

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА

©2013 В.О. Цветков<sup>1</sup>, И.А. Шпирная<sup>1</sup>, К.И. Валиахметова<sup>1</sup>,  
Л.Г. Яруллина<sup>2</sup>, Р.И. Ибрагимов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет, г. Уфа

<sup>2</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 14.06.2013

В данной статье описано выделение амилаз насекомых, дана их физико-химическая, биохимическая и экологическая характеристика.

**Ключевые слова:** амилолитические ферменты, очистка белков, физико-химическая характеристика белков.

Из личинок колорадского жука были выделены амилазы, гидролизующие картофельный крахмал. Для очистки ферментов был использован аффинный сорбент на основе полиакриламида с иммобилизованным крахмалом. С помощью двумерного электрофореза показано, что аффинноочищенные амилазы личинок насекомых представлены 4-мя белками с молекулярными массами в диапазоне 30-50 кДа. Наибольшую активность исследуемые ферменты проявляли при pH 7 и температуре 30-40 °С. В зависимости от состава пищевого субстрата (картофель, томаты, баклажаны) изменялся уровень активности амилаз личинок. Состав пищи не оказывал влияния на молекулярный состав ферментов.

### ВВЕДЕНИЕ

Колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* Say является одним из самых опасных вредителей пасленовых культур, в первую очередь картофеля.

Колорадский жук – олигофаг, и фактор влияния кормового растения для вида имеет особое значение. Все активные фазы жизни насекомого проходят непосредственно на растениях.

Одним из основных биохимических инструментов, позволяющих этим насекомым эффективно перерабатывать и усваивать растительную пищу, являются гидролитические ферменты. В соответствии с составом пищевых субстратов, в тканях насекомых присутствуют ферменты для расщепления белков, жиров и углеводов пищи: протеиназы, преимущественно цистеиновые [1], целлюлазы, α-амилазы, эстеразы, представленные множественными формами [2]. Наиболее подробно изученными являются протеазы, экспериментальные сведения о других гидролитических ферментах пока малочисленны. Амилазы являются одними из наиболее активных карбогидраз колорадского жука [3].

В связи с вышесказанным, изучение состава и свойств амилаз этого опасного вредителя является актуальной задачей. Наша работа посвящена выделению и очистке амилаз из личинок колорадского жука, исследованию их состава и свойств.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для выделения ферментов использовали личинок колорадского жука III стадии развития, собранных с вегетирующих растений картофеля, и баклажана в Уфимском районе РБ. Навеску замороженных личинок гомогенизировали в ступке (5 г) и экстрагировали в трехкратном объеме ацетатного буфера, pH 5,6, при 4 °С в течение 10 мин. Экстракт дважды центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5417R при ускорении 8000g в течение 10 мин при 4°С.

Для очистки ферментов использовали аффинный сорбент, синтезированный по оригинальной методике [4]. В качестве лиганда на сорбенте иммобилизовали специфический субстрат амилаз – крахмал.

Выделение ферментов производили на хроматографе BioLogic LP (Biorad, США) при 4°С. На колонку (2x6 см) с иммобилизованным крахмалом, уравновешенную рабочим буфером, наносили 8 мл супернатанта экстракта и промывали рабочим буфером. Элюцию активного белка производили трис-HCl-буфером (pH 8). Скорость тока буфера составляла 2 мл/мин. Ход хроматографии контролировали по оптической плотности элюата при длине волны 280 нм.

Амилолитическую активность белков определяли методом агарозных гелевых пластин [5]. Концентрацию белка определяли по Брэдфорд [6].

Для определения оптимума pH к аликватам препарата в четырехкратной повторности добавляли соответствующее количество соляной кислоты или гидроксида натрия до достижения требуемого значения pH и выдерживали в течение 10 мин при 4°С. Для определения температурного оптимума раствор выдерживали в течение 10 мин при нужной температуре. Затем определяли ферментативную активность.

Цветков Вячеслав Олегович, к.б.н., ассистент, e-mail: tsvetkov@bashedu.ru; Шпирная Ирина Андреевна, к.б.н., доцент, e-mail: i-shia@yandex.ru; Валиахметова Карина Ильдаровна, аспирант, e-mail: feuerkalte@yandex.ru; Яруллина Любовь Георгиевна, д.б.н., проф., ведущий научный сотрудник, e-mail: yarullina@bk.ru; Ибрагимов Ринат Исмагилович, д.б.н., проф., зав. кафедрой, e-mail: ibragimov56@yandex.ru

Для определения молекулярного состава полученных ферментов проводили SDS-электрофорез в 12%-ном ПААГ (0.75 мм) по Лэмбли в камере для вертикального электрофореза (Biorad, США). Электрофорез вели при постоянном напряжении 90 В и силе тока 70 мА.

Для определения изоэлектрической точки полученных ферментов проводили изоэлектрическое фокусирование в 12%-ном ПААГ (1 мм). Изоэлектрическое фокусирование вели при напряжении 1000 В и силе тока 2 мА.

После электрофореза гели фиксировали в 15%-ной ТХУ в течение 10 ч, затем окрашивали раствором Кумасси R-250 в 8%-ной уксусной кислоте и

25%-ном этаноле в течение 20 мин. Окрашивание проводили при комнатной температуре.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Выделение белков.** В таблице 1 приведены результаты выделения препарата амилаз из личинок колорадского жука на колонке с полиакриламидным гелем с иммобилизованным картофельным крахмалом. Для получения препарата белка с ферментативной активностью объединяли хроматографические фракции, обладающие высокими значениями амилазной активности; конечный объем раствора составил 12 мл.

**Таблица 1.** Аффинная очистка амилаз личинок колорадского жука на колонке с иммобилизованным крахмалом

	Объем, мл	Концентрация белка, мкг/мл	Ферментативная активность, Е/мл	Суммарная ферментативная активность, Е	Удельная ферментативная активность, Е/мкг
Исходный экстракт	3	600	50	150	0,08
Элюат	12	20	42	500	2,10

Амилолитическую активность во фракциях контролировали с помощью метода агарозных гелевых пластин. Как видно, с иммобилизованным субстратом полиакриламидной колонки связывалось около 240 мкг белка с ферментативной активностью около 500 Е. Удельная активность ферментов в процессе очистки повысилась в 26 раз, с 0,08 в исходном экстракте до 2,1 Е/мкг белка в элюате.

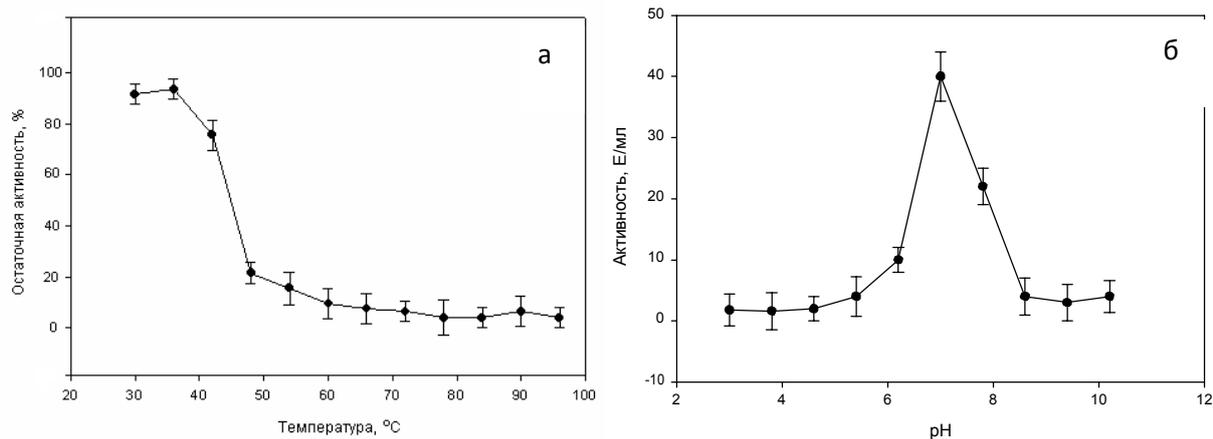
**рН-оптимум и температурная стабильность амилаз.** Амилазы колорадского жука проявляют активность в относительно широком диапазоне кислотности среды. Как видно, гидролиз крахмала осуществляется ферментами в интервале от 6 до 8 рН, максимальная активность отмечена при нейтральном значении рН (рис. 1а). По этому показателю амилазы жука существенно не отличаются от описанных в литературе амилолитических ферментов микроорганизмов и различных животных, в т.ч. насекомых и млекопитающих [7]. Исследования альфа-амилазы колорадского жука показали ее способность функционировать в широком диапазоне значений рН (от 6 до 10) с оптимумом около 6,5. Максимальная амилолитическая активность отмечена в переднем отделе кишечника колорадского жука, тогда как в среднем она пренебрежимо мала, а в заднем отсутствует вовсе [8].

Амилолитические ферменты колорадского жука проявляют наибольшую активность в диапазоне от 30 до 40°C (рис. 1б). При воздействии температуры выше 60°C ферментативная активность практиче-

ски полностью утрачивается. Содержание и активность амилаз в тканях насекомых существенно зависит от природы пищевого субстрата [9]. Одной из причин такой зависимости может быть влияние пищи на внутреннюю среду насекомого, в частности, на значение рН. В то же время, известно, что оптимум рН для многих ферментов насекомых зависит от их филогенетического положения [8]. По нашим данным, диапазон температуры, в котором функционирует амилазы личинок, также весьма широк (от 25 до 45°C), хотя оптимум составляет 37°C.

**Молекулярный состав амилаз.** Для более детального исследования молекулярного состава выделенных ферментов, определения молекулярной массы и изоэлектрической точки белков полученные ферменты разделяли методом двумерного электрофореза в 10%-ном ПААГ в денатурирующих условиях.

Результаты показывают, что амилазы колорадского жука представлены четырьмя белками (или группами белков) с молекулярной массой в диапазоне от 30 до 50 кДа и значениями рI от 5 до 6,5 (рис. 2). По-видимому, данные белки являются альфа-амилазами, среди которых известны представители с молекулярной массой 40-60 кДа [10]. Возможно, среди исследованных белков присутствуют также низкомолекулярные формы бета-амилаз или фрагменты их молекул, содержащие центр связывания с субстратом.



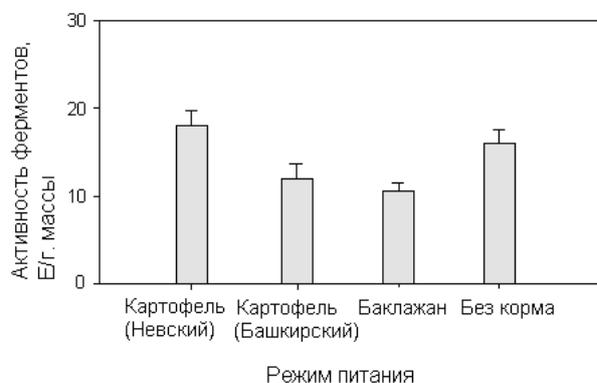
**Рис. 1.** Зависимость ферментативной активности амилаз личинок колорадского жука от температуры (а) и величины рН (б). Величину активности определяли при четырехкратной повторности опытной и контрольной проб методом агарозных гелевых пластин. В качестве величины погрешности показан доверительный интервал выборочного среднего



**Рис. 2.** Двумерный электрофорез амилаз личинок колорадского жука в 10%-ном SDS-ПААГ. Диапазон рН 3-10. Окраска Кумасси G-250

**Влияние кормового субстрата на активность и молекулярный состав амилаз.** Наши эксперименты свидетельствуют, что активность амилолитических ферментов насекомых также зависит от состава пищевого субстрата. Как видно из рис. 3, у личинок, выращенных на растениях картофеля сорта Невский, наблюдается наибольший уровень активности амилаз. Личинки, питающиеся листьями картофеля сорта Башкирский и листьями баклажана, имеют более низкие показатели, чем в варианте с сортом Невский. Низкий уровень ферментативной активности в этих случаях может быть связан с частичным ингибированием активности амилаз компонентами пищи [11]. Интересно отметить, что отсутствие пищи течение 48 ч не изменяет активность амилаз личинок (по сравнению с вариантом с сортом Невский). В то же время, активность протеолитических и пектолитических ферментов у личинок значительно снижается при отсутствии корма [12].

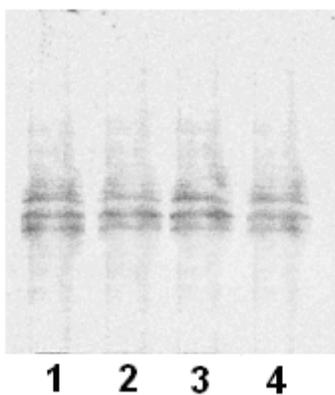
На рис. 4 приведены результаты разделения ферментов личинок, питавшихся различными субстратами.



**Рис. 3.** Активность гидролитических ферментов в гомогенате личинок колорадского жука в зависимости от пищевого субстрата. «Невский», «Башкирский» – сорта картофеля, «Без корма» – личинки, лишённые пищи в течение 48 ч

Как показывает разделение очищенных белков методом SDS-электрофореза по Лэммли, во всех исследуемых вариантах спектр белков идентичен. Эти результаты свидетельствуют, что сортовые и видовые особенности растительной пищи могут изменять относительную активность молекулярных компонентов ферментов, но не оказывают влияния на их молекулярный состав. Между тем, некоторыми исследователями было показано, что в зависимости от вида растения, которым питается колорадский жук, способен изменяться количественный и качественный состав протеолитических ферментов [13, 14].

Таким образом, наши исследования показывают, что амилолитические ферменты личинок колорадского жука III стадии развития представлены, по крайней мере, 4-мя белками с молекулярными массами в интервале 30-50 кДа и со значениями pI в слабокислой зоне рН. При питании личинок различными видами и сортами растений активность амилаз изменяется, однако молекулярный состав ферментов остается постоянным.



**Рис. 4.** SDS-электрофорез амилаз личинок колорадского жука при кормлении различным растительными субстратами. 1. Картофель (Невский, контроль); 2. Картофель (Башкирский); 3. Баклажан; 4. Без корма (48 ч). Окраска Кумасси G-250

Исследования поддержаны грантами: госконтракт № 01201353578.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thie N., Houseman J. Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) // Insect Biochem. 1990. V. 20. N 3. P. 313-318.
2. Khorram M., Adab R., Yazdaniyan M., Jafarnia S. Digestive alpha-amylase from *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): response to pH, temperature and some mineral compounds // Adv. Environ. Biol. 2010. V. 4. N 1. P. 101-107.
3. Рябченко Н.А., Никитин Н.И. Влияние пищевого фактора на микро-эволюцию колорадского жука // Вестн. Днепропетровск. ун-та. 2006. Т. 1. С. 165-171.
4. Цветков В.О., Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И., Гарипова М.И. Выделение протеиназ колорадского жука с использованием аффинного сорбента на основе полиакриламида // Мат. 14-й междунар. Пушинской шк.-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушкино, 2010 г. С. 66-67.
5. Шпирная И.А., Умаров И.А., Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И. Определение активности гидролаз и их ингибиторов с использованием субстратов, иммобилизованных в геле агарозы // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 497-501.
6. Bradford M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248-254.
7. Horvathova V., Janecek S., Sturdik E. Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties // Biologia, Bratislava. 2000. V. 55. N 6. P. 605-615.
8. Zang F., Zhu Y., Cohen A. Molecular cloning and partial characterization of a trypsin-like in salivary gland of *Lygus disponsi* (Hemiptera: Mirridae) // Insect Biochem. Mol. Biology. 2002. V. 32. P. 455-464.
9. Khorram M., Adab R., Yazdaniyan M., Jafarnia S. Digestive alpha-amylase from *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): response to pH, temperature and some mineral compounds // Adv. Environ. Biol. 2010. V. 4. N 1. P. 101-107.
10. Matsuura Y., Kusunoki M., Harada W., Kakudo M. Structure and Possible Catalytic Residues of Taka-Amylase A // J. Biochem. 1984. V. 95. N 3. P. 697-702.
11. Умаров И.А. Экологические и физиолого-биохимические закономерности взаимоотношений в системе "картофель-колорадский жук": Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2009. 16 с.
12. Цветков В.О. Гидролитические ферменты и их белковые ингибиторы как компоненты взаимодействия картофеля с колорадским жуком: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2011. 16 с.
13. Overney S., Fawe A., Yelle S., Michaud D. Diet-related plasticity of the digestive proteolytic system in larvae of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) // Insect Biochem. Physiol. 1997. V. 36. N 4. P. 241-250.
14. Zhu-Salzman K., Zeng R. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant defense: Lessons learned from a Bruchid beetle // Insect Sci. 2008. V. 15. N 6. P. 477-481.

#### PHYSICO-CHEMICAL AND ECOLOGICAL CHARACTERIZATION OF AMYLOLITIC ENZYMES OF COLORADO POTATO BEETLE

©2013 V.O. Tsvetkov<sup>1</sup>, I.A. Shpirnaya<sup>1</sup>, K.I. Valiakhmetova<sup>1</sup>, L.G. Yarullina<sup>2</sup>, R.I. Ibragimov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State University, Ufa

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

In this article purification of amylases of insects is described, their physic-chemical, biochemical and ecological features is done.

**Key words:** amylolytic enzymes, proteins purification, physic-chemical characterization of proteins.

Vyacheslav Tsvetkov, Candidate of Biology, assistant, e-mail: tsvetkov@bashedu.ru; Irina Shpirnaya, Candidate of Biology, associate professor, e-mail: i-shia@yandex.ru; Karina Valiakhmetova, postgraduate student, e-mail: feuerkalte@yandex.ru; Lyubov Yarullina, Doctor of Biology, professor, leading researcher, e-mail: yarullina@bk.ru; Rinat Ibragimov, Doctor of Biology, professor, head of chair, e-mail: ibragimov56@yandex.ru