

ГЕНЕТИКА

УДК 575.113.2: 577.112.82

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ И ГЕНЕТИКА ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА КРАХМАЛА

М. М. Копусь, Н. Г. Игнатьева, Н. Е.
Васюшкина,Н. С. Кравченко, Е. М. Копусь,
Всероссийский научно-исследовательский институт
зерновых культур им. И.Г. Калининко

Рассмотрены значение амилолитических ферментов, являющихся ключевыми гидролитическими ферментами зерна. Освещена роль крахмала, как основного компонента пшеничной муки, определяющую технологические и хлебопекарные свойства пшеницы.

It is considered a role of amylolytic enzymes in a grain ripening and germinating process. It is substantiated a necessity of starch genetics studying for selection improvement and sort variety according to quality.

Ключевые слова: Крахмал, зерно, пшеница, амилолитические ферменты, генетика, вакци, глиадины, нуль-аллели, локусы.

Key words: wheat, starch, amylolytic enzymes, polysugar, genes, alleles.

Генетика ферментов, контролирующих биосинтез крахмала в зерне пшеницы. Содержание крахмала в зерне пшеницы составляет 67–72% в а. с. веществе. В условиях Дона у местных сортов размах меньше, но также это основной компонент зерна. Прежде всего, крахмал источник энергии для прорастающего зерна. По химической структуре это полисахарид, основой которого является молекула D-глюкозы, и находится в форме α -D-глюкопиранозы [1].

В состав крахмала входят два основных гомополимера D-глюкозы: амилоза и амилопектин. Амилоза составляет 20–25% массы

крахмала и 70–75% амилопектин.

Амилоза – разветвлённый линейный полимер (1000–10000 остатков глюкозы). В её молекуле глюкозидные остатки соединены между собой α -1,4 соединениями.

Амилопектин имеет выше степень полимеризации (100000–1000000 остатков глюкозы) и молекулярной организации. Примерно 5% глюкозидных остатков в молекулярной структуре амилопектина имеют между собой α -1,6 связи, за счёт чего образуются разветвления в цепи полимерной молекулы.

Крахмал накапливается в специализированных органеллах клетки – амилопластах. Образование крахмальных гранул начинается через 4–5 дней после цветения и оплодотворения. В зерне пшеницы отличают по размерам три основных типа крахмальных гранул: тип А – 15–35 микрон, тип В – 5–10 микрон, и тип D – меньше 2 микрон [2].

Метаболический путь синтеза крахмала в эндосперме злаков является уникальным, и требует участия некоторых специфических изоформ ферментов, которые не присутствуют ни в каких других тканях злаков, где синтезируется крахмал, и ни в тканях других незлаковых видов растений [1].

Сложная структура крахмала свидетельствует о том, что в его синтезе принимает участие комплекс генов, которые контролируют все системы ферментов, катализирующие разные трансформации мономера глюкозы в

сложный полисахарид-крахмал.

Первым этапом на пути синтеза крахмала является образование АДФ-глюкозы из молекулы глюкозо-1-фосфата и АТФ под действием фермента АДФ-глюкозопирофосфорилазы (АДФ-азы). Гены, контролирующие синтез этого фермента локализованы в длинных плечах хромосом гомеологической группы (7A, 7B, 7D).

Не менее четырех классов ферментов-синтез принимают участие в биосинтезе крахмала в эндосперме пшеницы и других злаков: GBSS (связанные с крахмальными гранулами синтазы-GBSSI и GBSSII), синтазы крахмала (SSI, SSII, SSIII), ферменты разветвления цепи крахмала (BEI, ВТIIa, ВТIIb), и ферменты де-разветвления цепи крахмала (DBE).

Фермент GBSS – ключевой фермент синтеза амилозы. Мутации генов, кодирующих синтез этого фермента, приводят к появлению признака воскоподобного эндосперма, известного под названием вакси. Результатом таких мутаций является полное блокирование фермента GBSS и, соответственно, полное блокирование синтеза амилозы. Такие мутации были идентифицированы вначале у кукурузы, риса, ячменя, сорго, овса и амаранта и только потом у пшеницы [3].

Биосинтез амилопектина осуществляют ферменты-синтазы крахмала: SSI, SSII, SSIII. Гены, которые кодируют биосинтез фермента SSI, локализованы в коротких плечах хромосом гомеологической группы 7 (7A, 7B, 7D). Синтазы группы SSII представлены тремя протеинами молекулярной массой 100, 108 и 115 кДа и также контролируются генами, локализованными в коротких плечах хромосом 7 гомеологической группы [4]. Генетический контроль синтазы SSIII еще окончательно не изучен из-за сложности гомеологических отношений у пшеницы.

Ферменты ветвления полиглюкозидной цепи осуществляют реакцию блокирования α -1,4 связи, и вместе нейтрализуют ответвление молекулярной цепи крахмала (амилопектина) через α -1,6 глюкановую связь.

Фермент ветвления цепи крахмала BEI имеет молекулярную массу 88 кДа. Гомоло-

гичные гены, его кодирующие, локализованы дистально в длинных плечах хромосом 7 гомеологической группы. Ген, кодирующий синтез другой изоформы фермента BEI, локализован в длинном плече хромосомы 1D [5]. Энзим BEI имеет молекулярную массу 85 кДа, но локализация генов, кодирующих его, пока не установлена.

Роль ферментов де-разветвления цепи крахмала DBE заключается в блокировании образования избыточных α -1, 6 глюкановых связей в молекуле амилопектина, и таким образом, окончательном образовании молекулярной структуры амилопектина. Известны и другие ферменты, принимающие участие в биосинтезе крахмала: гексокиназы, инвертазы, изоамилазы, фосфорглюкомутазы, пуллуланазы и другие.

Генетика вакси (Waxy-Wx): направление использования. Главный фермент GBSSI (около 60 кДа) еще называется вакси (Wx)-протеин и является ключевым ферментом, отвечающим за синтез амилозы. Wx-протеины, или GBSS, кодируются генами с названиями – вакси (Wx) генами. У пшеницы идентифицированы три гомеологических гена: Wx-A1 (хромосома 7AS-короткое плечо), Wx-B1 (7BL-длинное плечо) и Wx-D1 (7DS-короткое плечо) [6]. Пшеница, у которой соединение трех неактивных нуль-аллелей этих генов приводит к полному блокированию синтеза фермента GBSS и амилозы, и называется вакси.

Впервые нуль-аллели были выделены и описаны в нашей стране по клейковинным белкам – глиадином [7, 8] еще в 1977 году.

Объяснение природы пшеницы вакси лежит в области биохимической генетики. Каждый Wx-ген имеет два аллеля: активный аллель, кодирующий синтез определенного Wx-протеина, и неактивный, или нуль-аллель, который блокирует синтез Wx-протеина. Каждый из этих типов Wx-аллелей можно идентифицировать с помощью SDS-электрофореза Wx-протеинов или методами ПЦР – анализа.

Среди сортов пшеницы мировой коллекции были найдены разные комбинации активных и неактивных Wx-аллелей. Каждый неактивный Wx – нуль – аллель вызывает снижение до определенного уровня содержания

амилозы в крахмале и меняет соотношение амилоза/амилопектин в зерне. Объединение всех трех неактивных нуль-аллелей в одном сорте пшеницы приводит к полному блокированию амилозы в крахмале. Это и будет пшеница вакси, где крахмал состоит из одного только амилопектина. Пшеница с одним или двумя Wx – нуль – аллелями имеет частично блокированный синтез амилозы и называется частично – вакси (partial Waxy).

Для практической идентификации пшеницы вакси можно использовать йодную пробу (0,2% элементарного йода и 2% KJ). Тестирование – при помощи инфракрасного анализатора, калиброванного по содержанию амилозы (показатель «число падения»). Все три нуль-аллеля не равноценны по их действию на содержание амилозы в крахмале. Самое большое снижение амилозы обуславливает нуль-аллель гена Wx-B1 в сравнении с нуль-аллелями: Wx A1 и Wx-D1 [9].

Соотношение амилоза/амилопектин в пшеничном крахмале имеет большое значение для технологических свойств крахмала и муки пшеницы. Крахмал пшеницы вакси с нулевым содержанием амилозы очень чувствителен к механическому действию рабочих органов мельниц. Разрушение крахмальных гранул крахмала, в соответствии с законами

геометрии, увеличивает площадь поверхности, что приводит к повышению водопоглотительной способности (ВПС%) и амилолитической активности муки. Повышение ВПС% муки дает «припек» хлеба. То есть увеличивает весовой выход продукта, а более активный амилолиз увеличивает объем испеченного хлеба. Для производства хлеба это существенные экономические выгоды: 56–58% ВПС у обычных пшениц и 75% у вакси (разница 19–17%). Объясняют это тем, что за короткое время амилаза муки пшеницы вакси активно гидролизует крахмал до низкомолекулярных сахаридов, создавая этим благоприятные условия для высокой активности дрожжей в тесте. Через это мука пшеницы вакси характеризуется высокими показателями газообразующей способности и подъемной силы теста. Следует обратить внимание на то, что такой важный для качества хлеба показатель, как «число падения» или индекс Хагберга, у пшеницы вакси, выращенной и собранной в нормальных условиях, колеблется в пределах 67–80 с. (!). Такое низкое «число падения» бывает у хлебопекарных пшениц только в условиях критического прорастания зерна на корню. В обычных условиях «число падения» для хлебопекарной пшеницы бывает в пределах 350–400 с. (рисунок).

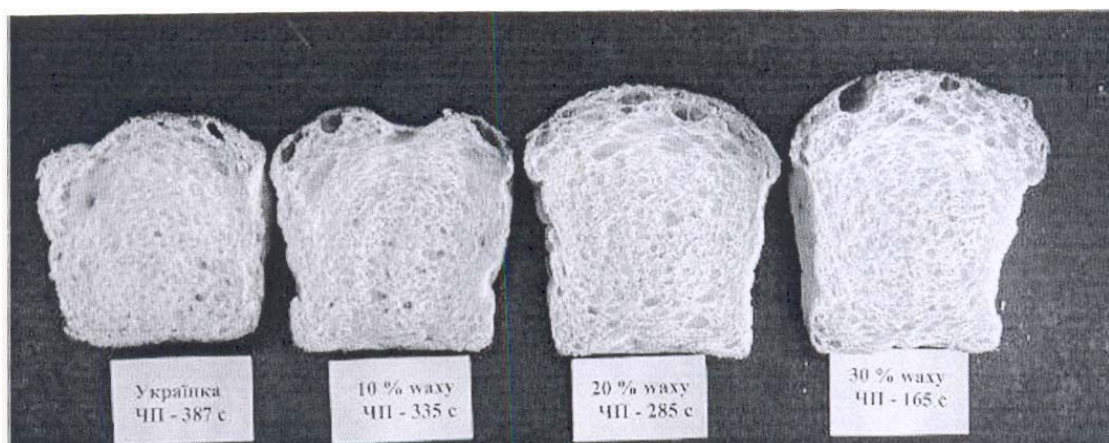


Рис. Влияние добавки муки вакси на объем хлеба из муки сорта Украинка: 1–100% мука сорта Украинка; 2 – добавка 10%; 3–20%; 4–30%. ЧП-число падения

Другим очень важным направлением использования сортов вакси – получение высоко-

качественной лапши, особенно для стран Японии, Индии, Китая, всей Юго-Восточной

Азии (а это 3 млрд человек), где этот продукт питания является традиционным. Крахмал пшеницы вакси имеет те физические свойства, которые необходимы для изготовления качественной лапши: выше уровень набухания и плотности суспензии крахмала, выше температура желатинизации крахмала и энтальпии. Лапша, изготовленная из пшеницы вакси, лучше набухает, имеет повышенную эластичность и упругость, лучшие вкусовые качества и товарный вид. Исследования показали, что тесто, изготовленное из пшеницы вакси, лучше выдерживает режим замораживания – оттаивания. А это открывает перспективы изготовления продуктов из замороженного теста, таких как круассаны, продукты из слоеного теста, вареники, пельмени, гамбургеры и другое.

Еще одно перспективное направление использования пшеницы вакси – производство биоэтанола. Если сорта обычной пшеницы могут дать из тонны зерна 350–450 л чистого этанола, то проведенные в последние годы исследования показали, что самая высокая эффективность трансформации крахмала в биоэтанол (650л/т) наблюдалась у генетических линий вакси с аномальным составом крахмала: нулевым содержанием амилозы. Умножив разницу на сотню тысяч тонн перерабатываемого сырья, получим цифры, которые заставят задуматься над эффективностью переработки зерна в этиловый спирт.

Генетический полиморфизм амилолитических ферментов зерна пшеницы. В зерне пшеницы присутствует два специфических фермента, которые осуществляют гидролиз крахмала:

1. α -амилаза, или α -1,4-глюкангидролаза, она гидролизует α -1,4-глюкановые связи крахмала и родственные ему углеводы до низкомолекулярных декстринов и частично мальтозы. Тривиальное название фермента – декстриногенамилаза. α -амилаза – фермент зерна, которое прорастает. Он не стойкий в водных незабуференных растворах. Ионы кальция способны стабилизировать гидрологическую функцию α -амилазы. Фермент инактивируется при низких значениях pH. α -амилаза достаточно термостабильный фермент и не теряет активности при температуре выше 70°C.

2. β -амилаза, или α -1,4-глюканмальтогидролаза, она гидролизует α -1,4-глюкановые связи крахмала, последовательно отсоединяя (экзофермент) остатки мальтозы от нередуцированных концов полимерного звена молекулы полисахаридов. В результате гидролиза крахмала образуется β -мальтоза. Тривиальное название фермента – сахарогенамилаза. В зерне пшеницы β -амилаза находится в неактивном или связанном – S-S-связями с молекулами глютенинов. В процессе созревания зерна активная β -амилаза постепенно инактивируется и переходит в латентное состояние.

Изоэлектрическое фокусирование позволило идентифицировать у сорта Чайниз Спринг больше 30 изоферментов, контролируемых двумя локусами: α -Amy-1 и α -Amy-2. Локус α -Amy-1 контролирует синтез не менее 17 изоэнзимов с изоэлектрическими точками в градиенте pH 6,0–7,5. Локус α -Amy-2 кодирует 16 изоэнзимов с изоэлектрическими точками: pH 4,9–6,0. Локус α -Amy-1 представлен серией генов, расположенных в длинных плечах хромосом гомеологической группы 6, тогда как локус α -Amy-2 имеет серию генов, расположенных в длинных плечах гомеологической группы 7[10].

Изоамилазы, контролируемые локусом α -Amy-1, синтезируются в зерне пшеницы, которое прорастает, и получили название «солодовых» (malt) α -амилаз. Тогда как α -амилазы, контролируемые локусом α -Amy-2, синтезируются как в прорастающем зерне, так и на ранних фазах развития и формирования зерновки. Эта группа изоферментов α -амилазы называется «зелеными» (green) α -амилазами.

У сорта Чайниз Спринг было идентифицировано около 33 изоферментов β -амилаз с изоэлектрическими точками в пределах pH 4,6–5,5. Генетический контроль β -амилаз осуществляют два локуса: β -Amy-1 и β -Amy-2. Локус β -Amy-1 расположен в длинных плечах хромосом 4A (локус β -Amy-A1) и 4D (локус β -Amy-D1). Локус β -Amy-2 находится в длинном плече хромосомы 5A (локус β -Amy-A2). У локуса β -Amy A1 идентифицировано два аллеля, у локуса β -Amy D1 – пять аллелей, и два аллеля идентифицировано в локусе β -Amy-A2.

Никаких данных в отношении связи локу-

сов, контролирующих состав α - и β -амилаз зерна пшеницы с какими-либо признаками качества муки в цитируемых работах найдено не было.

ЛИТЕРАТУРА

1. James M., Denyer K., Myers A. Starch synthesis in the cereal endosperm. // *Current Opinion in Plant Biol.* – 2003. – Vol. 6. – P. 215–222.
2. Bechtel D., Zayas I., Kaleikau L., Pomeranz J. Size distribution of wheat starch granules during endosperm development // *Cereal Chem.* – 1990. – Vol. 67. – P. 59–63.
3. Nakamura T., Jamamori M., Hirano H., Hidana S., Nagamine T. Production of waxy (amylase-free) wheat // *Mol. Gen. Genet.* – 1995. – Vol. 248. – P. 253–259.
4. Jamamori M., Selection of wheat lacking a putative enzyme for starch synthesis, SGP-1 // *Proc. 9-th Intl. Wheat Genet. Symp.* – 1998. – Vol. 4. – P. 300–302.
5. Nagamine T., Joshida H., Komae K. Varietal differences and chromosome locations of multiple isoforms of starch branching enzymes in wheat endosperm // *Phytochem.* – 1997. – Vol. 46. – P. 23–26.
6. Chao S., Sharp P., Worland E., Koeber R., Gale M. RELP-based genetic map of wheat homeologous group 7 chromosomes // *Theor. Appl. Genet.* – 1989. Vol. 78. – P. 495–504.
7. Созинов А. А., Копусь М. М. Мутация глиадинокодирующего локуса хромосомы 1D // *Цитология и генетика.* – 1983. – Т.17. – №2. – С.19–24.
8. Копусь М. М. Супермутант компонентного состава глиадина мягкой пшеницы (эффект «пустого» геля). // *Докл. ВАСХНИЛ.* – 1987. – №1. С.5–6.
9. Takata K., Nishio Z., Iriki N., Tabiki T., Funatsuki W., Jamaushi H. Comparison of quality characteristics of Waxy wheat using a near isogenic line // *Breeding Science.* – 2005. – Vol. 55. – P. 87–92.
10. Ainsworth C., Doherty P., Edwards K., Martienssen R., Gale M. Allelic variation of α -amylase loci in hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1985. – Vol. 70. – P. 400–406.

ИНФОРМАЦИЯ

УДК:633.174:661.72

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОИЗВОДСТВА БИОЭТАНОЛА ИЗ СОРГО

С.И. Горпиниченко, В.В. Ковтунов,
Всероссийский научно-исследовательский институт
зерновых культур им. И.Г. Калининко

В статье освещены достижения отечественной и зарубежной науки в области альтернативных источников энергии с использованием возобновляемых ресурсов – растительного сырья.

In the article these are elucidated domestic and foreign science achievements in the field of alternative energy sources with the usage of renewal resources – vegetable raw materials.

Ключевые слова: сорго, зерно, сорт, нефть, энергия, сырьё, топливо, литр, биоэтанол, биогаз, biodiesel.

Key words: sorghum, grain, variety, oil, en-

ergy, raw materials, fuel, liter, bioethanol, biogas, biodiesel.

Рост мировых цен на нефть, быстрое истощение её запасов, ухудшение экологической обстановки, особенно в крупных городах мира, уже давно поставили во многих странах проблему создания экологически чистых возобновляемых источников энергии. Различные формы энергии биомассы могут использоваться в качестве автомобильного топлива. Есть несколько видов топлива, которые можно получить из биомассы – биогаз (преимущественно метан), био-