

УДК 54.056, 577.15, 577.29

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ
ФАСОЛИ НА АМИЛАЗЫ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ****В.А. Базулева, Е.А. Прутенская, М.Г. Сульман**

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Введение. В настоящее время исследователи широко изучают возможности растительного сырья для производства питательных веществ и компонентов пищи. Бобовое сырье является ценным и очень богатым на белки, углеводы с низким гликемическим индексом, минеральные вещества (фосфор, калий, магний, кальций).

Белки бобовых представляют собой ингибиторы α -амилаз и трипсина. Они проявляют узкую специфичность по отношению к амилазам и протеиназам. Специфические ингибиторы ферментов были обнаружены во всех живых организмах. Они выполняют разнообразнейшие функции, такие, как защиту организма от патогенов, регуляцию активности ферментов и другие. Среди них особое место занимают ингибиторы гидролитических ферментов растений, которые являются одним из барьеров, стоящих на пути проникновения фитопатогенов в организм растения [1]. У растений природные ингибиторы отличаются друг от друга, способны приостанавливать прорастание, и играют заметную роль в сохранении покоя семян. Ингибирующая способность природных белков проявляется при нахождении этих веществ в цитоплазме. Ферменты выходят из связанного с белком состояния вследствие увеличения влажности зерна. Возникает вопрос о возможности использовании ингибиторов для хранения зерновых культур, учитывая их безопасность как веществ растительной природы (в отличие от химических реагентов и добавок).

Ингибиторы, содержащиеся в фасоли, проявляют активность к амилазам слюны и поджелудочной железы. Это позволяет использовать их для изготовления антидиабетических биодобавок к пище. Например, для лечения сахарного диабета второго типа можно применять ингибирование ферментов, расщепляющих углеводы для снижения уровня глюкозы в крови. С помощью специфических ингибиторов α -амилазы или α -глюкозидазы можно снижать уровень глюкозы в крови без значительных осложнений для организма. По этой причине ингибирование α -амилазы и α -глюкозидазы рассматривается как одна из перспективных стратегий лечения гипергликемии [2].

Цель работы заключается в изучении химико-биологических свойств полученных белковых веществ и исследование амилолитических характеристик на грибной, панкреатической и зерновой α -амилазах.

Материалы и методы. Для получения белковых веществ из фасоли *Phaseolus vulgaris* (сорта «Кидни» и «Бланш») использовали усовершенствованную технологию для выделения и концентрирования белковых веществ [3]. В качестве тест-системы для биологической активности выделенных белковых веществ использовали грибную α -амилазу *Aspergillus oryzae*, АС (амилолитическая активность) ~ 33 ед./мг, панкреатическую α -амилазу, АС ~ 13 ед./мг. Амилолитическую активность определяли в соответствии с ГОСТ 34440–2018 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилолитической активности.

Для определения ингибиторной активности полученных белковых веществ в условиях *in vivo* использовали семена ржи. Проращивание семян и определение энергии прорастания определяли в соответствии с ГОСТ 12038–84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Зерно ржи проращивали в растворах ингибиторов разной концентрации (3 %, 5 %, 7 %, 10 %), осуществляли протравку зерна ингибиторами и проращивали в рулонах [4].

Результаты и обсуждение. Первым блоком исследований было изучение влияния белковых веществ фасоли на грибную и панкреатическую амилазы. Для проведения экспериментов в условиях *in vitro* подбирали концентрацию амилаз, а затем проводили реакции ингибирования.

При концентрации α -амилазы *Aspergillus oryzae* равной 1 % наблюдался полный гидролиз крахмала, при концентрации α -амилазы *Aspergillus oryzae* равной 0,01 % гидролиз крахмала не произошел. Наиболее оптимальной концентрацией оказалась концентрация равная 0,05 %. При данной концентрации происходило постепенное снижение количества крахмала в среде, что позволит наблюдать процесс ингибирования грибной α -амилазы *Aspergillus oryzae* выделенными белковыми веществами из фасоли. В зависимости от величины концентрации белкового вещества, выделенного из фасоли (ингибитор) наблюдалась различная тенденция.

При уменьшении концентрации ингибитора происходило снижение активности. Наибольшее снижение активности наблюдается при добавлении растворов ингибитора с концентраций 0,000001 % и 0,00001 %. Дальнейшее уменьшение концентрации раствора ингибитора приводило к постепенному увеличению активности α -амилазы *Aspergillus oryzae*. Максимальное подавление ферментативной активности в пробах достигается при 0,015 %.

Изучали зависимость активности грибной α -амилазы *Aspergillus oryzae* от времени и ее активность при добавлении растворов ингибитора концентраций 0.000001 % и 0.00001 %. Максимальное ингибирование происходит через 10 минут после начала реакции, затем активность α -амилазы увеличивается. И после 15 минут течение ферментативной реакции приостанавливается. Таким образом, комплекс, образуемый между ингибитором и ферментом, нестабильный и зависит от концентрации ингибитора и субстрата.

Для дальнейших опытов по определению степени ингибирующего действия выделенных белковых веществ из фасоли на активность α -амилазы *Aspergillus oryzae* была выбрана концентрация ингибитора, при которой наблюдалось наибольшее снижение активности фермента – 0,00001 %.

На основе данных результатов можно сделать вывод, что при добавлении ингибитора активность амилазы падает, и меньшая концентрация оказывает большее воздействие на активность.

Для того чтобы определить то, как полученное белковое вещество из семян фасоли будет замедлять активность фермента, необходимо подобрать оптимальную концентрацию панкреатической α -амилазы.

Следующим этапом работы стало определение оптимальной концентрации панкреатической α -амилазы в ферментативной реакции. Диапазон концентрации амилазы варьировался от 0,1 до 2,2 %. Анализ проб осуществляли на 5, 10, 15, 20 минутах.

В процессе проведения экспериментов, было выявлено, что при повышении концентрации панкреатической α -амилазы свыше 1 % происходит полный гидролиз крахмала уже на 5 минуте.

Для лучшего представления об активности панкреатической α -амилазы было рассчитано остаточное количество крахмала в смеси в течение 20 минут ферментативной реакции. Из полученных результатов можно сделать вывод, что наиболее оптимальной концентрацией панкреатической α -амилазы является концентрация равная 0.6 %.

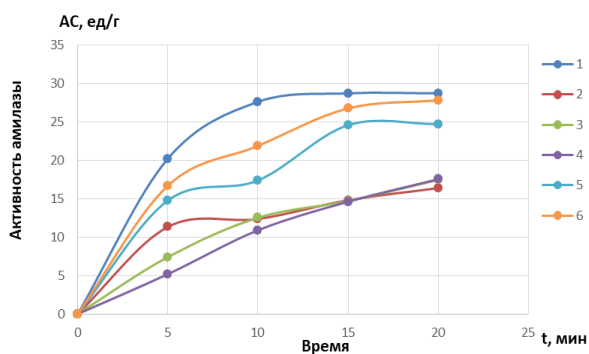


Рисунок 1 – Зависимость активности амилазы при добавлении ингибитора различной концентрации от времени: 1 – Активность амилазы без добавления ингибитора; 2 – активность амилазы при добавлении ингибитора с концентрацией 3 %; 3 – активность амилазы при добавлении ингибитора с концентрацией 2 %; 4 – активность амилазы при добавлении ингибитора с концентрацией 1 %; 5 – активность амилазы при добавлении ингибитора с концентрацией 0,5 %; 6 – активность амилазы при добавлении ингибитора с концентрацией 0,2 %

Наибольшее снижение активности наблюдается при добавлении растворов ингибитора концентраций 1 %.

Максимальное ингибирование фермента через 10 минут после начала процесса. На 20 минуте активность фермента увеличивается на 30 %.

Были взяты следующие концентрации растворов ингибитора: 0,2; 0,5; 1; 2; 3 % (рисунок 1). Для достижения максимального эффекта, необходимо использовать 1 % раствор ингибитора, так как снижение амилалитической активности наиболее эффективно.

Для определения посевных качеств большое значение имеет энергия прорастания. Ряд авторов прибегает к так называемой энергии наклеивания, когда оценивают количество наклевывшихся семян на самых ранних этапах прорастания.

К физиологическим изменениям, индуцируемым при старении семян, можно отнести: уменьшение скорости прорастания и роста проростков и повышенную чувствительность проростков к патогенам [5]. Вторым блоком исследований было изучение влияния белковых ингибиторов на амилазы ржи при прорастании.

При прорастании α -амилазная активность увеличивается, а количество ингибиторов зерна снижается. В результате активируются биохимические процессы роста.

Для эксперимента по торможению процесса прорастания использовали растворы белкового ингибитора с концентрацией в диапазоне от 1 до 10 %. Время проращивания осуществляли в течение 6 суток до становления проростка. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Данные по проращиванию семян ржи в растворах ингибиторов

Концентрация ингибитора, %	% проросших семян		
	2 сутки	3 сутки	6 сутки
0	51,67	60	73,34
1	46,67	51,67	63,33
3	26,67	50	60
5	3,33	28,83	28,83
7	0	0	0
10	0	0	0

Изучаемые ингибиторы существенно влияют на прорастание семян, они способны подавлять амилазы, находящиеся в зернах. Из-за этого количество проростков возрастает, но не так значительно, как в контрольном образце. При увеличении концентрации ингибитора наблюдается замедление роста и развития семян, при концентрации более 3 % процессы число проросших семян не достигает и 30 %. Процесс созревания ржи характеризуется периодическим изменением скорости накопления крахмала и активности амилаз. Следует отметить среднюю длину надземной части и корней проростков на 6 сутки: при контроле средняя длина ростков 0,5 см, корней 1,3 см, при ингибиторе 1 % – 0,24 см и 0,68 см, при ингибиторе 3 % – 0 см и 0,2 см, при ингибиторе 5 % – 0 см и не более 0,1 см, при ингибиторах с концентрацией 7 % и 10 % семена не прорастали.

Помимо проращивания в растворе ингибиторов осуществляли протравку зерна растворами ингибиторов с концентрациями 3; 5; 7 %. Из таблицы 2 видно, что с увеличением концентрации ингибитора уменьшает количество проросшего зерна. Можно сказать, что протравка замедляет рост семян, но менее эффективно, чем проращивание в растворе ингибиторов.

Таблица 2 – Данные по проращиванию семян после протравки растворами ингибиторов	
Концентрация ингибитора, %	% проросших семян
0	82,14
3	62,5
5	58,93
7	51,79

«фермент-ингибитор» ослабевает и, может быть, даже разрушается.

Белковые вещества фасоли – ингибиторы оказывают воздействие на амилазы зерна. Они способны замедлять биологическую активность в 1,5 раза. С увеличением концентрации ингибитора, процент прорастания семян снижается в 2,5 раза, а концентрация более 7 % полностью останавливает биологические процессы в зерне.

Данные об энергии прорастания свидетельствуют о том, что ингибиторы фасоли можно использовать для хранения зерновых культур, так как они будут снижать количество микроорганизмов, являются безопасной и экологичной субстанцией.

Исследование ингибиторов ферментов создает базу для внедрения этих веществ в пищевую и медицинскую сферу, например, для лечения сахарного диабета. Фасоль является источником соединений, способных эффективно ингибировать α -амилазу. Преимущество использования растительных ингибиторов в качестве терапевтических агентов при лечении сахарного диабета состоит в их доступности и легком способе выделения при помощи экстракции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–08–00185\19

Литература

Исламов, Р.А. Бифункциональный ингибитор α -амилазы / трипсина из зерна пшеницы / Р.А. Исламов, О.В. Фурсов // Прикладная биохимия и микробиология, 2007, том 43, № 4, с. 419–423.

Кунакова, Р.В. Растения как перспективные источники ингибиторов амилазы при разработке функциональных продуктов питания и профилактики сахарного диабета / Р.В. Кунакова, Р.А. Зайнуллин, Э.К. Хуснутдинова, Б.И. Ялаев, Е.П. Сегура, А.Д. Ильина // Общая биология. Вестник Академии наук РБ, 2016, том 21, 1 (81).

Сильченко, В.А. Разработка технологии получения белковых веществ и крахмала из бобовых культур / В.А. Сильченко, Е.А. Савченко // Сборник материалов VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 23–24 апреля 2018 г. – СПб.: Изд-во СПХФУ, 2018. – С. 506–508.

ГОСТ 12038–84 Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести Agricultural seeds. Methods for determination of germination. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2011. – 32 с.

Алексейчук, Г.Н. Сила роста семян зерновых культур и ее оценка методом ускоренного старения – Мн.: Право и экономика, 2009. – 44 с.