

А. А. ХАКИМЖАНОВ, Б. ТИЛЕГЕН, Н. С. МАМЫТОВА,
В. А. КУЗОВЛЕВ, О. В. ФУРСОВ

(РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии
им. М.А.Айтхожина» КН МОН РК, г. Алматы)

ИНГИБИРОВАНИЕ α -АМИЛАЗЫ ИЗ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ ФИТАТОМ НАТРИЯ

A. A. Khakimzhanov, B. Tilegen, N. S. Mamytova, V. A. Kuzovlev, O. V. Fursov

(“M.A.Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry” CS MES RK, Almaty)

INHIBITION OF α -AMYLASE FROM WHEAT GRAIN WITH SODIUM PHYTATE

Keywords: wheat, α -amylase, isozymes, phytate, inhibition.

Abstract: The essential differences in the action of sodium phytate on the activity of the two groups of α -amylase isozymes of wheat were established. Phytate largely inhibited germination α -amylase (group AMY1). In contrast, isozymes AMY2 weakly suppressed by this compound. The inhibitory effect of phytate on the α -amylase activity comparable with the other divalent metal chelator – EDTA- Na_2 .

Аннотация

Установлены существенные различия в действии фитата натрия на активность двух групп изоферментов α -амилазы зерна пшеницы. Фитат в большей степени ингибировал α -амилазу прорастания (группа Ами1). Напротив, изоферменты Ами2 слабо подавлялись этим соединением. Ингибиторное действие фитата на активность α -амилазы сопоставимо с действием другого хелатора двувалентных металлов – ЭДТА- Na_2 .

Ключевые слова: пшеница, α -амилаза, изоферменты, фитат, ингибирование.

Кілт сөздер: бидай, α -амилаза, изоферменттер, фитат, ингибирлену.

В семенах злаковых α -амилаза выполняет важную роль при прорастании и развитии проростка, осуществляя гидролиз крахмала до легкоусвояемых сахаров. Пшеничная α -амилаза представлена двумя основными группами – α -Ами1, или α -амилаза «прорастания» и α -Ами2 (α -амилаза «созревания»), различающимися по своим свойствам и функционированию в зерновке [1].

Важными регуляторами α -амилазы, как и любого другого ферментного белка, являются активаторы и ингибиторы различной природы. К числу первых, прежде всего, относится Ca^{2+} , который входит в состав молекулы фермента и необходим для проявления каталитической активности. Поскольку α -амилаза – металлсодержащий фермент, ее активность может регулироваться *in vitro* такими синтетическими хелатами, как ЭДТА, ЭГТА, БАПТА [2]. В качестве агентов с подобными свойствами могут выступать и некоторые природные органические кислоты, среди которых фитиновая кислота и ее соли – фитаты, являющиеся важнейшим в зерне резервом магния, кальция и неорганического фосфата [3,4].

В зернеу большинства злаковых (рожь, ячмень, пшеница, рис) фитин в виде глобонидов встречается в алейроновом слое, тогда как, например, у кукурузы – в зародышевой части [5,6]. На долю фитина может приходиться до 80% этих веществ от их общего содержания в зерновке. Химически фитин представляет собой конгломерат кальциевых и магниевых солей фитиновой кислоты – миоинозитгексафосфат, трудно растворимый в воде. Именно из-за свойства фитиновой кислоты образовывать комплексы с катионами двувалентных металлов, в том числе Ca^{2+} и Zn^{2+} , часто дефицитных для организма, данное вещество принято относить к антинутриентам [6]. С другой стороны, компоненты фитата (минералы, фосфор, мезоинозит) представляют собой очевидную биологическую ценность.

В связи с принципиальной ролью α -амилазы во многих технологических процессах, например, в хлебопечении и пивоварении, выявление и изучение регуляторов активности этого фермента имеет несомненную практическую значимость. В период прорастания оба процесса – синтез α -амилазы и дезагрегация фитина с высвобождением растворимого фитата происходят одновременно и локализованы в алейроне. В связи с этим возможное взаимодействие фитата и α -амилазы в самом зерне представляет определенный научный интерес. В нашей работе исследовано действие фитата натрия на активность пшеничной α -амилазы и ее изоферментных групп.

Материалы и методы

В работе использовали зерно пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казахстанская 10. α -Амилазу из проросшего (4 суток) зерна пшеницы получали методом гликогеновой преципитации в 40% этаноле по методу, описанному в руководстве [8].

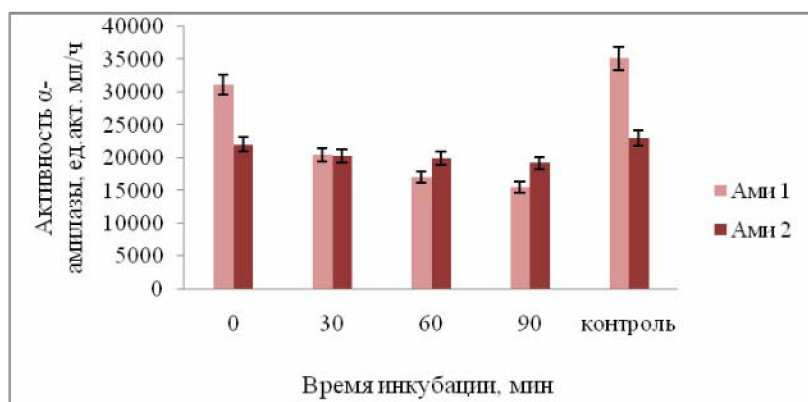
Разделение на группы Ами 1 и Ами 2 проводили ионообменной хроматографией на СМ-сефарозе (размер колонки 1,2?6 см), уравновешенной 0,02 М Na-ацетатным буфером pH-5,2. Элюирование α -амилазы вели ступенчатым градиентом – сначала стартовым буфером, а затем 0,08 и 0,2 М буфером. По данным нативного электрофореза фракции с 0,08 М буфером содержали только изоферменты Ами 2, а фракции с 0,2 М буфером – изоферменты Ами 1. Изолированные группы α -амилазы диализовали против 1 мМ раствора CaCl_2 , концентрировали на ячейке Amicon (Millipore, США), фильтр PM-10 и хранили при +4°C для дальнейшего использования.

Определение активности α -амилазы проводили с помощью колориметрического крахмал-йодного метода, описанного в руководстве [8].

Результаты и обсуждение

В предварительных экспериментах было выяснено, что коммерческий препарат фитина из рисовых отрубей (Sigma, США) не растворим в воде даже при нагревании и не действует на α -амилазу. В отличие от самого фитина, фитат натрия обладает хорошей растворимостью, поэтому в дальнейшей работе использовался только он.

Для исследования временной кинетики действия фитата на активность отдельных изоферментных групп α -амилазы Ами1 и Ами2, смеси инкубировали в 0,05 М фосфатном буфере pH 8,0 в течение 90 мин. Из диаграммы (рисунок 1) отчетливо видно значительное падение ферментной активности к 1,5 часам инкубации в варианте с Ами1, при этом Ами2 практически не подвергалась ингибированию хелатором. Представленные данные свидетельствуют об избирательном характере действия фитата на изоферменты пшеничной α -амилазы.



Концентрация фитата – 3 мМ
Рисунок 1 – Влияние фитата на активность Ами1 и Ами2

Известно множество соединений с хелатными свойствами естественного (природного) и искусственного происхождения. Наиболее важным свойством любого хелата является его способность и предпочтение связывать те или иные металлы. Одним из самых известных синтетических хелатов является этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), образующий комплексы с двувалентными катионами металлов. В научной практике этот хелатор часто используется для идентификации и исследования металл-зависимых ферментов, в том числе и α -амилазы.

В нашей работе проведено сравнительное изучение влияния фитата и ЭДТА на пшеничную α -амилазу. При действии на тотальный фермент оба хелатора подавляли активность, но в разной степени. Несколько разный характер влияния фитата и ЭДТА наблюдался и при действии на две отдельные группы α -амилазы. Оба агента сильно подавляли группу Ами1 и, напротив, слабо изменяли активность Ами2.

На диаграммах рисунков 2 и 3 хорошо видны различия в картине и степени ингибирования двух групп фермента. Сделанный выше вывод о преимущественном подавлении Ами1 обоими

хелатами в целом подтвердился. Кроме того, фитат проявлял заметно большую избирательность по сравнению с ЭДТА в отношении отдельных групп изоферментов α -амилазы. Иными словами, фитат способен специфически ингибировать группу Ами1, при этом мало затрагивая активность Ами2.

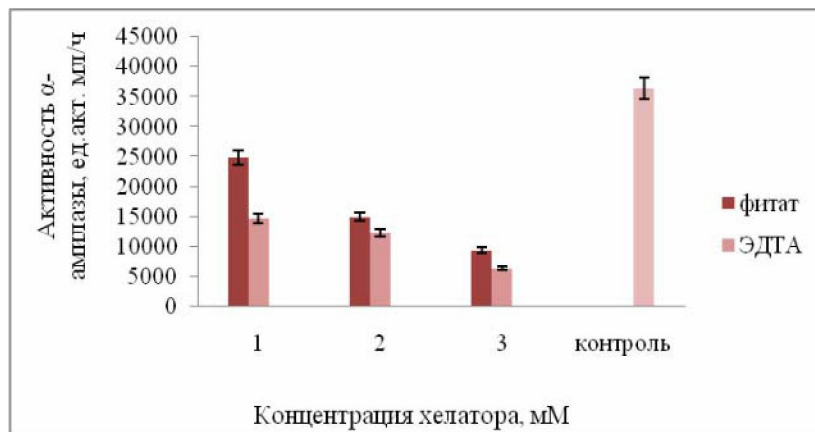


Рисунок 2 – Действие разных концентраций фитата и ЭДТА на активность α -амилазы Ами1

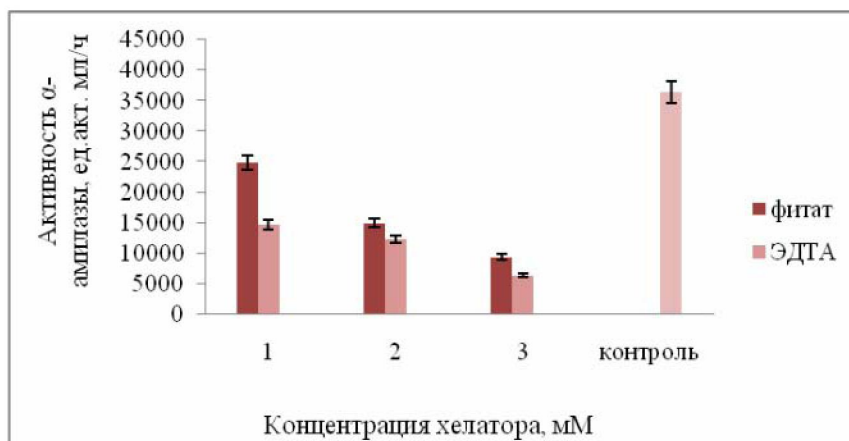


Рисунок 3 – Действие разных концентраций фитата и ЭДТА на активность α -амилазы Ами1

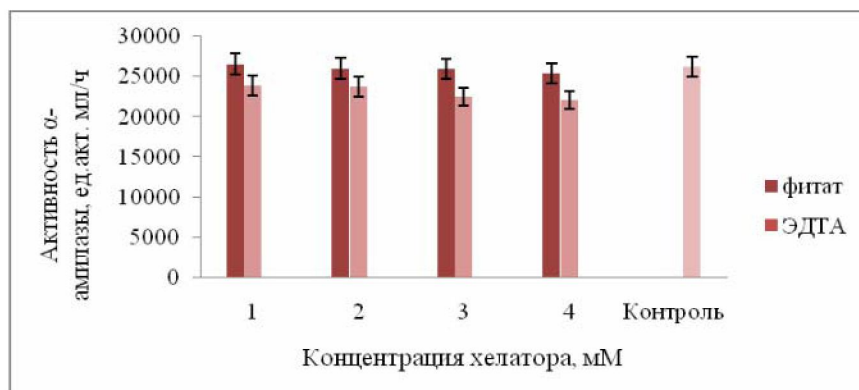
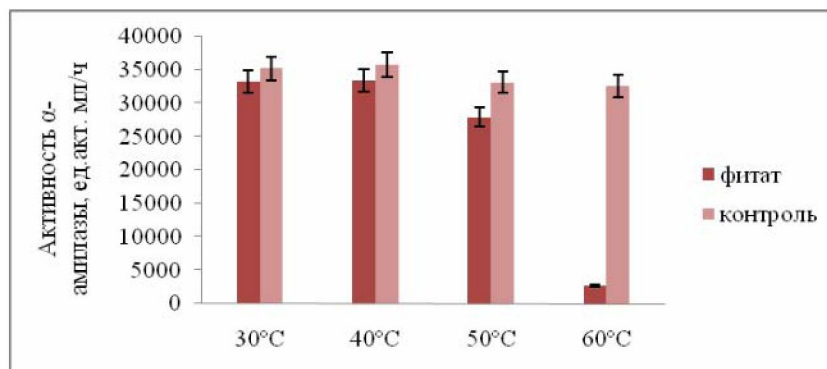


Рисунок 3 – Влияние разных концентраций фитата и ЭДТА на активность α -амилазы Ами2

Хорошо известен факт относительно высокой термостойкости α -амилазы (выдерживает 70°C 15 мин), что во многом обуславливается наличием в структуре белка атома кальция. Исходя из этого, представляло интерес изучение действия повышенной температуры на ингибирование α -амилазы фитатом. Для этого смеси фермента Ами1 с хелатором (10мМ) прогревали при разных

значениях температуры от 30 до 60°C в течение 5мин, затем резко охлаждали и определяли амилазную активность. Параллельно ставился контроль (без добавления фитата).

Данные эксперимента представлены на рисунке 4, из которого видно, что ингибирование слабо происходило до температуры 50°C. Однако, прогрев при 60°C приводил к резкому, почти полному подавлению активности фермента фитатом. Вероятно, подъем температуры влечет за собой повышение доступности кальция в молекуле белка, что облегчает его захват хелатором.



Концентрация фитата – 5мМ

Рисунок 4 – Действие повышенной температуры на ингибирование α-амилазы Ами1 фитатом

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что фитат натрия является довольно эффективным природным ингибитором пшеничной α-амилазы, причем избирательно подавляющим активность группы изоферментов Ами1 (амилаза прорастания). Это свойство фитата позволяет по новому взглянуть на его физиологическую роль в зерновке в, частности, вероятность регулирования этим соединением активности α-амилазы, а также других металлсодержащих ферментов и белков в период прорастания. В отличие от широко применяемого ЭДТА, фитат натрия является более мягким хелатором, что может стать практически полезным его преимуществом в энзимологических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Muralikrishna,G., Nirmala M. Cereal β -amylase – an overview // *Carbohydrate Polymers*. 2005. V.60. P. 163-173.
- 2 Robyt J.F. Inhibition, activation, and stabilization of β -amylase family enzymes // *Biologia, Bratislava*. 2005. V.60. P.17-26.
- 3 Jacobsen T., Slotfeld-Ellingsen D. Phytic acid and metal availability: A study of Ca and Cu binding // *Cereal. Chem.* 1983. V.60. P.392-395.
- 4 Bohn, L., Josefsen, L., Meyer, A.S., Rasmussen, S.K. Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V.55(18). P.7547-7552.
- 5 Hidvegi M., Laszity R. Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins // *PeriodicaPolytechnica, Ser. chem.* 2002. V.46. P.59-64.
- 6 Bohn, L., Meyer, A.S., Rasmussen, S.K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding // *J. Zhejiang Univ. Sci.* 2008. V.9. P.165-191.
- 7 Гильманов М.К., Фурсов О.В., Францев А.П. Методы изучения ферментов растений. Алма-Ата: Наука, 1981. – 91 с.

REFERENCES

- 1 Muralikrishna,G., Nirmala M. *Carbohydrate Polymers*, 2005,V.60. P.163-173.
- 2 Robyt J.F. *Biologia, Bratislava*, 2005, V.60. P.17-26.
- 3 Jacobsen T., Slotfeld-Ellingsen D. *Cereal Chem.*, 1983, V.60. P.392-395.
- 4 Bohn, L., Josefsen, L., Meyer, A.S., Rasmussen, S.K. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, V.55(18). P.7547-7552.
- 5 Hidvegi M., Laszity R. *PeriodicaPolytechnica, Ser.chem.*, 2002, V.46. P.59-64.
- 6 Bohn, L., Meyer, A.S., Rasmussen, S.K. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, 2008, V.9. P.165-191.
- 7 Gilmanov M.K., Fursov O.V., Francev A.P. *Alma-Ata: Nauka*, 1981, 92 (in Russ).

Резюме

А. А. Хакімжанов, Б. Тілеген, Н. С. Мамытова, В. А. Кузовлев, О. В. Фурсов

(ҚР БҒМ ҒК М.А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты, Алматы қ.)

БИДАЙ ДӘНІ α-АМИЛАЗАСЫНЫҢ ФИТАТ НАТРИЙМЕН ИНГИБИРЛЕНУІ

Фитат натрийдің әсерінен бидай дәні α-амилазасы изоферментінің екі тобының белсенділігінде айтарлықтай айырмашылықтар болатыны анықталды. Фитат көп жағдайда өсу α-амилазасын (Ами1 тобы) баяулатады. Керсінше, Ами2 изоферменты бұл қосылыстан аз бәсеңдеді. Фитаттың α-амилаза белсенділігіне ингибиторлық әсері басқа хелатор екі валентті металл - ЭДТА-Na₂ әсерімен салыстырмалы болады.