

УДК 581.19:577.1

<sup>1</sup>Н.С. Мамытова\*, <sup>2</sup>О.В. Фурсов<sup>1</sup>Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан

\*e-mail: mamytovanur@gmail.com

**Действие сахаров на прорастание зерновок пшеницы и индукцию  $\alpha$ -амилазы**

Выявлена специфичность действия разных сахаров на прорастание семян пшеницы и индукцию  $\alpha$ -амилазы. Испытанные сахара различались по своей способности к снижению скорости прорастания и подавлению синтеза фермента. Так, сахароза, мальтоза и глюкоза отчетливо ингибировали активацию анодных изоферментов ( $\alpha$ -амилаза «созревания»), в то время как галактоза и раффиноза преимущественно подавляли катодные изоферменты ( $\alpha$ -амилаза «прорастания»). Манноза обладала наиболее выраженным ингибиторным эффектом и в равной степени подавляла все изоформы  $\alpha$ -амилазы.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* –  $\alpha$ -амилаза – изоферменты – сахара – ингибитор

Н.С. Мамытова, О.В. Фурсов

**Бидай дәнінің өсуіне және  $\alpha$ -амилазаның индукциясына қанттардың әсері**

Бидай дәндерінің өсуіне және  $\alpha$ -амилазасының индукциясына әртүрлі қанттардың арнайы әсер ететіні анықталды. Сынамаға алынған қанттар өзінің фермент синтезін азайту және өсу жылдамдығын төмендету қабілетімен ерекшеленді. Сахароза, мальтоза және глюкоза анодты изоферменттердің ( $\alpha$ -амилаза «пісіп-жетілу»), белсенділігін нақты төмендететіні анықталса, ал галактоза және раффиноза катодты изоферменттерді ( $\alpha$ -амилазы «өсіп-өну») ингибирледі. Манноза аса үлкен (бірегей) ингибиторлық қасиетке ие және барлық изоформаларды бірдей деңгейде басады.

**Түйін сөздер:** *Triticum aestivum* -  $\alpha$ -амилаза – изоферменттер – қанттар – ингибитор

N.S. Mamytova, O.V. Fursov

**Effects sugar on the germination of wheat and grains induction of  $\alpha$ -amylase**

Revealed the specificity of action of various sugars on seed germination of wheat and the induction of  $\alpha$ -amylase. Tested sugars differed in their ability to reduce the rate of germination and inhibition of enzyme synthesis. Thus, sucrose, maltose and glucose clearly inhibit activation anode isoenzymes ( $\alpha$ -amylase "maturation"), while galactose, raffinose and preferentially inhibit cathode isozymes ( $\alpha$ -amylase "sprouting"). Mannose has the most pronounced (unique) inhibitory properties and equally inhibits all isoforms.

**Keywords:** *Triticum aestivum* -  $\alpha$ -amylase - isozymes - sugar - inhibitor

Пшеница – одна из трех главных продовольственных хлебных культур. Качество зерна пшеницы зависит не только от количества и качества клейковинных белков, но и от состояния углеводно-амилазного комплекса зерна, которое определяется в основном активностью  $\alpha$ -амилазы (3.2.1.1. или 1,4-глюкан-4-глюкогидролаза). К настоящему времени установлено существование различных механизмов регуляции активности четырех форм  $\alpha$ -амилазы зерна пшеницы [1]. Это прежде всего наличие «дефектных» генов, вызывающих синтез  $\alpha$ -амилазы на поздних этапах созревания [2], гормональный статус зерновки [3], специфичные белковые ингибиторы фермента [4], факторы внешней среды и др. [5].

Сравнительно недавно было показано, что наряду с гормонами в качестве важных эндогенных регуляторов некоторых ферментов углеводного метаболизма, в том числе и амилаз, могут выступать простые сахара. На клетках зародышей риса и ячменя было установлено, что такие эндогенные сахара как глюкоза и сахароза оказывают репрессирующее действие на экспрессию гена  $\alpha$ -амилазы [6]. В наших предыдущих работах с использованием культуры клеток рисового зародышевого щитка мы четко показали избирательное подавление сахарами синтеза отдельных изоферментов  $\alpha$ -амилазы [7]. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о наличии по крайней мере двух путей сигнализации, участвующих в процессах запуска биосинтеза  $\alpha$ -амилазы в период прорастания семени – гормонального и сахар-метаболического. Однако остается неясным, универсален ли механизм регулирования активности фермента в ряду представителей семейства злаковых, или же его проявление ограничено.

В нашей работе исследовалось влияние различных моно- и дисахаридов как на собственно процесс прорастания, так и активацию главного фермента прорастания семени злаковых –  $\alpha$ -амилазы.

**Материалы и методы**

Зерновки сорта Казахстанская 10 проращивали на средах с добавлением различных сахаров в концентрации 150 мМ, в контрольном варианте проростки были получены на дистиллированной воде.

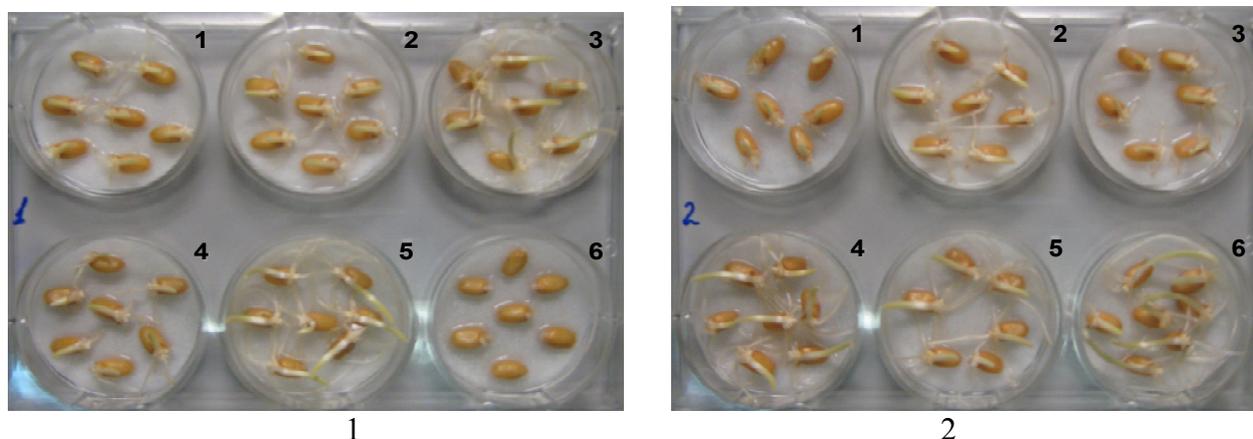
Экстракцию  $\alpha$ -амилазы из проросших зерен проводили 0,05 М ацетатным буфером pH 5,2 с 10 мМ  $\text{CaCl}_2$  в соотношении ткань/буфер - 1:3. Гомогенат настаивали 30 мин и центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 мин. Аналогично центрифугировали инкубационные среды. Все процедуры проводили при +4°C. Для удаления  $\beta$ -амилазы супернатанты прогревали 10 мин при 70°C, резко охлаждали и центрифугировали 10 мин при 8000 об./мин.

Амилазную активность определяли крахмал-йодным методом с использованием 0,02% крахмала в качестве субстрата и выражали в ед. активности на 1 мл за 1 ч [8]. Нативный электрофорез  $\alpha$ -амилазы проводили в столбиках 7,5% ПААГ согласно методу [8]. После электрофореза гели инкубировали в 1,5% растворе крахмала при +4°C в течение 1 ч, промывали холодной водой и окрашивали раствором 2%  $\text{J}_2$  в 5%  $\text{KJ}$ .

Эксперименты проводили в трех биологических и аналитических повторностях. На рисунках представлены результаты характерного опыта. [9].

### Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены фотографии 3-х суточных проростков пшеницы сорта Казахстанская 10. Семена проращивались на средах с добавлением 150 мМ различных сахаров, в контрольном варианте проростки были получены на дистиллированной воде без внесения углеводов. Из представленного фотоснимков видно, что испытанные сахара были в разной степени способны к подавлению прорастания. Наибольший ингибиторный эффект наблюдался в случае с маннозой (семена практически не прорастали), далее следовали галактоза и раффиноза. Эти же сахара в заметной степени подавляли процесс корнеобразования. Другие сахара: лактоза, фруктоза, рамноза и в особенности сахароспирт маннитол оказывали слабое ингибирующее действие на скорость прорастания.

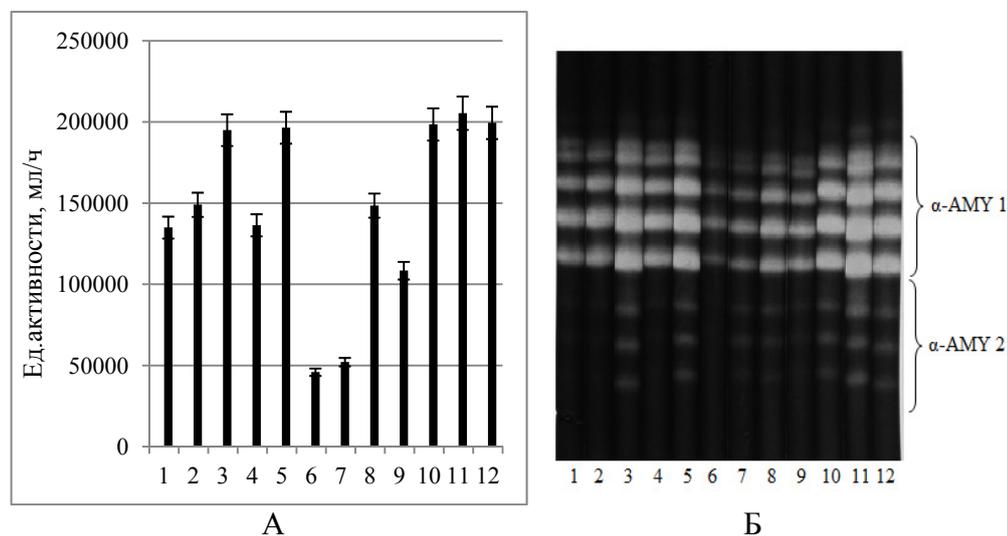


Плашка №1: 1- сахароза, 2- мальтоза, 3- лактоза, 4- глюкоза, 5- фруктоза, 6- манноза; плашка №2: 1- галактоза, 2- арабиноза, 3- раффиноза, 4- рамноза, 5- маннитол, 6- контроль (без сахара)

**Рисунок 1** – Влияние различных сахаров на прорастание зерновок пшеницы

Данные по прорастанию семян хорошо согласуются с уровнем  $\alpha$ -амилазной активности и гетерогенностью электрофоретического спектра (рисунки 2 А и Б). Хотелось бы обратить внимание на проявляющуюся специфичность действия разных сахаров на индукцию отдельных изоферментов  $\alpha$ -амилазы. Так, сахароза, мальтоза и глюкоза значительно подавляли активацию анодных изоферментов ( $\alpha$ -амилаза «созревания»), в то время галактоза и раффиноза преимущественно ингибировали катодные изоферменты ( $\alpha$ -амилаза «прорастания»). Среди испытанных сахаров манноза обладала наиболее выраженными ингибиторными свойствами и в равной степени подавляла все изоформы фермента.

В результате исследования выявлены сходства и отличия в действии разных сахаров на прорастание семян пшеницы и индукцию  $\alpha$ -амилазы. Сахароза, мальтоза и глюкоза существенно тормозили как сам процесс прорастания, так и ингибирование анодных изоферментов ( $\alpha$ -амилаза «созревания»), в то время как галактоза и раффиноза преимущественно подавляли катодные изоферменты ( $\alpha$ -амилаза «прорастания»). Манноза обладала наиболее выраженным ингибиторным эффектом и в равной степени подавляла все изоформы  $\alpha$ -амилазы.



1 - сахароза, 2- мальтоза, 3- лактоза, 4- глюкоза, 5- фруктоза, 6- манноза, 7- галактоза, 8- арабиноза, 9- раффиноза, 10- рамноза, 11- маннитол; 12 – контроль

**Рисунок 2** – Влияние различных сахаров на прорастание зерновок пшеницы  
А- активность и Б - изоэлектрофоретический спектр  $\alpha$  - амилазы

Выявленные особенности в действии сахаров на прорастание зерновок и активирование  $\alpha$ -амилазы, очевидно, объясняются рядом различий в свойствах, в том числе, в степени усвояемости и метаболизируемости клетками, а также их репрессорной активности на индукцию  $\alpha$ -амилазы.

#### Литература

1. Lunn J.D., Major B.J., Kettlewell P.S., Scott R.K.. Mechanisms leading to excess alpha-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum*, L) grain in the U.K. // J. Cereal Sci. 2001. V.33. P. 313-329.
2. Mrva K., Mares D.J. Regulation of high pI  $\alpha$ -amylase synthesis in wheat aleurone by a gene(s) located on chromosome 6B // Euphytica. 1999. V.109. P.17-23.
3. Mrva K., Wallwork M., Mares D.J.  $\alpha$ -Amylase and programmed cell death in aleurone of ripening wheat grains // J. Exp. Bot. 2006. V.57. №4. P.877-885.
4. Appleford N.E., Lenton J.R. Hormonal regulation of  $\alpha$ -amylase gene expression in germinating wheat (*Triticum Aestivum*) // Physiol. Plant. 1997. V.100. P.534-542.
5. Lovegrove A., Hooley.R. Gibberellin and abscisic acid signaling in aleurone // Trends Plant Sci. 2000. V.5. №3. P.102-110.
6. Svenson B., Fukuda K., Nielsen P., Bonsager B. Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V.1696. P.145-156.
7. Zawistowska U., Longstaff J., Friesen A. Purification and characterization of double-headed triticale iso-inhibitors of endogenous alpha-amylase and subtilisin // J. Food Biochem. 2007. V.13(3). P.215-239.
8. Guglielminetti L., Yamaguchi J., Perata P., Alpi A. Amylolytic activities in cereal seeds under aerobic and anaerobic condition // Plant Physiol. 1995. V.109. P.1069-1076.
9. Гильманов М.К., Фурсов О.В., Францев А.П. Методы очистки и изучения ферментов растений. - Алма-Ата: Наука. -1981. - 91с.
10. Крюков В.И. Статистические методы изучения изменчивости. – Орел: Орел-ГАУ. -2006. – 208с.