

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 319 (2017), 174 – 179

A. A. Khakimzhanov, B. Tilegen, N. S. Mamytova, D. A. Shansharova V. A. Kuzovlev

M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: a.khakimzhanov@mail.ru

INHIBITION OF STARCH HYDROLYSIS BY α -AMYLASE FROM WHEAT GRAINS WITH CYCLODEXTRINS

Abstract. The effect of various cyclodextrins on binding α -amylase to starch granules isolated from wheat grain and their hydrolysis were studied. α -Cyclodextrin has the greatest ability to inhibit enzyme, γ -cyclodextrin characterized by low inhibitory capacity. Not revealed significant differences in the action of β -cyclodextrin on the activity of the two groups of the enzyme – Amy1 and Amy2. Among α -amylases of germinating grains, the forms that do not capable to binding starch granules, as well as affinity sorbent α -cyclodextrin-sepharose were detected. This implies a possible "blocked" binding site of part the enzyme with endogenous oligosaccharides.

Keywords: wheat, α -amylase, cyclodextrins, starch granules, binding, hydrolysis.

УДК 577.29:581.19

А. А. Хакимжанов, Б. Тилеген, Н. С. Мамытова, Д. А. Шаншарова, В. А. Кузовлев

Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина КН МОН РК, Алматы, Казахстан

ИНГИБИРОВАНИЕ ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА α -АМИЛАЗОЙ ИЗ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ ЦИКЛОДЕКСТРИНАМИ

Аннотация. Исследовано действие различных циклодекстринов на связывание α -амилазы крахмальными гранулами, выделенными из зерна пшеницы и их гидролиз. Наибольшей способностью к ингибированию фермента обладал α -циклодекстрин, γ -циклодекстрин характеризовался низкой ингибиторной способностью. Не выявлено существенных различий в действии β -циклодекстрина на активность двух групп фермента – Ами1 и Ами2. В составе α -амилазы прорастающей зерновки обнаружены формы, не способные связываться гранулами крахмала, а также аффинным сорбентом α -циклодекстрин-сефарозой. Это предполагает возможную «забивку» центра связывания у части фермента эндогенными олигосахарами.

Ключевые слова: пшеница, α -амилаза, циклодекстрины, крахмальные гранулы, связывание, гидролиз.

Введение. α -Амилаза зерна злаковых весьма полиморфна и представлена двумя основными группами: α -Ами1 с ИЭТ в районе 5,8 и α -Ами2 с ИЭТ около 4,5. Изоферменты двух групп отличаются по степени аффинности к катионам кальция, чувствительности к рН и повышенной температуре [1]. В распаде крахмала принципиальную важность имеет α -амилаза «прорастания» (Ами1), выполняющая роль ферментов первичной атаки нативных гранул. Повышенная активность α -амилазы вследствие повреждения зерна предуборочным прорастанием значительно снижает качество муки и хлеба [2, 3]. В связи с этим исследование ингибиторов как естественных регуляторов зерновой α -амилазы представляется весьма важным.

Среди углеводистых регуляторов активности α -амилазы наиболее известны циклические декстрины (ЦД) микробного происхождения, а также синтетический олигосахарид акарбоза [4, 5]. Было показано, в том числе и в нашей лаборатории, что циклогексаамилоза (α -циклодекстрин) и циклогептаамилоза (β -циклодекстрин) способны ингибировать сорбцию α -амилазы из ряда

источников (рожь, тритикале, рис, кукуруза) с гранулированным (нативным) крахмалом путем блокирования или «забивки» дополнительного активного центра, ответственного за связывание фермента с субстратом [6,7,8]. Благодаря этим уникальным свойствам α - и β -циклодекстрины нашли широкое применение в качестве эффективных аффинных лигандов для очистки многих амилолитических ферментов, в том числе α - и β -амилаз. К сожалению, в этих работах не уделялось внимания изучению специфичности действия циклодекстринов на различные изоформы зерновых α -амилаз. Между тем это имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, поскольку нежелательная повышенная автолитическая активность пшеничной муки обуславливается в основном присутствием α -амилазы «прорастания» (группа α -Ами1).

Таким образом, регулирование активности α -амилазы различными веществами как в самом зерне, так и в условиях различных технологических процессов, в том числе хлебопечения, напрямую связано с особенностями структуры самого фермента. Поскольку циклодекстрины являются веществами природного происхождения, то логично их изучение в качестве регуляторов активности весьма важных для пищевых технологий амилолитических ферментов.

Материалы и методы. В работе использовали зерно пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с. Казахстанская 10.

Очистку тотальной α -амилазы из проросшего зерна пшеницы проводили методом precipitation на гликогене в 40% этаноле [9]. Разделение α -амилазы на группы изоферментов Ами1 и Ами2 проводили с помощью ионообменной хроматографии по методу, описанному в работе [10]. Активность α -амилазы определяли колориметрическим крахмал-йодным методом [9].

Крахмальные гранулы (КГ) выделяли из пшеничного шрота тонкого помола методом многократной декантации в дистиллированной воде и центрифугирования по методу [11]. Полученный сырой препарат КГ промывали тремя объемами этилового спирта, высушивали 48 ч при 35 °С и хранили при комнатной температуре.

Для связывания α -амилазы с крахмальными гранулами образец с известной активностью смешивали с 10–20 мг пшеничных КГ в 1 мл 0,05 М ацетатного буфера pH-5,3 с 1 мМ CaCl₂. Пробирки закрывали и слабо встряхивали в течение необходимого времени при 6 °С на шейкере для оптимальной адсорбции фермента. После этого смесь центрифугировали при 2000 g 5 мин. В супернатанте определяли количество связавшейся α -амилазы по разнице между количеством добавленного фермента и его количеством в супернатанте по окончании инкубации.

Для гидролиза крахмальных гранул α -амилазой образец с известной активностью смешивали с 10–20 мг пшеничных КГ в 1 мл 0,05 М ацетатного буфера pH-5,3 с 1 мМ CaCl₂. Пробирки закрывали и слабо встряхивали в течение необходимого времени при 24 °С на орбитальном шейкере. Через определенные интервалы времени отбирали равные аликвоты супернатанта и хранили до анализа при +4 °С. Активность фермента определяли по количеству мальтозы, образовавшейся в результате гидролиза крахмала [9].

Результаты исследований

Как отмечалось выше, циклодекстрины способны предотвращать сорбцию α -амилазы на естественном субстрате крахмальных гранулах и, как следствие, их гидролиз. Циклодекстрины различаются по количеству остатков глюкозы. Так, простейший представитель - α -ЦД содержит 6, β -ЦД - 7, а γ -ЦД - 8 глюкопиранозных звеньев. ЦД образуются в результате превращения крахмала под действием бактериального фермента циклодекстрин-глюканотрансферазы. Эти соединения не являются токсичными и применяются в медицине, фармацевтике, а также научных исследованиях [12]. С помощью β -ЦД в структуре α -амилазы было установлено наличие второго активного центра, ответственного за связывание фермента с крахмальными гранулами. Заполнение этого центра углеводом препятствует «посадке» α -амилазы на гранулу и ее гидролиз. При этом каталитический центр остается свободным, что позволяет ферменту гидролизовать растворимый крахмал [13].

В наших экспериментах использовались циклодекстрины фирмы Sigma-Aldrich (США), а в качестве субстрата – полученный нами в лабораторных условиях гранулированный крахмал из зерна пшеницы. Процедуры очистки α -амилазы и КГ приведены в методическом разделе. Предварительно было проверено, что все три использованных циклодекстрина не действовали на

активность α -амилазы в отношении растворимого крахмала и не давали положительной реакции с ДНС реагентом при определении редуцирующих сахаров (мальтозы).

На первом этапе опробована ферментсвязывающая способность выделенного нами гранулированного крахмала. В параллельных опытах ферменты Ами1 и Ами2 добавляли к суспензии КГ и осторожно раскачивали на шейкере при +4 °С для минимизации гидролиза. О количестве сорбированного фермента судили по остаточной активности в супернатанте. Сравнительная кинетика активности 2-х групп изоферментов КГ представлена на рисунке 1, из которого видно, что гранулы обладали хорошей связывающей способностью. Можно также заметить отличительные особенности между двумя группами в скорости связывания с субстратом. Для Ами1 процесс сорбции завершился уже к 1 часу, в то время как связывание Ами2 медленно продолжалось вплоть до конца периода инкубации. Более того, фермент Ами1, очевидно, менее прочно взаимодействовал с гранулой и начинал высвобождаться к 5 часу.

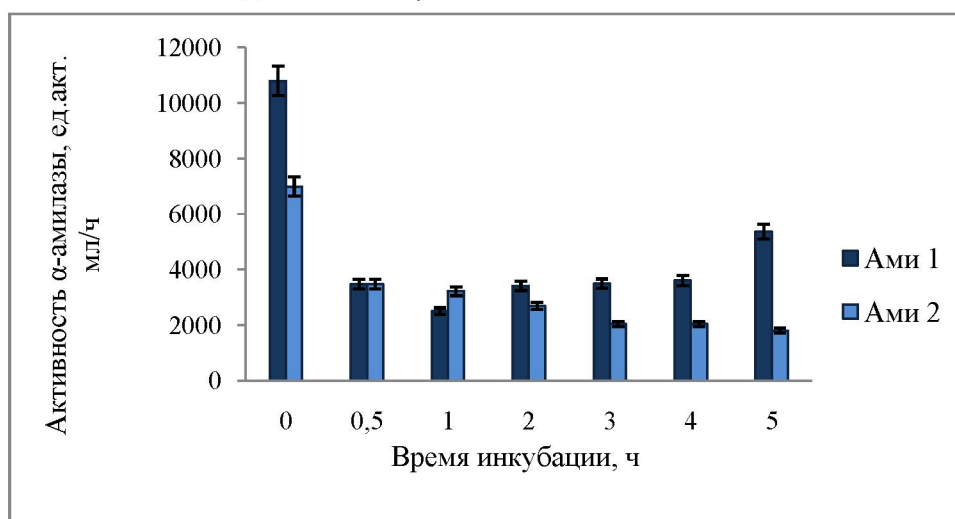
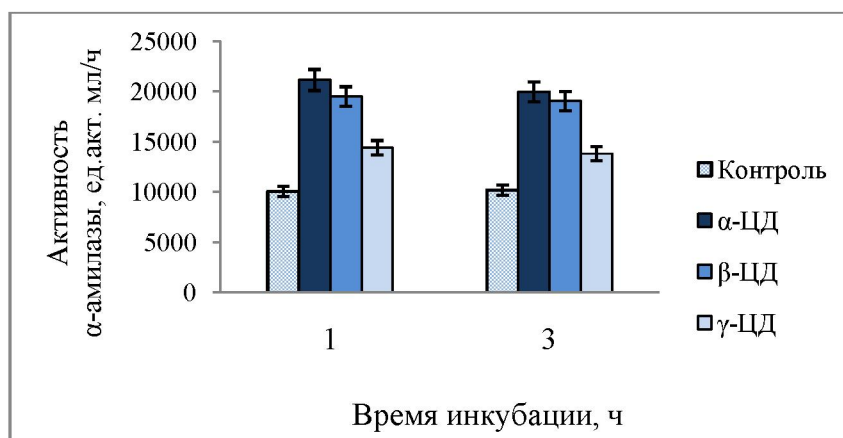


Рисунок 1 – Временная динамика сорбции изоформ α -амилазы крахмальными гранулами

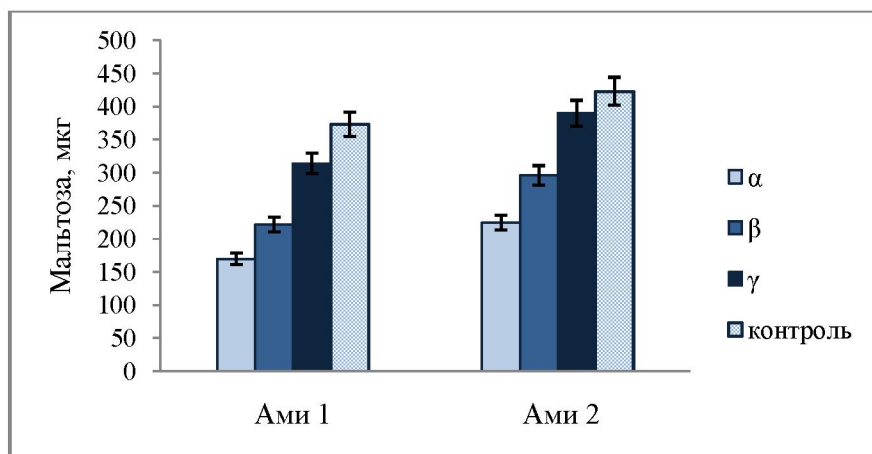
Изучалось влияние циклодекстринов α , β и γ на связывание тотальной (Ами1+Ами2) α -амилазы с крахмальными гранулами. На диаграмме рисунка 2 приведены значения активности тотальной α -амилазы, содержащейся в супернатантах после осаждения на КГ. Как видно, имеются заметные различия в ингибировании разными циклодекстринами сорбционной способности фермента. Наибольшим эффектом обладал α -циклодекстрин, наименьшим – γ -циклодекстрин. Видно также, что в условиях данного эксперимента процесс связывания α -амилазы с КГ довольно скоротечный и происходил в течении 1 часа. Дальнейшая инкубация не приводила к каким-то заметным изменениям в остаточной ферментной активности.



Концентрация циклодекстринов – 1мМ

Рисунок 2 – Влияние циклодекстринов α , β и γ на связывание тотальной α -амилазы с КГ

На рисунке 3 показано действие разных циклодекстринов, взятых в эквимольной концентрации (1мМ) на гидролиз КГ отдельными группами α -амилазы Ами1 и Ами2. Об изменении активности фермента судили по количеству мальтозы, образовавшейся в результате гидролиза крахмала в перемешиваемой при 24 °С суспензии. Как видно из диаграмм, каких-либо заметных различий в степени ингибирования углеводами двух групп изоферментов не наблюдалось. Это предполагает близость размерности центра связывания у изоферментов Ами1 и Ами2.



Концентрация циклодекстринов – 1 мМ

Рисунок 3 – Влияние разных циклодекстринов на гидролиз КГ группами Ами1 и Ами2

В дальнейшей работе изучались ингибиторные свойства наиболее доступного и распространенного β -циклодекстрина. Более детально рассмотрено действие разных концентраций β -ЦД на группы α -амилазы по отдельности. В одном эксперименте исследовали влияние очень малых концентраций – до 0,4мМ, в другом – более высоких, от 1 до 5 мМ (рисунки 4 и 5).

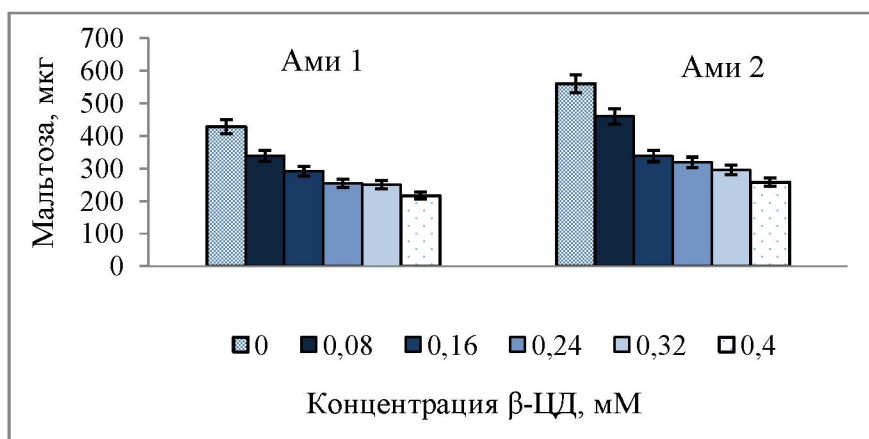


Рисунок 4 – Влияние разных концентраций β -ЦД на гидролиз КГ группами Ами1 и Ами2

Продолжительность обеих экспозиций составила 2 часа. Из представленных диаграмм видно, что изоформы Ами1 несколько более чувствительны к действию β -циклодекстрина по сравнению с Ами2 при относительно высоких его концентрациях. Изоформы Ами2, наоборот, ингибировались в большей мере при низких концентрациях углевода. Отметим также способность β -ЦД подавлять α -амилазный гидролиз КГ в довольно низких концентрациях – менее чем 0,1мМ.

Интересные данные получены с использованием аффинного сорбента для α -амилазы α -циклодекстрин-сефарозы. Установлено, что даже заведомо избыточный объем сорбента не способен к полному связыванию наносимого на колонку фермента. Не удерживаемая лигандом α -амилаза не способна была и к связыванию с гранулами крахмала. Данные по длительному периоду инкубации

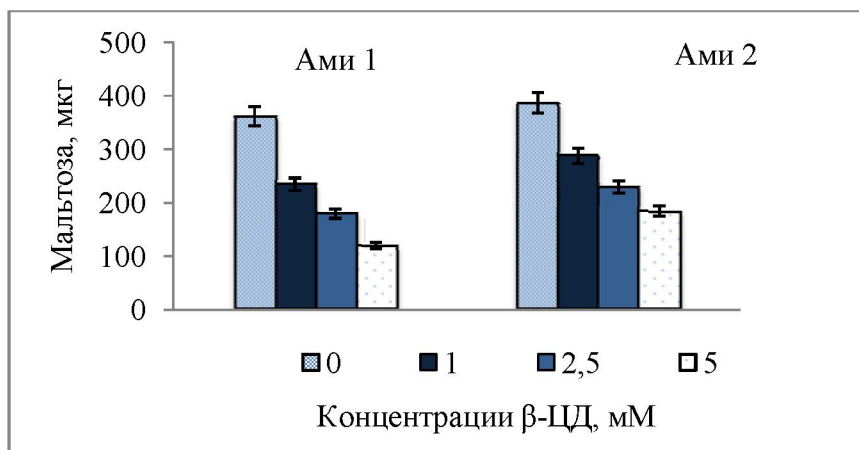


Рисунок 5 – Влияние разных концентраций β-ЦД на гидролиз КГ группами Ами1 и Ами2

смеси α-амилазы с КГ (рисунок 1) также свидетельствуют, что какая-то ее часть не сорбируется субстратом и остается в растворе. Возможно, неосаждаемый фермент с самого начала (еще в зерновке) был с заполненным центром связывания и если это так, то существуют какие-то эндогенные олигосахариды, похожие по действию на циклодекстрины.

Источник финансирования исследований. Министерство образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Malikrishna G., Nirmala M. Cereal α-amylase – an overview // Carbohydrate polymers. – 2005. – Vol. 60. – P. 163-173.
- [2] Кретович В.Л. Биохимия зерна и хлеба. – М.: Наука, 1991. – 132 с.
- [3] Kruger J.E. Enzymes of sprouted grain and possible technological significance / In Bushuk W. and Rasper V. (ed.) Wheat: Production, properties and quality. – Glasgow, UK, 1994. – P. 143-153.
- [4] Hamilton L.M., Kelly C.T., Fogarty W.M. Review: cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes // Enzymes Microbiol. Technol. – 2000. – Vol. 26. – P. 561-567.
- [5] Al Kazaz M., Desseaux V., Marchis-Mouren G., Prodanov E., Santimone M. The mechanism of porcine pancreatic α-amylase. Inhibition of maltopentaose hydrolysis by acarbose, maltose and maltotriose // Eur. J. Biochem. – 1998. – Vol. 15. – P. 100-107.
- [6] Weselake R.J., Hill R.D. Cycloheptaamylose as an affinity ligand of cereal α-amylase. Characterization and possible mechanism of the interaction // Carbohydrate Res. – 1982. – Vol. 108. – P. 153-161.
- [7] Хахимжанов А.А., Фурсов О.В. Ингибирование α-амилазы зерна риса β-циклодекстрином // Физиол. биохим. культ. раст. – 1988. – Т. 20. – С. 157-162.
- [8] Кузовлев В.А., Фурсов О.В., Дарканбаев Т.Б. Регуляция α-амилазы из зерна кукурузы циклодекстринами // Прикл. биохим. микробиол. – 1988. – Т. 24. – С. 636-641.
- [9] Гильманов М.К., Фурсов О.В., Францев А.П. Методы изучения ферментов растений. – Алма-Ата: Наука, 1981. – 91 с.
- [10] Хахимжанов А.А., Шаншарова Д.А., Тилеген Б., Мамытова Н.С., Кузовлев В.А., Фурсов О.В. Ингибирование α-амилазы из зерна пшеницы фитатом натрия // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2014. – № 4. – С. 55-59.
- [11] Zeng J., Li G., Gao H., Ru Zh. Comparison of A and B starch granules from three wheat varieties // Molecules. – 2011. – Vol. 16. – P. 10570-10591.
- [12] Dell Valle E.M. Cyclodextrins and their uses // Process Biochemistry. – 2004. – Vol. 39. – P. 1033-1046.
- [13] Robyt J.F. Inhibition, activation, and stabilization of α-amylase family enzymes // Biologia, Bratislava. – 2005. – Vol. 60. – P. 17-26.

REFERENCES

- [1] Malikrishna G., Nirmala M. Carbohydrate polymers. 2005. Vol. 60. P. 163-173.
- [2] Kretovich V.L. M.: Nauka, 1991. 132 p.
- [3] Kruger J.E. 1994. P. 143-153.
- [4] Hamilton L.M., Kelly C.T., Fogarty W.M. Enzymes Microbiol. Technol. 2000. Vol. 26. P. 561-567.
- [5] Al Kazaz M., Desseaux V., Marchis-Mouren G., Prodanov E., Santimone M. // Eur. J. Biochem. 1998. Vol. 15. P. 100-107.
- [6] Weselake R.J., Hill R.D. Carbohydrate Res. 1982. Vol. 108. P. 153-161.
- [7] Hakimzhanov A.A., Fursov O.V. Fiziol. biokhim. kul't. rast. 1988. Vol. 20. P. 157-162.

- [8] Kuzovlev V.A., Fursov O.V., Darkanbaev T.B. Prikl. biohim. mikrobiol. 1988. Vol. 24. P. 636-641.
- [9] Gil'manov M.K., Fursov O.V., Francev A.P. Metody izuchenija fermentov rastenij. Alma-Ata: Nauka, 1981. 91 p.
- [10] Hakimzhanov A.A., Shansharova D.A., Tilegen B., Mamytova N.S., Kuzovlev V.A., Fursov O.V. // Izvestija NAN RK. Serija biologicheskaja i medicinskaja. 2014. N 4. P. 55-59.
- [11] Zeng J., Li G., Gao H., Ru Zh. // Molecules. 2011. Vol. 16. P. 10570-10591.
- [12] Dell Valle E.M. Cyclodextrins and their uses // Process Biochemistry. 2004. Vol. 39. P. 1033-1046.
- [13] Robyt J.F. Biologia, Bratislava. 2005. Vol. 60. P. 17-26.

А. А. Хакімжанов, Б. Тілеген, Н. С. Мамытова, Д. А. Шаншарова, В. А. Кузовлев

ҚР БҒМ ҒК «М. А. Айтхожин атындағы молекулярлық биология және биохимия институты»,
Алматы, Қазақстан

ЦИКЛОДЕКСТРИНДІ БИДАЙ ДӘНДЕРІНДЕГІ КРАХМАЛ ГИДРОЛИЗИНІҢ α -АМИЛАЗАМЕН ИНГИБИРЛЕНУІ

Аннотация. Бидай дәндерінен бөлініп алынған крахмал түйіршіктерінің α -амилазамен байланысуына және оның гидролизіне әртүрлі циклодекстриндердің әсері зерттелді. Ферментті ингибирлеуде жоғары қабілетке α -циклодекстрин ие болса, γ -циклодекстрин төменгі ингибиторлық белсенділік көрсетті. В-циклодекстринмен ферменттің – Ами1 және Ами2 екі тобының белсенділігіне әсерінің айтарлықтай ерекшеліктері байқалмады. Өскен дәндердің α -амилазасы құрамында крахмал түйіршіктерімен, сонымен қоса аффинді сорбент α -циклодекстрин-сефарозамен байланысу қабілеті жоқ формалар анықталды. Бұл ферменттің байланыс орталығының эндогенді олигосахаридтермен бітеліп қалуы мүмкін деп жорамалданады.

Түйін сөздер: бидай, α -амилаза, циклодекстриндер, крахмал түйіршіктері, байланысу, гидролизі.

Сведения об авторах:

Хакимжанов Айдар Атымтаевич – к.б.н., зав. лабораторией, a.khkimzhanov@mail.ru
Мамытова Нургуль Сабазбековна – PhD, снс
Тилеген Булбул – мнс
Шаншарова Динара Айтпаевна – д.т.н., доцент
Кузовлев Владимир Анатольевич – к.б.н., внс