

УДК 577.152.3

ПРИРОДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ИЗ РАСТЕНИЙ СОИ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЭКЗОПРОТЕИНАЗАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *FUSARIUM*

А.Н. Чебан, Т.И. Щербакова, А.Б. Будак

Институт генетики, физиологии и защиты растений АН Молдовы, Кишинев, Молдова, sebanan@rambler.ru

Изучена величина ингибирующего действия белков семян сои у сортов различного происхождения – Irina и Hodgson. У экзопроотеиназ, секретированных в жидкую культуральную среду Чапека, пятью видами рода *Fusarium* – *F.oxysporum*, *F.verticillioides*, *F. equiseti*, *F.cultorum*, *Microdochium nivale*, экзопроотеолитическая активность подавляется белками-ингибиторами из генотипов сои Irina и Hodgson с различной величиной (в качестве субстрата – казеин по Гаммерстену). Грибы рода *Fusarium* проявляют различную экзопроотеолитическую активность, что может указывать на разную степень связывания комплекса экзопроотеиназа-ингибитор в защитном механизме растений при патогенезе.

Ключевые слова: соя, семена, белки, ингибиторы, экзопроотеиназы, фузариум, протеолитическая активность.

Впервые ингибирующее действие белков растений на протеазу пищеварительного тракта было выявлено в сое в 1938 году [Read, Naas, 1938], а 1944 году из экстракта муки сои очищен ингибитор трипсина [Ham, Sandstedt, 1944] и

кристаллизован [Kunitz, 1945]. Следующий белковый ингибитор трипсина из сои был выделен Бирком [Bowman, 1946; Birk, et al, 1963]. Ингибиторы протеаз взаимодействуют с целевой протеазой в каталитическом домене, формируя,

стабильный протеазо-ингибиторный комплекс и протеазы переходят в неактивное состояние [Laskowski и Kato, 1980; Norton, 1991], тогда как грибы определенных видов обладают способностью синтезировать экзо-протеиназы, что проявляется в их способности биохимически взаимодействовать с растением-хозяином.

В качестве объекта исследования взяты 2 сорта сои различного происхождения – Irina и Hodgson. Из семян были выделены белки-ингибиторы подавляющие активность экзопроотеиназ микроорганизмов, а о величине ингибиторной активности белков-ингибиторов судили по величине остаточной протеолитической активности экзопроотеиназ [Чебан и соавт., 2013]. Также, в исследовании использовали экзопроотеиназы, которые были секретированы в жидкую культуральную среду Чапека [Кирай и соавт., 1974] пятью видами грибов рода *Fusarium* – это *F.oxysporum* Schlechtend. Fr., *F.verticillioides* (Sacc) Nirenberg, *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc, *F.culmorum* (Wm.G.Sm.) Sacc., *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett, при выращивании их на 23–25 °C в течение 40 суток. В качестве субстрата использовали коммерческий препарат белка – казеин по Гаммерстону. Единицы протеолитической активности экзопроотеиназ, рассчитывали на концентрацию 1 мг экзо-белка, секретированного в культуральную среду произрастания микроорганизмов.

Экзо-белки у видов *F. equiseti* и *F.oxysporum* имеют экзопроотеолитическую активность одного уровня (4.8023ед. акт-ти и 4.3521ед. акт-ти), несколько ниже она у видов *F.culmorum* – 3.3200 ед. акт-ти и *M. nivale* – 3.2221 ед. акт-ти. У вида *F. verticillioides* она составляет всего 1.4425 ед. акт-ти, что в два раза ниже, чем у видов *F.culmorum* и *M. nivale*, а также почти в три раза ниже величин активности у видов *F. equiseti* и *F.oxysporum* (табл.). Не исключено, что у *F. verticillioides* могут синтезироваться экзопроотеиназы по своим физико-химическим свойствам отличающихся от экзопроотеиназ остальных видов *Fusarium*. Активность экзопроотеиназ из *F. equiseti* подавлялась на 58.98% белками-ингибиторами сорта Irina, на 64.81% сорта Hodgson, а *F.oxysporum* на 59.90% и на 65.48% соответственно (табл.). Белки-ингибиторы сорта Hodgson по активности превыша-

Таблица. Ингибирование протеолитической активности экзопроотеиназ микроорганизмов рода *Fusarium* белками-ингибиторами из семян разных генотипов сои

Наименование вида микроорганизма	Единиц протеолитической активности в 1мг экзобелков	Наименование генотипа сои	
		Irina	Hodgson
		Ингибирование экзопроотеолитической активности, %	
<i>F. equiseti</i>	4.8023	58.98	64.81
<i>F.oxysporum</i>	4.3521	59.90	65.48
<i>F.culmorum</i>	3.3200	64.22	72.79
<i>M. nivale</i>	3.2221	84.65	67.60
<i>F. verticillioides</i>	1.4425	29.81	15.47

ют на 6.0% таковую у сорта Irina по отношению к экзопроотеиназ из микроорганизмов вида *F. equiseti* и *F.oxysporum*.

Активность белков-ингибиторов из генотипа Irina выше на 5.0–20.0%, а из Hodgson на 3.0–7.0% относительно экзопроотеаз грибов *F.culmorum* и *M. nivale*, чем у экзопроотеиназ *F. equiseti* и *F.oxysporum*. Скорее всего, у этих 4-х видов секретируются однотипные экзопроотеиназы и их протеолитические активности сопоставимы между собой, так же как и белки-ингибиторы из сои, подавляющие их экзопроотеолитическую активность. Ингибирование активности экзопроотеиназ, секретированных в среду обитания видом *F. verticillioides* намного ниже, чем у остальных четырех видов и составляет всего 29.81% для белков-ингибиторов из сорта Irina, а из Hodgson всего 15.47%, что указывает на факт существования различных изоформ экзопроотеиназ, секретлируемых в среду обитания разными видами рода *Fusarium*. Разные изоформы экзопроотеиназ с различными физико-химическими свойствами могут определять и специфику биохимических взаимодействий с растением-хозяином. Поэтому, в ходе селекционных программ по выведению новых сортов растений, наверное, было бы целесообразным проводить скрининг получаемых новых форм на наличие и величину содержания белков-ингибиторов в них. Следует иметь в виду, что растения, предназначенные на корм животным без термообработки должны содержать минимальное количество белков-ингибиторов, так как от их избытка страдают внутренние органы и у животных снижаются привесы массы тела.

Библиографический список (References)

- Кирай З., Клемент З., Шоймоши Ф., Вереш Й. Методы фитопатологии. Изд-во М.: Колос. 1974. 344 с.
- Чебан А.Н., Лупашку Г.А., Будак А.К. Изучение активности белковых ингибиторов из семян генотипов сои генетической коллекции ex situ относительно экзопроотеаз из патогена *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) snyder et Hans. Proceedings of the 1st International Conference: Non-Traditional, New and Forgone Plant Species: Scientific and Practical Aspects of Cultivation, 10–12 September 2013. – Kyiv: «Knigonosha». 2013. P. 444–447. ISBN 978-966-2615-57-9 H 57
- Birk Y., Gertler A., Khalef S. A pure trypsin inhibitor from soya beans // Biochem J. V. 87. 1963. P. 281–284.
- Bowman D.E. Differentiation of soy bean antitryptic factors // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. V. 63. 1946. P. 547–550.
- Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 179–181
- Ham W. E., Sandstedt R. M. A proteolytic inhibitory substance in the extract from unheated soybean meal // J. Biol. Chem. 154. 1944. P. 505–506.
- Kunitz, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybeans // Science. 1945. V.101. P. 668–669.
- Laskowski M. JR, KATO I. Protein inhibitors of proteinases // Annu. Rev. Biochem. 1980. V.49. P. 593–626.
- Norton G. Proteinase inhibitors. In: D’Mello, J. P. F.; Duffus, C. M.; Duffus, J. H., eds. Toxic substances in crop plants. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 1991. P. 68–106.
- Read J. W., Haas, L. W. Studies on the baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Further studies concerning potassiumbromate and enzyme activity // Cereal Chem. 1938. V.15. P. 59–68

NATURAL INHIBITORS FROM SOYBEAN AND THEIR INTERACTION WITH EXOPROTEINASES PRODUCED BY MICROORGANISMS FROM GENUS *FUSARIUM*

A.N. Cheban, T.I. Scerbacova, A.B. Budac

Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection of ASM, cebanan@rambler.ru

The data about the rate of inhibitory activity of the protein inhibitors, extracted from the seeds of two soybean genotypes of the different origin – Irina and Hodgson, are presented. Protein inhibitors, extracted from the soybean suppressed the proteolytic activity of the exoproteinas (amount of the exo-proteins in the medium – 1mg/ml), which were secreted in the culture medium

Chapek by microorganisms from the genus *Fusarium* (*F.oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F.culmorum* Sacc., *M. nivale*. Protein inhibitors from the seeds var. Hodgson demonstrated activity to the exoproteinases of the different microorganisms' species, which varied from 15.9 to 72.8%. The inhibitory activity of the proteins extracted from the seeds var. Irina was 29.8–84.7%. This indicates their different degree of binding in the enzyme-inhibitor complex, which is the important element that forms the protective mechanism to the different kinds of stresses in the plants. The rate of the inhibitory activity was judged by the size of the residual proteolytic activity of the microorganisms' exoproteinases (the substrate was casein Hammerstein).