

УДК 577.151

АКТИВНОСТЬ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ И ГЛУТАТИОНЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНДИСУЛЬФИДОКСИДОРЕДУКТАЗЫ В ЗЕРНОВКАХ МЕЖСОРТОВЫХ ЗАМЕЩЕННЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С РАЗЛИЧНЫМ КАЧЕСТВОМ КЛЕЙКОВИНЫ

С.В. ОСИПОВА,¹ М.Д. ПЕРМЯКОВА,¹ Т.А. ПШЕНИЧНИКОВА,² М.Ф. ЕРМАКОВА²

¹*Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук*

664033 Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317

e-mail: gluten@sifibr.irk.ru

²*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук*

630090 Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

e-mail: wheatpsh@bionet.nsc.ru

Изучена связь активности липоксигеназы и глутатионзависимой протеиндисульфидоксидоредуктазы с показателями технологического качества в зерне межсортовых замещенных линий пшеницы Диамант 2/Новосибирская 67 по хромосомам первой и шестой гомеологичных групп и их родителей. В зерне замещенных линий с хорошими физическими свойствами клейковины наблюдали относительно низкий уровень активности эндогенных протеиндисульфидоксидоредуктазы и липоксигеназы. Предполагается, что влияние среды на формирование качества клейковины может быть опосредованно лабильной системой оксидоредуктаз, регулирующих SH/SS-редокс статус запасных белков зерновки.

Ключевые слова: мягкая пшеница, запасные белки, регуляция SH/SS-редокс статуса, физические свойства клейковины.

Наряду с урожайностью качество зерна является наиболее важной характеристикой сортов пшеницы. Под качеством зерна понимают широкий комплекс признаков, среди которых чрезвычайно важны содержание белка, количество и качество клейковины. Клейковина образуется из запасных белков зерновки глиадинов и глютеинов при гидратации. Обеспечивая вязкоэластичные свойства теста, она обуславливает широкое использование мягкой пшеницы в хлебопекарном производстве.

Формирование белкового матрикса клейковины при созревании зерновки представляет собой сложный, многоступенчатый и протяженный во времени процесс. При этом происходит полимеризация отдельных субъединиц глютеина в нерастворимый полимерный белковый комплекс, стабилизированный межмолекулярными SS-связями [7, 12]. По разным оценкам, 60—80 % стабильности качества клейковины зависит от состава белков полимерной фракции, 20—40 % — от прочих факторов, связанных с условиями выращивания [10]. На процессы полимеризации и деполимеризации запасных белков могут влиять как низкомолекулярные (глутатион, аскорбиновая кислота) эндогенные редокс-агенты, так и ферменты, регулирующие SH/SS-редокс статус белков, внося существенные коррективы в физические свойства и качество клейковины [9].

Среди оксидоредуктаз, способных влиять на формирование вязко-эластичных свойств клейковины, особый интерес представляют линолеат:кислородоксидоредуктазы (липоксигеназы, ЛОГ, КФ 1.13.11.12) и глутатионзависимая тиол:протеиндисульфидоксидоредуктаза (дисульфидредуктаза, ТПДО, КФ 1.8.4.2). Липоксигеназы зерновки пшеницы, представленные несколькими изоферментами, катализируют диоксигенацию полиненасыщенных жирных кислот. Образующиеся при этом гидропероксиды ненасыщенных жирных кислот могут окислять свободные SH-группы запасных белков, способствуя их полимеризации [3, 14]. Дисульфидредуктаза зерновки пшеницы — глутаредоксинподобный белок, катализирующий редукцию SS-связей белков в системе НАДФН — глутатионредуктаза — восстановленный глутатион — ТПДО и, соответственно, деполимеризацию белкового матрикса клейковины [2].

Межсортовые замещенные линии мягкой пшеницы по хромосомам первой и шестой гомеологичных групп, несущим структурные гены глина и глютелина, были созданы в Институте цитологии и генетики СО РАН под руководством О.И. Майстренко. Они подробно охарактеризованы по параметрам качества зерна и муки в работе Пшеничниковой и соавт. [4]. При создании линий реципиентом служил один из наиболее высокобелковых сортов мягкой пшеницы Диамант 2 (содержание клейковины в зерне 40—50 %), имеющий низкие хлебопекарные свойства, а в качестве донора хромосом — сорт Новосибирская 67 (30 % клейковины в зерне), отличающийся высоким качеством муки.

Цель настоящей работы — выявить связь между активностью эндогенных ферментов зерновки, участвующих в создании SH/SS-редокс статуса запасных белков, и физическими свойствами клейковины у линий, хорошо изученных по технологическим параметрам.

Методика

Объектами исследования служили семена шести межсортовых замещенных линий мягкой пшеницы по хромосомам первой и шестой гомеологичных групп, двойной замещенной линии по хромосомам 1А, 6D и их родителей сортов Диамант 2, Новосибирская 67, выращенных в одной полевой повторности (I) на экспериментальном участке СИФиБР СО РАН (Иркутск) и в двух повторностях (II, III) на экспериментальном поле ИЦиГ СО РАН (Новосибирск). В повторности I для анализа отбирали также зерновки молочной спелости, которые замораживали жидким азотом и хранили в кельвинаторе при температуре -70°C . Технологические параметры определены по методикам государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур [1]. Средние значения параметров качества зерна и муки за 4 года выращивания приведены в статье Пшеничниковой и соавт. [4].

Активность ферментов определяли в экстракте, полученном гомогенизацией муки грубого помола с 0,1 М *трис*-HCl буфером (pH 7,5) + 1 мМ ЭДТА и последовательным центрифугированием при 3000 и 20 000 g в течение 30 мин. Семена молочной спелости перед размолотом замораживали жидким азотом. Активность ТПДО определяли с БСА (19 мг/мл) («ICN», США) в качестве субстрата и Г-SH (1 мМ) («Reanal», Венгрия) в качестве кофактора как описано ранее [2]. Активность ЛОГ определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение конъюгированных пероксидов при 234 нм по методике Зиммермана и Вика [15] с модификациями, описанными ранее [3]. Содержание белка в экстрактах находили по Лоури, используя БСА как стандарт.

Активность ферментов измеряли дважды в каждой из полевых повторностей с 3—5 аналитическими. Число повторностей при определении технологических показателей — до 5. Расчеты среднего, стандартного отклонения, *t*-критерия, корреляционный анализ проводили с использованием Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Диамант 2 и Новосибирская 67 существенно различаются по содержанию и составу главных запасных белков — компонентов глиадина и субъединиц глютеина [5, 11]. Полученные межсортовые замещенные линии сохранили высокобелковость, свойственную сорту-реципиенту. По качеству клейковины к сорту-донору приблизились лишь замещенные линии по хромосомам 1A и 6D, а также двойная замещенная линия — по хромосомам 1A, 6D. Как считают [4], это произошло за счет замены *0*-аллелей локусов *Glu-A1* и *Glu-A3* сорта-реципиента Диамант 2 активными аллелями сорта-донора Новосибирская 67 [11]. Замещение по четырем другим хромосомам не только не улучшило качества клейковины, но даже его ухудшило.

В зерновках молочной и полной спелости этих разнообразных по качеству генотипов изучены уровни активности ТПДО и ЛОГ. Из данных табл. 1 видно, что родительские сорта не различались по активности ТПДО в зерновках полной спелости, у замещенных линий этот признак варьировал, особенно заметно в повторности I. Уровень активности ЛОГ в этой повторности варьировал меньше, поэтому вариабельность отношения ЛОГ/ТПДО определялась в основном вариабельностью уровня активности ТПДО.

Корреляционным анализом выявлены достоверные связи между отношением ЛОГ/ТПДО в зерне и физическими свойствами теста по данным фаринографа: положительные — со временем образования и устойчивости теста, со стабильностью теста и валориметрической оценкой, и отрицательную — с разжижением теста, высокие значения которого характеризуют клейковину плохого качества (табл. 2). В повторности I активность ТПДО определяли также в зерновках молочной спелости в период, когда идет активное накопление запасных белков и их посттрансляционная модификация посредством образования SS-связей. Тесная корреляционная связь между активностью ТПДО в зерновках молочной спелости и растяжимостью теста (положительная) и стабильностью теста (отрицательная) позволяет предположить, что уровень активности ТПДО в этот период может влиять на степень полимеризации белков клейковины и формирование ее физических свойств.

В повторностях II и III изменчивость по уровню активности ТПДО в зерновках была невысокой (см. табл. 1). Достоверных корреляционных связей между активностью ТПДО и параметрами качества выявлено немного, направление связей дало основание предположить негативное влияние высокой активности ТПДО на устойчивость клейковины.

В общей выборке, включающей данные трех полевых повторностей, линии были сгруппированы по уровню активности ТПДО, и в группах сопоставлены показатели физических свойств теста по *t*-критерию. Группа линий с относительно низкой активностью ТПДО, в которую вошли замещенная линия по хромосоме 1A и двойная замещенная линия, имела лучшие показатели физических свойств теста (табл. 3). Поскольку межмолекулярные SS-связи являются главным фактором, определя-

ТАБЛИЦА 1. Удельная активность (Е/мг белка) глутатионзависимой протейиндисульфидоксидоредуктазы (ТПДО) и липоксигеназы (ЛОГ) в зерновках межсортовых замещенных линий Диамант 2/Новосибирская 67, их родителей и коэффициенты вариации этих признаков у линий (V)

Сорт, линия	ТПДО, полевые повторности			ЛОГ × 10, полевые повторности			
	Молочная спелость	Полная спелость		Полная спелость		Полная спелость	
	I	I	II	III	I		II
Диамант 2	5,0±0,5	1,6±0,1	2,1±0,1	1,9±0,1	5,8±0,2	6,6±0,6	5,3±0,2
Новосибирская 67	3,1±0,9	1,8±0,6	2,5±0,1	1,6±0,1	4,9±0,1	4,7±0,3*	3,4±0,7
Диамант 2/Новосибирская 67							
1А	7,8±2,2	0,8±0,1*	2,0±0,1	1,4±0,1*	5,9±0,2	7,2±0,3	5,3±0,2
1В	5,6±2,5	2,6±0,6*	1,8±0,1	1,9±0,1	4,9±0,3	8,8±0,5*	5,3±0,2
1D	5,8±2,3	2,5±0,6	2,4±0,3	1,9±0,2	5,1±0,1	8,5±0,5	5,5±0,1
6А	3,7±1,0	2,0±0,1	2,2±0,2	1,5±0,1*	5,2±0,1	7,0±0,1	4,9±0,5
6В	4,8±1,5	3,6±0,3*	2,5±0,2	2,1±0,1	5,4±0,2	7,2±0,3	4,8±0,3
6D	4,6±1,1	5,3±0,5*	2,3±0,1	2,3±0,2	5,5±0,1	7,7±0,5	5,5±0,1
1А, 6D		—	1,8±0,1*	1,4±0,1*	—	8,7±0,4*	5,1±0,1
V, %	32,9	13,2	6,7	6,0	5,1	4,7	4,0

*Достоверность различий с сортом-реципиентом, $p < 0,05$.

Ющим стабильность белковых полимеров, связь активности ТПДО с физическими свойствами клейковины может означать, что фермент способен катализировать редукцию межмолекулярных SS-связей и ослаблять тем самым клейковину. Это отличает ТПДО от тиоредоксинов, которые, по данным разных авторов, редуцируют лишь внутримолекулярные SS-связи, что зачастую приводит к перераспределению связей, образованию новых межмолекулярных SS-связей и укреплению клейковины [6, 13].

По активности ЛОГ в зерне родители достоверно различались только в повторности II, заметную вариативность этого признака у замещенных линий наблюдали также в полевой повторности II (см. табл. 1). Корреляционным анализом обнаружены положительные связи между активностью ЛОГ, содержанием клейковины в зерне, разжижением теста; отрицательные связи — с силой муки, упругостью теста, объемом хлеба и общей хлебопекарной оценкой (см. табл. 2). Последние три параметра отрицательно коррелировали с активностью ЛОГ как в повторности II, так и в повторности III.

ТАБЛИЦА 2. Коэффициенты корреляции между активностями глутатионзависимой протеиндисульфидоксидоредуктазы (ТПДО), липоксигеназы (ЛОГ), параметрами качества зерна замещенных линий Диамант 2/Новосибирская 67 и их родителей

Параметр качества	Удельная активность в зерновках	Коэффициент корреляции
Повторность I		
Растяжимость теста	ТПДО, молочная спелость	0,89**
Стабильность теста	То же	-0,69*
Время образования теста	ЛОГ/ТПДО, полная спелость	0,78*
Время устойчивости теста	То же	0,70*
Стабильность теста	« «	0,74*
Разжижение теста	« «	-0,79*
Валориметрическая оценка	« «	0,82**
Повторность II		
Упругость/Растяжимость теста	ТПДО, полная спелость	0,70*
Упругость теста	ЛОГ	-0,67*
Объем хлеба	То же	-0,71*
Общая хлебопекарная оценка	« «	-0,71*
Повторность III		
Время устойчивости теста	ТПДО, полная спелость	-0,67*
Содержание клейковины	ЛОГ	0,67*
Сила муки	То же	-0,83**
Упругость теста	« «	-0,87**
Разжижение теста	« «	0,70*
Объем хлеба	« «	-0,76*
Общая хлебопекарная оценка	« «	-0,86**

*Достоверно на 5 %, ** — на 1 % уровнях значимости.

ТАБЛИЦА 3. Активность глутатионзависимой протеиндисульфидоксидоредуктазы (ТПДО) и показатели физических свойств теста в линиях общей выборки (n = 26), сгруппированных по уровню активности ТПДО

Показатель	1-я группа	2-я группа
Активность ТПДО, Е/мг	1,3±0,1	2,3±0,2**
Активность ЛОГ, Е/мг	4,9±0,3	6,2±0,3*
Сила муки, ед. альвеографа	275±48,1	174±14,1*
Упругость теста, ед. альвеографа	87,1±10,4	71,7±2,2*
Время устойчивости теста, мин	4,9±1,0	2,3±0,5*
Соппротивление теста, мин	9,9±1,6	6,3±0,7*
Разжижение теста, мин	38,5±11,9	65,8±5,0*
Валориметрическая оценка, ед. фаринографа	78,1±5,7	65,5±2,2*

*Достоверность различий между группами $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$.

Известно, что ЛОГ семян сои используют для улучшения хлебопекарных параметров пшеничной муки, но молекулярные механизмы ее действия выяснены не до конца [8]. Ранее нами было показано, что эндогенная ЛОГ зерновки пшеницы влияет на качество муки и теста, однако характер этого влияния может быть как положительным, так и отрицательным в зависимости от уровня активности фермента [3].

В представленной работе мы наблюдали достоверную положительную корреляцию активности ЛОГ с содержанием клейковины и отрицательную — с физическими свойствами клейковины. Возможно, при интенсивном окислении белковых SH-групп гидропероксидами жирных кислот вследствие высокой активности ЛОГ в зерновке образуется большое число термодинамически напряженных «некорректных» дисульфидных связей, что приводит к формированию менее устойчивого клейковинного матрикса. Другая причина отрицательного влияния высокой активности ЛОГ на физические свойства клейковины может быть связана с гидрофобностью белков. Изменения реологических свойств под влиянием ЛОГ, вероятно, являются следствием уменьшения поверхностной гидрофобности растворимых глютеинов, вызванного связыванием продуктов окисления ЛОГ [14].

Полученные нами данные дают основание заключить, что влияние условий выращивания пшеницы на качество клейковины может быть опосредовано лабильной системой оксидоредуктаз, катализирующих реакции SH/SS-обмена в запасных белках. Вклад ферментов в формирование структурного матрикса клейковины и ее физические свойства зависит от баланса ферментативных активностей, катализирующих SH/SS-метаболизм в созревающей зерновке и зрелом зерне, а также от общего SH/SS-редокс статуса белков, образующих клейковину.

1. *Методика* государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. — М., 1988. — 56 с.
2. *Осипова С.В., Пермяков А.В., Митрофанова Т.Н. и др.* Характеристика тиол:протеиндисульфидоксидоредуктазы из зерна пшеницы *Triticum aestivum* L. // Биохимия. — 2005. — **70**, вып. 8. — С. 1130—1136.
3. *Пермякова М.Д., Труфанов В.А., Пшеничникова Т.А., Ермакова М.Ф.* Роль липоксигеназы в определении качества зерна пшеницы // Прикл. биохимия и микробиология. — 2010. — **46**. — С. 96—102.
4. *Пшеничникова Т.А., Ермакова М.Ф., Попова Р.К.* Тенологические качества зерна и муки мягкой пшеницы в линиях с межсортовым замещением хромосом 1 и 6 гомеологичных групп // С.-х. биология. — 2006. — № 1. — С. 57—62.
5. *Пшеничникова Т.А., Майстренко О.И.* Изучение ранних этапов создания замещенных линий Диамант/Новосибирская 67 по экспрессии генов глиадина // Генетика. — 1999. — **26**. — С. 965—970.
6. *Buchanan B.B., Kobrehel K., Yee B.C. et al.* Use of thiol redox proteins for reducing protein intramolecular disulfide bonds, for improving the quality of cereal products, dough and baked goods and for inactivating snake, bee and scorpion toxins // USP 6113951. Publication Date 05.09.2002.
7. *Hamer R., van Vliet T.* Understanding the structure and properties of gluten: an overview // Wheat Gluten / Eds. P.R. Schewry, A.S. Tatham, Royal Society of Chemistry. — Cambridge, 2000. — P. 125—131.
8. *Hoseney R.C., Rao H., Faubion J., Sighu J.S.* Mixograph studies. IV. The mechanism by which lipoxygenase increases mixing tolerance // Cereal Chem. — 1980. — **57**. — P. 163—166.
9. *Joye I.J., Lagrain B., Delcour J.A.* Endogenous redox agents and enzymes that affect protein network formation during breadmaking // J. Cereal Sci. — 2009. — **50**. — P. 1—10.
10. *Lemelin E., Branlard G., Salvo L. et al.* Breadmaking stability of wheat flour: Relation between mixing properties and molecular weight distribution of polymeric glutenins // Ibid. — 2005. — **42**. — P. 317—326.

11. *Obukhova L.V., Maystrenko O.I., Generalova G.V. et al.* Prolamin patterns in common wheat substitution lines developed from cultivars with contrasting bread-making qualities // EWAC Newsletter, Proc. 11-th EWAC Conf. — Novosibirsk, 2001. — P. 80—82.
12. *Rhazi L., Cazalis R., Lemelin E., Aussenac Y.* Changes in the glutathione thiol-disulfide status during wheat grain development // *Plant Physiol. Biochem.* — 2003. — **41**. — P. 895—902.
13. *Shewry P.R., Tatham A.S.* Disulphide bonds in wheat gluten proteins // *J. Cereal Sci.* — 1997. — **25**. — P. 207—227.
14. *Shiiba K., Negishi Y., Okada K., Nagao S.* Purification and characterization of lipoxygenase isozymes from wheat germ // *Cereal Chem.* — 1991. — **68**. — P. 115—122.
15. *Zimmerman D.C., Vick B.A.* Hydroperoxide isomerase. A new enzyme of lipid metabolism // *Plant Physiol.* — 1970. — **46**. — P. 445—453.

Получено 26.05.2010

АКТИВНІСТЬ ЛІПОКСИГЕНАЗИ І ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНОЇ ПРОТЕЇНДИСУЛЬФІДОКСИДОРЕДУКТАЗИ В ЗЕРНІВКАХ МІЖСОРТОВИХ ЗАМІЩЕНИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ З РІЗНОЮ ЯКІСТЮ КЛЕЙКОВИНИ

С.В. Осипова,¹ М.Д. Перм'якова,¹ Т.О. Пшеничникова,² М.П. Єрмакова²

¹Сибірський інститут фізіології та біохімії рослин Сибірського відділення Російської академії наук, Іркутськ

²Інститут цитології та генетики Сибірського відділення Російської академії наук, Новосибірськ

Вивчено зв'язок активності ліпоксигенази та глутатіонзалежної протеїндисульфідоксидоредуктази з показниками технологічної якості в зерні міжсортних заміщених ліній пшениці Діамант 2/Новосибірська 67 по хромосомах першої і шостої гомеологічних груп та їх батьків. У зерні заміщених ліній з добрими фізичними властивостями клейковини спостерігали відносно низький рівень активності ендогенних протеїндисульфідоксидоредуктази та ліпоксигенази. Припущено, що вплив середовища на формування якості клейковини може бути опосередкований лабільною системою оксидоредуктаз, що регулюють SH/SS-редокс статус запасних білків зернівки.

LIPOXYGENASE AND GLUTATHIONE-DEPENDENT PROTEIN DISULFIDE OXYDOREDUCTASE ACTIVITY IN GRAINS OF INTERVARIETAL SUBSTITUTION LINES OF COMMON WHEAT WITH DIFFERENT GLUTEN QUALITY

S.V. Osipova,¹ M.D. Permyakova,¹ T.A. Pshenichnikova,² M.F. Ermakova²

¹Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

P.O. 317, 132 Lermontova St., Irkutsk, 664033, Russia

²Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
10 Lavrenteva pr., Novosibirsk, 630090, Russia

Correlations were studied between activities of lipoxygenase (LOX) and glutathiondependent protein disulfide oxydoreductase (PDO) and technological parameters in grain of the bread wheat intervarietal substitution lines Diamant 2/Novosibirskaya 67 for chromosomes of 1 and 6 homoeological groups and their parents. In the lines with high physical properties of gluten a relatively low activity level of endogenous LOX and PDO was detected. It is supposed that the environmental influence on the formation of gluten quality may be mediated by the system of oxydoreductases regulating redox SH/SS status of storage proteins in grain. The input of enzymes in the formation of structural gluten matrix and its physical properties depends both of balance of their activities in the ripening and the mature grain and from the whole SH/SS status of gluten proteins.

Key words: common wheat, storage proteins, regulation of SH/SS status, physical properties of gluten.