

<https://doi.org/10.15407/frg2019.06.508>

УДК 581.19:633.1

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА β -1,3-ГЛЮКАНАЗЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

А.А. ХАКИМЖАНОВ, А.О. АБАЙЛДАЕВ, В.А. КУЗОВЛЕВ

*Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина
Министерства образования и науки Республики Казахстан
050012 Алматы, ул. Досмухамедова, 86
e-mail: a.khakhimzhanov@mail.ru*

Исследован изоферментный состав β -1,3-глюканазы проростков пшеницы. По данным нативного изоэлектрофокусирования (ИЭФ), в стебле и корне семисуточных проростков фермент представлен 7–8 изоформами с широким диапазоном pI — от 3,5 до 9,0. В прорастающем зерне спектр менее гетерогенен и состоит только из кислых и щелочных форм (до 5 компонентов). Выявлены различия в локализации β -1,3-глюканаза: щелочные и нейтральные изоферменты сосредоточены внутри клеток, а кислые — преимущественно в межклеточнике. Изоформы фермента обладали разной устойчивостью к повышенной температуре. Щелочные компоненты более термостабильны и выдерживали 10-минутный прогрев при 60 °С, тогда как кислые и нейтральные инактивировались при этой температуре. Прогрев при 70 °С полностью подавлял активность фермента. Активность β -1,3-глюканазы зависит от наличия катионов металлов. Выраженным ингибирующим эффектом обладали катионы меди, в то время как другие исследованные катионы — Ca^{2+} , Ba^{2+} и в меньшей степени Mg^{2+} — повышали активность фермента.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., проростки, β -1,3-глюканаза, изоферменты.

β -1,3-Глюканаза (КФ 3.2.1.39) расщепляет внутренние β -1,3-связи в β -D-глюканах и принимает участие в таких физиологических процессах, как прорастание семян, развитие проростков, старение органов, образование пыльцы, формирование каллозы при поранении и др. [2, 8, 13]. Другой важной функцией фермента является участие в защите растений от различных патогенов — вирусов, бактерий, грибов. Активность этого фермента значительно изменяется при патогенной атаке и может повышаться многократно [6, 12, 14]. Выявлена строгая компартиментация двух основных форм β -1,3-глюканазы — внутриклеточная (в вакуоле, цитозоле) и внеклеточная, сосредоточенная в межклеточном пространстве (апопласте). Для обеих форм установлены отличительные свойства и особенности функционирования в норме и при патогенезе [5, 7, 19].

© А.А. ХАКИМЖАНОВ, А.О. АБАЙЛДАЕВ, В.А. КУЗОВЛЕВ, 2019

β -1,3-Глюканазы подавляют рост болезнетворных грибов, так как их субстраты — β -полиглюканы — являются одними из основных структурных компонентов клеточных стенок патогенов. Другой и главный полисахарид грибных стенок — хитин — разрушается хитиназами. В ряде исследований показан синергизм в действии β -1,3-глюканаз и хитиназ, усиливающий лизисный эффект [16]. Кроме того, в результате гидролиза образуются олигосахаридные элиситоры, запускающие защитные реакции растения [4]. Оба фермента входят в состав обширного семейства защитных PR (связанных с патогенезом) белков, при этом β -1,3-глюканазы относятся ко второй группе этих белков (PR-2) [9].

В составе растительных β -1,3-глюканаз насчитывается несколько (до 10) изоформ, имеющих широкий диапазон изоэлектрических точек — в кислой, щелочной и нейтральной средах (pH от 3,5 до 10), а их молекулярная масса варьирует от 30 до 40 кД. По структурным различиям β -1,3-глюканазы растений подразделяются на три основных класса, отличающихся по ферментативной и антифунгальной активности [13, 14, 16]. Столь высокий полиморфизм фермента обусловлен, в первую очередь, сложной организацией естественных высокополимерных субстратов — β -глюканов и их разнообразных олигосахаридных производных [11]. Дополнительные сложности при изучении фермента накладываются существованием конститутивных и индуцибельных форм, тканевой специфичности, а также гормональным и метаболитным контролем активности [20]. К настоящему времени β -глюканазный комплекс наиболее изучен в табаке, а среди злаковых растений — у ячменя. Для пшеницы сведения по составу, физико-химическим свойствам и регуляции фермента остаются крайне ограниченными.

Цель работы состояла в изучении особенностей изоферментного состава β -1,3-глюканазы в органах проростков пшеницы в норме, а также некоторых свойств фермента.

Методика

Объектами исследования служили зерновки, корни и стебли проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Шортландинская). Для получения проростков зерновки стерилизовали 5 %-м раствором пероксида водорода в течение 15 мин, промывали дистиллированной водой и проращивали в термостате при 24 °С в течение 7 сут. Ферменты экстрагировали на холоду 0,05 М натрийацетатным буфером (pH 5,0) в соотношении растительный материал : буфер = 1 : 3.

Для определения активности β -1,3-глюканазы к 0,1 мл 0,5 %-го ламинарина (Sigma-Aldrich, США) приливали 0,8 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 5,2) и 0,1 мл ферментного образца, смесь инкубировали 1 ч при 37 °С с перемешиванием. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 3,5-динитросалициловой кислоты, смесь кипятили 10 мин, охлаждали и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g. Оптическую плотность надосадочной жидкости измеряли на спектрофотометре Ultrospec 7000 («GE Healthcare», Швеция) при 540 нм [7]. Образовавшееся количество глюкозы определяли по калибровоч-

ному графику. Активность фермента выражали в микрограммах глюкозы за 1 ч в 1 мл. Удельную активность рассчитывали в единицах активности на 1 мг белка, который определяли по Лоури.

Внутриклеточную (вакуолярную) и внеклеточную (апопластную) β -1,3-глюканазу выделяли одним из общепринятых способов [15]. Для инфильтрации межклетника в колбу Бунзена на 300 мл помещали 100—150 мл дистиллированной воды с 8—10 г стеблей. Содержимое колбы подвергали разрежению 1 кПа с помощью вакуумного насоса PC 2001 Vario («Vacuubrand», Германия) в течение 30—40 мин. После этого стебли переносили в пробирки на 50 мл и центрифугировали 15 мин при 4 °С со скоростью, не выше 2000 g. Жидкость, скапливающаяся на дне пробирки, содержала апопластный, а экстракт из «выжатых» стеблей — вакуолярный фермент.

Нативное изоэлектрофокусирование β -1,3-глюканазы проводили в пластине 6 %-го ПААГ размером 90×120×1 мм с 1 % Servalyt (pH 3—10) («Serva», Германия) при 600 В в течение 5 ч на приборе Multiphor II («GE Healthcare», Швеция). После окончания ИЭФ пластину ПААГ помещали в 0,1 М раствор натрий-ацетатного буфера (pH 5,0) на 10 мин. Затем пластину переносили в 1 %-й раствор ламинарина в том же буфере на 30—40 мин (в зависимости от активности фермента) и инкубировали при 40 °С. После этого ПААГ дважды отмывали дистиллированной водой и переносили в 7 %-й раствор уксусной кислоты на 10 мин. После промывки водой гель помещали в окрашивающий раствор — 0,15 % 2,3,5-трифенилтетразолиум хлорид (Sigma-Aldrich, США) в 1 М NaOH. Процедуру окрашивания осуществляли при нагревании на водяной бане до появления красноватых зон активности β -1,3-глюканазы (от 3 до 10 мин) [17]. В качестве маркеров *rI* использовался набор белков (Sigma-Aldrich, США): 9,3 — трипсиноген, 8,8; 8,6; 8,2 — лектин, 6,8; 7,2 — миоглобин, 6,6; 5,9 — карбоангидраза, 5,1 — β -лактоглобулин, 4,6 — ингибитор трипсина, 3,6 — амилоглюкозидаза. Гели хранили в 7 %-м растворе уксусной кислоты.

Эксперименты и измерения ферментной активности проводились в трех повторностях. Результаты обработаны статистически с вычислением стандартной погрешности среднего.

Результаты и обсуждение

Зерновки пшеницы проращивали в течение 7 сут в термостате при 24 °С. Через 3, 5 и 7 дней из стеблей и корней проростков получали ферментные экстракты. Методом ИЭФ изучали изменчивость изоферментного спектра (рис. 1). Установлено, что по мере развития проростка в обоих органах повышалась активность и гетерогенность β -1,3-глюканазы. Дальнейшее проращивание не приводило к существенному изменению спектра. Стебли и корни в целом имели очень похожий набор, состоящий из 7—8 мажорных изоферментов в кислой, нейтральной и щелочной средах. Отличительной особенностью корней был синтез на 7-е сутки одного дополнительного компонента с *rI* около 7,8—8,0, который отсутствует у стеблей. Таким образом, β -1,3-глюканаза из проростков пшеницы имеет достаточно сложный

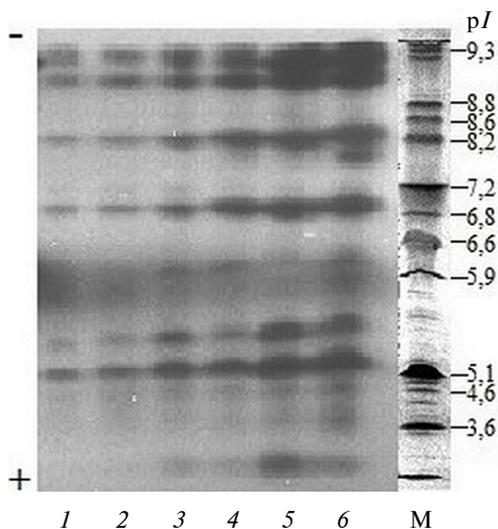


Рис. 1. Спектр ИЭФ β -1,3-глюканазы 3-, 5- и 7-суточных проростков пшеницы:

1–3 — соответственно стебель, 4–6 — корень. Здесь и на рис. 2—5: М — маркеры pI

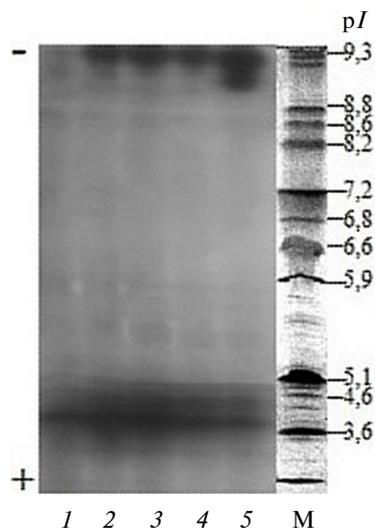


Рис. 2. Спектр ИЭФ β -1,3-глюканазы прорастающего зерна:

1–5 — соответственно сутки прорастания

изоферментный состав с широким диапазоном изоэлектрических точек (приблизительно от 3,5 до 9,0).

Изучено изменение активности и изоферментного состава β -1,3-глюканазы в прорастающем зерне пшеницы. Ферментные экстракты получали на 1–5-е сутки прорастания и анализировали с помощью ИЭФ (рис. 2). Следует отметить, что в покое зерне очень низкое содержание β -1,3-глюканазы, синтез фермента наблюдался при его прорастании. Сначала (через 1 день) синтезировался один кислый изофермент, через 2 дня появлялись еще два кислых компонента и один щелочной, на 5-й день синтезировалась вторая щелочная изоформа. Как видно из спектра, в отличие от стебля и корня β -1,3-глюканаза зерна практически не содержит нейтральных изоформ.

Изучено влияние гибберелловой кислоты на активизацию β -1,3-глюканазы в отдельных частях зерновки. Изолированный алейроновый слой и зародыши (места синтеза ферментов при прорастании) и целые зерновки инкубировали 36 ч при наличии 1 мкМ ГК. Контролем служили варианты без добавления гормона. Из приведенного на рис. 3 спектра ИЭФ видно, что ГК стимулировала активацию нижней щелочной изоформы в алейроне и синтез кислых изоферментов в целом зерне, тогда как в зародыше, напротив, активизация верхнего щелочного компонента подавлялась. Учитывая отсутствие кислых изоформ в алейроне и зародыше и их наличие в целом зерне, обработанном ГК, можно предположить, что этот фермент секретируется в эндосперм при прорастании.

Изоформы β -1,3-глюканазы отличаются по своей тканевой и клеточной локализации. Известны внутриклеточные (вакуолярные) и внеклеточные (апопластные) формы фермента. Накопление фермента в межклеточной жидкости часто происходит при внешних стрес-

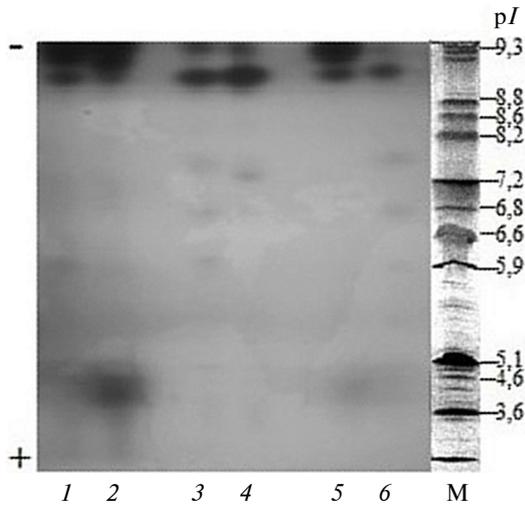


Рис. 3. Влияние гиббереллина на изоферментный состав β -1,3-глюканазы в изолированных частях зерновки:

1, 2 — целые зерновки; 3, 4 — алейроновый слой; 5, 6 — зародыши соответственно без добавления ГК и при наличии 1 мкМ ГК

совых воздействиях, в частности, при поражении патогенами. Эти особенности локализации и количественного распределения предполагают различия в защитных функциях β -1,3-глюканазы. Мы определили уровни абсолютной и удельной (в пересчете на общий белок) внутри- и внеклеточной глюканазной активности семисуточных проростков пшеницы. В количественном отношении вакуолярный фермент превосходил апопластный в 4 раза, однако его удельная активность — только в 1,5 раза (рис. 4, а, б). Установлено, что внутри клеток сосредоточены щелочные и нейтральные, а в

межклеточной жидкости — в основном кислые изоферменты β -1,3-глюканазы с pI 4,0—5,5 (см. рис. 4, в).

Важной характеристикой ферментов является термостабильность. В связи с этим исследована чувствительность β -1,3-глюканазы и ее изоформ к повышенной температуре. Для этого фермент из проростка прогревали в течение 10 мин при 50, 60 и 70 °С. После прогрева образцы быстро охлаждали и центрифугировали для удаления денатурированных белков. Контролем являлся непрогретый фермент. Измерение активности и ИЭФ показало наличие в составе β -1,3-глюканазы относительно термостабильных и термолабильных изо-

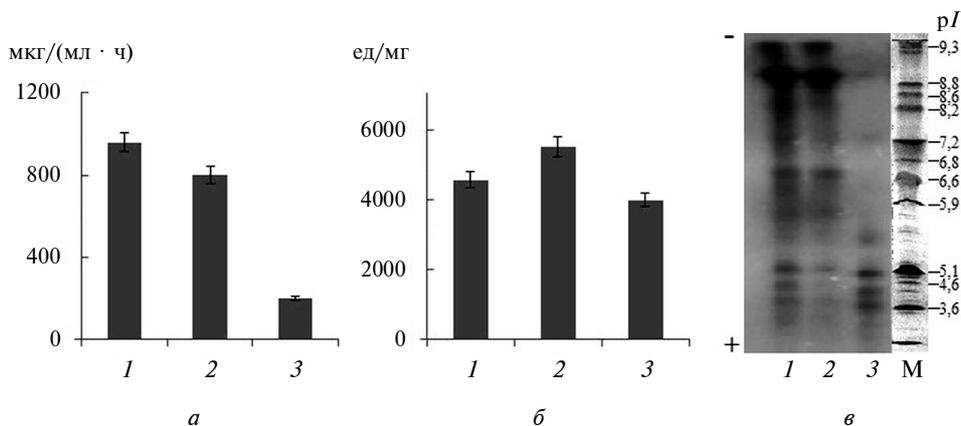


Рис. 4. Активность (а, б) и спектр ИЭФ (в) внутриклеточной и внеклеточной β -1,3-глюканазы стебля проростка:

1 — общая; 2 — апопластная; 3 — вакуолярная β -1,3-глюканаза

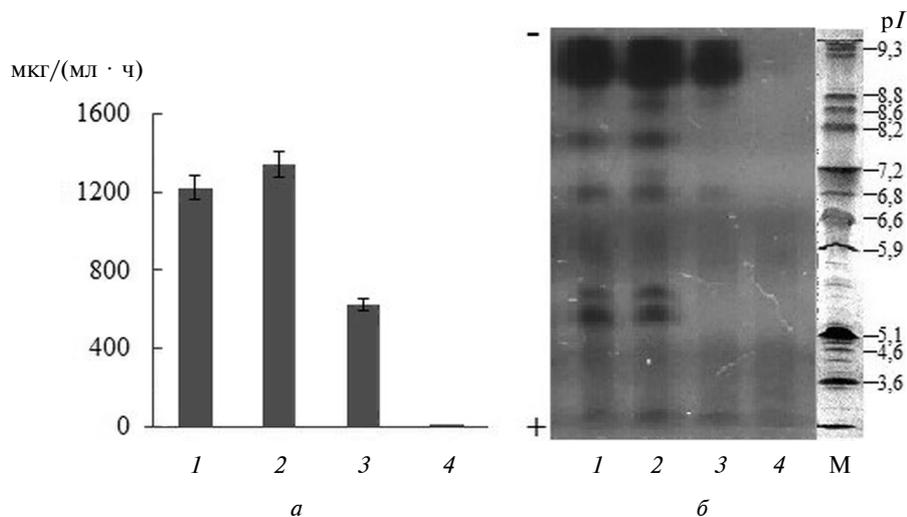


Рис. 5. Влияние повышенной температуры на активность (а) и ИЭФ спектр (б) β -1,3-глюканазы стеблей при 30 (1), 50 (2), 60 (3) и 70 °С (4)

ферментов. После прогрева при 50 °С наблюдалось некоторое повышение активности всех без исключения компонентов, однако прогрев при 60 °С выдерживали только щелочные изоформы с pI около 9,0 (рис. 5). При прогреве 70 °С происходила полная инактивация фермента.

Весьма важным фактором проявления и регуляции ферментной активности являются катионы металлов. Кроме того, атомы металлов могут входить в состав самих молекул ферментов. К сожалению, в литературе отсутствуют сведения относительно содержания металлов в структуре β -1,3-глюканазы злаковых растений, крайне ограничены данные и по действию металлов на активность фермента. В связи с этим мы изучали влияние разных концентраций двухвалентных катионов Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} и Cu^{2+} на активность β -1,3-глюканазы проростков пшеницы. Металлы в среду инкубации фермента с субстратом вносили в концентрации 1, 5 и 10 мМ. Кроме того, ферментный образец предварительно инкубировали с катионами в течение 10 мин. Были выявлены существенные различия в действии разных металлов на активность β -1,3-глюканазы проростков пшеницы (рис. 6). Ингибиторным эффектом обладала медь, при ее концентрации 10 мМ происходила почти полная инактивация фермента. Напротив, катионы Ca^{2+} и Ba^{2+} повышали активность β -1,3-глюканазы уже при концентрации 5 мМ. Активирующее действие катионов Mg^{2+} проявлялось только при их концентрации 10 мМ.

Приведенные в работе данные свидетельствуют о значительной гетерогенности β -1,3-глюканазы в проростках пшеницы. В стеблях и корнях семисуточных проростков фермент представлен 7–8 изоформами с широким диапазоном pI — от 3,5 до 9,0. В прорастающем зерне (до 5 компонентов) содержались только щелочные и кислые формы. ГК стимулировала активацию β -1,3-глюканазы в алейроновом слое, но подавляла образование фермента в зародыше. Ранее другими исследователями было установлено наличие до 7 экстрацел-

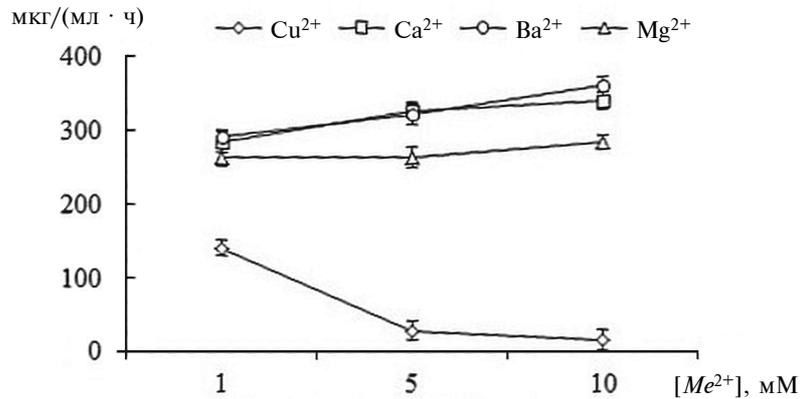


Рис. 6. Влияние катионов металлов на активность β -1,3-глюканазы стебля проростка

люлярных β -1,3-глюканаз в листьях взрослого растения пшеницы, пораженного стеблевой ржавчиной. Эти формы также обладали широким спектром pI и имели мол. м. от 29 до 32 кД [19]. В нашей работе показано, что щелочные изоферменты стебля сосредоточены внутри клеток, а кислые — в межклеточной среде. Эти данные хорошо согласуются с закономерностями локализации β -1,3-глюканаз, выявленными ранее для растений овса и табака [7, 19]. В другом исследовании, проведенном на зараженных фузариумом проростках пшеницы, показано влияние смещения pH под действием гриба на активацию и ингибирование апопластной β -1,3-глюканазы с нейтральными pI (6,5–7,0) [1]. По нашим данным, в апопласте неинкулированных проростков преимущественно содержатся кислые изоформы фермента.

β -1,3-Глюканазы пшеницы обладали разной устойчивостью к повышенной температуре. Наибольшую термостабильность проявляли щелочные (вакуолярные) изоферменты, которые выдерживали прогрев при 60 °С в течение 10 мин. Кислые (апопластные) и нейтральные изоферменты более термолабильные и инактивировались при этой температуре. Обработка при 70 °С приводила к полной инактивации фермента. Активность β -1,3-глюканазы пшеницы зависит от наличия катионов металлов. Среди изученных металлов ингибирующим эффектом обладали катионы меди, в то время как другие катионы — Ca^{2+} , Ba^{2+} и в меньшей степени Mg^{2+} — повышали активность фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (проект № AP05133823).

REFERENCES

1. Aleandri, M. P., Magro, P. & Chilosi, G. (2008). Influence of environmental pH modulation on efficiency of apoplastic PR proteins during *Fusarium culmorum* — wheat seedling interaction. *Plant Pathol.*, 57, pp. 1017-1025. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01859.x>
2. Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J. & Sakthivel, N. (2012). Plant β -1,3-glycanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnol. Lett.*, 34(11), pp. 1983-1990. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1012-6>

3. Barber, M.G., Jackson, E.A. & Smith, D.B. (1994). Total and individual barley (1–3), (1–4)- β -D-glucanase activities in some green and kilned malts. *J. Inst. Brew.*, 100, pp. 91-97. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1994.tb00812.x>
4. Boller, T. (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, pp. 189-214. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.46.060195.001201>
5. Burton, R., Qi, Z., Roulin, S. & Fincher, G.B. (1998). Gene structure and a possible cytoplasmic location for (1-3)- β -glucanase isoenzyme GI from barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Sci.*, 135, pp. 39-47. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00068-5)
6. Caruso, C., Chilosi, G., Caporale, C., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P. & Buonocore, V. (1999). Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Sci.*, 140, pp. 107-120. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00199-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00199-X)
7. Fink, W., Liefland, M. & Mendgen, K. (1988). Chitinases and β -1,3-glucanases in the apoplastic compartment of oat leaves (*Avena sativa* L.). *Plant Physiol.*, 88, pp. 270-275. <https://doi.org/10.1104/pp.88.2.270>
8. Finnie, C., Bak-Jensen, K., Laugesen, S., Roepstorff, P. & Svensson, B. (2006). Differential appearance of isoforms and cultivar variation in protein temporal profiles revealed in the maturing barley grain proteome. *Plant Sci.*, 170, pp. 808-821.
9. Gorganovich, S. (2009). Biological and technological function of barley seed pathogenesis-related proteins (PRs). *J. Inst. Brew.*, 115(4), pp. 334-360. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00389.x>
10. Hrmova, M. & Fincher, G.B. (1993). Purification and properties of three (1-3)- β -D-glucanase isoenzymes from young leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. J.*, 289, pp. 453-461. <https://doi.org/10.1042/bj2890453>
11. Jamar, C., Jardin, P. & Fauconnier, M.-L. (2011). Cell wall polysaccharide hydrolysis of malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 15(2), pp. 301-313.
12. Ji, C. & Kuc, J. (2002). Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 49 (4), pp. 257-265.
13. Leubner-Metzger, G. (2003). Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci. Res.*, 13, pp. 17-34. <https://doi.org/10.1079/SSR2002121>
14. Li, W.L., Faris, J.D., Muthukrishnan, S., Liu, D.J., Chen, P.D. & Gill, B.S. (2001). Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theor. Appl. Genet.*, 102, pp. 353-362. <https://doi.org/10.1007/s001220051653>
15. Rohringer, R., Ebrahim-Nesbat, F. & Wolf, G. (1983). Proteins in intercellular washing fluids from leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.*, 34, pp. 1589-1605.
16. Sharma, V. (2013). Pathogenesis related defence function of plant chitinases and β -(1,3)-glucanases. *Vegetos.*, 26, pp. 205-218. <https://doi.org/10.5958/j.2229-44-73.26.29.141>
17. Shen, Q. Pan, Xiang, S.Ye. & Kuc, J. (1991). A technique for detection of chitinase, β -1,3-glucanases, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. *Phytopathology*, 9 (9), pp. 970-974.
18. Sock, J., Rohringer, R. & Kang, Zh. (1990). Extracellular β -1,3-glucanases in stem rust-affected and abiotically stressed wheat leaves. *Plant Physiol.*, 94, pp. 1376-1389. <https://doi.org/10.1104/pp.94.3.1376>
19. Van den Bulcke, M., Bauw, G., Castresana, C., van Montagu, M. & Vandekerckhove, J. (1989). Characterization of vacuolar and extracellular β -(1,3)-glucanases of tobacco: Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, pp. 2673-2677. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2673>
20. Wu, C. & Bradford, K.J. (2003). Class I Chitinase and β -1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene and gibberellin in tomato seeds and leaves. *Plant Physiol.*, 133, pp. 263-273. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024687>

Received 01.10.2019

ІЗОФЕРМЕНТНИЙ СКЛАД І ДЕЯКІ ВЛАСТИВОСТІ β -1,3-ГЛЮКАНАЗИ
ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ

А.А. Хакімжанов, А.О. Абайлдаєв, В.А. Кузовлев

Інститут молекулярної біології і біохімії ім. М.А. Айтхожина Міністерства освіти і науки Республіки Казахстан, Алмати

Досліджено ізоферментний склад β -1,3-глюканази проростків пшениці. За даними нативного ізоелектрофокусування (ІЕФ), у стеблі й корені семидобових проростків фермент представлений 7–8 ізоформами з широким діапазоном pI — від 3,5 до 9,0. У проростаючому зерні спектр менш гетерогенний і складається тільки з кислих і лужних форм (до 5 компонентів). Виявлено відмінності в локалізації β -1,3-глюканаз: лужні і нейтральні ізоферменти зосереджені всередині клітин, а кислі — переважно в міжклітиннику. Ізоформи ферменту мали різну стійкість до підвищеної температури. Лужні компоненти більш термостабільні і витримували 10-хвилинний прогрів за 60 °С, тоді як кислі й нейтральні інактивувались при цій температурі. Прогрів за 70 °С повністю пригнічував активність ферменту. Активність β -1,3-глюканазі залежить від наявності катіонів металів. Виражений інгібувальний ефект мають катіони міді, тоді як інші досліджені катіони — Ca^{2+} , Ba^{2+} і меншою мірою Mg^{2+} — підвищували активність ферменту.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., проростки, β -1,3-глюканаза, ізоферменти.

ISOENZYME COMPOSITION AND SOME PROPERTIES OF β -1,3-GLUCANASE
OF WHEAT SEEDLINGS

A.A. Khakimzhanov, A.O. Abaildaev, V.A. Kuzovlev

M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan
86 Dosmuhamedov St., Almaty, 050012, Kazakhstan
e-mail: a.khakimzhanov@mail.ru

The isoenzyme composition of β -1,3-glucanase of wheat seedlings was studied. According to the data of native isoelectric focusing, in the stem and root of 7-day-old seedlings the enzyme is represented by 7–8 isoforms with a wide pI range from 3.5 to 9.0. In germinating seed the spectrum is less heterogeneous and consisted only of acidic and alkaline forms (up to 5 components). Differences in the localization of β -1,3-glucanases were revealed: alkaline and neutral isoenzymes are located inside the cells, and acidic isoenzymes mainly in the intercellular space. Isoforms of the enzyme had different resistance to elevated temperature. Alkaline components are more thermostable and withstand heating for 10 min at 60 °C, while acidic and neutral have been inactivated at this temperature. Heating at 70 °C completely inhibited the enzyme activity. The activity of β -1,3-glucanase depends on the presence of metal cations. Copper cations had a pronounced inhibitory effect, while other studied cations — Ca^{2+} , Ba^{2+} and to a lesser extent Mg^{2+} — increased the enzyme activity.

Key words: *Triticum aestivum* L., seedlings, β -1,3-glucanase, isoenzymes.