

ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ БЕЛКОВ СЕМЯН ПОДСОЛНЕЧНИКА

Балаян В.М., Погорлецкая В.Б.
Всесоюзный селекционно-генетический институт, СССР, 270036 Одесса,
Овидиопольская дорога 3.

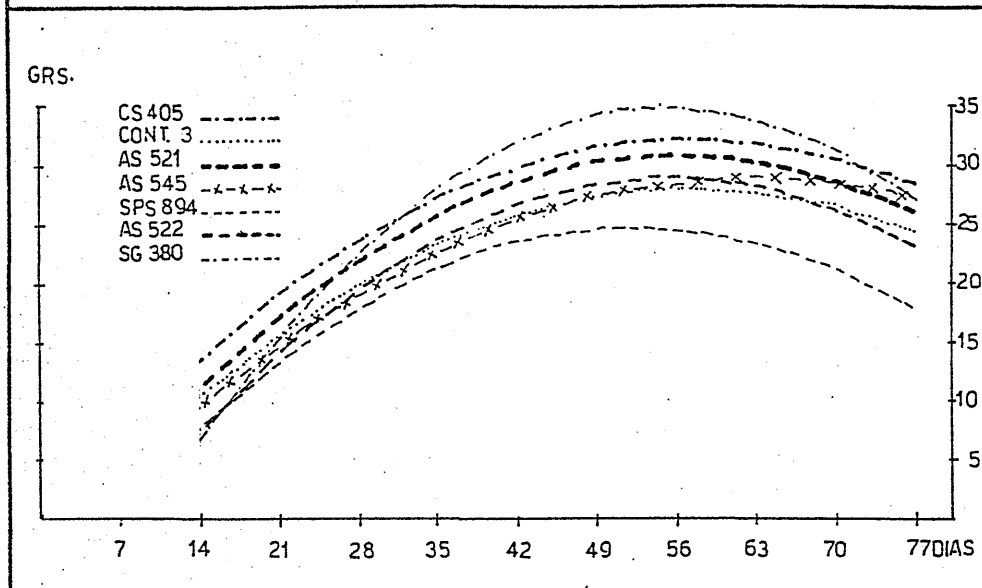
РЕЗЮМЕ

Исследования биохимических аспектов восприимчивости подсолнечника к серой гнили *Botrytis cinerea* Pers. показали, что одними из факторов защиты растений от патогена могут быть ингибиторы протеиназ. Было показано, что одна из фракций ингибиторов, выделенная при помощи аффинной хроматографии на трипсин-сефарозе 4В в большей степени подавляла активность протеиназ серой гнили, чем трипсин. Другая же была более активна по отношению к трипсину, чем ферментам патогена. В опытах на лабораторных крысах линии Вистар не было обнаружено достоверных различий в среднесуточных привесах животных и коэффициенту эффективности белка (КЭБ) при скармливании подсолнечного шрота с различным уровнем ингибиторов протеиназ. На биологическую ценность белка изучаемых форм подсолнечника не оказывали существенного влияния различия в его фракционном составе. На основании полученных результатов появляется возможность использовать в селекции подсолнечника на устойчивость к возбудителю серой гнили формы с повышенным содержанием ингибиторов протеиназ патогена, не снижая при этом биологическую ценность белков подсолнечного шрота.

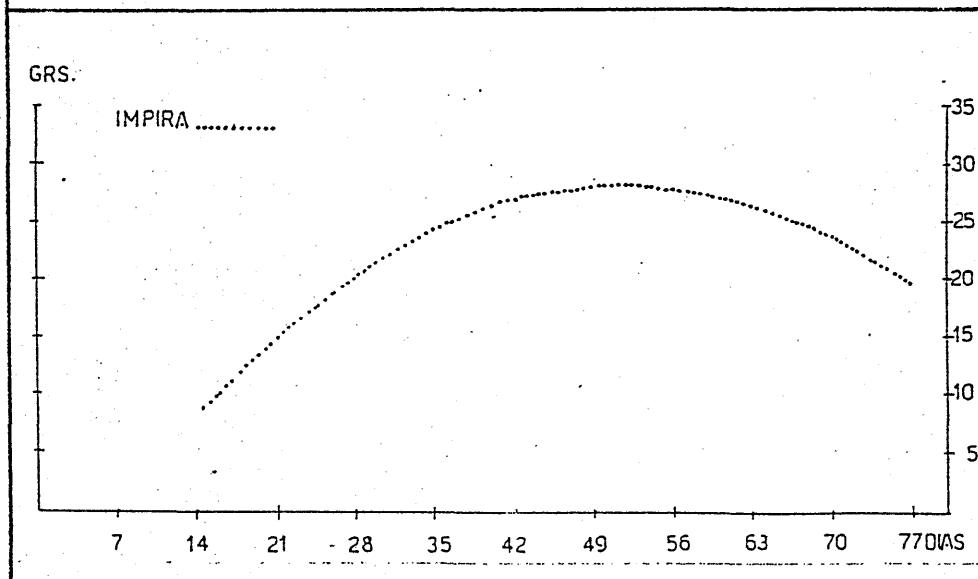
ВСТУПЛЕНИЕ

Среди биохимических факторов важную роль в восприимчивости растений к фитопатогенам могут играть ингибиторы протеиназ. Так в ряде работ было показано, что внеклеточные протеиназы микроорганизмов могут участвовать в гидролизе растительных тканей и создавать благоприятные условия для проникновения патогенов в растение (Keen et al., 1967). Кроме того, экзонептидазы фитопатогенов могут гидролизовать белки межклетников в растительных тканях (Lampert, 1963). Рядом исследователей на различных культурах было отмечено, что присутствующие в семенах растений ингибиторы протеиназ могут подавлять активность протеолитических ферментов грибных патогенов. В частности, ингибиторы протеиназ из фасоли при внесении их в питательную среду угнетали процесс прорастания спор и развитие мицелия грибов рода фузариум и ботритис (Бенкен с соавт., 1976). Отмечена корреляция между ингибиторной активностью в томатах после заражения патогеном и устойчивостью растений к фитофторозу (Feng, Block, 1976). Нами было показано, что в семенах подсолнечника присутствуют ингибиторы протеиназ серой гнили и трипсина. Они обнаружены в различных анатомических частях семян и уровень их активности изменяется в процессе онтогенеза растения. Исследовали ингибиторную активность в водо-солевой и щелочной фракциях белков подсолнечника. Отмечена корреляционная отрицательная связь между уровнем ингибиторов протеиназ патогена и восприимчивостью подсолнечника к серой гнили (Погорлецкая, 1985; Погорлецкая, Левицкий, 1985). Известно, что ингибиторы протеиназ могут играть отрицательную роль в переваримости растительных белков в желудочно-кишечном тракте животных. Скармливание им ингибиторов трипсина и хмоторипсина, особенно тех из них, которые устойчивы к протеолизу, приводит при

GRAFICA 7 - MGAB' (Y) VS. FECOS (X)



GRAFICA 8 - MGAB'(Y) VS. FECOS (X)



систематическом потреблении к гипертрофии поджелудочной железы (Birk, 1968). При совместном введении белка и комплексного ингибиторного препарата у крыс наблюдалось значительное снижение общей протеолитической активности в химусе тонкого кишечника и ухудшение всасывания аминокислот (Черников, 1975). Как показали исследования отрицательное влияние на рост животных, как правило, определяется уровнем ингибиторов протеиназ в рационе (Rackis, 1981). В связи с этим целью настоящих исследований было изучение некоторых свойств ингибиторов протеиназ серой гнили, а также связи между различным содержанием этих соединений в подсолнечном шроте и ростом лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали семена подсолнечника из коллекции Всесоюзного НИИ растениеводства (ВИР), а также сорта, созданные в нашем институте. Семена измельчали, обезжиривали гексаном и проводили солевую экстракцию ингибиторов протеиназ из подсолнечного шрота. Ингибиторную активность определяли по ранее описанной методике (Погорлецкая, Левицкий, 1985). Ингибиторную активность (ИА) выражали в ед/мл раствора, а удельную ингибиторную активность (УИА) — в ед/мг белка. Фракционирование белков подсолнечника проводили по Осборну в нашей модификации. 500 мг обезжиренной муки помещали в центрифужную пробирку, заливали 10 мл 5% раствора K_2SO_4 , перемешивали и проводили экстракцию в течение 20 мин. при комнатной температуре. После центрифугирования раствора при 3,5 тыс. об/мин в течение 15 мин. надосадочную жидкость через бумажный фильтр сливали в мерную колбу на 50 мл. Затем к осадку еще раз добавляли 10 мл 5% раствора K_2SO_4 и далее повторяли все в том же порядке. Для извлечения альбумин-глобулиновой фракции белков проводили 4 экстракции, а затем экстрагировали еще охлажденной водой. Глютелиновую фракцию белков извлекали 0,1 М раствором $NaOH$. Экстракцию и всю последовательность операций проводили также как и в случае с альбумин-глобулиновой фракцией. Содержание белка во фракциях определяли методом Кьельдаля.

Хроматографию ингибиторов протеиназ на трипсин-сефарозе 4В проводили на стеклянной колонке (1 x 40). Колонку с трипсин-сефарозой в 0,01 М ацетатном буфере pH 4,0 перед хроматографией уравновешивали 0,05 М фосфатным буфером pH 7,6, содержащем 0,2 М KCl . На колонку наносили 150–300 мг частично очищенного после высаливания сульфатом аммония (степень насыщения 0,4) белкового препарата и ступенчато элюировали сначала 0,05 М фосфатным буфером pH 7,6, содержащем 0,2 М KCl , а затем буфером $CH_3COO Na-HCl$ pH 4,0 и далее буфером, содержащим 0,01 М HCl и 0,2 М KCl pH 2,0. Элюцию проводили со скоростью 0,6 мл в мин. Профиль белковых фракций регистрировали на спектрофотометре при 280 нм. Во фракциях определяли ингибиторную активность по протеиназам серой гнили и трипсину. Полученные в результате аффинной хроматографии фракции, обладающие ингибиторной активностью, обезсаливали диализом против дистиллированной воды и при помощи гель-хроматографии на сефадексе G-10, а затем замораживали и лиофильно высушивали. Для определения молекулярной массы ингибиторов проводили ДСН-электрофорез и гель-хроматографию на сефадексе G-100. Электрофорез белковых фракций проводили в 15% полиакриламидном геле, содержащем 0,1% додецилсульфат натрия при pH 8,3. Перед нанесением на пластинку к растворам белка добавляли по 1 мл 0,06 М трис- HCl буфера pH 6,8, содержащего 2% додецилсульфата натрия и меркаптоэтанол (до 5% конечной концентрации). Аминокислотный состав определяли на автоматическом анализаторе "Хитачи 835" Японии. Биологическую оценку пи-

тательной ценности подсолнечного шрота проводили на лабораторных крысах линии Вистар при индивидуальном кормлении (Рядчиков, Добровольская, 1976). Зерновой рацион, содержащий 20% подсолнечного шрота, доводили кукурузным крахмалом до 10% белка и скармливали в течение 21 суток. В качестве критериев кормовой ценности использовали среднесуточные приросты массы животных (г/сут) и коэффициент эффективности белка (КЭБ) — прирост массы животных на 1г потребленного белка. Математическую обработку полученных данных проводили в вычислительном центре института на ЭВМ "СМ-4".

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследовали уровень ингибиторной активности в различных белковых фракциях двух форм подсолнечника, отличающихся по восприимчивости к серой гнили: ВИР 130 (менее восприимчивая) и ВИР 113 (восприимчивая). Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Активность ингибиторов протеиназ патогена в различных белковых фракциях семян подсолнечника

Изучаемая форма	Водо-солевая фракция			Щелочная фракция		
	МА	УИА	% белка от суммы фракций	МА	УИА	% белка от суммы фракций
ВИР 130	2,58	161,0	57,2	1,77	204,2	29,7
ВИР 113	2,16	137,9	52,2	0,87	106,2	31,4
НСР _{0,01}	0,22	11,5		0,10	12,4	
P, %	4,4	4,4		5,1	5,1	

Как видно из представленных в таблице 1 данных, в семенах менее восприимчивой формы ВИР 130 отмечается более высокий уровень водо-солевой фракции и менее высокий уровень щелочной фракции белков, по сравнению с восприимчивой формой ВИР 113. В белковых фракциях семян этой формы наблюдается и более высокий уровень ингибиторов протеиназ серой гнили. Таким образом, различия в ингибиторной активности у этих двух изучаемых форм подсолнечника может быть связана с различиями во фракционном составе белков семян. В дальнейшем для биологической оценки кормовой ценности подсолнечного шрота использовали семена 4 форм подсолнечника, различающихся по восприимчивости к серой гнили и уровню ингибиторной активности. Для этих целей взяли 2 менее восприимчивые формы (ВИР 130 и Солнечный) и 2 восприимчивые формы (ВИР 113 и Одесский 63). В зерновой рацион на основе ячменя включали 20% подсолнечного шрота из семян каждой изучаемой формы подсолнечника, скармливали его животным в течение 21 суток. Определяли среднесуточные приросты массы животных и коэффициенты эффективности белка (КЭБ). Результаты, представленные в таблице 2 показывают, что несмотря на различия в ингибиторной активности у исследуемых форм подсолнечника, существенных связей этого показателя с ростом животных и коэффициентом эффективности белка не отмечено.

Таблица 2

Биологическая ценность белков шрота из семян подсолнечника с различным содержанием ингибиторов протеиназ

Изучаемая форма	Активность ингибиторов, %	Прирост массы крыс, г/сут	К Э Б
ВИР I30	99,7	1,80	1,63
Солнечный	89,1	1,62	1,58
ВИР II3	12,9	1,77	1,54
Одесский 63	6,1	1,61	1,49
НСР _{0,01}		0,19	0,15
Р, %		5,5	5,1

Для изучения качественного состава ингибиторов протеиназ и некоторых их свойств частично очищенный препарат ингибитора разделяли при помощи аффинной хроматографии на трипсин-сефарозе 4В. На рисунке представлен профиль элюции и ингибиторная активность в хроматографических фракциях.

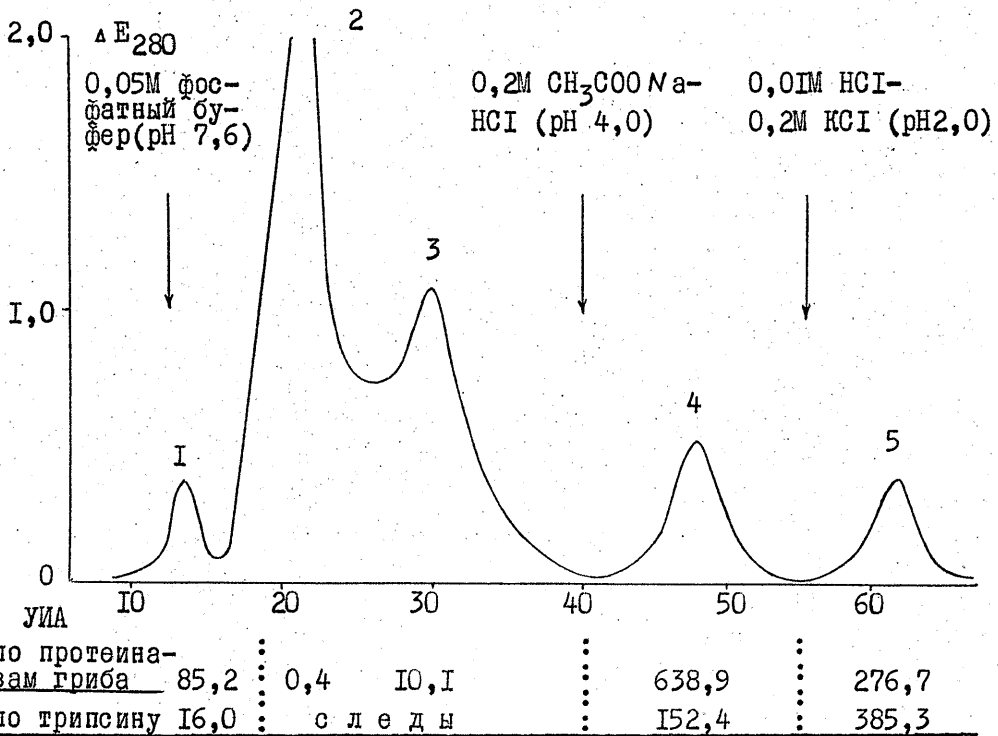


Рис. Аффинная хроматография ингибиторов протеиназ из семян подсолнечника на трипсин-сефарозе 4В

Из представленного на рисунке графика видно, что максимальной удельной ингибиторной активностью обладают 4 и 5 фракции, которые обозначали, как V_1 и V_2 соответственно. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле, а также гельхроматография на сефадексе G-100 указывает на низкомолекулярную природу этих ингибиторов протеиназ (~20000). Аминокислотный состав ингибиторов характеризуется высоким содержанием глутаминовой и аспарагиновой кислот. Необходимо отметить, что ингибитор V_1 обладает большей активностью по протеиназам патогена, чем по трипсину. Что касается ингибитора V_2 , то здесь наблюдается обратная картина.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что как и у большинства злаковых культур (Балаян, 1985) ингибиторы протеиназ из семян подсолнечника представлены различными белковыми фракциями. Причем максимальная ингибиторная активность наблюдается в альбумин-глобулиновой фракции белков. Сортовые различия в ингибиторной активности могут быть связаны как с различиями фракционного состава белков изучаемых форм, так и перераспределением белков внутри фракций. ДСН-электрофорез альбумин-глобулиновой и глютелиновой фракций белка двух различающихся по восприимчивости к серой гнили форм подсолнечника не обнаружил различий в белковом спектре. Учитывая то, что изучаемые ингибиторы протеиназ относятся к низкомолекулярным белкам и составляют небольшой процент от общего содержания белка в семенах, для изучения электрофоретического спектра необходимо проводить предварительную очистку и концентрацию препарата ингибитора. Наблюдаемые различия в ингибиторной активности и фракционном составе изучаемых форм подсолнечника не оказали существенного влияния на питательную ценность шрота, что, по-видимому, объясняется полигенностью данного признака. Кроме того, как показали исследования, уровень ингибиторной активности по отношению к протеиназам патогена или трипсину зависит от соотношения двух форм ингибиторов V_1 и V_2 . Благодаря этим свойствам ингибиторов протеиназ можно при помощи селекции отбирать формы подсолнечника с высоким содержанием ингибиторов V_1 , не повышая при этом содержание ингибитора V_2 , а следовательно, не снижать питательную ценность подсолнечного шрота. Следует также отметить, что высокий уровень глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, отмеченный у изучаемых ингибиторов протеиназ, характерен для соевых ингибиторов Баумана-Бирка и Кунитца (Birk, 1968; Мосолов, 1983). Интересно, что ингибитор V_1 содержит цистина более, чем в 10 раз больше, чем ингибитор V_2 . Подобные же различия наблюдаются между соевыми ингибиторами Баумана-Бирка (около 20%) и Кунитца (около 2%) (Koide, Ikenaka, 1973). В результате очистки и разделения ингибиторов протеиназ удалось значительно повысить их удельную активность. Учитывая то обстоятельство, что ингибиторы протеиназ являются низкомолекулярными соединениями, они могут играть важную защитную роль при прорастании семян, легко диффундируя через семенную оболочку в окружающую среду.

ВЫВОДЫ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

- В семенах подсолнечника содержатся ингибиторы протеиназ серой гнили и трипсина, которые представлены как альбумин-глобулиновой так и глютелиновой фракцией белков. У изучаемых форм подсолнечника, отличающихся по восприимчивости к серой гнили, отмечены различия как в уровне ингибиторов патогена, так и фракционном составе

ве белков.

- При помощи аффинной хроматографии получены частично очищенные низкомолекулярные ингибиторы протеиназ В₁ и В₂, обладающие различной активностью по отношению к ферментам серой гнили и трипсину. Ингибиторы отличаются высоким уровнем глутаминовой и аспарагиновой кислот.

- У изучаемых форм подсолнечника, отличающихся по восприимчивости к серой гнили, не отмечено существенной связи между уровнем ингибиторной активности, фракционным составом белков и биологической ценностью белков подсолнечного шрота. Появляется возможность селекционного отбора форм с повышенным содержанием ингибиторов протеиназ патогена, не снижая питательной ценности шрота.

ЛИТЕРАТУРА

- Балаян В.М., 1982, Влияние ингибиторов из семян злаковых и зернобобовых растений на активность протеолитических ферментов личинок *Tribolium confusum*. В сб. Протеолитические ферменты и их ингибиторы в семенах зерновых и зернобобовых культур, Одесса, ВСГИ; 61-70.
- Бенкен И.И., Мосолов В.В., Федуркина Н.В., 1976, Влияние ингибитора протеиназ из фасоли на фитопатогенные грибы, Микология и фитопатология, 10: 198-201.
- Мосолов В.В., 1983, Белковые ингибиторы как регуляторы процессов протеолиза, М., Наука: 40с.
- Погорлецкая В.Б., 1985, Ингибиторы протеиназ серой гнили из семян подсолнечника, Научно-техн. бюлл. ВНИИМК, 1(88): 17-19.
- Погорлецкая В.Б., Левицкий А.П., 1985, Ингибиторы протеиназ из семян подсолнечника, Физиология и биохимия культурных растений, 2: 153-157.
- Рядчиков В.Г., Добровольская С.В., 1976, Методы биологической оценки зерна при селекции на качество, Краснодар, НИИСХ: 28с.
- Черников М.П., 1975, Протеолиз и биологическая ценность белков, М., Медицина: 231с.
- Birk Y., 1968, Chemistry and nutrition significance of proteinase inhibitors from plant sources, Ann.N.Y. Acad.Sci., 146: 388-398.
- Keen N.T., Williams P.H., Walker J.C., 1967, Protease of *Pseudomonas lachrymans* in relation to cucumber angular leaf spot, Phytopathology, 57: 263-274.
- Koide T., Ikenaka T., 1973, Studies on soybean trypsin inhibitors. 3. Amino-acid sequence of the carboxyl-terminal region and the complete amino-acid sequence of soybean trypsin inhibitor (Kunitz), Eur. J. Biochem., 32: 417-431.
- Lamport D.T.A., 1963, Cell wall metabolism, Ann. Rev. Plant Physiol., 14: 43-64.
- Peng J., Black L., 1976, Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistance tomato plants by *Phytophthora infestans*, Physiol. and Biochem., 66: 958-963.
- Raskis J.J., 1981, Significance of soya trypsin inhibitors in nutrition, J. Amer. Oil. Chem. Soc., 58: 495-501.