

В.А. Кузовлев , Э.О. Абайлдаев* , А.А. Хакимжанов 

Институт молекулярной биологии и биохимии
им. М.А. Айтхожина КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы
*e-mail: abaildayevaset@gmail.com

АКТИВНОСТЬ И КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ В ЗЕРНЕ И ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ, ЯЧМЕНЯ И ОВСА

Целью работы явилось сравнительное исследование уровня активности и состава β -1,3-глюканазы, хитиназы, пероксидазы и ингибиторов протеаз в зерне и проростках пшеницы, ячменя и овса. Эти белки выполняют важную физиологическую роль, а также участвуют в защите растений от патогенов. Эксперименты по проращиванию, выделению и анализу белков проводились в одинаковых условиях, что способствовало объективной оценке защитного потенциала у исследуемых злаков. Наибольшей активностью и степенью гетерогенности при ИЭФ β -1,3-глюканазы отличались зерна и проростки ячменя, тогда как для овса характерен относительно низкий уровень фермента. Высокую активность хитиназы имели зерна и проростки овса. Активность и изоферментный состав ПО сильно варьировал у трех злаков, как в покоящихся зернах, так и в органах проростка. Наибольшим содержанием ингибиторов протеаз обладали зерна пшеницы, а наименьшим – овса. Изученные свойства ферментов β -1,3-глюканазы, хитиназы, пероксидазы и ингибиторов сериновых протеаз субтилизина и трипсина в норме в качестве конститутивных могут быть полезными при изучении их изменчивости и индукции новых изоформ при стрессовых воздействиях, в том числе, вызванных патогенами. Эти данные могут быть использованы и для оценки некоторых качественных характеристик зерна.

Ключевые слова: пшеница, ячмень, овес, β -1,3-глюканаза, хитиназа, пероксидаза, ингибиторы протеаз.

V.A. Kuzovlev, A.O. Abaildayev*, A.A. Khakimzhanov
Institute of Molecular Biology and Biochemistry
named after M.A. Aitkhozhin SK MES, Kazakhstan, Almaty
*e-mail: abaildayevaset@gmail.com

Activity and component composition of defense proteins in grain and seedlings of wheat, barley and oats

The aim of the work was a comparative study of the activity level and composition of β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and protease inhibitors in grains and seedlings of wheat, barley and oats. These proteins play an important physiological role and are also involved in plant defense against pathogens. Experiments on germination, isolation, and analysis of proteins were carried out under the same conditions, which contributed to an objective assessment of the defense potential of the studied cereals. Barley grains and seedlings were characterized by the highest activity and degree of heterogeneity at IEF β -1,3-glucanase, while oats were characterized by a relatively low level of the enzyme. Oat grains and seedlings had high chitinase activity. The activity and isozymic composition of POX varied greatly among the three cereals, both in dormant grains and in the organs of the seedling. Wheat grains had the highest content of protease inhibitors, whereas oats had the lowest content. The studied properties of the enzymes β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and serine protease inhibitors subtilisin and trypsin in norm as constitutive can be useful in studying their variability and induction of new isoforms under stressful conditions, including those induced by pathogens. These data can also be used to evaluate some quality characteristics of grain.

Key words: wheat, barley, oats, β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase, protease inhibitors.

В.А. Кузовлев, Ә.О. Абайлдаев*, А.А. Хакімжанов

ҚР БҒМ ҒК М.Ә. Айтқожин атындағы молекулалық биология
және биохимия институты, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: abaildayevaset@gmail.com

Бидай, арпа және сұлы дәндері мен өскіндеріндегі қорғаныш ақуыздарының белсенділігі мен компоненттік құрамы

Жұмыстың мақсаты бидай, арпа және сұлы дәндері мен өскіндеріндегі β -1,3-глюканазаның, хитиназаның, пероксидазаның және протеаза ингибиторлары белсенділігінің деңгейі мен құрамын салыстырмалы зерттеу болды. Бұл ақуыздар маңызды физиологиялық рөл атқарады, сондай-ақ өсімдіктерді қоздырғыштардан қорғауға қатысады. Өсіру, ақуыздарды оқшаулау және талдау бойынша тәжірибелер бірдей жағдайларда жүргізілді, бұл зерттелген дәнді дақылдардың қорғаныш әлеуетін объективті бағалауға ықпал етті. Арпа дәндері мен өскіндері β -1,3-глюканазаның ИЭФ бойынша ең жоғары белсенділік пен гетерогенділік дәрежесімен, ал сұлы ақуызының салыстырмалы түрде төмен деңгейімен сипатталды. Сұлы дәндері мен өскіндері хитиназаның жоғары белсенділігіне ие болды. Пероксидаза белсенділігі мен изоферменттік құрамы үш дәнді дақылда, қалыпты жатқан дәндерде де, өскіннің мүшелерінде де қатты өзгерді. Протеаз ингибиторларының ең көп мөлшері бидай дәндерінде, ал ең азы сұлыда болды. Конститутивтік қалыпты күйдегі ақуыздар β -1,3-глюканаза, хитиназа, пероксидаза және субтилизин мен трипсин сериндік ингибиторлардың зерттелген қасиеттері олардың өзгергіштігін, стресс жағдайында және қоздырғыштар тудыратын жаңа изоформалар индукцияланғанда пайдалы болуы мүмкін. Бұл деректерді астықтың кейбір сапалық сипаттамаларын бағалау үшін де пайдалануға болады.

Түйін сөздер: бидай, арпа, сұлы, β -1,3-глюканаза, хитиназа, пероксидаза, протеаза ингибиторлары.

Сокращения и обозначения

PR – связанные с патогенезом; ПО – пероксидаза; АФК – активные формы кислорода; БИ – белковый ингибитор; ДНС-3,5 – динитросалициловая кислота; ПАГ – полиакриламидный гель; ИЭФ – изоэлектро-фокусирование; pI – изоэлектрическая точка.

Введение

β -1,3-Глюканазы, хитиназы, пероксидазы и ингибиторы протеаз выполняют разнообразные физиологические функции в растительном организме. В настоящее время их изучению уделяется пристальное внимание в связи с участием в защите растений против различных патогенов, они являются важными членами семейства PR (pathogenesis-related) белков. Помимо функциональных особенностей, различные формы и типы этих ферментов и ингибиторов отличаются по своим физико-химическим свойствам, регуляции активности и органной локализации.

β -1,3-Глюканаза (КФ 3.2.1.39) расщепляет внутренние β -1,3-связи в β -D-глюканах и принимает участие в таких физиологических процессах как прорастание семян и развитие проростков, старение органов, образование пыльцы, формирование каллозы при поранении и др. [1,2]. Дру-

гой важной функцией фермента является участие в защите растений от различных патогенов – вирусов, бактерий и грибов. Активность этого фермента значительно изменяется при патогенной атаке и может увеличиваться многократно [3]. Выявлена строгая компартментация двух основных форм β -1,3-глюканазы – внутриклеточная (в вакуолях и цитозоле) и внеклеточная, сосредоточенная в межклеточном пространстве (в апопласте). Для обеих форм показаны отличительные свойства и особенности функционирования в норме и при патогенезе [4]. β -1,3-Глюканазы подавляют рост болезнетворных грибов, так как их субстраты – β -полиглюканы являются одними из основных структурных компонентов клеточных стенок патогенов. Другой полисахарид грибных стенок хитин разрушается хитиназами (КФ 3.2.1.14). В ряде исследований показан синергизм в действии ферментов, усиливающий лизисный эффект [5,6]. Кроме того, в результате гидролиза образуются олигосахаридные элиситоры, запускающие ответные защитные реакции растения [7]. Оба фермента входят в состав PR-белков, при этом β -1,3-глюканазы образуют группу PR-2, а хитиназы – 4 группы из 17 (PR-3, -4, -8, -11) [8].

В составе растительных β -1,3-глюканаз насчитывается несколько (до 10) изоформ, имеющих широкий диапазон изоэлектрических точек

в кислой, щелочной и нейтральной области рН (от 3,5 до 10), а молекулярная масса варьирует от 30 до 40 кДа. На основе структурных различий β -1,3-глюканазы растений подразделяются на три основных класса (I, II, III), отличающихся по ферментной и антифунгальной активности [9]. Столь высокий полиморфизм фермента обусловлен в первую очередь сложной организацией естественных высокополимерных субстратов – β -глюканов и их разнообразных олигосахаридных производных [10].

В связи с важной защитной ролью, изучению хитиназ также уделяется большое внимание, о чем свидетельствует ряд обзоров [11,12]. У растений хитиназа, как и многие гидролазы полимеров, представлена множеством молекулярных форм и кодируется мультисемейством генов. Дополнительные трудности при исследовании возникают из-за наличия конститутивных и индуцибельных форм фермента, а также тканевой специфичности их экспрессии. Значительный полиморфизм хитиназы в первую очередь связан со сложной организацией природных субстратов – хитина и его производных олигосахаридов, что предполагает различия в структуре ферментов, их субстратной специфичности, кинетических характеристиках и других свойствах [13,14]. По типу действия на субстрат среди хитиназ выделяют эндохитиназы и экзохитиназы. Первые расщепляет хитин внутри полимера случайным образом с образованием растворимых низкомолекулярных мультимеров N-ацетилглюкозамина, таких как хитотриоза, хитотетраоза и димер диацетилхитобиозида. Вторые способны отщеплять только концевой углеводный остаток полимера [15].

Было показано, что нет определенной корреляции в распределении хитиназ по видам растений, их органам и тканям, но было установлено, что только некоторые из них обладают противогрибковыми свойствами [16, 17]. По первичной структуре хитиназы делятся на 7 классов (I-VII). Эта классификация основана на наличии или отсутствии N-концевого сигнального домена и сходстве последовательностей каталитического домена. Хитиназный комплекс наиболее изучен в табаке, а среди злаков – у ржи. Хитиназа злаков содержит около 10 изоформ с широким диапазоном изоэлектрических точек в кислых, основных и нейтральных рН от 3,1 до 9,7. Это предполагает различие в оптимуме действия рН, что очень важно для проявления активности при патогенной атаке [18,19].

Классические пероксидазы растений (КФ 1.11.1.7), относящиеся к классу III являются гемсодержащими гликопротеинами, их молекулярный вес лежит в пределах 28-60 кДа [20]. Эти ферменты секретируются за пределы клеток, или транспортируются в вакуоли, окисляют различные соединения от малых молекул до макромолекул. Основная физиологическая функция в растениях – нейтрализация АФК, образующихся при различного рода стрессах абиотического и биотического характера. ПО относятся к PR-белкам и составляют группу 9 [8]. У злаковых ПО представлена множественными молекулярными формами и может насчитывать у разных видов около 10 и более изоформ. Ферменты III класса являются самыми многочисленными и локализованы преимущественно в апопласте, клеточной стенке и вакуоли. ПО классифицируют по типу их взаимодействия с клеточной стенкой – свободно-растворимые, слабосвязанные и ионно- или ковалентно связанные [21]. ПО также делят по электрофоретической подвижности на анионные, нейтральные и катионные. Физиологические функции ПО многообразны и каждая из них связана со специфической изоформой фермента, однако очень трудно определить конкретную функцию отдельной изоформы *in vivo* [22]. Индуцированные патогеном или элиситорами ПО окисляют широкий спектр фенолпропаноидов, монолигнинов, приводящий к укреплению клеточных стенок и формированию лигнина [23,24].

В зерне злаковых содержатся разнообразные белковые ингибиторы экзогенных ферментов, в том числе фитопатогенных микроорганизмов. Эти белки относятся к компонентам защитной системы растений, поскольку они подавляют активность дигестивных ферментов и препятствуют росту патогена [25,26]. Одними из главных ферментов у грибов и бактерий являются протеазы, переводящие нерастворимый протеин в легкоусвояемые вещества [27]. Внеклеточные протеазы грибов в основном серинового типа и представлены субтилизин и трипсин подобными белками [28,29]. В зерне ячменя установлено наличие БИ сериновых протеаз, содержание которых у разных сортов существенно варьировало [30]. Для пшеницы и овса таких сведений не имеется. В настоящее время ингибиторы протеаз (группа 6 PR-белков) классифицированы в несколько семейств на основе их структуры и свойств. Эти белки с небольшим молекулярным весом от 6 до 24 кДа и в основном сосредоточены в зрелом зерне [31].

Все выше описанные ферменты и ингибиторы выполняют определенные функции у растений в обычных нормальных условиях. Другой их физиологической ролью является участие в защите растений от патогенов, они являются важными членами PR-белков. Все три фермента, а также ингибиторы протеаз имеют сложный состав и представлены множественными формами, что обусловлено разнообразием их функций. Это обстоятельство серьезно препятствует изучению их свойств и регуляции активности в норме и при стрессовых условиях. Несмотря на очевидный успех в этой области, основная масса работ направлена на исследование поведения этих белков в условиях различного рода стрессов и при патогенезе. Однако для точной идентификации конститутивных и индуцибельных форм ферментов и ингибиторов, их активности важным представляется изучение белков в норме. Кроме того, в литературе не имеется четких данных об активности, изоферментном составе и содержании данных PR-белков в сравнительном плане у важных трех злаков. Проростки и зерна (при хранении) наиболее уязвимы к поражению микробными фитопатогенами, в связи с этим, исследование их исходного защитного потенциала имеет несомненное научное и прикладное значение.

Целью работы явилось сравнительное изучение уровня активности и компонентного состава β -1,3-глюканазы, хитиназы, пероксидазы и ингибиторов протеаз в зерне и проростках важных зерновых культур – пшеницы, ячменя и овса в норме. В работе использован наиболее эффективный метод изучения изоферментного состава – изоэлектрофокусирование в сочетании с измерением общего уровня активности. Эксперименты по выделению и анализу белков проводились в одинаковых условиях, что дает возможность объективной сравнительной оценки количественного и качественного содержания защитных белков. Полученные данные могут быть полезными при изучении этих ферментов и ингибиторов, их функционирования при стрессах, в том числе патогенной атаки.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили зерна, корни и стебли проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Шортанды 98), ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Туран 2) и овса (*Avena sativa* L., сорт Кулагер).

2.1. Приготовление растительного материала и белкового экстракта

Для получения проростков зерна стерилизовали 5% перекисью водорода в течение 15 мин, промывали дистиллированной водой и проращивали в темноте при 24°C в течение 5 дней. Ферменты экстрагировали 1 ч при 4°C 0,05 М Na-ацетатным буфером pH 5,0 в соотношении растительный материал/буфер 1:3. Гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин, супернатант использовали в качестве источника ферментов. Перед измерением активности β -1,3-глюканазы и хитиназы экстракты пропускали через колонку CentryPure («Serva», Германия) для удаления свободных сахаров. Для выделения ингибиторов протеаз 1 г покоящегося зерна размалывали в мельнице, добавляли 3 мл 0,05 М ацетатного буфера pH 5,5. Смесь настаивали 2 ч на холоде и центрифугировали при 3000 g 15 мин. Супернатант переводили в 10 mM фосфатный буфер pH 7,0 на колонке CentryPure.

2.2. Определение активности β -1,3-глюканазы

Активность β -1,3-глюканазы определяли колориметрическим методом [32]. Для этого 0,8 мл 0,05 М ацетатного буфера pH 5,2 и 0,1 мл образца фермента добавляли к 0,1 мл 0,5% ламинарина («Sigma-Aldrich», США), смесь инкубировали в течение 1 ч при 30°C. Реакцию останавливали добавлением 1 мл ДНС, смесь кипятили 10 мин, охлаждали и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли на спектрофотометре Ultrospec 7000 («GE Healthcare», Швеция) при 540 нм. Образовавшееся количество глюкозы определяли по калибровочной кривой. Активность фермента выражали в мг глюкозы в 1 мл⁻¹ за 1 ч⁻¹.

2.3. Определение активности хитиназы

Активность хитиназы определяли колориметрическим методом [32]. Для этого 0,8 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера pH 5,2 и 0,1 мл образца фермента добавляли к 0,1 мл 5% коллоидного хитина («Sigma», США), смесь инкубировали 5 ч при 37°C при перемешивании. Реакцию останавливали 1 мл ДНС, смесь кипятили 10 мин, охлаждали и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли при длине волны 540 нм. Образовавшееся количество N-ацетил-D-глюкозамина определяли по калибровочной кривой. Активность фермента выражали в мг N-ацетил-D-глюкозамина на 1 мл⁻¹ за 1 ч⁻¹.

2.4. Определение активности пероксидазы

Активность ПО определяли спектрофотометрическим методом с некоторой модификаци-

ей [33]. Реакционная смесь в кварцевой кювете на 2 мл содержала 10 мкл экстракта фермента, 1 мл 0,05 М ацетатного буфера pH 5,5, 0,5 мл 0,5% О-фенилендиамина («Sigma», США). Реакцию инициировали добавлением 0,5 мл 15 мМ H_2O_2 . Каждые 10 сек измеряли увеличение поглощения при 420 нм в течение двухминутного периода по сравнению с холостым образцом. Количество фермента, необходимое для образования 2,3-диаминофеназина, принимали за одну единицу активности и выражали как ед./мл⁻¹ в мин⁻¹.

2.5. Изоэлектрофокусирование

Нативный ИЭФ проводили в пластине 6% полиакриламидного геля (ПАГ) размером 90×120×1 мм с 1% Servalyt pH 3-10 («Serva», Германия) при 500 V в течение 5 ч в камере для электрофореза Multiphor II («GE Healthcare», Швеция).

2.5.1. Выявление β -1,3-глюканазы в геле

После ИЭФ пластину ПАГ помещали в 0,1 М раствор ацетатного буфера, pH 5,0, на 10 мин. Затем гель переносили в 1% раствор ламинарина в том же буфере на 30-40 мин (в зависимости от активности фермента) и инкубировали при 40°C. Гель дважды промывали дистиллированной водой, переносили в 7% уксусную кислоту на 10 мин и помещали в окрашивающий раствор 0,15% 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид («Sigma-Aldrich», США) в 1 М NaOH. Окрашивание проводили нагреванием в водяной бане до появления красноватых зон активности β -1,3-глюканазы (от 3 до 10 мин) [34]. В качестве маркеров pI использовали набор белков («Sigma-Aldrich», США): 9.3 – трипсиноген, 8.8, 8.6, 8.2 – лектин, 6.8, 7.2 – миоглобин, 6.6, 5.9 – карбоангидраза, 5.1 – β -лактоглобулин, 4.6 – ингибитор трипсина, 3.6 – амилоглюкозидаза.

2.5.2. Выявление хитиназы в геле

Активность хитиназы выявляли с помощью гелевой реплики с заподимеризованным субстратом 0,02% гликоль-хитина («Sigma», США) [35]. После ИЭФ разделяющий ПАГ и реплику помещали на 15 мин в 0,05 М ацетатный буфер, pH 5,0. Два геля плотно прижимали друг к другу и инкубировали в виде сэндвича 2 ч при 40°C. Затем гель-реплику переносили в 0,5 М трис-HCl буфер pH 8,9 с 0,01% флуоресцентным бриджтеном 28 («Sigma», США) и выдерживали 10 мин. Гель оставляли на ночь в воде при +4°C. Зоны активности визуализировали в УФ-свете (365 нм) с помощью гельдока Quantum ST5 Gel Doc System («Vilber Lourmat», Франция).

2.5.3. Выявление пероксидазы в геле

После ИЭФ гель вымачивали 10 мин в 0,05 М ацетатном буфере pH 5,0, инкубировали 20 мин в буфере с 0,15% бензидином и 15 мМ H_2O_2 до появления синих полос, затем фиксировали в 7% уксусной кислоте [36].

2.6. Определение активности ингибиторов протеаз

Предварительно была подобрана концентрация бактериального субтилизина и бычьего трипсина («Sigma-Aldrich», США) для определения их активности – 2 мкг/мл. Реакционная смесь состояла из 0,1 мл фермента (из расчета 20 мкг/мл) + 0,1 мл (0,5 М фосфатного буфера pH 7,8) + 0,2 мл H_2O + 0,1 мл 20 мМ $CaCl_2$ + 0,1 мл экстракта (из расчета 0,2 или 0,5 мг белка/мл) + 0,5 мл 1% азоказеина («Sigma», США). Смесь инкубировали 1 ч при 30°C, после чего реакцию останавливали 1,0 мл 10% трихлоруксусной кислоты. Образцы выдерживали на холоде 20 мин и центрифугировали 15 мин при 3000 g. Оптическую плотность фильтрата измеряли при 340 нм. За единицу активности принимали разницу оптической плотности ($OP_{\text{контр}} - OP_{\text{опыт}}$) в 1 мл за 1 ч (ед. активности г/мл ч.). Контролем служили значения активности субтилизина (9,40 ед. активности/мл ч) и трипсина (4,49 ед. активности/мл ч).

Эксперименты и измерения ферментной активности проводили в трех повторностях. Данные представлены в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений.

3. Результаты и их обсуждение

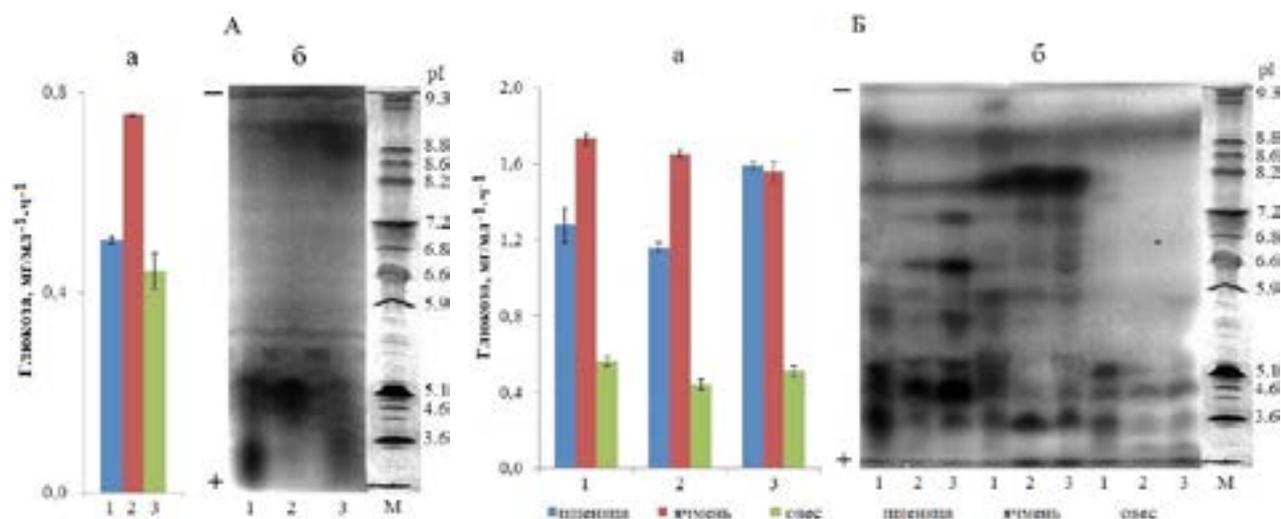
Активность и изоферментный состав β -1,3-глюканазы в зерне и проростках

Изучена активность β -1,3-глюканазы покоящегося зерна и различных органов 5-ти суток проростков пшеницы, ячменя и овса. Покоящиеся зерна пшеницы и овса содержали примерно одинаковые уровни активности фермента. В зерне ячменя активность фермента была немного выше (рисунок 1 – А, а). Значительное возрастание активности β -1,3-глюканазы наблюдалось при прорастании. Самой высокой активностью β -1,3-глюканазы характеризовались проростки ячменя, в особенности прорастающие зерна и ростки. Наименьшая активность фермента содержалась в проростках овса – почти втрое меньше по сравнению с ячменем. В проростках пшеницы максимальное содержание β -1,3-глюканазы приходилось на корни, приближаясь к активности фермента из ячменя. Не-

сколько меньшую активность β -1,3-глюканазы показали прорастающие зерна и ростки, тем не менее, их содержание в этих органах вдвое превышало фермент из проростков овса. Проростки овса обладали наименьшим количеством β -1,3-глюканазы и не отличались от активности фермента покоящегося зерна (рисунок 1 – Б, а).

При разделении β -1,3-глюканазы трех злаков методом ИЭФ наибольшая активность и гетерогенность состава была выявлена во всех органах проростка ячменя – в прорастающем зерне, ростке и корне. Относительный максимум фермента сосредоточен и в покоящемся зерне этого злака (рисунок 1 – А, б). В проростках овса значительная активность β -1,3-глюканазы также проявлялась в зерне, однако намного меньше по сравнению с ячменем. У пшеницы наибольшее число изоферментов β -1,3-глюканазы имели корни. Спектр ИЭФ β -1,3-глюканазы из различ-

ных органов злаковых включал несколько групп активности фермента в кислой, нейтральной и щелочной области рН с рI 3.2-5.4, 5.8-6.8, 8.0-9.3. Для всех видов злаков характерна активность этого фермента в кислой области рН 3.2-5.4 и в щелочной – 8.0-9.3. У овса полностью отсутствовали изоферменты β -1,3-глюканазы со слабокислыми и нейтральными рI (5.8-6.8), тогда как для проростков пшеницы (особенно в корнях), напротив, характерны высокая гетерогенность и активность фермента этой области рН (рисунок 1 – Б, б). Следует отметить – у всех злаков и во всех органах содержались изоформы с рI 3.2, 3.6, 4.6, 5.2. В щелочной области β -1,3-глюканаза была наиболее обильна в зерне ячменя и включала 3-4 изофермента с рI 8.0-8.2, 8.9 и 9.3. Особо надо выделить чрезвычайно высокую активность изоформ с рI 8.0-8.2 во всех органах проростка ячменя.



А – покоящееся зерно: 1 – пшеница, 2 – ячмень, 3 – овес. Б- проростки: 1 – прорастающее зерно, 2 – ростки, 3 – корни. а – активность, б – ИЭФ фермента, м – маркеры рI.

Рисунок 1 – Активность и компонентный состав β -1,3-глюканазы в покоящемся зерне и органах проростка злаковых

Активность и изоферментный состав хитиназы в зерне и проростках

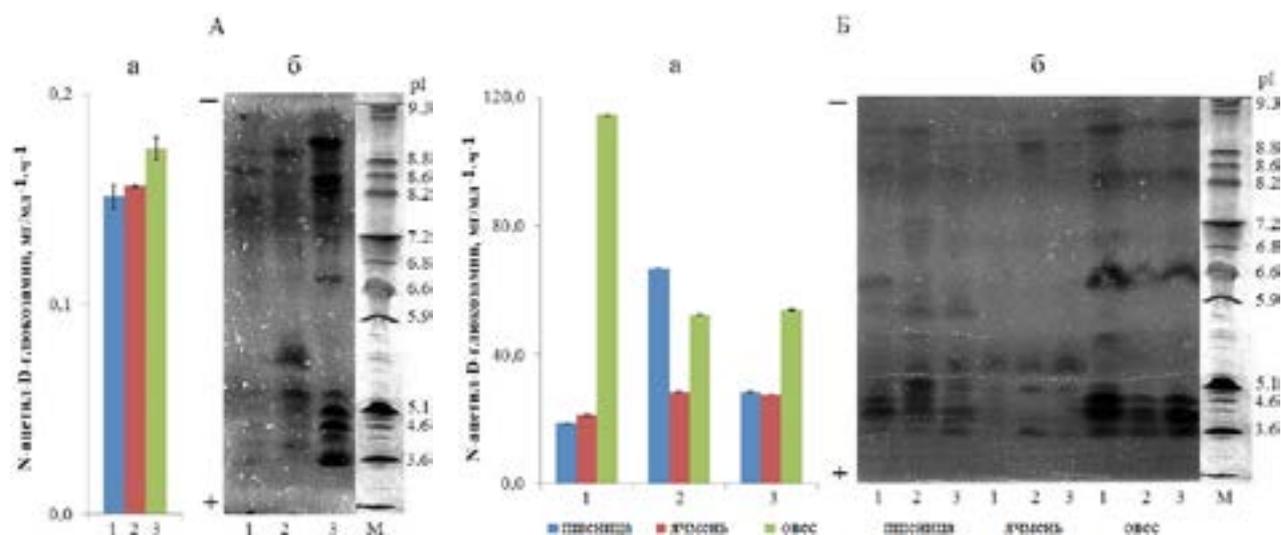
Изучение хитиназы показало существенные различия в активности фермента у покоящихся зерен между разными видами злаков. Чрезвычайно высокий уровень хитиназы наблюдался в зерне овса. Значительно меньше фермента содержали зерна пшеницы, а ячмень по этому показателю занимал промежуточное положение (рисунок 2 – А, а). При прораста-

нии активность хитиназы в зерне пшеницы и особенно овса увеличивалась, однако в ячмене уровень фермента заметно снижался. Очень высокой активностью хитиназы в целом обладали проростки овса, где фермент наиболее обилён в прорастающем зерне и был почти в 10 раз больше по сравнению с пшеницей и ячменем. В проростках пшеницы максимальным содержанием хитиназы отличались ростки, в которых активность фермента была 2-3 раза

выше, чем в корнях и прорастающем зерне. Сравнительно низкую активность хитиназы имели проростки ячменя с наименьшим содержанием фермента в прорастающем зерне (рисунок 2 – Б, а). Из представленных данных отчетливо виден значительный контраст между количеством фермента в покоящихся и прорастающих зернах у трех злаков.

ИЭФ хитиназ показало наибольшую гетерогенность фермента в покоящихся зернах, а также во всех частях проростков овса – в прорастающем зерне, ростках и корнях. Максимальная активность фермента присутствовала в зерне этого злака и она была намного больше по сравнению с пшеницей и ячменем (рисунок 2 – А, б). Однако в ростках пшеницы гетерогенность и активность хитиназы были тоже достаточно высоки. В составе хитиназы из различных органов злаковых были выявлены не-

сколько групп активности фермента, локализованных по всему ИЭФ спектру с рI 3.6-5.4, 5.8-6.8 и 8.0-9.3. Для всех видов и во всех органах обнаружены компоненты хитиназы с рI 3.6-4.5, а также с рI 5.2 (кроме овса). Следует отметить, что активность компонентов этого фермента в слабнокислой и нейтральной области спектра (рI 5.8-6.8) была слабо выражена во всех органах проростков ячменя. В щелочной области рН выше 8.0 хитиназа была представлена несколькими компонентами, однако у пшеницы отсутствовали ферменты в районе рI 8.9-9.3. Чрезвычайно высокую активность имели кислые формы хитиназы у проростков овса, а также один нейтральный компонент в зерне с рI около 6.5 (рисунок 2 – Б, б). Наименее выраженными по активности и числу компонентов оказались хитиназы прорастающего зерна ячменя и пшеницы.



А – покоящееся зерно: 1 – пшеница, 2 – ячмень, 3 – овес. Б- проростки: 1 – прорастающее зерно, 2 – ростки, 3 – корни.

А – активность, б – ИЭФ фермента, м – маркеры рI.

Рисунок 2 – Активность и компонентный состав хитиназы в покоящемся зерне и органах проростка злаковых

Активность и изоферментный состав пероксидазы в зерне и проростках

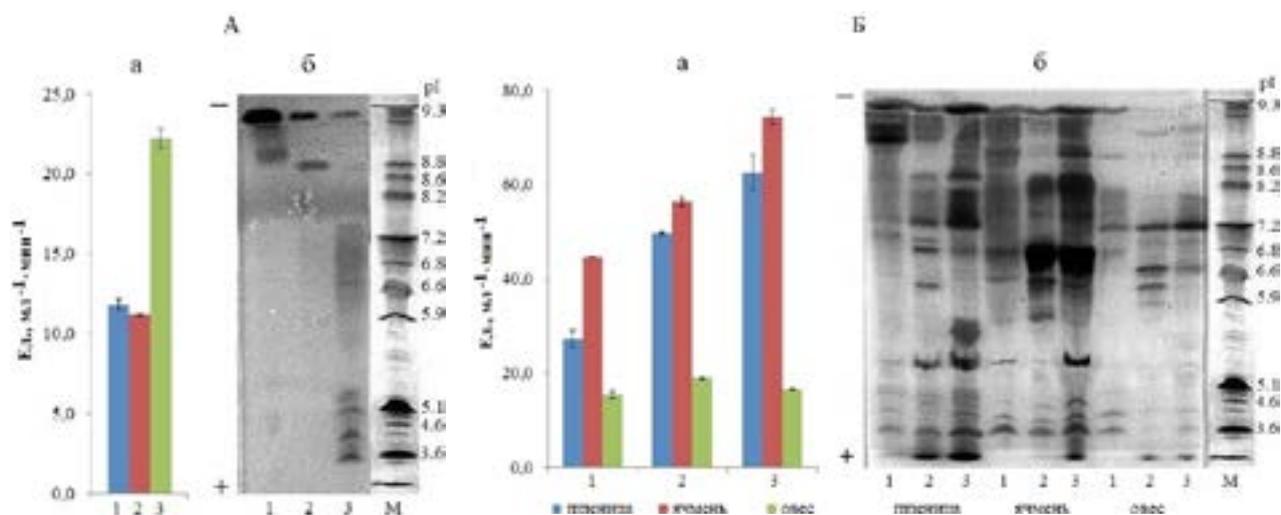
Изучение активности пероксидазы покоящихся зерен не выявило явных различий между тремя злаками. В зерне всех видов уровень фермента был низким. Однако при прорастании фермент претерпевал значительные изменения. Наибольшим содержанием ПО отличались проростки ячменя, где ферментом были особенно богаты корни и ростки. В пшеничных пророст-

ках максимум ПО, как и у ячменя, обнаруживался в корнях и заметно меньше в прорастающем зерне и ростках. Самым низким содержанием фермента характеризовались проростки овса, в особенности прорастающее зерно этого злака (рисунок 3 – А, а и Б, а)

ИЭФ пероксидаз показало низкую гетерогенность спектра фермента в покоящихся зернах пшеницы и ячменя – по 2 зоны активности в щелочной области спектра. В зерне овса до-

полнительно присутствовали 4 изофермента в кислом районе рН (рI 3.6-5.4), а также слабо выявлялась группа изоферментов нейтральной области спектра (рисунок 3 – А, б). В проростках наибольшая активность фермента была обнаружена во всех органах – прорастающем зерне, ростке и корне у пшеницы и ячменя. В отличие от этих видов, спектр ПО проростков овса оказался намного беднее и в основном был представлен нейтральными формами в районе рН 5.9-7.0 (корни и ростки), а также двумя изоферментами в зерне с рI 3.6 и 4.1. и слабо про-

являлась в кислой и щелочной области спектра. В проростках ячменя и пшеницы высокой активностью этого фермента отличались ростки и корни. Следует особо отметить присутствие в составе ПО ячменя двух сильно выраженных (мажорных) изоферментов с рI 7.2 и 8.2 (корни, ростки) (рисунок 3 – Б, б). В отличие от щелочных и нейтральных, кислые изоформы у трех злаков имели большое сходство по своему составу и значениям рI. В целом, изоферменты ПО распределялись в спектре ИЭФ в очень широком диапазоне рН от 3.0 до 9.3.



А – покоящееся зерно: 1 – пшеница, 2 – ячмень, 3 – овес. Б – проростки:

1 – прорастающее зерно, 2 – ростки, 3 – корни.

А – активность, б – ИЭФ фермента, м – маркеры рI.

Рисунок 3 – Активность и компонентный состав пероксидазы в покоящемся зерне и органах проростка злаковых

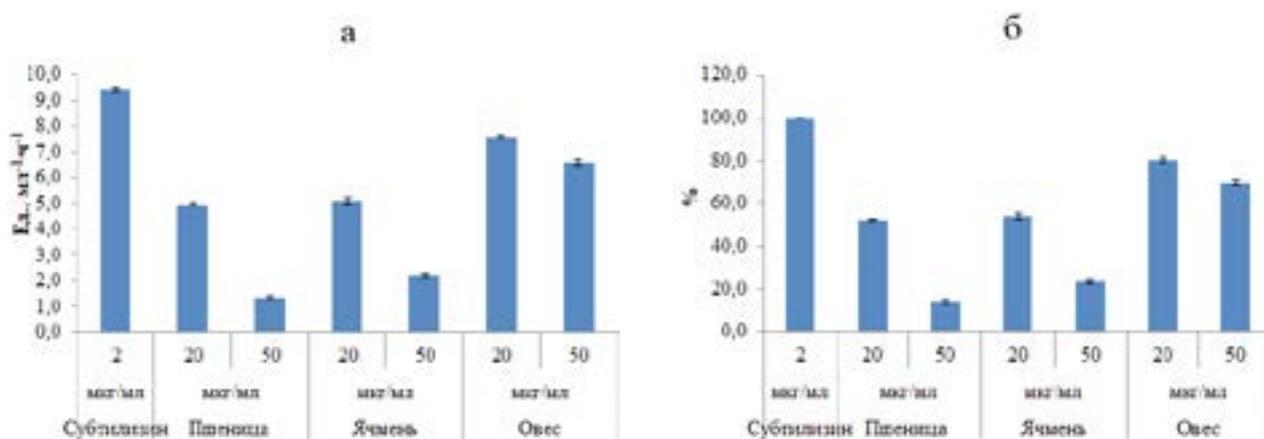
Активность ингибиторов протеаз в зерне

Изучение ингибиторов протеаз злаковых показало, что наибольшей антисубтилизиновой и антитрипсиновой активностью обладали зерна пшеницы, а наименьшей – овса. Зерновой экстракт пшеницы при концентрации 20 и 50 мкг/мл белка подавлял активность субтилизина на 47 и 86% и трипсина – на 48 и 84% соответственно. Намного меньшую антипротеазную активность имели зерна овса, экстракты из которых подавляли субтилизин лишь на 19 и 30%, а трипсин – на 30 и 66%. Ингибиторная активность зерна ячменя против субтилизина и трипсина при концентрации белка экстракта 20 мкг/мл очень близка по своим значениям к пшенице, однако при большей концентрации (50 мкг/мл) ее уровень был заметно ниже (рисунки 4 и 5).

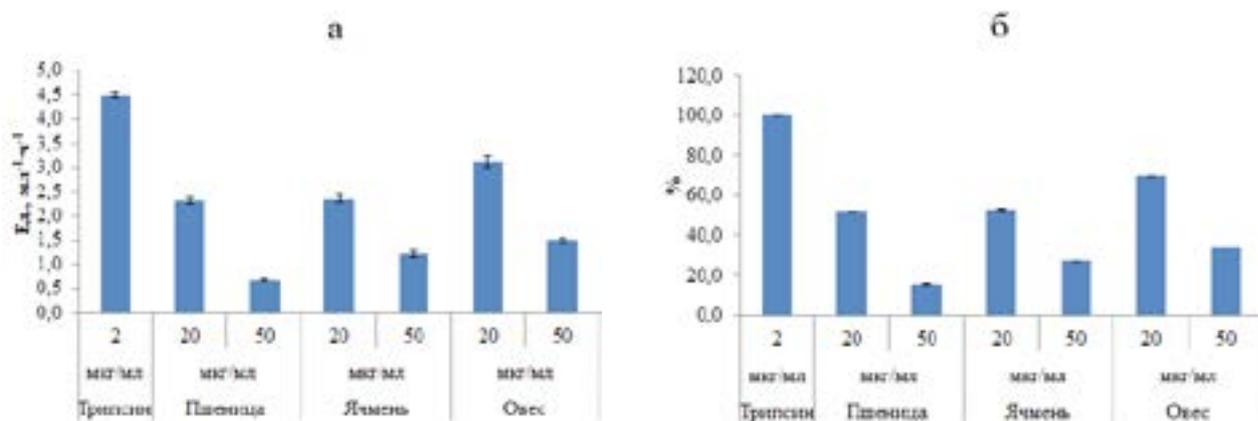
Таким образом, в сравнительном плане изучены уровни активности и компонентные составы ферментов в зерне и проростках в норме у трех важных зерновых культур – пшеницы, ячменя и овса. Для этого все эксперименты по проращиванию, получению экстрактов и анализу ферментов производились в идентичных условиях. В результате были установлены существенные различия в активности и компонентном составе ферментов у трех видов злаков. Наибольшим содержанием β -1,3-глюканазы отличались зерна и проростки ячменя, высокой активностью и гетерогенностью характеризовались также корни 5-дневных проростков пшеницы. В сравнении с этими видами овес имел низкий уровень фермента. Обращает внимание факт наличия мажорных изофермен-

тов у ячменя как кислых, так и нейтральных и щелочных, напротив, у овса преобладали кислые изоформы. Злаковые культуры существенно отличаются по содержанию β -глюкана в зерне, его физико-химическим свойствам и растворимости. Так, например, у овса преобладает растворимый β -глюкан, тогда как у ячменя он в основном не растворимый [37]. Получен-

ные нами данные показали большие различия в активности и изоферментном составе β -1,3-глюканазы ячменя и овса. В связи с этим, можно предположить, что индивидуальные изоформы β -1,3-глюканазы могут выступать в качестве маркеров количественного и качественного содержания β -глюкана у различных видов и сортов зерновых культур.



а и б – активность фермента, выраженная в единицах и процентах.
Рисунок 4 – Влияние экстрактов зерна на активность субтилизина



а и б – активность фермента, выраженная в единицах и процентах.
Рисунок 5 – Влияние экстрактов зерна на активность трипсина

Отличительной особенностью хитиназы является отсутствие субстрата в растениях. В настоящее время имеются лишь косвенные сведения об участии данного фермента в физиологии самого растения. Основное назначение этого фермента, по-видимому, заключается в защите от хитин-содержащих фитопатогенов, в частности грибов. В нашем исследовании мы показали

уникальные свойства зерна и проростков овса, заключающиеся в очень высоком содержании хитиназы по сравнению с такими злаками, как пшеница и ячмень.

Активность и изоферментный состав пероксидазы также сильно варьировал у трех злаков, как в покоящихся зернах, так и в органах проростков. Фермент был значительно активнее в

проростках ячменя и пшеницы по сравнению с овсом. В ряде исследований была установлена роль анионной ПО в защитных функциях растений [38]. В нашей работе мы показали наличие этой изоформы в норме в корнях и ростках и отсутствие в зерне у всех трех злаков. Имеются также работы, где показано связь катионной (щелочной) ПО с базальной устойчивостью к грибному поражению [39]. По нашим данным эти изоформы хорошо выражены в зерне и корнях проростков пшеницы и ячменя, но не овса.

Несмотря на наличие существенных отличий в ИЭФ спектре ферментов из трех злаковых культур, все же можно проследить и ряд сходств. Например, многие компоненты хитиназы и пероксидазы кислой области спектра имели одинаковые значения pI . Похожие по локализации компоненты имеются и в щелочном диапазоне ИЭФ спектра. Наиболее значительные отличия между злаками имелись в составе β -1,3-глюканазы проростков, особенно в соотношении активности кислых и щелочных групп фермента. В этой связи представляет интерес исследование внутривидовых и сортовых особенностей изоферментов β -1,3-глюканазы и хитиназы. В этом направлении уже проведены работы на пшенице и тритикале, где были найдены коррелятивные связи между отдельными изоформами и плоидностью [40,41].

Анализ ингибиторов протеаз выявил наибольшую их активность в зерне пшеницы, а наименьшую – у овса. Зерновой экстракт пшеницы при концентрации 20 и 50 мкг/мл белка подавлял активность субтилизина на 47 и 86% и трипсина – на 48 и 84% соответственно. Заметно меньшую антипротеазную активность имели зерна овса, экстракты из которых подавляли субтилизин лишь на 19 и 30%, а трипсин – на 30 и 66%. Ингибиторная активность в зерне ячменя была близка по своим значениям к пшенице.

Заключение

В работе исследованы активность и компонентный состав β -1,3-глюканазы, хитиназы, пероксидазы и ингибиторов протеаз зерна и проростков пшеницы, ячменя и овса. Для разделения изоферментов был использован метод нативного изоэлектрофокусирования.

Сравнительный анализ показал, что, несмотря на близкое родство исследуемых злаков, в уровне активности и спектрах ИЭФ ферментов имелись значительные видовые особенности. Наибольшей активностью и степенью гетерогенности при ИЭФ β -1,3-глюканазы отличались

зерна и проростки ячменя, тогда как для овса характерен относительно низкий уровень фермента. Выявлены уникальные свойства зерна и проростков овса, заключающиеся в очень высоком содержании хитиназы по сравнению с пшеницей и ячменем. Активность и изоферментный состав ПО сильно варьировал у трех злаков, как в покоящихся зернах, так и в органах проростков. Обе, анионные и катионные формы были значительно активнее в зерне и проростках ячменя и пшеницы по сравнению с овсом. Установлен и ряд сходств в изоферментах у трех злаковых культур. Например, многие компоненты хитиназы и ПО кислой области спектра имели одинаковые значения pI . Похожие по локализации компоненты имелись и в щелочном диапазоне ИЭФ спектра.

Наибольшим содержанием ингибиторов протеаз обладали зерна пшеницы, а наименьшим – овса. Зерновой экстракт пшеницы при концентрации 20 и 50 мкг/мл белка подавлял активность субтилизина на 47 и 86% и трипсина – на 48 и 84% соответственно. Заметно меньшую антипротеазную активность имели зерна овса, экстракты из которых подавляли субтилизин на 19 и 30%, а трипсин – на 30 и 66%. Ингибиторная активность в зерне ячменя была близка по своим значениям к пшенице.

Изученные параметры ферментов и ингибиторов в норме в качестве конститутивных могут быть полезными при изучении их изменчивости и индукции новых изоформ при стрессовых воздействиях, в том числе, вызванных патогенами. Эти данные могут быть использованы и для оценки качественных характеристик зерна, например на содержание β -глюкана, а также применения зерновых культур и их экстрактов в сохранности пищевых продуктов и, в частности, от поражения микробными патогенами.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках бюджетной программы 217 «Развитие науки» и подпрограммы 101 «Программно-целевое финансирование субъектов научной и/или научно-технической деятельности за счет средств республиканского бюджета», OR11465447, договор № 337 от 07 июля 2021 года.

Литература

- 1 Leubner-Metzger, Gerhard. "Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening." *Seed Science Research* 13, no. 1 (March 2003): 17–34.
- 2 Finnie, Christine, Kristian S. Bak-Jensen, Sabrina Laugesen, Peter Roepstorff, and Birte Svensson. "Differential appearance of isoforms and cultivar variation in protein temporal profiles revealed in the maturing barley grain proteome." *Plant Science* 170, no. 4 (April 2006): 808–21.
- 3 Gupta, Poonam, Indu Ravi, and Vinay Sharma. "Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*." *Journal of Plant Interactions* 8, no. 2 (June 2013): 155–61.
- 4 Balasubramanian, Vaiyapuri, Divya Vashisht, Jean Cletus, and Natarajan Sakthivel. "Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi." *Biotechnology Letters* 34, no. 11 (August 1, 2012): 1983–90.
- 5 Gorjanović, Stanislava. "A review: biological and technological functions of barley seed pathogenesis-related proteins (PRs)." *Journal of the Institute of Brewing* 115, no. 4 (November 2009): 334–360.
- 6 Ali, Sajad, Bashir Ahmad Ganai, Azra N Kamili, Ajaz Ali Bhat, Zahoor Ahmad Mir, Javaid Akhter Bhat, Anshika Tyagi, Sheikh Tajamul Islam, Muntazir Mushtaq, Prashant Yadav, Sandhya Rawat, Anita Grover. "Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance." *Microbiological Research* 212–213, (July 2018): 29–37.
- 7 Mishra, Ajay Kumar, Kamal Sharma, and Raj Shekhar Misra. "Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants." *Journal of Plant Interactions* 7, no. 2 (June 2012): 95–120.
- 8 Loon, L.C. van, M. Rep, and C.M.J. Pieterse. "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants." *Annual Review of Phytopathology* 44, no. 1 (September 1, 2006): 135–62.
- 9 Sharma, Vinay. "Pathogenesis related defence functions of plant chitinases and β -1,3-glucanases." *Vegetos- An International Journal of Plant Research* 26, no. 2s (May 1, 2013): 205-218.
- 10 Jamar, Catherine, Patrick du Jardin and Marie-Laure Fauconnier. "Cell wall polysaccharides hydrolysis of malting barley (*Hordeum vulgare* L.): a review." *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 15, no. 2 (June 30, 2011): 301-313.
- 11 Sharma, N., K.P. Sharma, R.K. Gaur, and V.K. Gupta. "Role of chitinase in plant defense." *Asian Journal of Biochemistry* 6, no. 1 (December 15, 2010): 29–37.
- 12 Kumar, Manish, Amandeep Brar, Monika Yadav, Aakash Chawade, V. Vivekanand, and Nidhi Pareek. "Chitinases—potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens." *Agriculture* 8, no. 7 (June 22, 2018): 1-12.
- 13 Kasprzewska, Anna. "Plant chitinases--regulation and function." *Cellular & molecular biology letters* 8, no.3 (January 1, 2003): 809-824.
- 14 Ohnuma, Takayuki, Tomoyuki Numata, Takuo Osawa, Hideko Inanaga, Yoko Okazaki, Shoko Shinya, Kaori Kondo, Tatsuya Fukuda, and Tamo Fukamizo. "Crystal structure and chitin oligosaccharide-binding mode of a 'loopful' family GH19 chitinase from rye, *secale cereale*, seeds." *The FEBS Journal* 279, no. 19 (September 3, 2012): 3639–3651.
- 15 Stoykov, Yuriy Mihaylov, Atanas Ivanov Pavlov, and Albert Ivanov Krastanov. "Chitinase biotechnology: production, purification, and application." *Engineering in Life Sciences* 15, no. 1 (December 3, 2014): 30–38.
- 16 Taira, Toki. "Structures and antifungal activity of plant chitinases." *Journal of Applied Glycoscience* 57, no. 3 (February 23, 2010): 167–176.
- 17 Oyeleye, Ayokunmi and Yahaya M. Normi. "Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications." *Bioscience Reports* 38, no. 4 (August 29, 2018): 1-21.
- 18 Grover, Anita. "Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles." *Critical Reviews in Plant Sciences* 31, no. 1 (January 1, 2012): 57–73.
- 19 Tanaka, Jun, Tamo Fukamizo, and Takayuki Ohnuma. "Enzymatic properties of a GH19 chitinase isolated from rice lacking a major loop structure involved in chitin binding." *Glycobiology* 27, no. 5 (March 15, 2017): 477–485.
- 20 Hiraga, Susumu, Katsutomo Sasaki, Hiroyuki Ito, Yuko Ohashi, and Hirokazu Matsui. "A large family of class III plant peroxidases." *Plant and Cell Physiology* 42, no. 5 (May 15, 2001): 462–468.
- 21 Maksimov, I. V., E. A. Cherepanova, G. F. Burkhanova, A. V. Sorokan', and O. I. Kuzmina. "Structural-functional features of plant isoperoxidases." *Biochemistry (Moscow)* 76, no. 6 (June 17, 2011): 609–621.
- 22 Kukavica, Biljana M., Sonja D. Veljović-Jovanović, Ljiljana Menckhoff, and Sabine Lüthje. "Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth." *Journal of Experimental Botany* 63, no. 12 (July 1, 2012): 4631–4645.
- 23 Almagro, L., L. V. Gómez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barceló, and M. A. Pedreño. "Class III peroxidases in plant defence reactions." *Journal of Experimental Botany* 60, no. 2 (December 10, 2008): 377–390.
- 24 Moural, Timothy W., Kevin M. Lewis, Carlo Barnaba, Fang Zhu, Nathan A Palmer, Gautam Sarath, Erin D. Scully, Jeffrey P. Jones, Scott E. Sattler, and ChulHee Kang. "Characterization of class III peroxidases from switchgrass." *Plant Physiology* 173, no. 1 (November 15, 2016): 417–433.
- 25 Mosolov, V. V., and T. A. Valueva. "Proteinase inhibitors and their function in plants: a review." *Applied Biochemistry and Microbiology* 41, no. 3 (May 1, 2005): 227–246.
- 26 Jashni, Mansoor Karimi, Rahim Mehrabi, Jérôme Collemare, Carl H. Mesarich, and Pierre J. G. M. de Wit. "The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions." *Frontiers in Plant Science* 6, no. 584 (August 3, 2015):1-7.

- 27 Eggert, Kai, Hashdrai M. Rawel, and Elke Pawelzik. "In vitro degradation of wheat gluten fractions by *Fusarium graminearum* proteases." *European Food Research and Technology* 233, no. 4 (August 27, 2011): 697–705.
- 28 Valueva, Tatiana A., Natalia N. Kudryavtseva, Alexis V. Sof'in, Tatiana A. Revina, Ekaterina L. Gvozdeva, and Elena V. Ileva. "Comparative analyses of exoproteinases produced by three phytopathogenic microorganisms." *Journal of Pathogens* 2011, no. 947218 (December 14, 2011): 1–9.
- 29 Chandrasekaran, Murugesan, Boopathi Thangavelu, Se Chul Chun, and Muthukrishnan Sathiyabama. "Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity." *Journal of General Plant Pathology* 82, no. 5 (August 2, 2016): 233–239.
- 30 Pekkarinen, Anja I., Colin Longstaff, and Berne L. Jones. "Kinetics of the inhibition of *Fusarium* serine proteinases by barley (*Hordeum vulgare* L.) inhibitors." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, no. 7 (March 7, 2007): 2736–2742.
- 31 Clemente, Marina, Mariana Corigliano, Sebastián Pariani, Edwin Sánchez-López, Valeria Sander, and Víctor Ramos-Duarte. "Plant serine protease inhibitors: biotechnology application in agriculture and molecular farming." *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 6 (March 17, 2019): 1–21.
- 32 Fink, Werner, Mathias Liefeland, and Kurt Mendgen. "Chitinases and β -1,3-glucanases in the apoplastic compartment of oat leaves (*Avena sativa* L.)." *Plant Physiology* 88, no. 2 (October 1, 1988): 270–275.
- 33 Fornera, Sara, and Peter Walde. "Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine." *Analytical Biochemistry* 407, no. 2 (December 15, 2010): 293–295.
- 34 Pan, Shen-Quan, Xiang-Sheng Ye, and Joseph Kuć. "Direct detection of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels." *Analytical Biochemistry* 182, no. 1 (October 1, 1989): 136–140.
- 35 Trudel, Jean, and Alain Asselin. "Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis." *Analytical Biochemistry* 178, no. 2 (May 1, 1989): 362–366.
- 36 Magro, Paolo. "Onion neck rot: isoperoxidase patterns in infected scales and the effect of *Botrytis allii* polygalacturonase on host peroxidase and phenolic compounds." *Rivista Di Patologia Vegetale* 20, no. 3 (September 1, 1984): 124–132.
- 37 Havrlentová, Michaela, Zuzana Petrušáková, Alena Burgárová, František Gago, Andrea Hlinková and Ernest Šturdík. "Cereal beta-glucans and their significance for the preparation of functional foods – a review." *Czech Journal of Food Sciences* 29, no. 3 (February 11, 2011): 1–14.
- 38 Maksimov, I. V., A. Sh. Valeev, E. A. Cherepanova, and G. F. Burkhanova. "Effect of chitooligosaccharides with different degrees of acetylation on the activity of wheat pathogen-inducible anionic peroxidase." *Applied Biochemistry and Microbiology* 50, no. 1 (December 27, 2013): 82–87.
- 39 Takashima, Yuya, Miho Suzuki, Futoshi Ishiguri, Kazuya Iizuka, Nobuo Yoshizawa, and Shinso Yokota. "Cationic peroxidase related to basal resistance of *Betula platyphylla* var. *japonica* plantlet No. 8 against canker-rot fungus *Inonotus obliquus* strain IO-U11." *Plant Biotechnology* 30, no. 2 (June 25, 2013): 199–205.
- 40 Moravčíková, Jana, Denisa Margetinyová, Zdenka Gálová, Iwona Žur, Zuzana Gregorová, Mária Zimová, Eva Boszorádová, and Ildikó Matusíková. "Beta-1,3-glucanase activities in wheat and relative species." *Nova Biotechnologica et Chimica* 15, no. 2 (December 1, 2016): 122–132.
- 41 Moravčíková, Jana, Nikoleta Ujvariová, Iwona Žur, Zdenka Gálová, Zuzana Gregorová, Mária Zimová, Eva Boszorádová, and Ildikó Matusíková. "Chitinase activities in wheat and its relative species." *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)* 63, no. 1 (May 24, 2017): 14–22.