

УДК 577.152.3

ИНГИБИТОР ХИМОТРИПСИНА И ТРИПСИНА ИЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

© 2011 г. Т. А. Ревина, И. А. Парфёнов, Е. Л. Гвоздева, Н. Г. Герасимова, Т. А. Валуева

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 31.05.2010 г.

Из клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова) выделен и очищен до гомогенного состояния белок, обозначенный как РКСИ-23 (potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor). Очистку белка проводили с помощью методов гель-хроматографии на сефадексе G-75 и ионообменной хроматографии на КМ-сефарозе CL-6В. Белок РКСИ-23 с одинаковой степенью эффективности подавлял активность химотрипсина и трипсина, образуя с ферментами эквимоллярные комплексы. Значительно слабее он действовал на субтилизин Карлсберг. Определена N-концевая 20-членная аминокислотная последовательность белка РКСИ-23. Показано, что ингибитор РКСИ-23 в различной степени угнетает рост и развитие патогенных микроорганизмов *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. и *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, поражающих картофель.

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) относится к числу ведущих и наиболее ценных продовольственных культур в большинстве стран мира, занимающая одно из важнейших мест среди продуктов питания, так как достаточно дешев и обладает относительно высокой питательной ценностью [1]. В настоящее время в связи с необходимостью повышения качества питания, включающее снижение калорийности пищи и увеличение содержания полноценного белка, вносятся серьезные коррективы и в селекцию картофеля, направленные на создание сортов с пониженным содержанием крахмала [2].

Ранее из клубней картофеля сорта Истринский, характеризующийся высоким содержанием крахмала (до 20%), нами были выделены несколько белков, один из которых (PSPI-21) подавлял активность ряда сериновых протеиназ клана химотрипсина (эластазы из лейкоцитов человека (HLE), трипсина и химотрипсина) [3], другой (PK-SI) – специфически действовал на субтилизин [4], а третий (PKTI-22) – на трипсин [5]. Белки были отнесены к подсемейству картофельных ингибиторов протеиназ типа Кунитца (PKPI, potato Kunitz-type proteinase inhibitors) и локализованы в различных структурных группах, на которые белки PKPI были разделены на основании особенностей их N-концевых аминокислотных последовательностей [6]. Так, белки PSPI-21 и PKTI-22 принадлежали к группе PKPI-B, белок PKSI – к группе PKPI-C. Было показано, что все три белка подавляют рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов, поражающих растение картофеля

[3–5], а некоторые из них накапливаются в инфицированных клубнях [7]. Таким образом, можно с большой степенью вероятности заключить, что изученные белки-ингибиторы играют важную роль в защите растения от атаки патогенными микроорганизмами.

Новый сорт картофеля Юбилей Жукова, в настоящее время районированный и возделываемый в Московской области, является сортом столового назначения. Для него характерно невысокое содержание крахмала (до 14%). Кроме того, растения картофеля этого сорта обладают повышенной устойчивостью к вирусным заболеваниям и поражению фитопатогенными микроорганизмами [2]. В связи с этим определенный интерес представляет изучение белковых ингибиторов, присутствующих в клубнях данного сорта картофеля, и их роли как в повышении его питательной ценности, так и в защитных процессах растения.

Цель работы – выделение из клубней картофеля сорта Юбилей Жукова белка, действующего как ингибитор химотрипсина, изучение его свойств и определение N-концевой аминокислотной последовательности.

МЕТОДИКА

В работе использовали клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова), которые хранили в течение 2–4 мес в темноте при 4°C, а также трипсин (КФ 3.4.21.4, “Spofa”, Чехия), дополнительно перекристаллизованный из сульфата магния, α-химотрипсин (КФ 3.4.21.1, “Serva”, Гер-

мания), субтилизин Карлсберг (КФ 3.4.21.14, “Sigma” США), папаин (КФ 3.4.22.1, “Calbiochem”, США) и в качестве субстратов – казеин (НПО “Биолар”, Латвия) и *n*-нитроанилиды: *N*-сукцинил-L-глицил-L-глицил-L-фенилаланина (СукГГФПА), *N*α-бензоил-L-аргинина (БАПА), *N*-карбобензоксид-L-аланил-L-аланил-L-лейцина (КбзААЛПА) и L-пироглутамил-L-фенилаланил-L-лейцина (ПгФЛПА) (“Calbiochem”, США). В работе использовали сефадексы G-75 и G-25, КМ-сефарозу CL-6В и низкомолекулярные белки-маркеры фирмы “Pharmacia” (Швеция).

Белки из сока клубней картофеля осаждали (NH₄)₂SO₄. Осадок растворяли в 0.05 М бикарбонате аммония, pH 7.8 и подвергали гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-75, как описано ранее [4]. Фракции, содержащие белки с молекулярной массой 20–25 кДа, объединяли и лиофильно высушивали.

Белки с молекулярной массой 20–25 кДа (35 мг) растворяли в 2.5 мл 0.04 М ацетатного буфера, pH 4.3 и наносили на колонку (0.5 × 15 см) с КМ-сефарозой CL-6В, уравновешенную тем же буфером. Сорбент промывали стартовым буфером до полного удаления материала, поглощающего при 280 нм. Связавшийся с ионообменником белок элюировали линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 0.5 М в стартовом буфере. Во фракциях элюента определяли активности ингибиторов химотрипсина, трипсина и субтилизина Карлсберг. Фракции, содержащие материал с максимальной активностью ингибитора химотрипсина, объединяли, обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали.

Диск-электрофорез в 20%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na и β-меркаптоэтанола проводили по Лэммли [8]. Гели окрашивали 0.1%-ным раствором кумасси R-250 в 25%-ном растворе этанола, содержащем 5% формальдегида.

Молекулярные массы ингибитора и его комплексов с ферментами определяли методом высокоэффективной гель-хроматографии (ВЭГХ) на жидкостном хроматографе Стайер (“Аквилон”, Россия), используя колонку Bio Sep-Sec-S-200 (300 × 7.8 мм, “Phenomenex”, США). Гель уравновешивали 0.02 М КН₂РО₄-буфером, pH 7.0, содержащим 0.1 М NaCl. Белок (0.7 мг/мл) растворяли в стартовом буфере, наносили на колонку Bio Sep-Sec-S-200 и элюировали тем же буфером. Для получения комплексов белок (0.7 мг/мл) инкубировали с трипсином или химотрипсином (0.5 мг/мл) в течение 10 мин при комнатной температуре. Для определения тройного комплекса использовали

смесь, содержащую равные количества (0.5 мг/мл) белка, трипсина и химотрипсина.

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Брэдфорд [9] с использованием в качестве стандарта БСА.

Секвенирование белков осуществляли на секвенаторе 470А (“Applied Biosystems”, США) по стандартной программе 02 RPTH [10]. Для идентификации фенилтиогидантоиновых производных аминокислот использовали ВЭЖХ в обращенной фазе на колонке с сорбентом С18 (“Applied Biosystems”) в 20%-ном ацетонитриле. Детекцию производных аминокислот осуществляли на проточном абсорбциометре 757 (“Cratos”, США).

Активность ингибитора оценивали по степени подавления активности соответствующих ферментов. Активность ферментов определяли по скорости гидролиза казеина [11] и хромогенных субстратов: для химотрипсина использовали СукГГФПА, трипсина – БАПА, субтилизина – КбзААЛПА и для папаина – ПгФЛПА [12–15]. Амидолитическую активность сериновых протеиназ измеряли в 0.05 М трис-НСl-буфере, pH 8.0, при 37°C, используя 1.0 мМ соответствующего хромогенного субстрата (*n*-нитроанилида пептида) в 1.0 мл конечного объема пробы. Концентрация ферментов в пробе составляла для химотрипсина, трипсина и субтилизина 1.0, 1.5 и 2.0 нМ соответственно. Реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 30%-ной уксусной кислоты и определяли оптическую плотность раствора при 405 нм. Концентрацию активных центров химотрипсина определяли титрованием *N*-транс-циннамоилимидазолом [16], трипсина *n*-нитрофенил-*n*'-гуанидинобензоатом [17]. Для определения концентрации активного ингибитора и равновесных констант ингибирования (*K_i*) химотрипсин (1.0 нМ) или трипсин (1.5 нМ) инкубировали с возрастающими концентрациями ингибитора в 0.2 мл того же буфера при 37°C в течение 5 мин. Остаточную активность фермента оценивали, как описано выше. Кажущуюся *K_i* определяли с использованием компьютерной программы Enzfitter [18], принимая при этом, что взаимодействие ингибитора с ферментом протекает по механизму медленного компактного связывания.

Для определения pH-стабильности раствор белка (0.15 мг/мл) инкубировали в течение 20 ч при 4°C и различных значениях pH: 2.0; 4.0; 6.0; 10.0 и 12.0 (универсальный буфер Джонсона–Линдсея). По окончании инкубации пробы разводили 0.1 М трис-НСl-буфером, pH 8.0, (до концентрации белка 0.03 мг/мл) и определяли активность ингибитора по отношению к химотрипсину, используя в качестве субстрата СукГГФПА.

Термостабильность белка изучали при значениях pH 2.0 и 6.0. Раствор белка (0.15 мг/мл) инкубировали в течение 10 мин на водяной бане при различных значениях температур: 50, 60, 70, 80 и 90°C. Затем пробы быстро охлаждали на льду, разводили 0.1 М трис-НСI-буфером, pH 8.0, (до концентрации белка 0.03 мг/мл) и оценивали активность ингибитора по отношению к химотрипсину, как описано выше.

Влияние белка на рост и развитие макроконидий гриба *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. и зооспор оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary изучали с помощью метода, описанного в работе [19]. Количество растущих и лизированных макроконидий и зооспор и длину образующихся гиф определяли с помощью микроскопа "Laboval" (Германия). В качестве контроля использовали суспензии макроконидий и зооспор без добавления белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Белки с молекулярной массой 20–25 кДа выделяли из сока клубней картофеля сорта Юбилей Жукова, используя солевое осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и гель-хроматографию на колонке с сефадексом G-75, как описано в работе [4]. Эти белки разделяли с помощью ионообменной хроматографии на КМ-сефарозе CL-6В при pH 4.3, используя линейный градиент концентрации NaCl от 0 до 0.5 М (рис. 1). Видно, что связавшиеся с сорбентом белки разделялись на три основных компонента, обозначенных I, II и III. Все три белковых компонента обладали активностью ингибиторов протеиназ. Они эффективно подавляли активности химотрипсина и трипсина, в то же время значительно слабее действовали на субтилизин Карлсберг и практически не угнетали активность цистеновой протеиназы – папаина.

Электрофоретическое исследование полученных компонентов в ДДС-Na-ПААГ в присутствии восстановителя показало, что только компонент III, элюировавшийся при концентрации NaCl, равной 0.38 М, содержал единственный белок с молекулярной массой 23 ± 1 кДа (рис. 2). Таким образом, можно сделать заключение, что в составе компонента III присутствовал в основном белок, обозначенный как РКСИ-23 (potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor), молекула которого состоит из одной полипептидной цепи.

Гомогенность белка РКСИ-23 была подтверждена результатами определения N-концевой аминокислотной последовательности. Были осуществлены 20 стадий автоматической деградации по Эдману, позволившие идентифицировать его первые

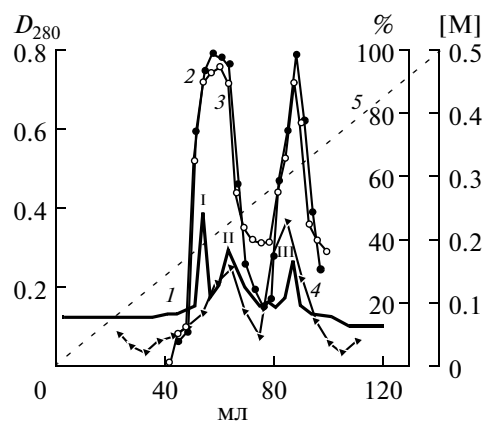


Рис. 1. Ионообменная хроматография на КМ-сефарозе CL-6В белков с молекулярной массой 20–25 кДа из клубней картофеля, I–III — белковые компоненты; 1 — D_{280} ; 2–4 — степень ингибирования трипсина, химотрипсина и субтилизина соответственно (%); 5 — концентрация NaCl (М). Для определения активности ферментов использовали в качестве субстрата казеин.

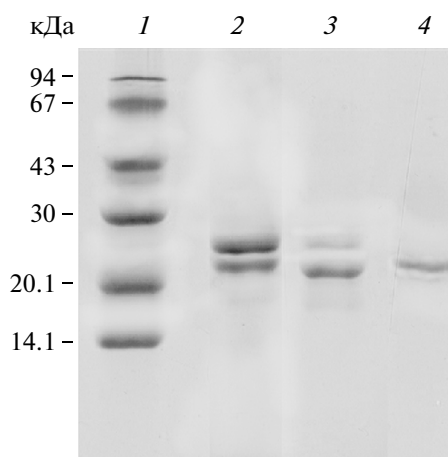


Рис. 2. ДДС-Na-ПААГ-электрофорез компонентов, полученных после ионообменной хроматографии на КМ-сефарозе CL-6В; 1 — белки-маркеры (кДа): фосфоорилаза b (94), БСА (67), яичный альбумин (43), карбоангидраза (30), соевый ингибитор трипсина Кунитца (20.1), лактальбумин (14.4), 2–4 — компоненты I–III соответственно.

20 аминокислотных остатков. На рис. 3 приведено сравнение установленной N-концевой последовательности белка РКСИ-23 с последовательностями трех белков PSPI-21-6.3, PKTI-22 и PKSI, выделенных нами ранее из клубней картофеля сорта Истринский [3–5]. Видно, что последовательности белков РКСИ-23, PSPI-21-6.3 и PKTI-22 значи-

10 20
1 - P S D A T P V L D - G G K E L D S R L S Y . .
2 L P S D A T P V L D V T G K E L D P R L S Y . .
3 L P S D A T P V L D V T G K E L D S R L S Y . .
4 L V L P E V Y D Q D G N P L R I G E R Y I I . .

Рис. 3. Сравнение N-концевых аминокислотных последовательностей белков из клубней картофеля: 1 – РКСИ-23 (данная работа), 2 – РКТИ-22 [5], 3 – ПСПИ-21-6.3 [3], 4 – ПКСИ [4]. Различающиеся остатки выделены жирным шрифтом.

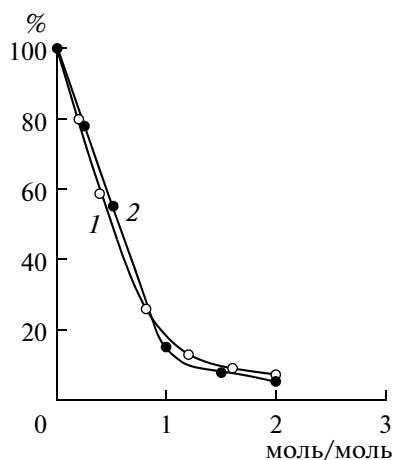


Рис. 4. Влияние белка РКСИ-23 на активность трипсина (1) и химоотрипсина (2). Измеряли остаточную активность ферментов (% от исходной) при различных соотношениях ингибитор/фермент. Для определения активности трипсина и химоотрипсина использовали в качестве субстратов БАПА и СукГГФПА соответственно.

тельно отличались от последовательности белка РКСИ, что указывает на их принадлежность к различным структурным группам ингибиторов РКПИ. В работе [4] было показано, что белок РКСИ, действующий как специфический ингибитор субтилизина, входит в состав группы РКПИ-С. В то же время первые 9 аминокислотных остатков белков РКСИ-23, ПСПИ-21-6.3 и РКТИ-22 полностью совпадали. Эти остатки обнаружены в последовательностях всех белков структурной группы РКПИ-В и являются консервативными [6]. Таким образом, белок РКСИ-23 следует отнести именно к этой структурной группе.

Результаты изучения влияния ингибитора РКСИ-23 на активность химоотрипсина и трипсина приведены на рис. 4. Видно, что белок в равной степени эффективно подавлял активность обоих ферментов. Зависимости степени их ингибирования

от количества внесенного ингибитора сохраняли линейный характер практически до полного угнетения (рис. 4, кривые 1 и 2). Однако видно, что с химоотрипсином белок РКСИ-23 связывается несколько сильнее, чем с трипсином, поскольку для него линейный характер данной зависимости сохраняется на более протяженном участке вплоть до 85% ингибирования. Расчеты показали, что с 1 молем ингибитора связывается 1 моль как химоотрипсина, так и трипсина. В то же время ингибитор слабо действовал на активность субтилизина Карлсберг и не действовал на цистеиновую протеиназу папаин. Равновесную константу диссоциации ($K_i = 0.3 \pm 0.1$ нМ) комплекса химоотрипсин–РКСИ-23 рассчитывали на основании результатов определения степени подавления возрастающими количествами ингибитора активности фермента при гидролизе СукГГФПА (0.3 мМ). Для трипсина значение K_i , рассчитанное при гидролизе БАПА (1.35 мМ), составило величину, равную 1.2 ± 0.1 нМ. Таким образом, это подтверждает заключение о том, что белок РКСИ-23 сильнее связывает химоотрипсин, чем трипсин.

При ВЭГХ на колонке Bio Sep-Sec-S-200 ингибитор РКСИ-23 элюировался в виде одного гомогенного белкового компонента. Рассчитанное значение его молекулярной массы 23 ± 1 кДа соответствовало величине, определенной методом ДДС-На-ПААГ-электрофореза. Совпадение значений молекулярной массы, полученных двумя различными способами, подтверждало высказанное ранее предположение о том, что молекула белка состоит из одной полипептидной цепи. При ВЭГХ смесей, содержащих избыток белка РКСИ-23 и химоотрипсина или трипсина, в элюатах присутствовали дополнительно более тяжелые компоненты. Их молекулярные массы составляли величины 46 и 45 (± 1) кДа, что практически равно сумме молекулярных масс белка РКСИ-23 и химоотрипсина/трипсина соответственно. Этот результат подтверждает сделанное выше заключение о том, что ингибитор образует комплексы, содержащие одну молекулу ингибитора и одну молекулу фермента. Таким образом, выделенный белок РКСИ-23 образовывал с обоими ферментами стехиометрические комплексы (моль/моль), устойчивые в условиях ВЭГХ. При ВЭГХ смесей, содержащих избыток белка РКСИ-23, химоотрипсина и трипсина, элюировался только один тяжелый компонент с молекулярной массой 63 ± 1 кДа, представляющий собой, вероятнее всего, тройной комплекс ингибитора с ферментами, в котором с одной молекулой белка РКСИ-23 связывались одновременно одна молекула химоотрипсина и одна молекула трипсина. Это давало основание предположить, что ингибитор является

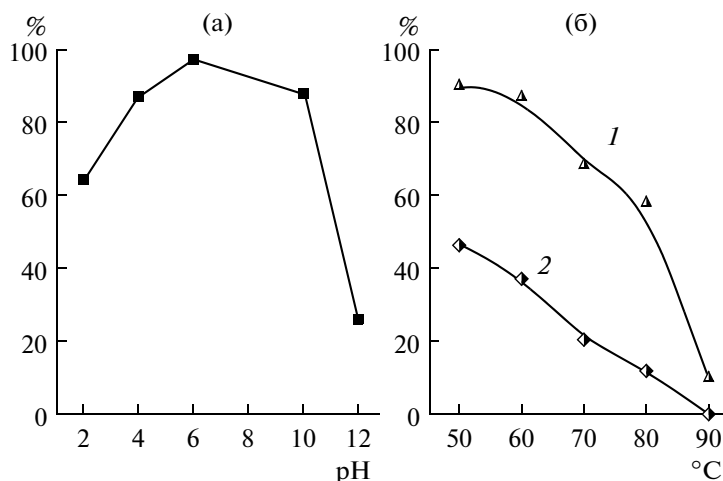


Рис. 5. Зависимость активности белка РКСИ-23 по отношению к химотрипсину от pH (а) и температуры (б). Инкубация при pH 6.0 (1) и pH 2.0 (2). В качестве субстрата использовали СукГГФПА. Измеряли степень ингибирования фермента (%).

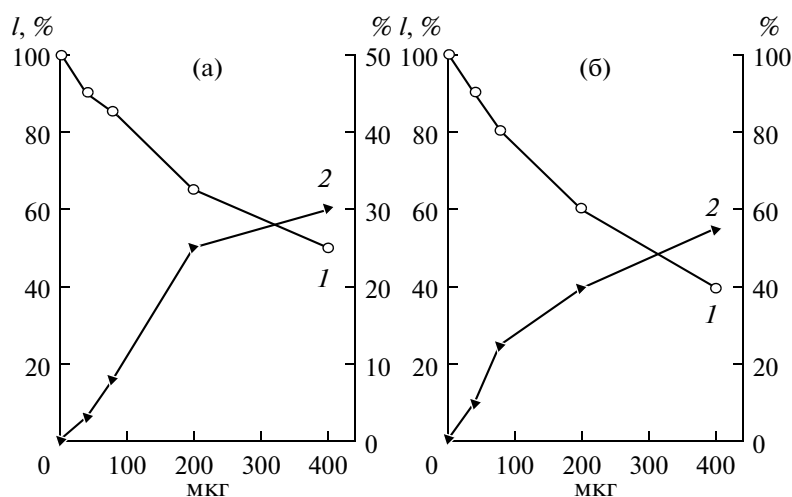


Рис. 6. Влияние белка РКСИ-23 на рост гиф и повреждение макроконидий гриба *F. culmorum* (а) и зооспор оомицета *P. infestans* (б): 1 – длина гиф (левая шкала, l, % от контроля); 2 – количество лизированных макроконидий или зооспор (правая шкала, % от контроля). Приведены средние значения трех независимых экспериментов со стандартной ошибкой от 2 до 10%.

“двуглавым” и содержит два независимых реактивных центра, ответственных за связывание каждой из этих протеиназ.

Известно, что многие ингибиторы сериновых протеиназ обладают высокой устойчивостью к воздействию различных денатурирующих факторов [20]. В связи с этим представляло определенный интерес изучение pH- и термостабильности белка РКСИ-23, результаты которого представлены на рис. 5. Видно, что при 20 ч инкубации белка при различных значениях pH наблюдалось определен-

ное снижение его активности по отношению к химотрипсину, наиболее выраженное при pH 2.0 и 12.0 (рис. 5а), где ее потеря составила 30 и 70% соответственно. Нагревание белка РКСИ-23 от 50 до 90°C в течение 10 мин приводило к значительному снижению активности ингибитора по отношению к химотрипсину как при pH 6.0, так и при pH 2.0. При этом при 90°C ингибитор практически полностью терял свою активность. Таким образом, имелись все основания предположить, что при кислых и щелочных значениях pH, а также при высоких

температурах среды белок РКСИ-23 теряет конформацию нативной молекулы.

Ранее мы наблюдали накопление некоторых белков-ингибиторов РКПИ при инфицировании клубней картофеля сорта Истринский оомицетом *P. infestans* [7]. Было показано, что эти белки не только *in vitro* подавляют активность экзопроотеиназ, секретлируемых патогенными микроорганизмами [21, 22], но и угнетают рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов [5]. В связи с этим представлялось интересным исследовать действие на рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов белка РКСИ-23, выделенного из картофеля сорта Юбилей Жукова, который обладает к ним повышенной устойчивостью. На рис. 6 представлены результаты изучения влияния белка РКСИ-23 на рост гиф и развитие макроконидий гриба *F. culmorum* и зооспор оомицета *P. infestans* (Mond.) de Vary. Гриб *F. culmorum* вызывает у растения картофеля фузариозное увядание, а оомицет *P. infestans* — фитофтороз. Оказалось, что при добавлении 400 мкг белка РКСИ-23 длина растущих гиф гриба уменьшалась на 40% по сравнению с контролем (рис. 6а, кривая 1). При этом более чем 50% макроконидий подвергались повреждению (рис. 6а, кривая 2). В то же время при той же концентрации белка РКСИ-23 длина гиф оомицета уменьшалась только на 20% (рис. 6б, кривая 1) и разрушению подвергались всего 30% его зооспор (рис. 6б, кривая 2). Эти свидетельства о том, что белок РКСИ-23 слабее действовал на рост и развитие оомицета, чем гриба.

Таким образом, из клубней картофеля сорта Юбилей Жукова выделен высокоочищенный белок РКСИ-23, который действовал, как эффективный ингибитор химотрипсина и трипсина, а также подавлял рост и развитие двух фитопатогенных микроорганизмов, поражающих растение картофеля. Можно предположить, что белок РКСИ-23 наряду с другими известными факторами включен в защитную систему картофеля. Поскольку белок РКСИ-23 утрачивал активность при инкубации в кислых и щелочных средах и при повышенных температурах, имеются все основания предполагать, что его присутствие в клубнях не снижает питательную ценность картофеля данного сорта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Симаков Е.А., Яшина И.М. // Картофелеводство. 2008. Т. 14. С. 304–315.
2. Королёв Д.Д. В кн. Картофель и топинамбур — продукты будущего / Ред. В.И. Старовойтов М.: ФГНУ “Росинформагротех”, 2007. 237 с.
3. Valueva T.A., Revina T.A., Mosolov V.V., Mentele R. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 2000. V. 381. № 12. P. 1215–1221.
4. Ревина Т.А., Сперанская А.С., Кладницкая Г.В., Шеллевец А.Б., Валуева Т.А. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1345–1352.
5. Ревина Т.А., Кладницкая Г.В., Герасимова Н.Г., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А. Биохимия. 2010. Т. 75. № 1. С. 46–52.
6. Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K. // Plant Cell Physiol. 1994. V. 35. № 2. P. 303–312.
7. Валуева Т.А., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л. // Биоорганическая химия. 2003. Т. 29. № 5. С. 499–504.
8. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
9. Appenroth K.J., Angsten H. // Biochem. Physiol. Pflanzen. 1987. V. 182. № 1. P. 85–89.
10. Левина Н.Б., Слепак В.З., Киселёва О.Г., Шемякин В.В., Хохлачёв А.А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 24–31.
11. Нортрон Д., Кунитц М., Херриотт Р. // Кристаллические ферменты / Ред. В.Н. Орехович М.: Иностранная литература, 1950. С. 303–306.
12. Kakade M.L., Simons N., Liener I.E. // Cereal Chem. 1969. V. 46. № 5. P. 518–526.
13. Bieth J., Wermuth C.G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. V. 53. № 2. P. 383–390.
14. Люблинская Л.А., Якушева Л.Д., Степанов В.М. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 273–279.
15. Filippova I.Ju., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 203–297.
16. Shonbaum G.R., Lerner B., Bender M.Z. // Biol. Chem. 1961. V. 236. № 11. P. 2930–2935.
17. Chase T., Shaw E. // Meth. Enzymol. 1970. V. 19. P. 20–27.
18. Knigh C.G. // Proteinase Inhibitors / Eds. A.J. Barret, G.R. Salvesen Amsterdam: Elsevier, 1986. P. 23–51.
19. Ревина Т.А., Герасимова Н.Г., Кладницкая Г.В., Чаленко Г.И., Валуева Т.А. // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 1. С. 101–105.
20. Ohtsubo K. // Agric. Biol. Chem. 1989. V. 53. № 2. P. 333–339.
21. Иевлева Е.В., Ревина Т.А., Кудрявцева Н.Н., Софьин А.В., Валуева Т.А. // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 3. С. 338–344.
22. Гвоздева Е.Л., Волоцкая А.В., Софьин А.В., Кудрявцева Н.Н., Ревина Т.А., Валуева Т.А. // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. С. 572–579.

Chymotrypsin and Trypsin Inhibitor Isolated from Potato Tubers

T. A. Revina, I. A. Parfenov, E. L. Gvozdeva, N. G. Gerasimova, and T. A. Valueva

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Received May 31, 2010

Abstract—Potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor (PKCI-23) was isolated from potato tubers (*Solanum tuberosum* L., Zhukov's Jubilee breed) and purified to a homogenous state. The protein was purified by gel-filtration chromatography and ion-exchange chromatography using Sephadex G-75 and CM-Sepharose CL-6B, respectively. PKCI-23 protein has been shown to inhibit both chymotrypsin and trypsin with equal efficacy, forming equimolar complexes with these enzymes. However, much weaker inhibitory effect of PKCI-23 has been observed for *Carlsberg* subtilisin. The N-terminal 20 amino acid sequence of PKCI-23 has been sequenced. PKCI-23 has been shown to suppress, with different efficacy, the growth and development of pathogenic microorganisms *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary that infect potato.