай, α -амилаза, изоферменттер, ақуыздық ингибитор.

Summary

A. A. Khakimzhanov, V. A. Kuzovlev, N. S. Mamytova, O. V. Fursov

(«M. A. Aitkhozhin institute of molecular biology and biochemisrtry» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan)

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF ENDOGENOUS α -AMYLASE INHIBITOR FROM WHEAT GRAIN

The endogenous α -amylase inhibitor was purified from wheat grains. Its molecular weight and isoelectric point were about 21kD and 7,0 respectively. The inhibitor inactivated wheat high pI α -amylase isozymes, but had no effect on low pI isozymes. The protein was relatively high thermostable and most active at pH 7,8 - 8,0.

Keywords: wheat, α -amylase, isoenzymes, proteinaceous inhibitor.

Поступила 10.0.2014 г.