

АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ И КАЧЕСТВЕННЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДЕПОНИРОВАНИЯ ФИТИНА В ЗРЕЛЫХ СЕМЕНАХ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

В.В. ТИТОК¹, С.И. ВАКУЛА², В.Н. ЛЕОНТЬЕВ³, В.Г. ЛУГИН³

¹ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск
E-mail: V.Titok@cbg.org.by

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

³ Белорусский государственный технологический университет, Минск

Рассмотрены вопросы запасаения фитина в зрелых семенах льна масличного — диапазон накопления, влияние погоднo-климатических условий сезона выращивания, морфология и размер фитиновых глобoidов алейроновых зерен. В семенах льна масличного урожаяв 2005–2009 гг. содержание фитиновой кислоты составляло 29,3–35,4 г/кг. Накоплению высоких доз фитина способствуют высокая интенсивность осадков и низкие среднесуточные температуры в период созревания семян. По данным сканирующей электронной микроскопии фитиновые глобoidы запасающей паренхимы семядолей льна — это электронно-плотные сферические конкреции диаметром 2,3–5,6 мкм. В химическом составе фитиновой соли льна выявлены элементы K, Mg, Mn, Ca, Fe.

Ключевые слова: фитин, глобoidы, лен масличный, изменчивость, сканирующая электронная микроскопия, запасные микроэлементы.

Введение. Семена льна — ценное масличное и фуражное сырье, удобный модельный объект для исследования физиологии и биохимии семян двудольных растений. Семя льна содержит в среднем 45 % масла, 30 % углеводов, 25 % белка, оставшиеся 5 % составляют минорные компоненты — фитин, лигнаны, фенольные кислоты, витамины, минералы [1].

Фитиновая (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисдигидрофосфорная) кислота — основная форма запасаения фосфатов и мио-инозитола в клетках растений. Благодаря сильным хелатирующим свойствам фитиновая кислота связывает ионы цинка, магния, калия, железа и других металлов в фитин — сложную смешанную соль, содержание которой в обезжиренном остатке семян льна достигает 1,8–3,0 % [2]. В паренхиме зрелых семян фитин образует глобoidы. Это крупные, разнообразные по

форме базофильные конкреции, структурно и функционально интегрированные в алейроновые зерна [3].

Помимо запасаения фосфора и минеральных веществ [4, 5], фитиновая кислота выполняет ряд важных физиологических функций, таких как контроль метаболизма нуклеиновых кислот и АТФ [6], роль вторичного клеточного мессенджера [7]. Посредством ингибирования сборки белка клатрина фитиновая кислота участвует в регуляции эндоцитоза [8]. Для человека и большинства животных фитин и фитиновая кислота — антинутриенты, препятствующие усвоению минеральных веществ из пищи [9].

Целью исследования являлась качественная и количественная оценка состава и содержания фитина в зрелых семенах льна масличного (*Linum usitatissimum* L). Выбор объекта исследования обусловлен высоким уровнем накопления фитина в семенах льна, структурными и топографическими особенностями фитиновых глобoidов запасающей паренхимы семядолей, а также необходимостью создания сортов льна пищевого назначения.

Материалы и методы. Для исследования использовали семена льна сорта McGregor, выращенного в погоднo-климатических условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси без внесения фосфорных удобрений. Это среднеспелый сорт (вегетационный период составляет приблизительно 91 сут) канадской селекции, концентрация белка в семени — 20,8 %, масла — 41,2 %.

Анализ морфологии фитиновых глобoidов осуществляли с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-5610 LV, оснащенного системой химического анализа (EDX JED-2201 JEOL). Поперечные срезы нативных (без нанесения проводящего покрытия) семян льна

изучали в режиме низкого вакуума с использованием детектора обратно отраженных электронов. Содержание ионов металлов в клетках и глобоидах оценивали по уровню эмиссии энергии их рентгеновских спектров [10]. Оценку содержания фитиновой кислоты в образцах семян льна проводили по методу Латта и др. [11], в основе которого лежит обесцвечивание фитиновой кислотой раствора комплексного аниона дисульфосалицилата железа красно-бурого цвета. Для определения неорганического фосфата использовали метод Лоури-Лопеса в модификации Скулачева [12].

Статистическую обработку данных осуществляли в программной среде Statistica 10.0. Долю влияния условий среды в общей изменчивости анализируемых признаков определяли как долю частной суммы квадратов в общем варьировании признака [13].

Результаты исследований и их обсуждение. Семена льна характеризуются уплощенной, продолговато-эллиптической формой, закруглены у основания и заострены на вершине [14]. Продольный размер среднего семени льна составляет 3,3–5,0 мм, масса 1000 семян – 4,0–13,0 г [15], основные запасающие ткани – паренхима семядолей и эндосперм [16]. По данным морфометрического анализа средняя длина семени сорта McGregor составляет 4,4 мм, ширина – 2,2 мм, масса 1000 семян – 5,9 г.

Содержание фитинового фосфора в семенах зависит от сорта и вида растения, климатических и географических условий выращивания, степени вызревания, а также особенностей технологии переработки зерна [17].

Пятилетний мониторинг показал, что в условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси в семенах льна масличного накапливается 29,3–35,4 г/кг фитиновой кислоты, что выше указанных в литературе (для Канады, например, получены данные 22,8–32,5 г/кг [18]). Для сорта McGregor средний многолетний уровень запасного фитина составляет 32,92 г/кг, неорганических фосфатов – 2,25 г/кг. Максимальная (за пять лет) концентрация фитина в семени сорта McGregor отмечена в 2005 г. – 35,54 г/кг, что связано, вероятно, с высокой интенсивностью осадков (более 188,0 мм) и снижением испарения (среднемесячная температура 17,7 °С) в августе, в период созревания

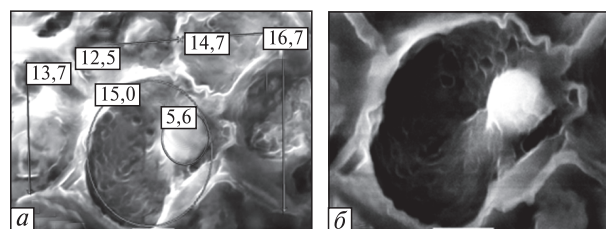


Рис. 1. Клетки запасающей паренхимы семядолей льна сорта McGregor в свете отраженных электронов. Фитиновый глобоид – светлое сферическое образование справа по экватору клетки. Абсолютные размеры клеток и клеточных структур (мкм) указаны стрелками (измерения проведены при использовании программного обеспечения микроскопа JSM-5610 LV); Ув.: а – 3500, б – 5000

семян. В 2008 г. сильная засуха на этапах формирования и налива семян (сумма осадков за июль и август – 153 мм) способствовала снижению накопления фитина в семенах льна (таблица).

Согласно результатам дисперсионного анализа влияние погодных условий сезона выращивания на уровень накопления соединений фосфора в семенах льна масличного сорта McGregor статистически значимо ($MS_{\text{фитин}} = 32,18$; $MS_{\text{роз}} = 0,3$, достоверно при $\alpha \leq 0,01$). Доля эффекта условий выращивания на уровень накопления фитина и неорганических фосфатов в семенах льна составляет 93,86 и 9,92 % соответственно.

На изображениях срезов зрелых семян льна, полученных с использованием сканирующей электронной микроскопии, видно, что запасающая паренхима семядолей состоит из тонкостенных пятиугольных клеток, средний продольный размер которых составляет 15,7 мкм, площадь – 170,0 мкм². Контуры клеток слегка волнистые. В клетках семядолей выявляются

Содержание фитина и неорганических фосфатов, г/кг, в семенах льна сорта McGregor

Год	Фитин	Неорганические фосфаты
2005	2,64 ± 0,04	35,54 ± 0,18
2006	2,32 ± 0,10	34,29 ± 0,21
2007	2,01 ± 0,08	34,96 ± 2,01
2008	2,44 ± 0,17	27,47 ± 0,41
2009	1,87 ± 0,07	32,34 ± 0,57
Среднее	2,25 ± 0,14	32,92 ± 1,46

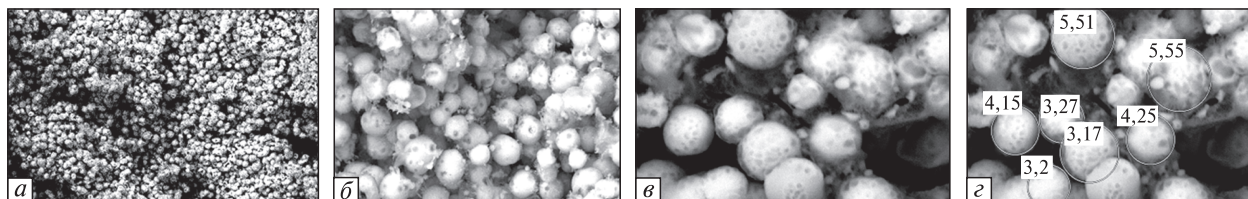


Рис. 2. Зольный остаток семян льна сорта McGreggor в свете отраженных электронов. В золе сохранена сферическая структура глобидов. Диаметр глобидов (мкм) измерен с использованием программного обеспечения микроскопа JSM-5610 LV. Ув.: а – 500; б – 2000; в – 5000; з – 5000

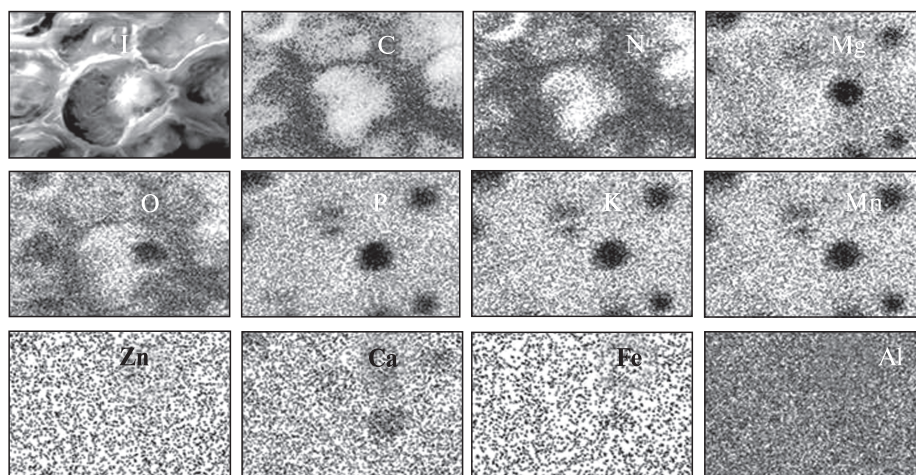


Рис. 3. Рентгенофлуоресцентные карты распределения элементов в клетках запасающей паренхимы семян льна сорта McGreggor: I – нативное изображение клеток в режиме низкого вакуума. Темные точки на изображениях соответствуют сигналам эмиссионных квантов элементов: С – углерода, Mg – магния, О – кислорода, Р – фосфора, К – калия, Mn – марганца, Zn – цинка, Са – кальция, Fe – железа, Al – алюминия. Высокая плотность точек на изображениях соответствует высокой концентрации элемента в компартментах клеток. Ув. 5000

на изображениях соответствуют сигналам эмиссионных квантов элементов: С – углерода, Mg – магния, О – кислорода, Р – фосфора, К – калия, Mn – марганца, Zn – цинка, Са – кальция, Fe – железа, Al – алюминия. Высокая плотность точек на изображениях соответствует высокой концентрации элемента в компартментах клеток. Ув. 5000

алейроновые зерна, которые содержат глобулины, альбумины и фитин, отложенный в виде сферического глобоида диаметром до 5,5 мкм (рис. 1).

Известна зависимость уровня накопления фитина в семени от абсолютного размера глобидов, например, в зернах низкофитиновой мутантной формы пшеницы глобиды имеют меньшие размеры и организованы в кластеры [19].

Для снижения уровня инструментальной ошибки, вызванной неравноценным рассечением клеток и разной глубиной залегания алейроновых зерен в цитоплазме, оценка изменчивости размера индивидуальных глобидов льна проведена на препаратах зольного остатка семян, полученного после термогравиметрического анализа. В результате медленной термоокислительной деструкции семян зола сохраняет характерную для глобидов микрогранулированную структуру (рис. 2). Вероятно, взаимодействие солей фитиновой кислоты с

кислородом воздуха приводит к образованию сложных псевдокристаллических структур, состоящих из оксидов металлов и фосфора.

В препаратах зола семян льна размер глобидов варьирует от 2,3 до 5,6 мкм. Исходя и того, что глобиды являются практически сферическими (средний фактор формы 0,9), объем индивидуального глобоида составляет 6,4–82,4 мкм³, или примерно 5 % объема клетки запасающей паренхимы.

Комплексообразующие свойства фосфатных групп позволяют фитиновой кислоте эффективно хелатировать катионы металлов, которые в свою очередь обладают высоким сродством к инозитолфосфатам. Аморфные комплексы фитина с металлами (до 22 молекул воды на одну молекулу фитата) при избытке кислоты растворимы в воде, при избытке катионов металлов – слабо- и нерастворимы [20]. В зависимости от снижения проч-

ности комплексов с фитиновой кислотой катионы металлов можно расположить в последовательности $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Ca^{2+}$ [21]. Однако минеральный состав глобидов определяется не только аффинностью катионов, но и доступностью элементов питания, а также генетическими особенностями вида. Фитиновая соль, выделенная из эукариотических клеток, содержит главным образом магний, кальция и калий [22].

Для оценки катионного состава фитина глобидов льна был использован электронно-зондовый энергодисперсионный (рентгенофлюоресцентный) анализ. На рис. 3 видно, что в зрелых семенах льна сигналы биогенных элементов (кислорода, азота, углерода) локализируются в зоне клеточной стенки и за исключением кислорода практически не регистрируются в зоне глобоида. Сопоставление рентгенофлюоресцентных данных выявило совмещенную локализацию в районе глобоида атомов фосфора, кислорода, калия, магния, марганца, кальция и железа. Массовая доля этих элементов в минеральном составе семян льна составила 39,0; 16,2; 24,1; 12,4; 9,2; 5,5 и 2,0 % соответственно.

Высокие значения сигналов фосфора и кислорода соответствуют их высокой массовой доле в составе фитиновой кислоты (28,2 и 58,2 % для фосфора и кислорода соответственно). Калий, магний, кальций, марганец и железо — элементы, необходимые для обеспечения нормального прорастания семян, важные компоненты ферментных систем, запасание которых в составе фитиновой соли позволяет регулировать метаболизм семени и наступление периода покоя.

Известно, что при определенных условиях выращивания в семенах льна могут накапливаться тяжелые металлы, особенно кадмий и медь [23]. В наших исследованиях с фитиновыми глобоидами ассоциированы два тяжелых элемента — железо и марганец, что может быть отнесено как к видовым особенностям льна, так и к влиянию условий выращивания. На накопление марганца в семенах льна оказывает влияние высокое содержание железа в почве [24].

Фитиновые глобоиды составляют около 5 % объема клетки запасующей паренхимы и предстают как сферические (фактор формы 0,7–0,9, при идеальной окружности 1,0), крупные (2,3–5,6 мкм) электронно-плотные включения, четко

выделяющиеся на фоне цитоплазмы и клеточной стенки. Энергодисперсионный анализ показал присутствие в химическом составе глобидов атомов фосфора, кислорода, калия, магния, марганца, кальция и железа. Как правило, в состав фитиновой соли также входит цинк, однако для льна этого не выявлено.

Погодно-климатические и геохимические условия центральной агроклиматической зоны Беларуси способствуют накоплению в семенах льна сравнительно высоких концентраций фитина 29,3–35,4 г/кг. Ведущая роль в определении уровня накопления фитина принадлежит условиям выращивания. Так, в зависимости от сезона выращивания (2005–2009 гг.) семена сорта McGregor содержали 27,47–35,54 г/кг фитиновой кислоты. Увеличение содержания фитина в семенах льна, вероятно, связано с увеличением доступности и подвижности в почве ионов фосфата при избыточном увлажнении.

Пищевая ценность запасного фитина в семенах льна определяется направлением их хозяйственного использования — для получения низкофитиновых кормов или высокофитиновых биологически активных добавок. Широкий диапазон генетической и средовой изменчивости исследованного признака позволяет сделать вывод о возможности дивергентной селекции льна как на повышение, так и снижение содержания фитиновой кислоты и фитина в семени льна масличного.

STRUCTURAL AND QUALITATIVE ANALYSIS OF THE PHYTIN ACCUMULATION IN THE MATURE FLAX SEEDS

V.V. Titok, S.I. Vakula, V.N. Leontiev, V.G. Lugin

E-mail: V.Titok@cbg.org.by

Central Botanical Garden NAS of Belarus, Minsk
Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus
Belarusian State Technological University

Different aspects of phytin accumulation in mature flax seeds are considered: range of variation, an impact of the environmental conditions and morphology of phytate globoids. Over a period of 2005–2009 harvest seasons the phytin concentration in flax seeds varied from 29.3 to 35.4 g/kg. Intensive rain and cool weather during seed maturation promoted phytic acid accumulation. According to the SEM, cotyledonous globoids are electron-dense spherical concretions with an average diameter of 2.3–5.6 μm. Chemical elements K, Mg, Mn, Ca and Fe were detected in the chemical composition of phytate globoids.

АНАЛІЗ СТРУКТУРНИХ ТА ЯКІСНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ДЕПОНУВАННЯ ФІТИНУ У ЗРІЛОМУ НАСІННІ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО

В.В. Туток, С.И. Вакула,
В.Н. Леонтьев, В.Г. Лугин

Розглянуто питання запасання фітину у зрілому насінні льону олійного – діапазон накопичення, вплив погодно-кліматичних умов сезону вирощування, морфологія та розмір фітинових глободів алейронових зерен. Зміст фітинової кислоти у насінні льону олійного врожаїв 2005–2009 рр. становив 29,3–35,4 г/кг. Висока інтенсивність опадів і низькі середньодобові температури в період дозрівання насіння сприяють накопиченню високих доз фітину. За даними скануючої електронної мікроскопії фітинові глободиди запасуючої паренхіми лляного насіння – це електронно-щільні сферичні конкреції діаметром 2,3–5,6 мкм. У хімічному складі фітинової солі льону виявлені хімічні елементи К, Mg, Mn, Ca, Fe.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Rubilar M., Gutiérrez C., Verdugo M. et al. Flaxseed as a source of functional ingredients // J. Soil Sci. Plant Nutr. – 2010. – **10**, № 3. – P. 373–377.
2. Bhatti R.S., Cherdkiatgumchai P. Compositional analysis of laboratory-prepared and commercial samples of linseed meal and of hull isolated from flax // J. Amer. Oil Chem. Soc. – 1990. – **67**, № 2. – P. 79–84.
3. Greenwood J.S., Bewley J.D. Subcellular distribution of phytin in the endosperm of developing castor bean: a possibility for its synthesis in the cytoplasm prior to deposition within protein bodies // Planta. – 1984. – **160**, № 2. – P. 113–120.
4. Graf E., Empson K.L., Eaton J.W. Phytic acid: a natural antioxidant // J. Biol. Chem. – 1987. – **262**, № 24. – P. 11647–11650.
5. Raboy V. Accumulation and storage of phosphate and minerals // Adv. Cell. Mol. Biol. – 1997. – **4**. – P. 441.
6. York J.D., Odom A.R., Murphy R. et al. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export // Science. – 1999 – **285**, № 5424. – P. 96–100.
7. Sasakawa N., Sharif M., Hanley M.R. Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate // Biochem. Pharm. – 1995. – **50**, № 2. – P. 137–146.
8. Voglmaier S.M., Keen J.H., Murphy J.E. et al. Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2 // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1992. – **187**, № 1. – P. 158–163.
9. Raboy V., Gerbasi P.F., Young K.A. et al. Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1 // Plant Physiol. – 2000. – **124**, № 1. – P. 355–368.
10. Kirkbright G.F., Sargent M. Atomic absorption and

fluorescence spectroscopy. – New York : Acad. press, 1974. – 523 p.

11. Latta M., Eskin M.A. Simple and rapid colorimetric method for phytate determination // J. Agricult. Food Chem. – 1980. – **28**, № 6. – P. 1313–1315.
12. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И. Методы биохимических исследований растений. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.
13. Ивантер Э.В., Коросов А.В. Элементарная биометрия : Учеб. пособие. – Петрозаводск, 2010. – 104 с.
14. Diederichsen A., Richards K. Cultivated flax and the genus *Linum* L. Taxonomy and germplasm conservation // Flax : The Genus *Linum* / Ed. A.D. Muir, N.D. Westcott. – CRC press, 2003. – P. 22–54.
15. Wiesnerová D., Wiesner I. Computer image analysis of seed shape and seed color for flax cultivar description // Comp. Electron. Agricult. – 2008. – **61**, № 2. – P. 126–135.
16. Щербатов В.Г., Лобанов В.Г. Биохимия и товароведение масличного сырья. – М.: Колос, 2003. – 360 с.
17. Reddy M.B., Hurrell R.F., Juillerat M.A., Cook J.D. The influence of different protein sources on phytate inhibition of nonheme-iron absorption in humans // Amer. J. Clin. Nutr. – 1996. – **63**, № 2. – P. 203–207.
18. Oomah B.D., Kenaschuk E.O., Mazza G. Phytic acid content of flaxseed as influenced by cultivar, growing season, and location // J. Agric. Food Chem. – 1996. – **44**, № 9. – P. 2663–2666.
19. Joyce C., Deneau A., Peterson K. et al. The concentrations and distributions of phytic acid phosphorus and other mineral nutrients in wild-type and low phytic acid Js-12-LPA wheat (*Triticum aestivum*) grain parts // Can. J. Bot. – 2005. – **83**, № 12. – P. 1599–1607.
20. Torres J., Dominguez S., Cerdá M.F. et al. Solution behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations, prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic/nuclear conditions // J. Inorg. Biochem. – 2005. – **99**, № 3. – P. 828–840.
21. Maddaiah V.T., Kurnick A.A., Reid B.L. Phytic acid studies // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1964. – **115**, № 2. – P. 391–393.
22. 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. Agricult. Food Chem. – 2007. – **55**, № 18. – P. 7547–7552.
23. Moraghan J.T. Accumulation of cadmium and selected elements in flax seed grown on a calcareous soil // Plant and Soil. – 1993. – **150**, № 1. – P. 61–68.
24. Wikoffa L., Moraghana J.T. Different iron/manganese relationships in two flax cultivars // J. Plant Nutr. – 1986. – **9**, № 37. – P. 839–849.

Поступила 10.07.13