*ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2018, том 54, № 2, с. 108–114*

*УДК 547.9:581.19*

# СВОЙСТВА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИНГИБИТОРА α-АМИЛАЗЫ/СУБТИЛИЗИНА ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

**© 2018 г. В. А. Кузовлев[1], Ж. Д. Бескемпирова[1], Д. А. Шаншарова[2], О. В· Фурсов[1], А. А. Хакимжанов[1*]**

*[1]Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, г. Алматы, 050012, Казахстан*
*[2]Алматинский технологический университет, г. Алматы, 050012, Казахстан.*
**e-mail: a.khakimzhanov@mail.ru*
Поступила в редакцию 25.09.2017 г.

Из зерна пшеницы выделен и очищен белковый бифункциональный ингибитор эндогенной α-амилазы и субтилизина. Ингибитор инактивировал специфически изоферменты α-амилазы с высокими значениями изоэлектрических точек (группу α-AMY1) и практически не действовал на изоферменты α-AMY2 с низкими их значениями. Ингибитор не являлся гликопротеином, его молекулярная масса соответствовала 21 кД, а изоэлектрическая точка – 7.2. Белок обладал относительно высокой термостабильностью и оптимумом действия вблизи pH 8.0, а для проявления ингибиторной активности было необходимо присутствие катионов $Ca^{2+}$. Изучено ингибирование очищенным белком избытка α-амилазы в зерне пшеницы с низким числом падения.

*Ключевые слова: Triticum aestivum* L., бифункциональный ингибитор, α-амилаза, изоферменты, субтилизин, число падения.

**DOI:**

Зерновки злаковых содержат разнообразные ингибиторы амилаз белковой природы. Большинство из них активны по отношению к экзогенным α-амилазам (1,4-глюкан-4-глюкогидролазам, КФ 3.2.1.1) бактерий, насекомых и млекопитающих. Известно небольшое число белковых ингибиторов, действующих на собственные (эндогенные) α-амилазы, и изучены они сравнительно недостаточно [1–4]. Группу ингибиторов экзогенных α-амилаз принято относить к компонентам защитной системы (иммунитета) растений. Физиологическая роль ингибиторов эндогенных α-амилаз, по-видимому, заключается в регулировании активности эндогенного фермента в периоды созревания и прорастания зерна, хотя прямые доказательства этого до сих пор отсутствуют. Многих представителей обеих групп относят к семейству PR-белков, участвующих в патогенезе [5, 6].

Среди белковых ингибиторов зерновых α-амилаз наиболее известен бифункциональный α-амилаза/субтилизин ингибитор (**БФИ**), впервые обнаруженный в зерне ячменя и обозначенный как BASI (barley amylase/subtilisin inhibitor) [7, 8]. Ингибитор способен подавлять активность эндогенной α-амилазы II ячменя и сериновой протеиназы *Bacillus* sp. В дальнейшем ингибиторы, подобные BASI, были обнаружены в семенах некоторых других злаковых – пшеницы, ржи, риса и тритикале [9–12]. К настоящему времени основные работы были посвящены изучению BASI вследствие его важной роли в регуляции содержания α-амилазы в пивоваренном ячмене, влияющем на качество солода. Это представляет большой практический интерес. Показано также, что BASI участвует в защите растений от микробных и грибных патогенов, а также абиотических стрессов. Детально изучаются структура белка и регуляция его активности, функционирование в зерновке и генетический полиморфизм [13–16]. БФИ присутствует и в зерне пшеницы, он обозначен как WASI (wheat amylase/subtilisin inhibitor). Сведений о его характеристике крайне мало. Однако, этот белок-ингибитор, помимо защитных функций, может выполнять определенную роль в контроле качества муки и ее хлебопекарных свойств, подавляя нежелательную избыточную активность α-амилазы в созревающем зерне и при его хранении.

α-Амилаза прорастающего зерна пшеницы характеризуется широким полиморфизмом. Она представлена двумя главными группами: α-AMY1 с основными pI (6.3–7.5) и α-AMY2 с кислыми pI (4.9–6.0). Изоферменты этих групп кодируются разными подсемействами генов и несколько отличаются по своей структуре, свойствам, регуляции и функциям в зерновке [17, 18]. При гидролизе крахмала важную роль играет α-AMY1 (α-амилаза

"прорастания"), функционирующая при первичной атаке крахмальных гранул. Вследствие повреждения зерна предуборочным прорастанием (PHS, pre-harvest sprouting) или присутствия а нем специфической формы α-амилазы позднего созревания (LMA, late maturity α-amylase) повышается активность этого фермента, что значительно снижает качество муки и хлеба [19, 20]. В связи с этим изучение БФИ, как естественных регуляторов зерновой α-амилазы, представляется весьма важным.

Цель работы – получить из зерна пшеницы высокоочищенный БФИ α-амилазы/субтилизина и изучить его некоторые биохимические свойства и функциональные особенности.

## МЕТОДИКА

**Очистка бифункционального ингибитора.** Покоящееся зерно пшеницы (*Triticum aestivum* L. сорт Казахстанская 10) размалывали в мельнице LM-120 ("Perten Instruments", Швеция). К 50 г муки добавляли 200 мл 20 мМ ацетатного буфера, pH 5.2, содержавшего 1 мМ $CaCl_2$. Смесь перемешивали в течение 2 ч при +4 °С и центрифугировали при 8000 g 20 мин. Белок из супернатанта осаждали сульфатом аммония насыщением от 40 до 70% и диализовали против 10 мМ трис-HCl буфера, pH 8.0, содержавшего 1 мМ $CaCl_2$. Осадок удаляли центрифугированием, а супернатант наносили на колонку (1.2 × 8 см) с ДЭАЭ-сефарозой ("Sigma", США), уравновешенной буфером для диализа. Белок элюировали ступенчатым градиентом NaCl от 0.07 до 0.11 М. Фракции, содержащие ингибиторную активность, концентрировали на фильтре UM-10 в ячейке Amicon ("Millipor", США) и подвергали аффинной хроматографии на иммобилизованной α-амилазе.

Очищенную пшеничную α-амилазу иммобилизовали на сефарозе 4B, активированной CNBr, ("Amersham Biosciences", Швеция) по общепринятой методике связывания белкового лиганда [21]. Перед нанесением белка сорбент уравновешивали 0.05 М фосфатным буфером, pH 7.6, а после его нанесения промывали стартовым буфером, затем тем же буфером, содержавшем 1 М NaCl и 8 М мочевину. Связавшийся белок-ингибитор элюировали 75 мМ уксусной кислотой. Фракции, содержащие ингибитор, быстро нейтрализовали 1 М NaOH до pH 7.0–7.2 для предотвращения инактивации ингибитора, концентрировали и хранили при 4 °С.

**Очистка и разделение α-амилазы.** Тотальную α-амилазу из проросшего зерна пшеницы очищали методом осаждения на гликогене ("USB", США) в присутствии 40%-ного этанола, описанным в руководстве [22]. Изоферментные группы α-AMY1 и α-AMY2 разделяли на колонке (1.2 × 6 см) с CM-сефарозой ("Sigma", США), уравновешенной 20 мМ ацетатным буфером, pH 5.0. Связавшиеся с ионообменником белки элюировали ступенчатым градиентом буферов: сначала стартовым, а затем последовательно 0.08 и 0.2 М ацетатными буферами, pH 5.0. Фракции, содержащие α-амилазы, концентрировали и хранили при 4 °С.

**Определение активности БФИ.** Антиамилазную активность ингибитора определяли в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 8.0, содержавшем 1 мМ $CaCl_2$, и 50 мМ ацетатный буфере, pH 5.2, содержавшем 1 мМ $CaCl_2$,. Степень ингибирования оценивали по уменьшению активности α-амилазы. К смеси ингибитора и фермента (по 20 мкл) добавляли соответствующий буфер до объема 1 мл. Смесь инкубировали в течение 15 мин при 30 °С, затем вносили 1 мл β-декстрина (1 мг/мл) и продолжали инкубацию еще 15 мин. Контролем служили смеси без ингибитора. Реакцию останавливали добавлением 4 мл йодного раствора, содержавшего 0.005% $J_2$ и 0.05% KJ, и определяли оптическую плотность при 540 нм. За единицу активности ингибитора принимали изменение оптической плотности контроля на 0.01 в течение 1 ч в присутствии ингибитора в 1 мл [7].

Антипротеазную активность ингибитора определяли по степени подавления активности субтилизина А ("Sigma", США) в 0.1 М трис-буфере, pH 7.8, при гидролизе 1%-ного казеина, используемого в качестве субстрата. Активность протеазы определяли после инкубации 10 мкг субтилизина и различных количеств ингибитора в течение 30 мин при 30 °С. Затем белки осаждали трихлоруксусной кислотой и измеряли оптическую плотность фильтрата при 280 нм. За единицу активности принимали такое количество ингибитора, которое снижало оптическую плотность фильтрата против контроля на 0.01 за 1 мин [23].

**Определение термостабильности БФИ.** Для изучения термостабильности белок-ингибитор прединкубировали в течение различного периода времени при температурах от 65 до 90 °С, а затем измеряли активность, как было описано выше.

**Электрофорез и изоэлектрофокусирование белков.** Электрофорез белков в присутствии додецилсульфата натрия (**ДДС-Na**) проводили в пластинах 10%-ного ПААГ по методу Лэммли [24]. Электрофорез в нативных условиях осуществляли в столбиках 7.5%-ного ПАГ по методу [22]. Изоэлектрофокусирование (**ИЭФ**) проводили в пластинах 6%-ного ПААГ с использованием Servalyt 3–10 ("Serva", Германия) на приборе Multiphor II ("LKB", Швеция) при напряжении 600 V.

**Определение гликопротеинов в ПААГ**. Для окрашивания гликопротеинов в ПААГ после электрофореза в присутствии ДДС-Na использовали набор

реагентов “Pierce glycoprotein staining kit” (“Thermo scientific”, США) согласно прилагаемой инструкции.

**Определение числа падения (ЧП).** ЧП шрота (помол целого зерна) товарного зерна яровой пшеницы определяли на приборе Falling Number 1700 (“Perten Instruments”, Швеция) согласно стандарту 3093-2009 Международной организации стандартизации (**ИСО**) [25].

Эксперименты и измерения ферментативной активности проводились в трех повторностях. Данные представлены средними арифметическими значениями и их стандартными отклонениями.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выделения и изучения свойств БФИ из зерна пшеницы была использована 3-х стадийная очистка, включавшая осаждение белка сульфатом аммония (30–70% насыщения) из водного экстракта, ионообменную и гель-хроматографию. В ходе очистки собирали фракции с антиамилазной активностью. Степень чистоты целевого белка на каждом этапе контролировали с помощью электрофореза в присутствии ДДС-Na. На электрофореграмме (рис. 1) видно, что молекулярный вес белка составлял 21 кД. По данным ИЭФ изоэлектрическая точка (pI) ингибитора находилась в нейтральной области значений pH и соответствовала значению 7.2 (рис. 2).

Важной характеристикой белка является наличие или отсутствие углеводного остатка. Присутствие этого остатка в молекуле придает ряд свойств белку, в том числе, повышенную устойчивость к протеолизу

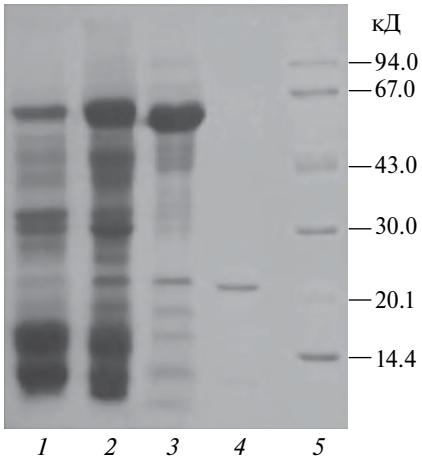


**Рис. 1.** Гель-электрофорез в присутствии ДДС-Na белков из экстракта из зерна пшеницы (*1*), осаждаемых $(NH_4)_2SO_4$ 30–70% насыщения (*2*), после хроматографии на DEAE-Sephacel (*3*), аффинной хроматографии на α-амилазе-сефарозе (*4*) и маркеров молекулярной массы (*5*): фосфорилаза b – 94.0, альбумин – 67.0, овальбумин – 43.0, карбоангидраза – 30.0, ингибитор трипсина – 20.1 и α-лактальбумин – 14.4 кДа.

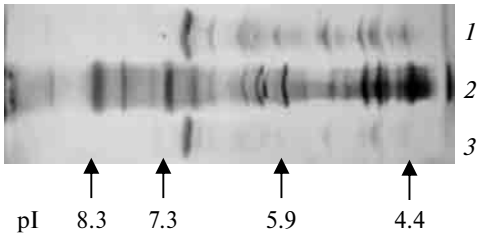


**Рис. 2.** Изоэлектрофокусирование в ПААГ белков экстракта из зерна пшеницы после нагревания в течение 15 мин при 80°C (*1*), очищенного БФИ (*3*) и маркеров изоэлектрических точек (*2*): миоглобин кита – 8.3, миоглобин лошади – 7.3, кональбумин – 5.9, ферритин – 4.4.

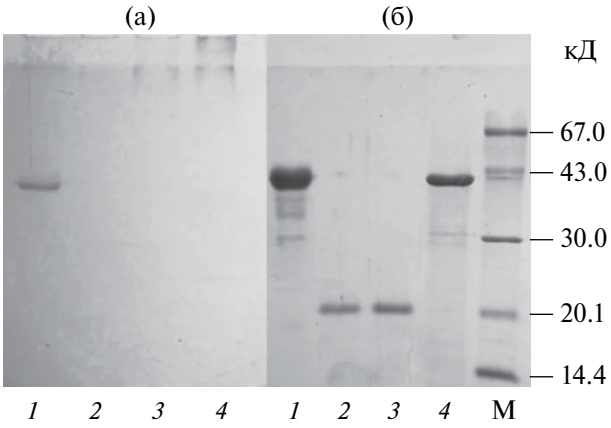


**Рис. 3.** Окрашивание гликопротеинов (а) и белка (б) на ПААГ после электрофореза в присутствии ДДС-Na пероксидазы хрена (*1*, положительного контроля), ингибитора трипсина из сои (*2*, отрицательного контроля), очищенного БФИ из пшеницы (*3*), α-амилазы пшеницы (*4*) и маркеров

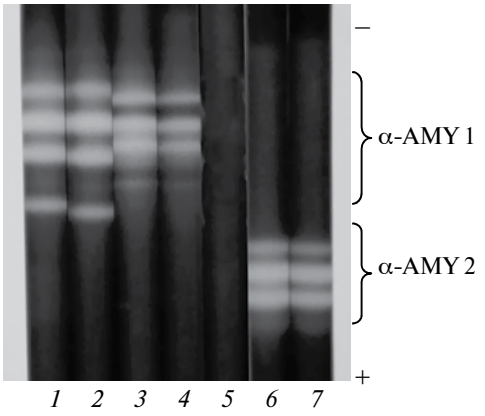


**Рис. 4.** Действие 0, 10, 20, 30 и 50 мкг/мл очищенного БФИ на AMY1 (*1–5*) и 0 и 50 мкг/мл этого БФИ на 30 мкг/мл AMY2 (*6, 7*) из прорастающего зерна пшеницы после предварительной инкубации фермента с ингибитором в течение 30 мин.

и высокой температуре, а также способствует его направленному транспорту. В связи с этим представляло интерес выяснить, являлся ли выделенный ингибитор гликопротеином. Для этого проводили электрофорез в присутствии ДДС-Na по Лэммли с последующим окрашиванием ПААГ на гликопротеины и общий белок. Гликопротеины окрашивали с помощью специального набора реагентов, приведенного в разделе "Методика", а белки – красителем Кумасси бриллиантовым голубым. На электрофореграмме (рис. 3) видно, что БФИ, как и родственный ему соевый ингибитор трипсина, не содержал углеводного компонента. Следует отметить, что α-амилаза из зерна пшеницы также не давала положительной реакции на карбогидраты, хотя известно, что в молекуле ферментов ряда представителей злаковых содержится углеводный остаток [26].

Было изучено влияние очищенного ингибитора на две главные группы изоферментов пшеничной α-амилазы, AMY1 и AMY2. Изоферменты эндогенных α-амилаз разделяли ионообменной хроматографией. Результаты нативного гель-электрофореза показали, что изоферменты α-AMY2 элюировались с ионообменника 0.08 М ацетатным буфером, а α-AMY1–0.2 М. Оказалось, что ингибитор высоко специфичен и был способен подавлять активность изоформ с высокими pI (α-AMY1) и не действовал на изоформы группы α-AMY2 (рис. 4).

Он не проявлял активность по отношению к ряду α-амилаз микроорганизмов и млекопитающих, однако подавлял субтилизин А из *Bacillus licheniformis*. Данные по ингибированию активности этой бактериальной протеиназы представлены на рис. 5.

Полученные результаты указывали на близкое сходство физико-химических свойств и строгой избирательности действия на пшеничную α-амилазу выделенного белка-ингибитора с БФИ α-амилазы/субтилизина из ячменя (BASI) [27].

Изучали влияние pH среды и высокой температуры на активность и стабильность очищенного БФИ. 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 90 °C в течение кратковременной (10 мин) обработки (рис. 6).

Это свойство отличало его от относительно термолабильного и родственного белка BASI из ячменя [7], но было подобно высокой термоустойчивости ряда таких близких по свойствам белков-ингибиторов, как ингибитор 0.19 α-амилазы из зерна пшеницы и ингибитора трипсина Куница из папайи [28, 29].

Для проявления своей активности БФИ строго требовал присутствия в среде катионов $Ca^{2+}$. Удаление этих катионов приводило к потере способности белка ингибировать α-амилазу. Ионы кальция также поддерживали термостабильность ингибитора. Было обнаружено, что повышение их содержания от 0.05 до 20 мМ способствовало многократному росту стабильности БФИ при нагревании в течение 10 мин при 80 °C (рис. 7).

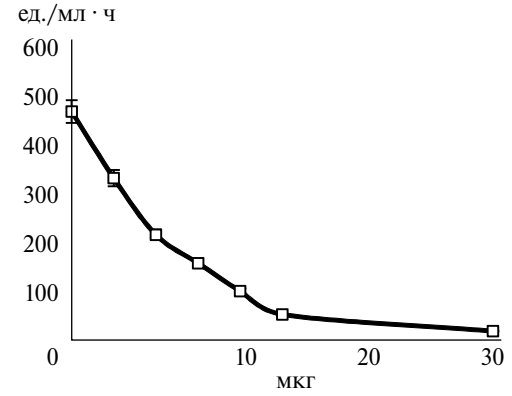


**Рис. 5.** Действие очищенного БФИ из пшеницы на субтилизин А.

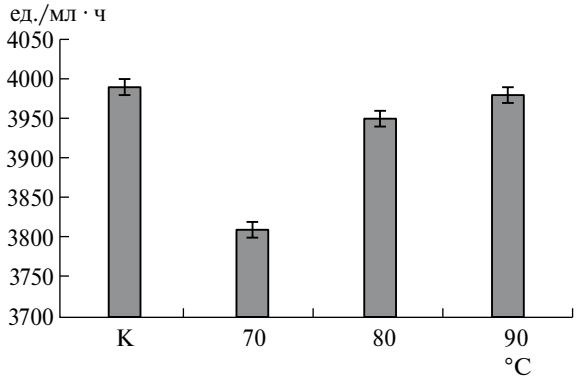


**Рис. 6.** Влияние высокой температуры ($^0$C) на активность очищенного БФИ из пшеницы на субтилизин А. К – контроль.

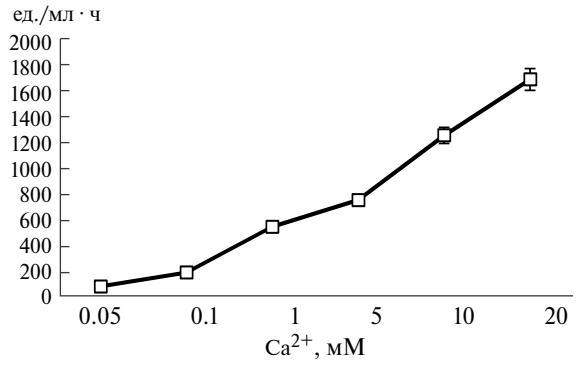


**Рис. 7.** Влияние содержания ионов кальция на термостабильность ингибитора

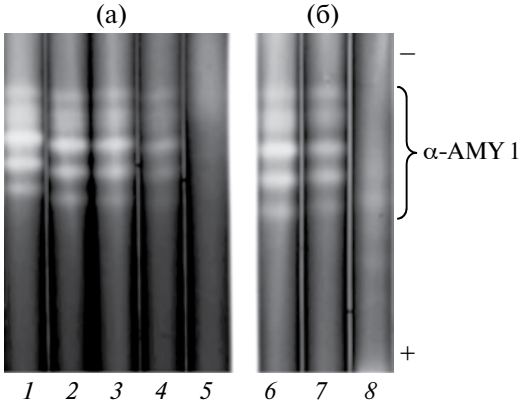


**Рис. 8.** Гель-электрофорез водных экстрактов шрота с низким ЧП после внесения 0, 10, 20, 40, 80 мкг грубого (а *1–5*) и 5, 10, 20 мкг очищенного (б, *6–8*) БФИ из пшеницы.

Одним из важных показателей хлебопекарных свойств пшеничной муки является альфа-амилазная активность (**АА**). Неблагоприятные условия созревания или хранения зерна (влажность и пониженная температура) могут провоцировать его прорастание, сопровождаемое крайне нежелательным повышением активности ферментов, главным образом, α-амилазы. Для оценки АА муки используется общепринятый метод Хагберга, при котором определяется ЧП, являющийся показателем вязкости. При этом чем выше АА муки, тем ниже вязкость суспензии и соответственно ниже значение ЧП. Для пшеничной муки ЧП, равное 250 с, считается оптимальным значением. При ЧП меньше 250 с получается некачественный хлеб, низкой формы и с липким и расплывающимся мякишем.

Изучено влияние очищенного и грубого (после нагревания в течение 15 мин при 80 °С) БФИ на α-амилазу шрота (помол целого зерна) с показателем ЧП 91 с, содержавшего гетерогенный спектр ферментов, накопленных при созревании. Предварительно перед добавлением ингибитора водный экстракт шрота нагревали в течение 15 мин при 80°С для удаления термолабильных β-амилазы и α-AMY2. Результаты, приведенные на рис. 8 показали, что добавление ингибитора к экстракту шрота с низким ЧП приводило к полному подавлению активности α-амилазы AMY1.

В предыдушей работе [30] было установлено, что БФИ синтезируется в созревающем зерне, начиная с молочно-восковой фазы, и его максимальное количество накапливается к полной спелости. При прорастании зерновок активность ингибитора быстро уменьшалась в результате действия ряда факторов – слабокислого pH, ведущего к инактивации ингибитора и способствующего диссоциации его комплекса с ферментом, и расщепления белка протеазами. Можно предположить, что БФИ участвует в контроле (сдерживании) избыточной α-амилазы в созревающем или зрелом зерне, образующейся при преждевременном прорастании (PHS) или активации LMA-формы фермента.

Таким образом, свойства (молекулярная масса, изоэлектрическая точка и высокая специфичность по отношению к изоферментам с высокими pI) выделенного из зерна пшеницы БФИ эндогенной α-амилазы и протеиназы субтилизина были значительно сходны ссвойствами “двуглавого” ингибитора BASI из ячменя. Особенностью выделенного белка-ингибитора оказалась его высокая термостабильность и строгая зависимость от катионов $Ca^{2+}$. Полученные данные свидетельствовали о способности БФИ эффективно ингибировать в зерне с низкими ЧП α-амилазу, образовавшуюся в период созревания.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки Республики Казахстан (проект № 5584/Гф4).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Silano V.* Enzymes and their Roles in Cereal Technology / Eds. J.E. Kruger, D. Lineback, C.E. Stauffer. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1987. P. 141–199.
2. *Svenson B., Fukuda K., Nielsen P., Bonsager B.* // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1696. № 2. P. 145–156.
3. *Мосолов В.В., Валуева Т.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 1. С. 233–240.
4. *Jerkovic A., Kriegel A.M., Bradner J.R., Attwell B.J., Roberts T.H., Willows R.D.* // Plant Physiol. 2010. V. 152. № 3. P. 1459–1470.
5. *Gorjanovich S.* // J. Inst. Brew. 2009. V. 115. № 4. P. 334–360.
6. *Яруллина Л.Г., Ахатова А.Р., Касимова Р.*И. // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 2. С. 205–217.
7. *Weselake P.J., MacGregor A.W., Hill R.D.* // Plant Physiol. 1983. V. 72. № 3. P. 809–812.
8. *Mundy J., Svendsen I.B., Hejgaard J.* // Carlsberg Res. Commun. 1983. V. 48. № 2. P. 81–90.
9. *Weselake P.J., MacGregor A.W., Hill R.D.* // Cereal Chem. 1985. V. 62. № 2. P. 120–123.
10. *Täufel A., Böhm H., Flamme W.* // J. Cereal Sci. 1997. V. 25. № 3. P. 267–273.
11. *Yamagata H., Kunimatsu K., Kamasaka H., Kuramoto T., Iwasaki T.* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998. V. 62. № 5. P. 978–985.
12. *Zawistowska U., Longstaff J., Friesen A.* // J. Food Biochem. 2007. V. 13. № 3. P. 215–239.
13. *Finnie C., Ostergaard O., Bak-Jensen S., Nielsen P.K., Bonsager B., Mori H., Nohr J., Juge N., Svensson B.* // J. Appl. Glycosci. 2003. V. 50. № 2. P. 277–282.

14. *Vallée F., Kadziola A., Bourne Y., Juy M., Rodenburg K., Svensson B., Haser R.* // Structure. 1998. V. 6. № 5. P. 649–659.

15. *Liu J.H., Hill R.D.* // Plant Mol. Biol. 1995. V. 29. № 5. P. 1087–1091.

16. *Hill R.D., Gubbels S.M., Boros L.* // Canadian J. Botany. 1995. V. 73. № 7. P. 82–90.

17. *Hader A., Rikiishi K., Nisar A., Noda K.* // Breeding Sci. 2003. V. 53. № 2. P. 119–124.

18. *Mohamed S.A., Al-Malki A.L., Kumosani T.A.* // Australian J. Basic Appl. Sci. 2009. V. 3. № 3. P. 1740–1748.

19. *Lunn G.D., Major B.J., Kettlewell P.S., Scott R.K.* // J. Cereal Sci. 2001. V. 33. № 3. P. 313–329.

20. *Mares D., Mrva K.* // J. Cereal. Sci. 2008. V. 47. № 1. P. 6–17.

21. *Остерман Л.А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот, 1985. М.: Наука. 535 с.

22. *Гильманов М.К., Фурсов О.В., Францев А.П.* Методы изучения ферментов растений. Алма-Ата: Наука, 1981. 91 с.

23. *Шульгин М.Н., Мосолов В.В.* // Биохимия. 1985. Т. 50. № 10. С. 1676–1684.

24. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 277. № 4. P. 680–683.

25. International Standard. ISO 3093–2009. Wheat, Rye and Flours, Durum Wheat and Durum Semolina. Determination of the Falling Number According to Hagberg-Perten. 2009. P. 13. www.iso.org

26. *Lecommandeur D., Sirou Y., Lauriere C.* // Arch. Biochem. Biophys. 1990. V. 278. № 1. P. 245–250.

27. *Nielsen P.K., Bonsager B.C., Fukuda K., Svensson B.* // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1696. № 2. P. 157–164.

28. *Oneda H., Lee S., Inoye K.* // J. Biochem. 2004. V. 135. № 3. P. 421–427.

29. *Azarkan M., Dibiani R., Goormaghtigh E., Raussens V., Baeyens-Volant D.* // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1764. № 6. P. 1063–1072.

30. *Тилеген Б., Бескемпирова Ж.Д., Далелханкызы А., Мамытова Н.С., Кузовлев В.А., Хакимжанов А.А.* // Известия НАН Республики Казахстан. 2016. № 1. С. 153–158.

# Title

**Author(s)**

*Affiliation*

*e-mail*

Received

**Abstract** –

*Keywords*:

Сдано в набор 00.0.2018 г. Подписано к печати 00.00.2018 г. Дата выхода в свет 00.00.2018 г. Формат 60 × 88 1/8
Цифровая печать Усл.печ.л. 00.0 Усл.кр.-отт. 1.6 тыс. Уч.-изд.л. 00.0 Бум.л. 7.0
Тираж 000 экз. Зак. 000 Цена свободная

Учредители: Российская академия наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН

Издатель: ФГУП «Издательство «Наука», 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
Отпечатано в ФГУП «Издательство «Наука» (Типография «Наука»), 121099 Москва, Шубинский пер., 6