

УДК 547.9:581.19

## ОСОБЕННОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ ИЗОФЕРМЕНТОВ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ ИЗ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ ФИТАТОМ НАТРИЯ

А.А. ХАКИМЖАНОВ<sup>1</sup>, Д.А. ШАНШАРОВА<sup>2</sup>, Б. ТИЛЕГЕН<sup>1</sup>, В.А. КУЗОВЛЕВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина  
Министерства образования и науки Республики Казахстан  
050012 Алматы, ул. Досмухамедова, 86  
e-mail: a.khakimzhanov@mail.ru

<sup>2</sup>Алматинский технологический университет  
050012 Алматы, ул. Толе би, 100

Установлены особенности действия фитата натрия на активность двух основных изоферментных групп  $\alpha$ -амилазы из зерна пшеницы. Фитат в большей степени ингибировал активность  $\alpha$ -амилазы с высокими значениями изоэлектрической точки (ИЭТ) (группа  $\alpha$ -АМУ1). Напротив, изоферменты с низкими значениями ИЭТ ( $\alpha$ -АМУ2) слабо угнетались этим соединением. Ингибирующее действие фитата на активность  $\alpha$ -амилазы по уровню сопоставимо с действием известного хелатора двухвалентных металлов — ЭДТА- $\text{Na}_2$ . Однако в случае с фитатом ингибирующий эффект на отдельные группы изоферментов был более избирательным. Обсуждены вероятные механизмы действия фитата натрия на активность пшеничной  $\alpha$ -амилазы.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L.,  $\alpha$ -амилаза, изоферменты, фитат натрия, ЭДТА, ингибирование.

В зерне злаковых  $\alpha$ -амилаза выполняет важную роль при прорастании и развитии проростка, осуществляя гидролиз крахмала до легкоусвояемых сахаров. Пшеничная  $\alpha$ -амилаза представлена двумя основными группами —  $\alpha$ -АМУ1, или  $\alpha$ -амилаза «прорастания», и  $\alpha$ -АМУ2, или  $\alpha$ -амилаза «созревания», различающимися по своим физико-химическим свойствам и функционированию в зерновке [9].

Важными регуляторами  $\alpha$ -амилазы, как и любого другого ферментного белка, являются активаторы и ингибиторы различной природы. К числу первых прежде всего относится  $\text{Ca}^{2+}$ , который входит в состав молекулы фермента и необходим для проявления каталитической активности. Поскольку  $\alpha$ -амилаза — металлсодержащий фермент, ее активность может регулироваться *in vitro* такими синтетическими комплексонами (хелаторами), как ЭДТА, ЭГТА, БАПТА [11]. 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 [4, 8].

В зерне большинства злаковых (рожь, ячмень, пшеница, рис) фитин в виде глобидов встречается в алейроновом слое, тогда как, например, у кукурузы — в зародышевой части [7]. Химически фитин представ-

ляет собой конгломерат кальциевых и магниевых солей фитиновой кислоты — миоинозитгексафосфат, трудно растворимый в воде. Именно из-за свойства фитиновой кислоты образовывать комплексы с катионами двухвалентных металлов, в том числе с  $Fe^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , часто дефицитных для организма, данное вещество принято относить к антинутриентам [5]. В то же время компоненты фитата (минералы, фосфор, мезоинозит) имеют очевидную биологическую ценность. На долю фитина может приходиться до 80 % общего содержания этих веществ в зерне.

В связи с принципиальной ролью  $\alpha$ -амилазы в самом зерне, а также 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  $\alpha$ -амилазы и дезагрегация фитина с высвобождением растворимых солей фитата — происходят одновременно и локализованы в алейроне. В связи с этим возможное взаимодействие фитата и  $\alpha$ -амилазы в самом зерне представляет определенный научный интерес.

В литературе имеются лишь единичные сведения относительно действия фитата на ферменты, в частности на  $\alpha$ -амилазу. Так, в работах [10, 12] показано ингибирующее влияние фитиновой кислоты на общую  $\alpha$ -амилазную активность зерна пшеницы. Между тем хорошо известно, что  $\alpha$ -амилаза у злаковых весьма полиморфна и имеет сложный изоферментный состав. В прорастающих зерновках пшеницы фермент может насчитывать до 10—12 изоформ, подразделяемых на две главные группы:  $\alpha$ -амилазы АМУ1 с высокими ИЭТ и АМУ2 — с низкими ИЭТ [3].

Целью нашей работы было изучение действия натриевой соли фитиновой кислоты как на активность очищенной тотальной  $\alpha$ -амилазы из зерна пшеницы, так и ее отдельных изоферментных групп.

## Методика

В работе использовали зерно пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казахстанская 10.  $\alpha$ -Амилазу из экстракта пророщенного в течение 4 сут зерна получали методом преципитации на гликогене (USB Corp., США) при наличии 40 %-го этанола по методу, описанному в руководстве [1].

Разделение  $\alpha$ -амилазы на группы изоферментов  $\alpha$ -АМУ1 и  $\alpha$ -АМУ2 проводили методом ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефарозе («Sigma», Германия). Фракции с разделенными ферментами собирали, концентрировали на ультрафильтрационной ячейке Amicon («Millipore», США) и хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в 10 %-м глицерине до использования.

Чистоту препаратов  $\alpha$ -амилазы проверяли методом гелевого электрофореза. Нативный электрофорез проводили в столбиках 7,5 % ПАГ согласно методике [1]. После электрофореза гели инкубировали в 1,5 %-м растворе крахмала при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч, промывали холодной водой и окрашивали раствором 2 %  $I_2$  в 5 % KI. Электрофорез в денатурирующих условиях с ДДС- $Na_2$  проводили по Лэммли.

Для изучения действия фитата натрия («Sigma», Германия) и ЭДТА- $Na_2$  («Serva», Германия) на  $\alpha$ -амилазу смеси фермента с хелатным агентом инкубировали в 0,05 М трис-буфере, pH 8,0, при  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение определенного времени. После этого измеряли амилазную активность крахмал-йодным методом с использованием в качестве субстрата 0,02 % раство-

римого картофельного крахмала («Sigma», Германия) и выражали ее в единицах активности на 1 мл за 1 ч [1].

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

### Результаты и обсуждение

Для разделения  $\alpha$ -амилазы на группы изоферментов использовали ионообменную хроматографию на ДЕАЕ-сефарозе. При градиенте элюирования от 0 до 0,3 М NaCl в 25 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, общий препарат  $\alpha$ -амилазы отчетливо разделялся на две группы изоферментов. Группа  $\alpha$ -AMY1 элюировалась с сорбента при концентрации NaCl 0,05–0,09 М, группа  $\alpha$ -AMY2 — в пределах концентрации соли 0,20–0,25 М. Результаты очистки и разделения  $\alpha$ -амилазы представлены на рис. 1.

В предварительных экспериментах было выяснено, что коммерческий препарат фитина из рисовых отрубей («Sigma», Германия) не растворяется в воде даже при нагревании и не действует на  $\alpha$ -амилазу. В отличие от самого фитина натриевая соль фитиновой кислоты обладала хорошей растворимостью, поэтому в дальнейшей работе использовалась только она.

Для исследования временной кинетики действия фитата на активность отдельных изоферментных групп  $\alpha$ -амилазы AMY1 и AMY2 смеси инкубировали в течение 90 мин. Из диаграммы (рис. 2) отчетливо видно значительное падение ферментной активности к 1,5 часам инкубации в варианте с  $\alpha$ -AMY1, при этом  $\alpha$ -AMY2 практически не подвергалась ингибированию хелатором. Представленные данные свидетельствуют об избирательном характере действия фитата на отдельные изоферменты пшеничной  $\alpha$ -амилазы.

Известен ряд соединений с хелатными свойствами естественного (природного) и искусственного происхождения. Наиболее важным свой-

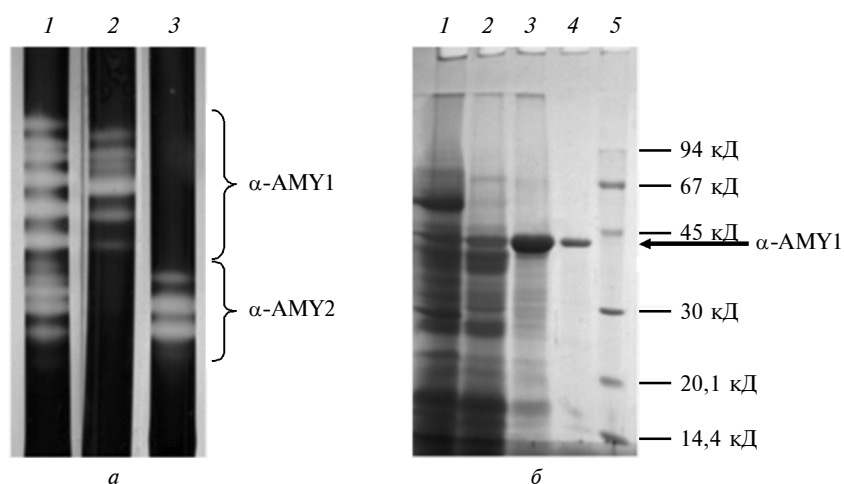


Рис. 1. Электрофорез  $\alpha$ -амилазы после ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефарозе: *a* — нативный электрофорез (1 —  $\alpha$ -амилаза после осаждения гликогеном, 2 — изоферменты  $\alpha$ -амилазы после элюирования 0,09 М NaCl, 3 — изоферменты  $\alpha$ -амилазы после элюирования 0,25 М NaCl); *б* — электрофорез в денатурирующих условиях с ДДС-Na<sub>2</sub> (1 — грубый экстракт белка, 2 — препарат белка после прогрева при 70 °С в течение 15 мин, 3 —  $\alpha$ -амилаза после осаждения гликогеном, 4 —  $\alpha$ -амилаза после элюирования 0,09 М NaCl, 5 — белки-маркеры)

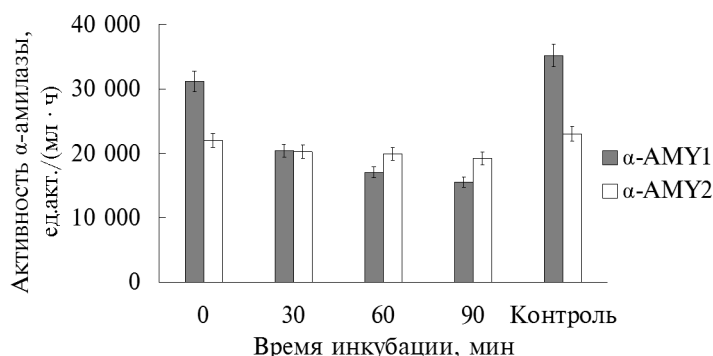


Рис. 2. Влияние фитата на активность  $\alpha$ -амилазы групп AMY1 и AMY2. Концентрация фитата 3 мМ

ством любого хелатора является его способность и предпочтение связывать те или иные металлы. Одним из самых известных синтетических хелаторов является этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), образующая комплексы с двухвалентными катионами металлов. В научной практике этот хелатор часто используется для идентификации и исследования металл-зависимых ферментов, в том числе и  $\alpha$ -амилазы.

Нами проведено сравнительное изучение влияния фитата и ЭДТА на пшеничную  $\alpha$ -амилазу. При действии на тотальный фермент оба хелатора угнетали активность, но в разной степени. Несколько разный характер влияния фитата и ЭДТА наблюдался и при действии на две отдельные группы  $\alpha$ -амилазы. Однако оба агента сильнее подавляли группу  $\alpha$ -AMY1 и, напротив, слабо изменяли активность  $\alpha$ -AMY2.

Из диаграмм (рис. 3, а, б) хорошо видны различия картины и степени ингибирования двух групп фермента. Сделанный выше вывод о преимущественном подавлении  $\alpha$ -AMY1 обоими хелаторами в целом подтвердился. Кроме того, фитат проявлял заметно большую избирательность по сравнению с ЭДТА в отношении отдельных групп изоферментов  $\alpha$ -амилазы. Иными словами, фитат способен специфически ингибировать группу  $\alpha$ -AMY1, при этом мало затрагивая активность  $\alpha$ -AMY2.

Хорошо известен факт относительно высокой термоустойчивости  $\alpha$ -амилазы (выдерживает температуру 70 °С в течение 15 мин), что во многом обуславливается наличием в структуре белка атома кальция. Исходя из этого, представляло интерес изучение действия повышенной температуры на ингибирование  $\alpha$ -амилазы фитатом. Для этого смеси фермента  $\alpha$ -AMY1 с хелатором (1 мМ) прогревали при температурах в интервале 30–60 °С в течение 5 мин, затем резко охлаждали и определяли амилазную активность. Параллельно ставился контроль (без добавления фитата).

Данные эксперимента представлены на рис. 4, из которого видно, что группа  $\alpha$ -AMY1 слабо ингибировалась до температуры 50 °С. Однако прогрев при 60 °С приводил к резкому, почти полному подавлению активности  $\alpha$ -амилазы фитатом. Вероятно, подъем температуры повышает доступность кальция в молекуле белка, облегчая его захват хелатором, либо приводит к снижению термостабильности фермента ввиду связывания свободных катионов металла среды.

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что фитат натрия является довольно эффективным природным ингибитором пшенич-

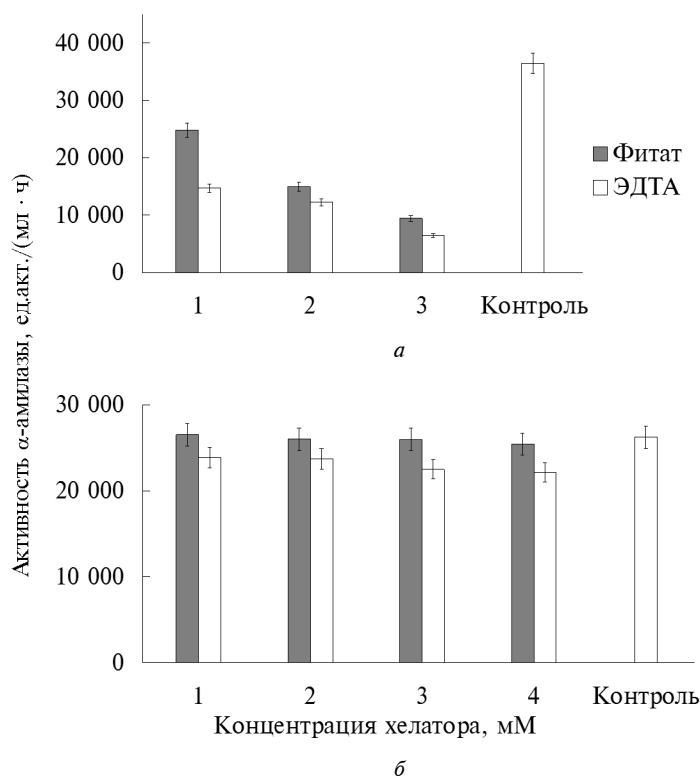


Рис. 3. Влияние разных концентраций фитата и ЭДТА на активность  $\alpha$ -амилазы AMY1 (a) и AMY2 (б)

ной  $\alpha$ -амилазы, причем избирательно подавляет активность группы изоферментов  $\alpha$ -AMY1 (амилаза прорастания). Это свойство фитата дает основание по-новому оценить его функции в зерновке, в частности, вероятность регулирования этим соединением активности  $\alpha$ -амилазы, а также других металлсодержащих ферментных белков в период прорастания. Физиологическая роль фитата и его олигомерных форм в зерне злаковых остается крайне слабо изученной. Фитат в основном рассматривался с точки зрения резерва ценных питательных веществ и микроэлементов в зерне, изучались также его антипитательные свойства, что важно для диетологии. В данной работе впервые выявлены особенности специ-

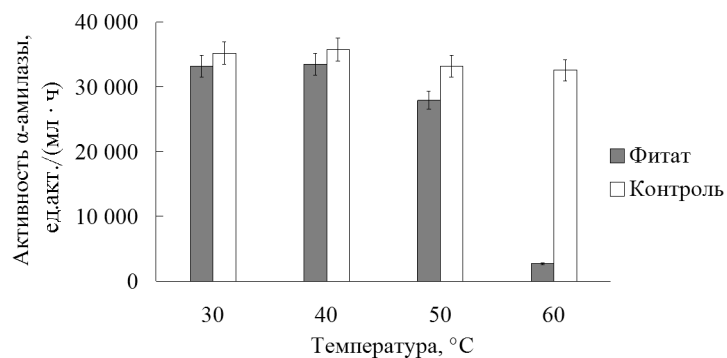


Рис. 4. Действие повышенной температуры на ингибирование  $\alpha$ -амилазы AMY1 фитатом. Концентрация фитата 1мМ

фичности действия фитата натрия на активность двух основных изоферментных групп  $\alpha$ -амилазы зерна пшеницы.

Различия в ингибировании отдельных изоферментов могут быть объяснены их структурными особенностями, в частности, различиями степени доступности катионов  $\text{Ca}^{2+}$  в белковой молекуле для хелатного агента. В литературе имеется ряд данных, свидетельствующих о существенных различиях между отдельными изоформами  $\alpha$ -амилазы в аффинности (сродстве) к кальцию, а также в чувствительности к этим катионам [6].

По нашим данным, ферменты  $\alpha$ -АМУ1 (в отличие от  $\alpha$ -АМУ2) для проявления каталитической активности строго требуют наличия  $\text{Ca}^{2+}$  в среде [2]. Их удаление из среды приводит к необратимой инактивации этой группы  $\alpha$ -амилазы. Исходя из этого, можно предположить существование другого механизма потери ферментной активности — через связывание фитатом натрия (или другим хелатором) свободных катионов кальция среды. В пользу этого механизма инактивации свидетельствуют данные нативного электрофореза  $\alpha$ -амилазы. Спектр изоферментов  $\alpha$ -АМУ1 после их обработки оставался неизменным, что подтверждает отсутствие комплекса фермента с хелатором.

Таким образом, в работе показано ингибирующее действие фитата натрия на активность  $\alpha$ -амилазы зерна пшеницы. Установлено, что активность снижается главным образом вследствие специфического подавления изоферментов группы  $\alpha$ -АМУ1. В гораздо меньшей степени фитат затрагивал активность  $\alpha$ -амилазы группы АМУ2.

1. Гильманов М.К., Фурсов О.В., Францев А.П. Методы изучения ферментов растений. — Алма-Ата: Наука, 1981. — 91 с.
2. Маденова С.К., Мамытова Н.С., Хакимжанов А.А., Богуспаев К.К., Фурсов О.В. Влияние гормонов и кальция на синтез и секрецию  $\alpha$ -амилазы в зародыше пшеницы // Изв. НАН РК. Сер. биол. мед. — 2013. — № 4. — С. 191—198.
3. Мамытова Н.С., Хакимжанов А.А., Фурсов О.В. Гибберелловая и абсцизовая кислоты как регуляторы  $\alpha$ -амилазы зародыша со щитком и алейронового слоя зерна пшеницы // Физиология растений и генетика. — 2014. — 46, № 2. — С. 143—150.
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. — 55 (18). — P. 7547—7552.
5. 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. — 9. — P. 165—191.
6. Bush D., Sticher L., Huystee R., Wagner D., Jones R. The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone  $\alpha$ -amylase // J. Biol. Chem. — 1989. — 264, N 32. — P. 19392—19398.
7. Hidvegi M., Laszity R. Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins // Periodica Polytechnica, Ser. chem. — 2002. — 46. — P. 59—64.
8. Jacobsen T., Slotfeld-Ellingsen D. Phytic acid and metal availability: A study of Ca and Cu binding // Cereal Chem. — 1983. — 60. — P. 392—395.
9. Muralikrishna G., Nirmala M. Cereal  $\alpha$ -amylase — an overview // Carbohydrate Polymers. — 2005. — 60. — P. 163—173.
10. Nole J.S. Effect of phytate, pH, and acid treatment on the falling number of sound and weathered wheats // Cereal Chem. — 1985. — 62 (1). — P. 22—25.
11. Robyt J.F. Inhibition, activation, and stabilization of  $\alpha$ -amylase family enzymes // Biologia, Bratislava. — 2005. — 60. — P. 17—26.
12. Sharma C.K., Goel M., Irshad M. Myo-inositolhexaphosphate as a potential inhibitor of  $\alpha$ -amylase // Phytochemistry. — 1978. — 17. — P. 201—204.

Получено 06.07.2017

ОСОБЛИВОСТІ ІНГІБУВАННЯ ІЗОФЕРМЕНТІВ  $\alpha$ -АМІЛАЗИ ІЗ ЗЕРНА ПШЕНИЦІ ФІТАТОМ НАТРІЮ

*А.А. Хакімжанов<sup>1</sup>, Д.А. Шаншарова<sup>2</sup>, Б. Тілеген<sup>1</sup>, В.А. Кузовлев<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і біохімії ім. М.А. Айтхожина Міністерства освіти і науки Республіки Казахстан, Алмати

<sup>2</sup>Алматинський технологічний університет

Встановлено особливості дії фітату натрію на активність двох основних ізоферментних груп  $\alpha$ -амілази із зерна пшениці. Фітат більшою мірою інгібував активність  $\alpha$ -амілази з високими значеннями ізоелектричної точки (ІЕТ) (група  $\alpha$ -АМУ1). Навпаки, ізоферменти з низькими значеннями ІЕТ ( $\alpha$ -АМУ2) слабо пригнічувались цією сполукою. Інгібувальна дія фітату на активність  $\alpha$ -амілази за рівнем зівставна з дією відомого хелатора двовалентних металів — ЕДТА- $\text{Na}_2$ . Проте у випадку з фітатом інгібувальний ефект на окремі групи ізоферментів був більш вибіркоким. Обговорено вірогідні механізми дії фітату натрію на активність  $\alpha$ -амілази пшениці.

PECULIARITIES OF INHIBITION OF  $\alpha$ -AMYLASE FROM WHEAT GRAIN WITH SODIUM PHYTATE

*A.A. Khakimzhanov<sup>1</sup>, D.A. Shansharova<sup>2</sup>, B. Tilegen<sup>1</sup>, V.A. Kuzovlev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>Almaty Technological University

100 Tole by St., Almaty, 050012, Kazakhstan

Specific features in the effect of sodium phytate on the activity of the two main isozyme groups of  $\alpha$ -amylase of wheat grain are established. Phytate strongly inhibited the activity of high pI  $\alpha$ -amylase (group  $\alpha$ -AMY1). In contrast, the  $\alpha$ -AMY2 (low pI isoenzymes) were weakly suppressed by this compound. The inhibitory effect of phytate on the activity of  $\alpha$ -amylase is comparable in level to that of the known chelator of divalent metals, EDTA- $\text{Na}_2$ . However, in the case of phytate, the inhibitory effect on individual isoenzyme groups was more selective. Possible ways of sodium phytate impact on the activity of wheat  $\alpha$ -amylase are discussed.

*Key words:* *Triticum aestivum* L.,  $\alpha$ -amylase, isozymes, sodium phytate, EDTA, inhibition.