

Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина

УДК 577.152.3

На правах рукописи

**ИСЛАМОВ РИНАТ АЛИМЖАНОВИЧ**

**Бифункциональный ингибитор альфа-амилазы/трипсина  
из зерна пшеницы**

03.00.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители

Доктор биологических наук,  
профессор  
О.В. Фурсов

Кандидат биологических наук  
А.А. Хакижанов

Республика Казахстан  
Алматы, 2006

## Содержание

	стр.
<b>Введение</b>	4
<b>1 Обзор литературы</b>	8
1.1 Ингибиторы гидролитических ферментов	8
1.1.1 Ингибиторы сериновых протеиназ	8
1.1.2 Ингибиторы $\alpha$ -амилаз	15
1.1.3 Растительные бифункциональные ингибиторы сериновых протеиназ и $\alpha$ -амилаз	18
1.2 Физиологическая роль и регуляция ингибиторов сериновых протеиназ и $\alpha$ -амилаз в растениях	23
1.3 Применение ингибиторов некоторых сериновых протеиназ и $\alpha$ -амилаз в генетике и селекции растений	26
<b>2 Материалы и методы исследований</b>	28
2.1 Материалы и оборудование	28
2.2 Объекты исследования	28
2.3 Метод выделения ингибитора	28
2.4 Гель-фильтрационная хроматография	29
2.5 Определение концентрации белка и активности ферментов	29
2.6 Изучение физико-химических свойств ингибитора.	30
Электрофорез	
2.7 Кинетические свойства БФИ и статистическая обработка результатов	31
2.8 Химическая модификация и окисление ингибитора	31
<b>3 Результаты исследований и их обсуждение</b>	32
3.1 Разделение ингибиторов сериновых протеиназ и $\alpha$ -амилаз гель-фильтрацией	32
3.2 Изучение полученных фракций на антипротеиназную и антиамилазную активность	35
3.3 Выделение и очистка бифункционального ингибитора $\alpha$ -амилазы/трипсина из зерна пшеницы	41
3.4 Определение молекулярной массы и чистоты бифункционального ингибитора	42
3.5 Изучение специфичности бифункционального ингибитора	46
3.6 Кинетические характеристики бифункционального ингибитора $\alpha$ -амилазы/трипсина	49
3.7 Термостабильность, выявление дисульфидных связей и рН оптимум действия ингибитора	53
3.8 Окисление ингибитора перекисью водорода в присутствии анионов йода и хлора	56
3.9 Химическая модификация аминокислот, важных для проявления активности ингибитора	58
<b>Заключение</b>	65
<b>Список использованных источников</b>	66

## Определения, обозначения, сокращения

БФИ – бифункциональный ингибитор  
ОЭП – относительная электрофоретическая подвижность  
м.м. – молекулярная масса  
кДа – килодальтон  
а.о. – аминокислотные остатки  
ЭФ – электрофорез  
ИЭФ – изоэлектрофокусирование  
ИЭТ – изоэлектрическая точка  
АБК – абсцизовая кислота  
ГК – гибберреловая кислота  
ИТ – ингибиторы трипсина  
ВАЕЕ – бензоил-аргинина этиловый эфир  
ВАСI – бифункциональный ингибитор  $\alpha$ -амилазы/субтилизина из ячменя  
РАSI – бифункциональный ингибитор  $\alpha$ -амилазы/субтилизина из риса  
RBI – бифункциональный ингибитор из проса  
DsbA – дисульфидизомераза  
Мф – модификатор  
 $K_i$  – константа ингибирования  
 $K_m$  – константа Михаэлиса-Ментен  
 $V_{max}$  – максимальная скорость  
 $H_2O_2$  - I – перекись водорода - анионы йода  
ДС-На – додецилсульфат натрия  
Арг – аргинин  
Лиз – лизин  
Лей – лейцин  
Иле – изолейцин  
Мет – метионин  
Сер – серин  
Цис – цистеин  
Глю – глютамин  
Гли – глицин  
Трп – триптофан  
Тир – тирозин  
Вал – валин  
Ала – аланин  
Про – пролин

## ВВЕДЕНИЕ

Ингибиторы гидролитических ферментов – огромный класс соединений белковой и небелковой природы, широко распространены в живой природе, от бактерий до высших эукариот. Известно, что ферменты – каталитические белки, выполняют важнейшие функции в живых организмах. Функциональное значение ингибиторов огромно, регуляция активности ферментов с их помощью позволяет влиять на процессы роста и развития. Это достигается различными способами, одним из таких способов является взаимодействие ферментов с ингибиторами, которое приводит к подавлению ферментативной активности. Ингибиторы могут постоянно синтезироваться в процессе жизнедеятельности клетки, регулируя ее метаболический и пластический обмен, либо появляться в результате воздействия на нее. Например, в результате внедрения в клетку или ткань различных патогенов – бактерий, грибов, вирусов, других живых организмов и их продуктов, против которых вырабатывается целый комплекс веществ, в том числе и ингибиторы. В норме соотношения протеиназ и их ингибиторов в тканях человека уравновешены, но при канцерогенезе и метастазировании это равновесие нарушается. Опухоль, стремясь разрушить тканевой барьер, синтезирует преимущественно протеиназы. Таким образом, некоторые ингибиторы активным образом воздействуют как на клеточное окружение, так и на протеом клетки, меняя его состав [1].

Известно, что одним из путей иммунного ответа растений, является образование специальных веществ различной химической природы, взаимодействующих с патогенами. Среди таких веществ – ингибиторы многих гидролитических ферментов, проникающие с патогенами или выделяющиеся последними. Повреждения растений и их частей различными паразитами приводит к заболеванию и гибели первых, что особо остро ощущается в производстве сельскохозяйственно и промышленно важных культур. Иногда потеря урожая достигает 80 %, приводя к экономическому бедствию [2].

Большинство вредителей пшеницы, при внедрении в растение, выделяют протеолитические и амилолитические ферменты, которые гидролизуют белки и крахмал, в результате, если даже растение не погибло, то резко ухудшается качество продукции, получаемой из поврежденного зерна. Примером может служить клоп-черепашка, который продырявливает зерно и впрыскивает комплекс трипсинподобных и амилолитических ферментов, в результате чего снижаются реологические показатели теста и выпекается хлеб очень низкого качества. Для Казахстана, как мирового экспортера пшеничного зерна, решение проблемы защиты посевов от вредителей и болезней является первостепенной [2,С.4].

Кроме того, зерно может служить источником ингибиторов, которые широко представлены в злаковых. Прежде всего, ингибиторы сериновых протеиназ, которые могут быть использованы в медицинских целях, в частности в предотвращении некоторых патологических процессов при которых тканевые протеиназы излишне активны. Примером может служить

инфаркт миокарда, в результате разрыва сердечной мышцы из клеток выходят протеиназы, которые усугубляют патологический процесс или приводит к септическому шоку [3]. В последнее время в литературе все чаще появляются работы, посвященные функциям различных классов ингибиторов и их модификации, которая приводит к появлению новых свойств или специфичности. Например, серпины, ингибиторы сериновых протеиназ из зерна пшеницы, у которых были модифицированы некоторые связи в реактивном участке ингибитора. В результате серпины приобрели способность блокировать ангиогенез и индуцировали регрессию опухоли [4]. Изучение некоторых ингибиторов сериновых протеиназ из различных источников на культуре гладкомышечных клеток сосудов показало их антиапоптотические свойства. В отсутствие этих ингибиторов наблюдалась деградация внеклеточных структур и клетки теряли способность прикрепляться к матриксу, что в конечном счете, приводило их к апоптозу [5].

В 80-х гг. одна за другой появляются публикации о новом классе ингибиторов, так называемых бифункциональных, которые характеризуются тем, что на одной полипептидной цепи располагаются два активных центра, способных взаимодействовать с протеиназой и  $\alpha$ -амилазой. Изучение таких ингибиторов позволят понять, каким образом происходят белок-белковые взаимодействия, а так же повысить результативность борьбы с вредителями, получая формы растений богатых бифункциональными ингибиторами.

Настоящее исследование выполнялось в рамках госзаказа по общегосударственным программам фундаментальных исследований Республики Казахстан: «Изучение структурно-функциональных особенностей важнейших белков протеома основных продовольственных культур Казахстана в связи с продуктивностью и устойчивостью к различным стрессовым факторам».

**Цель исследования** – изучение спектра ингибиторов трипсина, субтилизина, бактериальной и пшеничной  $\alpha$ -амилаз, выделение, очистка и изучение свойств нового ингибитора  $\alpha$ -амилазы и трипсина из зерна пшеницы, а также определения аминокислот, входящих в состав его активных центров.

#### **Задачи исследования**

1. Установить гетерогенность ингибиторов, содержащихся в покоящемся зерне пшеницы, активных против некоторых сериновых протеиназ и  $\alpha$ -амилаз.
2. Методом аффинной хроматографии выделить и очистить бифункциональный ингибитор  $\alpha$ -амилазы и трипсина.
3. Определить его молекулярную массу, изучить термостабильность, рН оптимум действия.
4. Изучить кинетику реакции ингибирования  $\alpha$ -амилазы и трипсина;
5. Изучить возможность окислительной модификации ингибитора системой: пероксидаза хрена –  $H_2O_2$  – I.

6. С помощью химической модификации, определить аминокислотные остатки активного центра.

### **Научная новизна**

Из зерна пшеницы впервые выделен, очищен и изучен новый бифункциональный ингибитор  $\alpha$ -амилазы млекопитающих и трипсина (БФИ). Определены: молекулярная масса, термостабильность, наличие дисульфидных связей, рН оптимум действия, кинетические свойства и специфичность. Химической модификацией установлены аминокислоты, входящие в состав реактивного центра ингибитора. Установлено, что БФИ относится к аргинин-содержащей группе ингибиторов. Показано, что ингибитор имеет два реактивных центра, и что инактивация одного не влияет на активность другого. Показан спектр ингибиторов  $\alpha$ -амилаз, трипсина и субтилизина содержащихся в зерне пшеницы сорта Саратовская 29. Предложен механизм инактивации БФИ в зерне через окисление функциональных аминокислот в системе: пероксидаза- $H_2O_2$ -I.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В зерне пшеницы сорта Саратовская 29 содержатся ингибиторы трипсина, субтилизина, эндогенных и экзогенных  $\alpha$ -амилаз. Ингибиторы сериновых протеиназ имеют молекулярную массу около 20 кДа. Молекулярная масса ингибиторов  $\alpha$ -амилаз составила 20, 40 и 60 кДа, что очевидно свидетельствует о том, что ингибиторы  $\alpha$ -амилазы могут образовывать олигомеры.

2. Методом аффинной хроматографии на трипсин-сефарозе выделен и очищен новый бифункциональный ингибитор  $\alpha$ -амилазы млекопитающих и трипсина. Гомогенность препарата ингибитора подтверждена электрофорезом в денатурирующих и нативных условиях. Молекулярная масса БФИ составляет около 14 кДа.

3. Бифункциональный ингибитор показал высокую специфичностью к трипсину и  $\alpha$ -амилазе млекопитающих, а также имеет высокую ингибиторную эффективность с  $K_i=10^{-10}$  М.

4. Ингибитор содержит два независимых активных центра взаимодействующих с трипсином и  $\alpha$ -амилазой. Нативную конформацию молекулы поддерживают дисульфидные связи. Ингибитор обладает высокой термостабильностью, оптимальными значениями рН ингибирования являются нейтральные.

5. Бифункциональный белок-ингибитор может подвергаться окислению с полной инактивацией в системе пероксидаза хрена –  $H_2O_2$  – I.

6. Активный центр БФИ, взаимодействующий с трипсином, содержит аргинин. Лизин и метионин участвуют во взаимодействии молекулы ингибитора с  $\alpha$ -амилазой.

### **Практическая значимость**

Высокая эффективность бифункционального ингибитора ( $K_i=10^{-10}$ М и высокая термостабильность), а также его бифункциональная природа позволяет рекомендовать его для разработки системы защиты растений от различных фитопатогенов. А также в терапии заболеваний, связанных с недостатком ингибиторов трипсин-подобных ферментов и  $\alpha$ -амилазы, таких как эмфизема легких, гепатиты, панкреатиты, при трансплантации органов и тканей.

### **Апробация работы**

Материалы диссертационной работы доложены на Международной научно-практической конференции «Биологически активные добавки к пище и функциональные продукты питания – искоренение микронутриентной недостаточности» (Алматы, 2005); на V Международной научно-практической конференции «Астма и аллергия» (Алматы, 2005); на Международной школе «Биоинформатика, геномика, протеомика» (Алматы, 2006); на 9-ой и 10-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2005, 2006).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из них 3 статьи, одна принята к печати (журнал Прикладная биохимия и микробиология РАН, – 2007, Т. 43, № 2).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 74 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения и выводов. Работа содержит 10 таблиц, 21 рисунок и список цитируемой литературы, включающий 131 наименование, в том числе 89 на английском языке.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Ингибиторы гидролитических ферментов

Важнейшими группами класса гидролитических ферментов являются  $\alpha$ -амилазы и протеиназы, КФ 3.2.1.1 и КФ 3.4.21, соответственно. Нет процесса в клетке, где бы они не участвовали, пусть то будет регуляция метаболических процессов, пищеварение, патогенез и т.п. Регуляция активности ферментов, посредством воздействия на них ингибиторами, дает возможность влиять на весь ход роста и развития организма [6].

Широкое применение ингибиторы получили в различных областях. Так, в медицинской практике уже используются ингибиторы для профилактики и лечения различных заболеваний. Медицинская промышленность выпускает на основе ингибиторов лекарственные препараты саувагин, ксенопсин, каптоприл, контрикал, тразилол, криксиван и т.д. [7, 8]. При лечении СПИДа используют специфические ингибиторы аспартатной протеиназы ВИЧ, принимающей участие в сборке вириона [9, 10]. Ингибиторы имеют важное значение для диагностики многих патологических процессов, таких как канцерогенез и метастазирование, нарушения свертываемости крови [7]. Широко применимы они и как генетические маркеры различных сортов пшеницы (*Triticum aestivum* L.), ячменя (*Hordeum vulgare* L.), ржи (*Secale cereal*), тритикале (*Triticale sp*), кукурузы (*Zea mays* L.), риса (*Oryza sativa* L.) [11]. Ингибиторы протеиназ находят практическое применение в медицине и сельском хозяйстве, тогда как ингибиторы амилолитических ферментов используются для защиты культурных растений от вредителей и болезней [12, 13].

В процессе эволюции, растения выработали защитные механизмы, позволяющие им в какой то мере противостоять различного рода неблагоприятным факторам. Важнейшими составляющими всех механизмов защиты являются вещества белковой природы. В их число входят гидролитические ферменты – глюканазы, хитиназы, амилазы, лектины и ингибиторы – протеаз и  $\alpha$ -амилаз [14, 15].

### 1.1.1 Ингибиторы сериновых протеиназ

Ингибиторы сериновых протеиназ широко распространены в высших растениях, представляя обширную группу белковых веществ, объединенных общим свойством – способностью образовывать с ферментами комплексы, стойкие при физиологических условиях рН, с полной или частичной потерей их каталитической активности. В остальном, ингибиторы различаются по своей молекулярной массе, от 8 до 50 тысяч дальтон, по величине и знаку заряда, аминокислотному составу и количеству активных центров на одну полипептидную цепь [16, 17]. В таблице 1 дается перечень некоторых ингибиторов сериновых протеиназ с указанием количества аминокислот в их составе, полученного из анализа их кДНК [18].



Таблица 1 – Ингибиторы сериновых протеиназ

Название ингибитора	Количество аминокислот в одном домене	Число доменов
Бычий трипсиновый ингибитор из поджелудочной железы	60	1
Ингибитор Казала	55	до 7
Соевый ингибитор Кунитца	198	1
Ингибитор Баумана-Бирка	35	2
Трипсиновый ингибитор из ячменя	120	1
Ингибитор II из картофеля	50	До 8
Ингибитор из белой акации	35	1:2
Серпины	400	1
Ингибитор пепсина из аскариды	150	1
Ингибитор трипсина из аскариды	60	1
$\alpha$ -2-Макроглобулин	1500	2-4
Тауматин из кукурузы	200	1

Общим свойством белковых ингибиторов является способность подавлять активность протеолитических ферментов в результате образования с ними стойких белок-белковых комплексов. Образование этих комплексов показано с помощью различных физико-химических методов – ультрацентрифугирования, электрофореза, гель-фильтрации. Значения констант ингибирования ( $K_i$ ) соединений трипсин – ингибитор трипсина из бобов сои составляют  $2 \times 10^{-10}$  М, для ингибитора из куриного белка –  $5 \times 10^{-9}$  М, еще более низкие  $K_i$  равные  $1 \times 10^{-11}$  –  $1 \times 10^{-12}$  М получены для соединения трипсина с ингибиторами из поджелудочной железы животных [19]. Величины  $K_i$  для других белковых ингибиторов субтилизина, химотрипсина, трипсина имеют тот же порядок [20]. Добавление высоких концентраций синтетических субстратов к соединению трипсина с белковым ингибитором, приводит к восстановлению ферментативной активности. Это указывает на конкурентный характер

взаимодействия фермент – ингибитор. Однако, конкурентный или неконкурентный тип ингибирования определяется относительным сродством фермента к субстрату и ингибитору. Так, неконкурентное взаимодействие наблюдается с белковыми, а также с некоторыми синтетическими субстратами. Например, трипсиновый ингибитор из слюнных желез с п-нитроанилидом бензоиларгинина ( $K_m$   $3-4 \times 10^{-4}$  М) действует как неконкурентный ингибитор [21].

Одним из первых хорошо исследованных ингибиторов трипсина является соевый ингибитор Кунитца. Он представляет собой белок типа глобулина, не содержит углеводных остатков, устойчив в широком интервале рН 1,0-12,0, при температуре ниже 40°C. Молекула ингибитора состоит из 198 аминокислот, на N-конце расположена аспарагиновая кислота, на C-конце лейцин. Реактивный центр включает в себя остаток аргинина-64. Модификация 10 из 11 остатков лизина не приводит к инактивации ингибитора. Молекулярная масса 21,5 кДа. Вторым хорошо изученным ингибитором является спирторастворимый ингибитор Баумана-Бирка, который значительно отличается от ингибитора Кунитца по своему аминокислотному составу и способен взаимодействовать не только с трипсином, но и химотрипсином [16,С.304].

Ласковский с сотр. [22] установили, что реакция фермента с ингибитором может сопровождаться расщеплением в молекуле ингибитора специфической пептидной связи, которая у ингибиторов трипсина имеет вид Арг-Х или Лиз-Х. Эта связь представляет собой «реактивный центр» ингибитора. Представление о том, что остатки лизина или аргинина в молекуле ингибитора играют важную роль во взаимодействии с трипсином, согласуется с результатом опытов по химической модификации функциональных групп ингибиторов [23].

Комплекс фермента с ингибитором, как правило, стабилизирован ковалентной связью с гидроксилом серина активного центра фермента и представляет собой соединение типа ацил-фермент. Образующийся в результате реакции с ферментом модифицированный ингибитор с расщепленной пептидной связью отличается от нативного ингибитора тем, что его молекула состоит из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями. Модифицированный ингибитор сохраняет свою ингибиторную активность, хотя и медленнее взаимодействует с ферментом. В тоже время не во всех случаях комплексы ингибитора с ферментом стабилизированы ковалентной связью с гидроксилом серина. Химотрипсин, содержащий вместо остатка серина дегидроаланин, сохраняет способность образовывать устойчивые комплексы с овомукоидом [16,С.279]. Таким образом, соединение ингибитора с ферментом может представлять собой либо комплекс типа комплекса Михаэлиса стабилизированного нековалентными связями, либо ковалентное соединение типа ацил-фермент. Характер образующегося комплекса зависит как от окружающих условий (рН среды), так и от свойств самого ингибитора [17]. В таблице 2 показаны две группы ингибиторов с лизином или аргинином в реактивном центре [16,С.281].

Таблица 2 – Группы ингибиторов содержащих лизин или аргинин в реактивном центре

Ингибиторы, содержащие остаток аргинина	Ингибиторы, содержащие остаток лизина
соевый ингибитор Кунитца	поливалентный ингибитор Кунитца и Нортропа
куриный овомукоид	ингибиторы из лимской фасоли
ингибиторы из семян ржи, пшеницы, кукурузы	ингибитор из молозива коровы
ингибитор Казалья	овомукоиды индюка, пингвина, страуса, утки
ингибиторы из клубней картофеля	

Представления о важной роли остатков лизина или аргинина в молекуле ингибитора получены в результате опытов по химической модификации функциональных групп ингибиторов. Например, модификация аргинина ингибитора Кунитца и куриного овомукоида 1,2-циклогександионом приводила к их инактивации [16,С.70].

То, что аргинин входит в состав реактивного центра других ингибиторов, показано анализом трехмерной структуры бифункционального ингибитора  $\alpha$ -амилазы/трипсина из проса (*Eleusine coracana Gaertneri*), в котором аргинин 34 расположен между двумя  $\alpha$ -спиралями, образуя трипсин связывающий участок [24].

Примером взаимодействия ингибитора с ферментом может служить структурная кристаллическая модель домена Кунитца-1 (КД-1) ингибитора-2 тканевого фактора свертывания крови. Были получены данные о механизме взаимодействия и роли некоторых аминокислот в этом процессе. Так остаток Арг-15 КД 1 взаимодействует с аспарагином-189, глицином-219, - 193 и серином-195 трипсина. Кроме того, остаток глутамина-192 S1 участка трипсина стабилизирует комплекс фермент-ингибитор [25].

Из выше представленного видно, что роль аргинина весьма важна в проявлении активности ингибиторов трипсина. Замена некоторых аминокислот может привести к изменению свойств ингибиторов. В работах по сайтспецифическому мутагенезу гена  $\alpha_1$ -антитрипсина тканей человека показано, что замена Мет-358 в участке связывания с эластазой (пролин-метионин-серин) на Арг-358 не только не снижает активность, но придает способность ингибировать тромбин. Кроме того, замена метионина на валин, лейцин, изолейцин и аланин делает устойчивым  $\alpha_1$ -антитрипсин к окислению, что немаловажно в процессе его использования в медицине [26].

В пшенице, кукурузе, ржи, рисе, ячмене и других растениях ингибиторы сериновых протеиназ имеют многокомпонентный состав, каждый ингибитор отличается по массе, заряду, содержанию аминокислот. В таблице 3 представлены данные о ИЭТ, молекулярной массе и количестве некоторых аминокислот ингибиторов из кукурузы (*Zea mays* L.) [27], пшеницы (*Triticum aestivum* L.), ржи (*Secale cereal*) и тритикале (*Triticale sp*) [28, 29, 30, 31, 32], гороха (*Pisum sp.*) [33], гречихи (*Fagopyrum esculentum*) [12, С.207] (*Brassica napus* var. *Oleifera*) [34]

Таблица 3 – Некоторые физико-химические свойства ингибиторов из семян культурных растений

Ингибиторы	Изоэлектрическая точка мономера	Молекулярная масса мономера кДа	Некоторые важнейшие аминокислоты
1	2	3	4
Кукуруза			
Ингибитор I химотрипсина	5,1	9,7	Арг; Лиз
Ингибитор II химотрипсина	4,6	9,5	Арг; Лиз
Пшеница			
Ингибитор субтилизина	7,2	20,2	Арг; Лиз
Ингибиторы трипсина	Около 8,0	11-12	Арг
Ингибиторы трипсина (из листьев)	5,8 – 6,2	19 и 21	Гликозильный остаток на N-конце
Ингибиторы химотрипсина	5,5 – 7,5	Около 20	-
Серпины ингибиторы (химотрипсина, катепсина G)	-	Более 40	Арг; Лей; Мет; Сер, Цис и Глю

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
Ячмень			
Ингибитор трипсина (тип Баумана-Бирка)	-	16	Арг
Рожь			
Ингибитор субтилизина	6,8	19,5	Арг; Лиз
Тритикале			
Ингибитор субтилизина	6,8	19,6	Арг; Лиз
Горох			
Ингибитор трипсина-1	менее 7	11,0	Цис
Ингибитор трипсина-2	менее 7	20,0	Цис
Гречиха			
Ингибитор трипсина (BWI-1c)	8,2-8,7	5,2	Арг; Лиз
(BWI-2c)	8,2-8,7	5,35	Арг; Лиз
(BWI-3c) так же химотрипсина и субтилизина	8,2-8,7	7,77	Арг; Лиз
(BWI-4c) так же химотрипсина и субтилизина	8,2-8,7	6,0	Арг; Лиз
Капуста			
Ингибитор трипсина	Около 8	6,7	Арг; Лиз; Цис

Из таблицы 3 видно, насколько разнообразны свойства некоторых ингибиторов трипсина, химотрипсина и субтилизина в важнейших злаковых и других культурах. Причем следует отметить то, что ингибиторы могут быть как кислыми, так и щелочными белками с ИЭТ от 4,6 до 8,7, с молекулярной массой от 5,2 до 20,2 кДа. В таблице 3 представлена только небольшая часть ингибиторов протеома семян важнейших сельскохозяйственных культур.

Протеом семян со временем изменяется под влиянием внутренних и внешних факторов. Растения не имеют иммунной системы, как животные, однако они все же способны реагировать на инвазии различными патогенами. Известно большое число белков, способных тем или иным способом приостанавливать рост и развитие патогенов в растениях. Многие противогрибковые белки обладают ингибиторной активностью, и наоборот, ингибиторы противогрибковыми свойствами. Мелентьеву с сотр. [35] удалось выделить ингибиторы трипсина с молекулярной массой мономера 18 кДа, обладающие гемагглютинирующей активностью и богатые содержанием глицина и цистеина, термостабильных и устойчивых при низких рН. Причем связывание аффинного углевода с ингибитором не влияло на антитрипсиновую активность, что, по-видимому, обусловлено наличием независимых центров связывания углевода и фермента. Так же, показано, что зерно кукурузы содержит белок массой 22 кДа, имеющий на 99 % сходство по аминокислотному составу с бифункциональным ингибитором  $\alpha$ -амилаза/трипсин из этой культуры и на 57 % гомологичный тауматину из картофеля. Этот белок эффективно подавлял рост грибов *Fusarium oxysporum* и *Alternaria solani* [36]. Chilos G. с сотр. [37] из зерна пшеницы выделили ингибитор трипсина, относящийся к группе ингибиторов Бумана-Бирка, который обладал сильной антигрибковой активностью, подавляя рост и ветвление грибов.

Регуляция ингибиторов сериновых протеиназ осуществляется различными путями. Например, некоторые ингибиторы томата управляются системой поранения, при повреждении тканей высвобождается фактор инициации протеазных ингибиторов (PIIF), который в свою очередь запускает целый каскад реакций, направленных на синтез ингибиторов. В тоже время синтез ингибиторов контролируется уровнем ясмониновой и абсцизовой кислот [38, 39].

Гены, кодирующие ингибиторы, не имеют интронов и в большинстве случаев образуют мультигенные семейства. «Двухголовые» ингибиторы типа Бауман-Бирка образуются за счет дубликации последовательностей трипсин/трипсин, трипсин/химотрипсин и трипсин/эластаза. Зрелый белок состоит из «кора», сшитого дисульфидными мостиками и высоковариабельными амино- и карбокси- участками молекулы. Примером может служить ингибитор химотрипсина Кунитца из сои, ген которого входит в семейство, состоящее из 4-х генов и 3-х псевдогенов [33, 38].

Использование ингибиторов в качестве молекулярно-генетических маркеров в селекции было детально изучено и оценено в работах А.В. Конарева [40, 41]. Им показана корреляция в изменчивости ингибиторов трипсинподобных протеиназ из различных сортов пшеницы с устойчивостью к зерновым вредителям [42, 43].

Свыше 14 белков – ингибиторов протеиназ уже синтезированы в различных культурных растениях. В подавляющем большинстве трансгенные растения, содержащие гены ингибиторов протеиназ, характеризовались повышенной устойчивостью к насекомым и другим вредителям. Например ген ингибитора сериновых протеиназ (СрPI), в сочетании с геном ингибитора цистеиновых протеиназ (ОС-I), дает наибольший эффект защиты томатов, риса от различных вредителей [14,С.200].

Таким образом, из приведенных в обзоре литературы данных видна значительная гетерогенность белковых ингибиторов протеиназ по свойствам, функциональной значимости и возможностям их прикладного использования.

### 1.1.2 Ингибиторы $\alpha$ -амилаз

Углеводы играют важную роль в растениях, являясь энергетическим и структурным компонентом клеток. Кроме того, сахара участвуют в фолдинге белка и сигнальной трансдукции. Изучение регуляции ферментов углеводного обмена имеет важное значение в понимании выше перечисленных процессов, а так же в механизмах защиты растений от патогенов.

Одними из важнейших ферментов, участвующих в углеводном обмене являются  $\alpha$ -амилазы [44]. Растения содержат огромное количество разнообразнейших ингибиторов  $\alpha$ -амилаз. Их подразделяют на семь типов, причем шесть из них обнаружены в высших растениях. Некоторые свойства этих белков представлены в таблице 4 [45, 46].

Таблица 4 – Структура и свойства  $\alpha$ -амилазных ингибиторов.

Тип ингибитора	Источник выделения	Количество аминокислотных остатков	Дисульфидные связи	Действие, $\alpha$ -амилаза	Аббревиатура или название
1	2	3	4	5	6
Легумин-лектиновый	Бобовые	240-250	5	Млекопитающих, насекомых, грибов	$\alpha$ -AI1, $\alpha$ -AI2
Кноттиновый	Амарант ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )	32	3	Насекомых	AAI

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6
Злаковый (СМ-белки)	Пшеница, кукуруза, ячмень, рожь, рис и др.	124-160	5	Насекомых, микро- организмов, млеко- питающих	0,19; 0,53; 0,28; WRP25- 27, RBI, BMAI-1
Кунитца	Пшеница, кукуруза, ячмень, рис и др.	176-181	1-2	Насекомых, злаковых	BASI, WASI, RASI
Томанитинов ый	Кукуруза	173-235	5-8	Насекомых	Зематин
$\gamma$ -Тиониновый ( $\gamma$ - пуротионинов ый)	Сорго	47-48	5	Насекомых	SI $\alpha$ 1, SI $\alpha$ 2, SI $\alpha$ 3
Микробный	<i>Streptomyces</i>	74-76	-	Микро- организмов, млеко- питающих	Haim, Paim, Tendamis- tat (НОЕ 467)
Целлюлозно- связывающий домен	<i>Trichoderma reesei</i>	36	-	Млеко- питающих	CBD
Циклодекстри ны (анти- $\alpha$ - амилазный ингибитор из свиньи)	Микробы	-	-	Микро- организмов	AMD7, AMD9, AMD10

Ингибиторы  $\alpha$ -амилазы из пшеницы довольно подробно изучены и описаны в работах [47 – 52].

Silano V. [47], на основании электрофоретических характеристик ингибиторов из альбуминовой фракции зерна пшеницы, подразделил их на три



семейства: 60 кДа, 24 кДа с относительной электрофоретической подвижностью (ОЭП) (0,19 единиц) и 12 кДа с ОЭП (0,28). Их содержание в муке достигает 1 %. Предварительное исследование фракции белков с м.м. 60 кДа показало, что она состоит из 80 % субъединиц с м.м. 12 кДа. Все представители этих семейств характеризуются термостабильностью, ИЭТ более 7, способностью образовывать ди-, три- и тетрамеры, благодаря наличию дисульфидных связей. Также была изучена способность ингибиторов трех семейств ингибировать  $\alpha$ -амилазы 58 животных и 8 сельскохозяйственных злаковых растений, который показали значительную активность по отношению к  $\alpha$ -амилазам из слюнных желез насекомых и млекопитающих. Образование комплекса фермент – ингибитор происходило при молярных соотношениях 1 к 2.

На основании изучения кинетики реакции ингибирования, Maeda и соотр. предположили [49], что ингибиторы (0,19 ед ОЭП) в начале образуют димер, а затем в таком виде взаимодействуют с ферментом. Тогда как ингибиторы семейства 0,28 независимо друг от друга образуют комплекс с  $\alpha$ -амилазой. Ингибитор 0,19 инактивирует только  $\alpha$ -амилазу мучнистого хрущача (*Tenebrio molitor* L.).

В ячмене содержатся ингибиторы эндогенных (собственных)  $\alpha$ -амилаз, что указывает на их регуляторную роль в гликолитическом обмене запасного полисахарида – крахмала. Кроме того, ингибиторы эндогенных  $\alpha$ -амилаз из других злаковых имеют 95 % гомологию N-конца полипептида, состоящего из 45 аминокислотных остатков [53].

Большинство ингибиторов эндогенных  $\alpha$ -амилаз активны против  $\alpha$ -амилазы 2 (Ами-2) с ИЭТ 6,0-6,5. Для ячменя показан полиморфизм этих ингибиторов с ИЭТ 5-8 и небольшим числом белков с ИЭТ около 3,5. Показана локализация генов, кодирующих эти ингибиторы. Расположены они на длинном плече 2 хромосомы ячменя, пшеницы и ржи. При изучении генотипов ячменя из Северной Америки и Европы, были обнаружены характерные для них аллельные формы, что предполагает их использование в генетике и селекции [54]. Аллельные варианты показаны для субъединиц VTAI-CMb1 и CMb2 тетрамерного ингибитора, с молекулярной массой мономера 12-16 кДа имеющего гликозильные остатки, из ячменя против  $\alpha$ -амилазы насекомых (*T. molitor* L.) [55].

Сравнительное изучение внутривидового полиморфизма ингибиторов  $\alpha$ -амилаз и их компонентного состава у разных видов позволили выдвинуть ряд интересных гипотез о происхождении системы ингибиторов у злаковых. Показано, что по мере эволюции происходило усложнение спектра ингибиторов, и наиболее полный спектр имеют мягкие гексаплоидные пшеницы [41].

Taufel A. и др. [56] из семян ржи выделили, изучили и подразделили ингибиторы на два типа: D и R. D-тип активный против экзогенных  $\alpha$ -амилаз, содержится преимущественно в зародыше и эндосперме, выполняя защитную функцию. Ингибиторы R-типа взаимодействуют с эндогенными  $\alpha$ -амилазами,

выполняя регуляторную функцию и содержатся в алейроновом слое. Обнаружена зависимость между активностью этих типов и погодными условиями. R-тип активен в генотипах ржи произрастающих в дождливую погоду и малоактивен в сухую, тогда как D-тип наиболее активен в прорастающих семенах при любых погодных условиях.

Тритикале является гибридом пшеницы и ржи, образуя гексаплоиды (AABBRR) и октоплоиды (AABBDDRR). Некоторые сорта тритикале обладали более высокой ингибиторной активностью, чем пшеница или рожь. При хроматографии на Биогеле Р-150 растворимых белков, у зерна тритикале, получены два пика: Т1 и Т2, причем Т1 с более высокой ингибиторной активностью и термолабильностью, чем Т2 [57].

Подавляющее большинство ингибиторов  $\alpha$ -амилаз в полипептидной цепи несет остатки цистеина, которые образуют дисульфидные мостики, обеспечивают термостабильность и поддерживают нативную конформацию белка. Кроме дисульфидных связей, конформация поддерживается ионными и гидрофобными силами [58].

Третичная и четвертичная структура  $\alpha$ -амилазного ингибитора семейства 0,19 из зерна пшеницы определена рентгеноструктурным анализом, с разрешением в 2,06 Å. Молекула состоит из 124 аминокислотных остатка, двух коротких антипараллельных  $\beta$ -структур, четырех  $\alpha$ -спиралей, 10 цистеинов, которые образуют дисульфидные связи. Активный центр ингибитора включает в себя остатки тирозина и аспарагина [59].

Некоторые биологически активные вещества, такие как  $\omega$ -агатоксин и  $\omega$ -конотоксин из яда пауков, а так же некоторые клеточные рецепторы, имеют значительные сходства в структуре молекул с ингибитором  $\alpha$ -амилазы ААІ [60].

Как и многие секретлируемые молекулы, некоторые ингибиторы  $\alpha$ -амилаз так же подвергаются посттрансляционной модификации. Так  $\alpha$ -АІ и  $\alpha$ -АІІ ингибиторы из семян бобов (*Phaseolus vulgaris*) были гликозилированы с С-конца по остаткам аспарагина и содержали высокоманнозные углеводные остатки. Следует также отметить то, что многие лектины РНА-Е гликозилированы подобным образом, что  $\alpha$ -АІ и АІІ [61].

Значительная гетерогенность ингибиторов  $\alpha$ -амилаз злаковых позволяет предположить, что их роль весьма значительна, как в жизни растений, так и их возможного применения в защите важнейших культур от различных вредителей. Также показана их регуляторная роль в процессе прорастания семени в зависимости от погодно-климатических условий.

### **1.1.3 Растительные бифункциональные ингибиторы сериновых протеиназ и $\alpha$ -амилаз**

Полифункциональность белков широко распространена в природе. Например каталитические антитела (абзимы) [62], кининоген из плазмы крови,

проявляющий активность ингибитора против цистеиновых протеиназ или фрагменты коллагена, также обладающие антипротеиназной активностью [63]. Ингибиторы многих протеиназ и  $\alpha$ -амилаз не являются исключением.

На сегодня известно большое число ингибиторов бифункциональной природы, которые способны ингибировать  $\alpha$ -амилазы и протеиназы, имея два активных центра на одной полипептидной цепи. Также встречаются ингибиторы, у которых на одной полипептидной цепи расположены центры, связывающие одну разновидность протеиназ. В таблице 5 представлены бифункциональные ингибиторы из пшеницы [64, 65, 66], проса (*Eleusine coracana Gaertneri*) [67, 68, 69], ячменя [70, 71], риса [72].

Таблица 5 – Некоторые физико-химические свойства бифункциональных ингибиторов злаковых

Название ингибитора (источник $\alpha$ -амилазы)	Источник ингибитора	Молекулярная масса, кДа	Изоэлектрическая точка	Количество аминокислотных остатков
$\alpha$ -амилаза/субтилизин (BASI) (ячмень)	Зерно пшеницы	21	7,2	188
$\alpha$ -амилаза/субтилизин (WASI) (пшеница)	Зерно пшеницы	20,5	7,2	187
$\alpha$ -амилаза/протеиназа К (PKI3) (пшеница)	Зерно пшеницы	19,6	выше 7	180
$\alpha$ -амилаза/трипсин (RBI) (пшеница)	Зерно проса	13,3	10	122
$\alpha$ -амилаза/субтилизин (BASI) (насекомые)	Зерно ячменя	19,8	7	182
$\alpha$ -амилаза/субтилизин (RASI) (злаковые)	Зерно риса	21	9,05	189
$\alpha$ -амилаза/трипсин (грибы)	Зерно кукурузы	22	-	198

Все представленные ингибиторы имеют значительное сходство, а их гомология первичной структуры может достигать 60 % [67].

Из зерна пшеницы выделен бифункциональный ингибитор способный ингибировать сериновые протеиназы – субтилизин и химотриписин (WSCI). Этот ингибитор содержит 72 аминокислотных остатка, среди них метионин и триптофан, м.м. 8126,3, ИЭТ – 5,8. Но по данным аффинной хроматографии и анализа последовательности, ингибитор имеет только один активный центр [73]. Это может свидетельствовать о том, что бифункциональность определяется, прежде всего, наличием отдельных активных центров связывания двух различных классов ферментов. Возникновение подобных структур, возможно, происходит в результате объединения двух близко расположенных генов различных ингибиторов.

Одним из важных аспектов понимания роли белка, является изучение структурной организации молекулы, которая во многом определяет его функциональное значение. Установлены вторичные и третичные структуры многих бифункциональных ингибиторов. Например: третичная структура молекулы ингибитора  $\alpha$ -амилазы/трипсина (RBI) из проса. Ингибитор состоит из 122 аминокислот, нативная конформация поддерживается 5 дисульфидными связями между 6-55, 29-85, 44-20, 45-103 и 57-114 аминокислотными остатками. Молекула RBI имеет форму глобулы с четырьмя спиральными мотивами между остатками 18-29, 37-51, 58-65 и 87-94. Фрагмент полипептидной цепи: (Вал 67-Сер 69 и Гли 73-Глю-75) образует  $\beta$ -складчатую антипараллельную структуру. Трипсин-связывающая петля имеет «каноническую», субстрат связывающую конформацию. Причем последовательность активного центра высоко консервативна среди ингибиторов сериновых протеиназ. Сюда также входят аминокислоты: (Гли 32, Про 33, Арг 34, Лей 35, Ала 36 и Трп 37). Связывающая петля стабилизирована двумя близлежащими  $\alpha$ -спиралями 1 и 2. Этот мотив новый и еще мало известный среди ингибиторов сериновых протеиназ. Амилаза-связывающий участок расположен напротив трипсин связывающей петли. Определение аминокислот ответственных за взаимодействие с  $\alpha$ -амилазой, изучалось их химической модификацией, которая показала, что Лиз 96, Трп 22 и Тир 23 в RBI участвуют в связывании  $\alpha$ -амилазы млекопитающих [24]. Образование дисульфидных связей катализируется дисульфид-изомеразой (DsbA). На примере с RBI было показано значение DsbA в правильной сборке дисульфидных связей ингибитора, которое обеспечивает его активность [69].

Другим примером может служить третичная структура PKI3, которая включает в себя шесть антипараллельных  $\beta$ -структур, две дисульфидные связи между Цис 42-89 и 143-147, поддерживающие нативную конформацию молекулы. Активный участок, связывающий протеиназу K, состоит из Гли 66 и Ала 67,  $\alpha$ -амилаза-связывающий – триптофан в составе Трп-Арг-Тир-пептида [66].

Изучение фермент-связывающих участков ингибитора ведется, как правило, несколькими способами, среди них часто используемый метод химической модификации аминокислотных остатков. Группа российских ученых из Института биохимии им. Баха Российской Академии наук провела

исследование бифункционального ингибитора  $\alpha$ -амилазы/субтилизина из пшеницы [74]. Ими было показано, что метионин в положении P1 ответственен за взаимодействие с субтилизином, кроме того один или два остатка триптофана принимают участие во взаимодействии ингибитора с  $\alpha$ -амилазой. Образование комплекса ингибитора с субтилизином защищало ингибитор от потери активности к протеиназе в процессе окисления [74].

Ранее было установлено [75], что в реактивных центрах ряда ингибиторов протеиназ, действующих на сериновые протеиназы микроорганизмов, в положении P1 находится метионин. К их числу относятся и некоторые ингибиторы, принадлежащие семейству цистеин-независимых ингибиторов протеиназ. У большинства ингибиторов в положении P2 – остаток тирозина, P6 – глицина, P6' – аргинина, P3 – лейцина или валина. Важно так же то, что P6' – аргинин образует водородные связи с P2 – тирозином. Все это указывает на возможное родство бифункциональных ингибиторов, как между собой, так и с некоторыми белками, входящими в состав класса «цистеин-независимых ингибиторов» [75].

Обработка ингибитора из ячменя BAsI специфическими реагентами (1,2-циклогександион и фенилглиоксаль) модифицирующими аргинин, гистидин, метионин и тирозин показало, что аргинин участвует во взаимодействии ингибитора с ячменной  $\alpha$ -амилазой 2. Комплекс  $\alpha$ -амилаза-BAsI защищает 4 остатка аргинина от окисления фенилглиоксалем. По данным кристаллографического анализа была построена трехмерная структура комплекса  $\alpha$ -АМИ2-BAsI. Ингибитор взаимодействует с тремя аминокислотами каталитического участка фермента с участием ионов кальция. Причем, для большинства комплексов  $\alpha$ -амилаза/ингибитор показано сходство в образовании комплексов, в которых участвуют, со стороны фермента остатки глутамина с группами (-COO<sup>-</sup>), а со стороны ингибитора – аргинин с группой (-NH<sup>+</sup>), в результате между ними образуется связь [76].

Семейство ингибиторов Баумана-Бирка характеризуется наличием двух реактивных центров на одной полипептидной цепи молекулы по отношению к трипсину и химотрипсину или эластазе, имеют молекулярную массу около 8 кДа. Характеризуются высоким содержанием цистеина (7 и более остатков на один полипептид), и отсутствием аминокислотных остатков триптофана и тирозина. Иногда встречаются ингибиторы, содержащие два домена на одну полипептидную цепь и активных только по отношению к трипсину [77]. Ингибиторы этого семейства были выделены из различных растений и показаны их физико-химические свойства. В таблице 6 представлены ингибиторы семейства Баумана-Бирка, для которых характерно наличие на одной полипептидной цепи двух активных центров, из сои (*S.Odani*), садовой фасоли (*Phaseolus vulgaris*), из лимской фасоли (*Phaseolus lunatus*), китайской вигны (*Vigna sinensis*), земляного ореха (*Arachis hypogaea*), проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.), рисовых отрубей, проса (*Eleusine coracana Gaertneri*) и семян растения (*Setaria italica*) [78].

Таблица 6 – Физико-химические свойства ингибиторов семейства Баумана-Бирка из различных растений

Название ингибитора, протеиназа/протеиназа	Источник ингибитора	Молекулярная масса кДа	Изоэлектрическая точка	Количество аминокислотных остатков
1	2	3	4	5
ВВІ-А, трипсин/химотрипсин или эластаза или плазмин	Соя	7,9	3,95	71
SBI-B, трипсин/химотрипсин или эластаза	Соя	7,8	3,42	71-72
SBI-C-II, трипсин/химотрипсин	Соя	8,0	4,7-4,8	76
GBI-I, трипсин/химотрипсин	Садовая фасоль	8,0	4,0	74
ИТФ-5,1, трипсин/химотрипсин	Садовая фасоль	10,0	5,1	98
LBI-I, трипсин/химотрипсин или эластаза или катепсин G	Лимская фасоль	9,0	-	73
ВЕРСІ, трипсин/химотрипсин	Китайская вигна	8,0	5,1-6,5	83
СРІ, трипсин/химотрипсин	Земляной орех	7,4-7,7	Около 9,0	66
Группа изоингибиторов I-2, трипсин/трипсин	Проростки пшеницы	14,5	-	123

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5
Группа изоингибиторов II-4, трипсин/трипсин	Проростки пшеницы	7,0	-	61
RVTI, трипсин/трипсин	Рисовые отруби	14,5	8,07	133
FMPI-I-III, трипсин/трипсин	Проса	7,2	-	67
BVVI Трипсин/трипсин	Ячмень	16	-	125

Особый интерес представляют бифункциональные ингибиторы, обладающие способностью подавлять активность как  $\alpha$ -амилаз, так и протеиназ. Эти ингибиторы, скорее всего, выполняют в растениях защитную функцию, ингибируя экзогенные ферменты. Также, благодаря наличию второго активного центра, взаимодействующего с протеиназами, эти ингибиторы могут быть использованы в защите растений от патогенов. В связи с этим изучение свойств, функций и возможностей практического применения этих белков весьма актуально.

## 1.2 Физиологическая роль и регуляция ингибиторов сериновых протеиназ и $\alpha$ -амилаз в растениях

Молекулярная структура достаточно подробно описана для многих ингибиторов [77,С.45]. Однако регуляция большинства ингибиторов в процессе созревания и прорастания семян не полным образом освещена в литературе. Однозначно дана оценка их роли в растениях, которая, прежде всего, сводится к защите растения от патогенов и регуляции ферментативной активности [14,С.195].

Известно, что растения поражаются множеством патогенных микроорганизмов – грибов, бактерий, вирусов. Различные насекомые и паразитические черви, которые, вызывая заболевания и нередко гибель растения, наносят сельскому хозяйству большой экономический ущерб. Однако при заражении растений инфекционными агентами не все растения одной популяции или вида заболевают. Это связано с наличием фитоиммунитета – способности противостоять патогену [16,С.30]. Защитные механизмы выработались в процессе длительного сосуществования хозяина и паразита.

Важнейшими составляющими всех действующих механизмов защиты являются вещества белковой природы. В их число входят ферменты – глюканы, хитиназы и ингибиторы протеаз и  $\alpha$ -амилаз. Например, повреждение листьев томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) насекомыми или микроорганизмами индуцировало синтез более двадцати различных белков, включая ингибиторы сериновых, цистеиновых и аспартильных протеиназ и  $\alpha$ -амилаз [14,С.195].

В таблице 7 представлены специфические ингибиторы растений, экспрессирующиеся при поражении растений насекомыми [45,С.398].

Таблица 7 – Ингибиторы растений активные по отношению к  $\alpha$ -амилазам насекомых

Ингибитор	Источник ингибитора	Насекомое, против $\alpha$ -амилаз которых активны ингибиторы
$\alpha$ -AI1	<i>P. vulgaris</i>	<i>Callosobruchus maculatus</i> , <i>Callosobruchus chinensis</i> , <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> , <i>Tenebrio molitor</i> , <i>Hypothenemus hampei</i>
$\alpha$ -AI2	<i>P. vulgaris</i>	<i>Callosobruchus maculatus</i> , <i>Zabrotes subfasciatus</i>
0,19	<i>T. aestivum</i>	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> , <i>Callosobruchus maculatus</i> , <i>Acanthoscelides obtectus</i> , <i>Sitophilus oryzae</i> , <i>Tenebrio molitor</i> , <i>Tribolium castaneum</i>
0,28	<i>T. aestivum</i>	<i>Acanthoscelides obtectus</i> , <i>Tenebrio molitor</i>
0,53	<i>T. aestivum</i>	<i>Callosobruchus maculatus</i> , <i>Tenebrio molitor</i> , <i>Acanthoscelides obtectus</i> , <i>Zabrotes subfasciatus</i>
1,2,3	<i>S. cereal</i>	<i>Acanthoscelides obtectus</i> , <i>Tenebrio molitor</i>
ВIII	<i>S. cereal</i>	<i>Zabrotes subfasciatus</i> , <i>Acanthoscelides obtectus</i>
Zeamatin	<i>Z. mays</i>	<i>Tribolium castaneum</i> , <i>Sitophilus zeamais</i> , <i>Rhyzoperta dominica</i>

Как и в случае с насекомыми, ингибиторы протеиназ способны подавлять активность ферментов фитопатогенных микроорганизмов. Так ингибиторы трипсина и химотрипсина из сои, фасоли и картофеля способны подавлять