

UDC 577.152.3:616.3:542.978:602.44

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A PANCREATIC AMYLASE INHIBITOR

Galyna V. Krusir^{1*}, Christoph Hugi¹, Lena Breitenmoser¹, Liudmyla N. Pylypenko²,
Elena V. Sevastyanova², Kseniia I. Mazurenko²¹Institute for Ecopreneurship, School of Life Sciences, University of Applied Sciences und Arts Northwestern Switzerland, Hofackerstrasse 30, 4132 Muttenz, Switzerland²Odesa National University of Technology, St. Kanatna, 112, Odessa, Ukraine, 65039

Received 19 August 2022; accepted 9 November 2022; available online 26 January 2023

Abstract

The role and sources of digestive enzyme inhibitors, which are effective correctors of digestive processes in the body, are characterized. Screening of vegetable raw materials zoned in Ukraine for the content of pancreatic α -amylase inhibitors showed the expediency of using secondary raw materials – oat flour *Avena sativa*. An inhibitor of pancreatic amylase from oat flour has been isolated and characterized. It has significant anti-amylolytic activity. The obtained inhibitor is promising for creating compositions designed for nutritional correction of increased activation of amylolytic enzymes. Grain extracts and oat flour are characterized by significant inhibitory activity to pancreatic amylase. The water-soluble protein fractions from oat grains and oat flour have the maximum inhibitory activity. The highest degree of inhibitor extraction from oat flour occurs when extracting 0.15 M NaCl in 0.1 M hydrocarbonate buffer, pH 9.2. A monomeric pancreatic amylase inhibitor with a molecular mass of 25.11 kDa was isolated by affinity chromatography with a purity of 92.7; pH-optimum 5.5, thermo-optimum 37 °C. The inhibitor is most stable at pH 5.0 and 20 °C.

Keywords: oat grain, oat flour; extraction; affinity chromatography; gel electrophoresis; pancreatic amylase inhibitor; molecular weight; biotechnology; pharmacy.

ВИДІЛЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА ІНГІБІТОРУ ПАНКРЕАТИЧНОЇ АМІЛАЗИ

Галина В. Крусір¹, Хрістоф Хугі¹, Лена Брайтенмозер, Людмила М. Пилипенко²,
Олена В. Севастьянова², Ксенія І. Мазуренко²¹Інститут екопідприємництва, Школа наук про життя, Університет прикладних наук і мистецтв Північно-Західної Швейцарії, Гофакерштрассе 30, 4132 Муттенц, Швейцарія²Одеський національний технологічний університет, вул. Канатна, 112, м. Одеса, Україна, 65039

Анотація

Охарактеризовано роль та джерела інгібіторів травних ферментів, які є ефективними коректорами процесів травлення в організмі. Скринінг районованої в Україні рослинної сировини на вміст інгібіторів панкреатичної α -амілази показав доцільність використання вторинної сировини – борошенець вівса *Avena sativa*. Виділено та охарактеризовано інгібітор панкреатичної амілази з борошенець вівса. Він має значну антиамілолітичну активність і є перспективним для створення композицій, призначених для корекції харчування в різних умовах, що супроводжується посиленою активацією амілолітичних ферментів. Екстракти зерна і борошенець вівса характеризуються значною інгібіторною активністю по відношенню до панкреатичної амілази. Максимальну інгібіторну активність має водорозчинна фракція білка з зерен та борошенець вівса. Найвища ступінь вилучення інгібітору з борошенець вівса має місце за умов екстракції 0.15 М NaCl в 0.1 М гідрокарбонатному буфері, pH 9.2. За допомогою афінної хроматографії виділено мономерний інгібітор панкреатичної амілази з молекулярною масою 25.11 кДа, ступінь очищення якого складає 92.7; pH-оптимум – 5.5, термооптимум – 37 °C. Інгібітор найбільш стабільний за pH 5.0 і температури 20 °C.

Ключові слова: зерно вівса; борошенеця вівса; екстракція; афінна хроматографія; гель-електрофорез; інгібітор панкреатичної амілази; молекулярна маса; біотехнологія; фармація.

*Corresponding author: e-mail address: krussir.65@gmail.com

© 2022 Oles Honchar Dnipro National University;

doi: 10.15421/jchemtech.v30i4.263201

Вступ

Функціональні порушення травлення за частотою виникнення займають друге місце у сучасному світі після серцево-судинних захворювань, тому є особливо важливим дослідження нових профілактичних біологічно активних добавок (БАД) з фітоферментною складовою для нормалізації функціонування системи травлення. Кінець ХХ і початок ХХІ сторіч ознаменувалися широким використанням рослинних ферментних БАД, які застосовуються для корекції розладів травлення, містять гідролітичні ферменти, а також використовуються в лікувально-профілактичному харчуванні. Розробка технологій таких біологічно-активних речовин та пошук нових перспективних джерел рослинних коректорів процесів травлення (ферментів та інгібіторів травних ферментів) є актуальними завданнями [1–3].

Травні ферменти і інгібітори травних ферментів ефективно корегують процеси травлення в організмі, порушення яких призводить до таких захворювань як серцево-судинні захворювання, діабет, гіперліпідемія, новоутворення та ін. Проблема порушення функціонування травної системи розцінюється як епідеміологічна та вирішується за допомогою, у тому числі, препаратів ферментів переважно тваринного або мікробного походження, а також синтетичних інгібіторів [3; 4].

Останнім часом ферменти та їх інгібітори знаходять широке застосування у медицині, нутріціології, для запобігання розладів травлення, у разі захворювань печінки, підшлункової залози, у літньому й похилому віці [5–7]. Тривалий прийом ферментних препаратів, джерелом для одержання яких слугують, в основному, тканини тваринного походження й мікроорганізми, приводить до «звикання» – до припинення секреції власних ферментів шлунково-кишкового тракту. Рослинні ж ферменти позбавлені такого недоліку, вони володіють м'яким, природним, фізіологічним впливом на організм. Рослинні ферменти розглядають як альтернативну заміну ферментам тваринного і мікробного походження за їх використання в терапії захворювань шлунково-кишкового тракту. Рослинні ферменти та інгібітори травних ферментів у складі біологічно активних добавок сприяють не тільки перетравленню їжі, вони не викликають припинення продукування власних ферментів організму

людини. Вони також здатні функціонувати не тільки у кишківнику, але й у кислому середовищі шлунка, характеризуються незначною токсичністю і низьким алергенним потенціалом [8]. Таким чином, розробка і використання функціональних продуктів та БАД з вмістом інгібіторів амілази є актуальним і необхідним завданням, враховуючи, що стан здоров'я населення знаходиться в прямій залежності від системи харчування [9; 10]. Використання рослинних аналогів, які за багатьма показниками перевершують мікробні та тваринні аналоги, розглядається на сьогоднішній час як альтернативний шлях корегування функцій органів травлення.

Інгібітори рослинного походження, що мають здатність пригнічувати панкреатичну амілазу, представлені білками, фенольними сполуками та речовинами вторинного метаболізму [11; 12]. Встановлено, що насіння і вегетативні органи деяких рослин містять білкові речовини, які зв'язують ферменти з утворенням неактивних комплексів. Інгібітори амілаз у клітинах рослин, тварин і мікроорганізмів виконують важливі функції підтримки необхідного рівня активності власних амілаз, пригнічуючи їх негативний вплив у комплексній системі метаболізму вуглеводів. Раніше показано, що інгібітори амілаз приводять до збільшення втрати ваги у порівнянні з дієтою [1; 13]. Таким чином, існує можливість взаємодії між інгібіторами амілази та агентами зниження ваги.

Вивчення різних фракцій борошна зернових культур встановило [14], що вміст інгібіторів корелює з вмістом крохмалю і вони зв'язані з крохмалем за допомогою різних зв'язків. Встановлено також, що альбуміни знаходяться на поверхні крохмальних гранул і виконують головну роль у сполученні крохмальних гранул та запасних білків.

Інгібітори амілаз можна класифікувати на рослинні, тваринні та мікробні за джерелами їх одержання. Можна розділити на дві групи: по-перше, інгібітори α -амілаз, що знаходяться у рослинах: низькомолекулярні (абсцизова та розмаринова кислоти, деякі оліго- та полісахариди з молекулярною масою 500...8000 Да) та, по-друге, білкові інгібітори з масою від 12 000 Да і вище. Вони відрізняються розмірами молекул та індивідуальною специфічністю пригнічення активності амілаз різного походження [3; 11; 12; 14; 15].

Інгібітори α -амілази та α -глюкозидази

затримують гідроліз вуглеводів, знижують постпрандіальну гіперглікемію і покращують перебіг ЦД2 та переддіабету, мають різну термостійкість в процесі переробки сировини [13; 16–18].

Згідно з аналітичними відомостями інгібітори панкреатичної амілази широко розповсюджені в рослинних джерелах: арахісі *Arachis hypogaea*, кінських бобах *Vicia faba*, гречці *Fagopyrum sagittatum*, кукурудзі *Zea mays*, овсі *Avena sativa*, просі *Penisetum typhoideum*, пшениці *Triticum aestivum*, житі *Secale cereale*, ріжковому дереві *Ceratonie siliqua*, сорго *Leoti Sorghum*, квасолі *Phaseolus vulgaris*, ячміні *Hordeum vulgare*, рисі *Oryza sativa*, ражі *Eleusine Geartn*, клькві *Phaseolus vulgaris* [3; 12–15; 18]. Аналіз літературних джерел свідчить, що найбільшу антиамілолітичну активність виявляють альбуміни та глобуліни зернових культур [12], але пошук нових перспективних вітчизняних джерел рослинних гідролаз є актуальним і перспективним науковим і практичним напрямом.

Метою роботи було проведення скринінгу районованої в Україні рослинної сировини і вторинних продуктів її переробки на вміст інгібіторів панкреатичної α -амілази, дослідження умов екстрагування, виділення інгібітору панкреатичної амілази з борошенець вівса *Avena sativa* методом афінної хроматографії та дослідження його характеристик – молекулярної маси, ступеню очищення, визначення гомогенності, рН- та термооптимумів.

Об'єкти та методи досліджень

Для скринінгу вмісту інгібіторів панкреатичної α -амілази використовували найбільш поширені вітчизняні, районовані в Україні види зернових, бобових, олійних культур та вторинні продукти їх переробки – боби сої *Glycine max* і квасолі *Phaseolus vulgaris*, стручки квасолі *Phaseolus vulgaris* та гороху *Pisum sativum* L., зерно пшениці *Triticum vulgare*, гречки *Fagopyrum esculentum*, проса *Penisetum typhoideum*, ячменю *Hordeum vulgare*,

вівса *Avena sativa*, насіння льону *Linum usitatissimum* та рапсу *Brassica napus var. oleifera*, а також пшеничні висівки, соломку та борошенець вівса. Визначення інгібіторної активності водних екстрактів та екстрактів, отриманих з використанням 0.1 М фосфатного буферу (рН 7,8) проводили за [13].

Фракціювання білкових речовин борошенець вівса проводили за [19].

Інгібітор α -амілаз з борошенець вівса очищували через фракціювання білкової складової екстракту сульфатом амоніаку, наступну афінну хроматографію на біоспецифічному сорбенті α -амілаза-сефароза 4В (виробник ("Serva", Німеччина). Використовували класичний метод фракціювання екстрагованих білків розчинами $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ з різним ступенем насиченості – фракції між ступенем насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 % і 40 % (F20–40), 40 % і 75 % (F40–75), 75 % і 100 % (F75–100). В якості органічних осаджувачів для фракціювання використовували ацетон, метанол.

Методичні особливості афінної хроматографії, визначення молекулярної маси (Mr) отриманого білка-інгібітора за допомогою електрофорезу в 15 %-ому ПААГ з використанням калібрувальної кривої наведено нами в попередніх публікаціях [5; 20].

Результати та обговорення

Скринінг рослинної сировини на вміст інгібіторів панкреатичної α -амілази. Проводили визначення інгібіторної активності водних екстрактів та екстрактів, отриманих з використанням 0.1 М фосфатного буферу (рН 7.8), найбільш поширених вітчизняних видів зернових, бобових, олійних культур та вторинних продуктів їх переробки. Результати проведення скринінгу районованої в Україні рослинної сировини на вміст інгібіторів панкреатичної α -амілази наведено у табл. 1.

Table 1

Inhibitory activity to pancreatic amylase of plant extracts

Таблиця 1

Інгібіторна активність до панкреатичної амілази рослинних екстрактів

Зразки сорту	Інгібіторна активність, ІО/см ³	
	Водні екстракти	0.1 М фосфатний буфер, рН 7.8
Боби сої <i>Glycine max</i>	5.80	6.41
Боби квасолі <i>Phaseolus vulgaris</i>	6.70	7.20
Стручки квасолі <i>Phaseolus vulgaris</i>	0.12	0.15

		Продовження табл. 1
Стручки гороху <i>Pisum Sativum L.</i>	0.26	0.29
Зерно пшениці <i>Triticum vulgare</i>	2.38	2.44
Пшеничні висівки <i>Triticum vulgare</i>	0.29	0.31
Зерно гречки <i>Fagopyrum esculentum</i>	5.38	5.47
Зерно просо <i>Penisetum typhoideum</i>	1.44	1.52
Зерно ячменю <i>Hordeum vulgare</i>	3.37	3.52
Насіння льону <i>Linum usitatissimum</i>	0.35	0.51
Насіння рапсу <i>Brassica napus var. oleifera</i>	9.37	10.10
Зерно вівса <i>Avena sativa</i>	15.87	17.40
Солома вівса <i>Avena sativa</i>	0.01	0.02
Борошенця вівса <i>Avena sativa</i>	13.40	16.51

Наведені експериментальні дані свідчать, що інгібіторна активність водних екстрактів і екстрактів, отриманих за допомогою 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.8) мають порівняні значення. По відношенню до панкреатичної амілази максимальну інгібіторну дію проявляють екстракти вівса і вторинного продукту його переробки, борошенця вівса, що визначає їх потенційну перспективність як сировинних джерел вилучення інгібітору панкреатичної амілази.

Дослідження умов екстракції інгібітору. Враховуючи, що інгібітори рослинного походження, які здатні пригнічувати панкреатичну амілазу, представлені переважно білками [1; 3; 6; 11; 12; 15], проводили фракціювання білкової складової борошенець вівса і визначення ІА фракцій.

Результати фракціювання білкових речовин борошенець вівса і визначення ІА кожної фракції наведено в табл. 2.

Table 2

Inhibitory activity of protein fractions of oat flour in relation to pancreatic amylase (n = 3; p ≥ 0.95)

Таблиця 2

Інгібіторна активність білкових фракцій борошенець вівса по відношенню до панкреатичної амілази (n = 3; p ≥ 0.95)

Білкові фракції	Вміст білку, г/100г	Вміст білкових фракцій до загальної кількості білку, %	Інгібіторна активність, %
Загальний вміст білку	2.08	100.0	
Білковий азот. в тому числі:	1.71	82.2	
альбуміни	0.26	12.5	85.4
глобуліни	0.36	17.3	20.3
проламіни	0.48	23.1	0.00
глютеліни	0.61	29.3	0.00
Азот нерозчинного залишку	0.37	17.8	0.00

З результатів визначення ІА видно, що найбільша ІА спостерігається для водорозчинної фракції. Інгібіторною активністю володіє також глобулінова фракція, отримана з використанням розчину солі (0.5 М розчин NaCl). Можна припустити, що саме ця суміш білків – альбумінів і глобулінів – може бути використана для

отримання інгібітору панкреатичної амілази.

3. Вибір екстрагенту. Наступним етапом досліджень було визначення впливу складу екстрагенту на ступінь вилучення інгібітору. Вплив буферної системи на вихід інгібіторів амілолітичних ферментів з борошенець вівса оцінювали за максимальним значенням питомої інгібіторної активності (табл. 3).

Table 3

Extraction of amylase inhibitor (n = 3; p ≥ 0.95)

Таблиця 3

Екстракція інгібітору амілази (n = 3; p ≥ 0.95)

Екстрагуючий агент	pH	ІА. ІО/см ³	Концентрація білка. мг/см ³	Питома ІА. ІО/ мг білка
Фосфатний буфер. 1/15 М	4.8	0.033	0.73	0.045
-II-	6.0	0.090	1.45	0.062
-II-	8.0	0.189	3.94	0.048
Фосфатний буфер. 0.1 М	4.0	0.517	3.47	0.149
-II-	7.0	0.116	2.07	0.056
-II-	7.4	0.076	1.31	0.058
Ацетатний буфер. 0.1 М	4.5	-	0.57	-
-II-	6.0	-	0.74	-
-II-	11.2	0.280	0.84	0.334

<i>Продовження табл.3</i>				
Трис/HCl буфер. 0.1 М	7.2	0.268	6.81	0.039
-II-	8.1	0.240	5.11	0.047
-II-	9.1	0.082	6.31	0.013
Гідрокарбонатний буфер. 0.1 М	9.2	0.228	1.16	0.196
-II-	10.2	0.365	1.88	0.194
-II-	11.0	0.000	1.92	0.000
Гліцин/HCl буфер. 0.1 М	2.2	0.000	0.24	0.000
-II-	3	0.000	0.57	0.000
-II-	3.6	0.000	0.89	0.000
Гліциновий буфер. 0.1 М	8.6	0.340	1.92	0.177
-II-	9.6	0.203	4.41	0.046
-II-	10.6	0.131	4.68	0.028
Вода дистильована	6.0	0.005	6.00	0.030
0.1 М розчин NaCl	6.0	0.045	0.69	0.031
0.15 М розчин NaCl	6.0	0.062	1.36	0.084
0.5 М розчин NaCl	6.0	0.061	0.41	0.025
1 М розчин NaCl	6.0	0.064	0.23	0.015
1 М розчин сечовини	6.0	0.000	0.00	0.000
0.1 М NaCl в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.339	0.68	0.230
0.15 М NaCl в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.441	0.63	0.280
0.5 М сахарози в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.313	0.06	0.175
0.5 М гліцерину в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.328	0.34	0.110
0.05 М триптофану в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.257	1.07	0.275
0.05 М аланіну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.000	0.01	0.000
0.05 М лізіну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.000	0.01	0.000
0.05 М валіну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.111	0.33	0.037
0.05 М лейцину в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.156	1.56	0.244
0.05 М треоніну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.093	0.18	0.017
0.05 М метіоніну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.056	0.21	0.012
0.05 М гістидіну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.175	0.21	0.037
0.05 М глутаміну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.123	0.7	0.009
0.05 М серіну в 0.1 М гідрокар-бонатному буфері	9.2	0.071	1.14	0.081
0.05 М цистеїну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.241	0.21	0.050
0.05 М аспарагіну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.000	0.00	0.000
0.05 М проліну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.047	0.13	0.006
0.05 М фенілаланіну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.000	0.01	0.000
0.05 М ізолейцину в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.000	0.01	0.000
0.05 М гліцину в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.000	0.01	0.000
0.05 М аргініну в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.129	0.15	0.019
0.05 М тирозину в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.002	0.50	0.001
0.05 М глутамінова кислота в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.000	0.01	0.000
0.05 М аспарагінова кислота в 0.1 М гідрокарбонатному буфері	9.2	0.428	0.58	0.250

З результатів дослідження видно, що найбільша концентрація білка (6.81 мг/см³) спостерігається в екстракті, отриманому за допомогою 0.1 М трис/НСІ буферу, рН 7.2. Але питома ІА за даних умов має низьке значення, яке свідчить про те, що екстрагований білок не є інгібітором панкреатичної амілази. Найбільше значення питомої активності (0.196 ІО/мг білка) спостерігається за умови використання 0.1 М гідрокарбонатного буфера (рН 9.2), що свідчить про максимальний вихід інгібітору з рослинної сировини. Тому цей буфер було обрано за основу для подальшого дослідження впливу речовин, що, як відомо з літературних джерел, сприяє підвищенню ступеня вилучення інгібітора. До таких речовин належать неорганічні солі, багатоатомні спирти, сечовина, сахароза, глутатіон відновлений, амінокислоти, органічні природні кислоти та ін.

Результати визначення ІА розчинів, отриманих екстракцією сировини 0.1 М гідрокарбонатним буфером рН 9.2 з додаванням вищезазначених сполук, також наведено в табл. 3.

З представлених експериментальних результатів можна зробити висновок, що найбільша питома активність (0.280 ІО/мг білка) має місце за використання в якості екстрагуючого агента 0.15 М NaCl в 0.1 М гідрокарбонатному буфері, рН 9.2. Вихід інгібітору за умови екстракції наведеним розчином збільшується приблизно на 43 % у порівнянні з 0.1 М гідрокарбонатним буферним екстрагентом (рН 9.2).

На підставі наведених результатів дослідження можна зробити висновок, що найбільший вплив на повноту вилучення інгібітору з рослинної сировини мають триптофан, аспарагінова кислота і лейцин. Це дозволяє прогнозувати, що ці амінокислоти

беруть участь в утворенні комплексу інгібітор – панкреатична α -амілаза. Дослідження ступеню екстракції білкового інгібітору 0.1 М гідрокарбонатним буфером, рН 9.2, у присутності 0.15 М NaCl і 0.05 М триптофану свідчить про незначне збільшення виходу інгібітору (на 3.57 %) за сумісної присутності NaCl і триптофану в екстракційному середовищі, тому для подальших досліджень розчин триптофану не використовували.

Вивчення впливу органічних кислот (лимонна, аскорбінова, винна, оксалатна, яблучна та саліцилова кислоти) на ступінь вилучення інгібітору α -амілази з борошенець вівса показало, що наявність органічних кислот в екстрагенті приводить до зменшення виходу інгібітору панкреатичної амілази з борошенець вівса.

Таким чином, найбільший ступінь вилучення інгібітору амілази з борошенець вівса має місце за умови екстракції 0.15 М NaCl в 0.1 М гідрокарбонатному буфері, рН 9.2.

Для більш детального визначення білкової фракції, відповідальної за інгібування панкреатичної α -амілази, провели фракціонування білкової складової борошенець вівса.

Очищення інгібітору α -амілази з борошенець вівса. Цей етап включав фракціонування білкової складової екстракту сульфатом амоніаку або органічним осаджувачем. афінну хроматографію на біоспецифічному сорбенті α -амілаза-сефароза 4В та ліюфільну сушку.

Фракціонування екстрагованих білків проводили поширеним класичним методом – солями з отриманням розчинів різного ступеня насиченості солей. Проведено дослідження ІА в різних фракціях білкових речовин, отриманих за ступеня насиченості сольових розчинів від 20 % до 100 % (табл. 4).

Table 4

Fractionation of extracted oat flour proteins

Таблиця 4

Фракціонування екстрагованих білків борошенець вівса

Зразки	Концентрація білка, г/см ³	ІА, ІО/см ³	Питома ІА, ІО/мг білка
Е*	1.164	0.33	0.28
1	0.4	0.06	0.15
2	0.031	0.13	4.2
3	0.11	0.044	0.4
4	0.12	0.04	0.33
5	0.1	0.026	0.26

* Е – екстракт (0.15 М NaCl в 0.1 М гідрокарбонатному буфері, рН 9.2).

У цьому діапазоні концентрацій отримали 3 зразки:

1) Фракція між ступенем насичення (NH₄)₂SO₄ 20 % і 40 %-м ступенем насичення

цієї ж солі (F20–40) (зразок 1);

2) Фракція між ступенем насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 % і 75 %-м ступенем насичення цієї ж солі (F40–75) (зразок 2);

3) Фракція між ступенем насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75 % і 100 %-м ступенем насичення цієї ж солі (F75–100) (зразок 3).

В якості органічних осаджувачів для фракціонування використовували ацетон (зразок 4), метанол (зразок 5) (табл. 4).

За результатами, наведеними в табл. 4, можна зробити висновок про те, що за використання сульфату амоніаку із ступенем

насиченості між 40 і 75 % питома ІА отриманого осаду має максимальне значення і складає 4.2 ІО/мг білка, що в 15 разів перевищує активність екстракту. Низькі значення ІА фракцій, отриманих з використанням органічних осаджувачів, свідчать про можливий денатураційний вплив на білкову складову, що пояснюється відносно високим значенням температурного режиму проведення експерименту.

Отриманий білок-інгібітор очищали за допомогою афінної хроматографії (рис. 1, табл. 5).

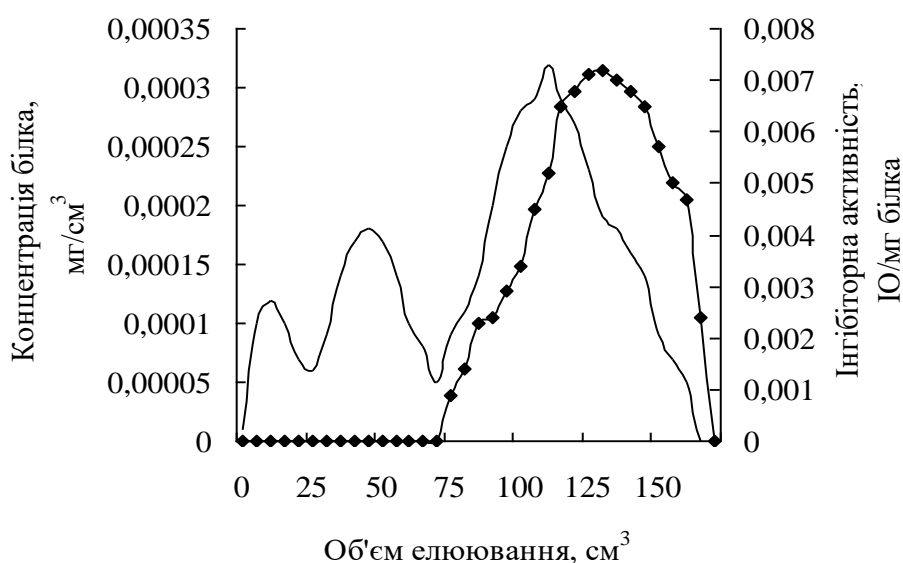


Fig. 1. Initial inhibitor chromatography curve on an affinity sorbent (pancreatic α -amylase-sepharose 4B): 1 - protein, optical density at 280 nm; 2 - fraction with inhibitory activity

Рис. 1. Вихідна крива хроматографії інгібітору на афінному сорбенті (панкреатична α -амілаза-сефароза 4В): 1 - білок, оптична густина при 280 нм; 2 - фракція, яка характеризується інгібіторною активністю.

Table 5

Purification of the inhibitor

Таблиця 5

Очищення інгібітору

Найменування	Стадія очищення		
	Екстракція	Фракціонування і діаліз	Афінна хроматографія
Об'єм, см ³	55.00	100.00	80.00
ІА, ІО/см ³	0.33	0.13	0.09
Білок, мг/см ³	1.16	0.03	0.004
Загальний білок, мг	64.00	3.09	0.28
Сумарна ІА, ІО/см ³	18.00	13.00	7.24
Питома ІА, ІО/мг	0.28	4.20	26.00
Ступінь очищення	1.00	15.00	92.70
Вихід, %	100.00	72.20	40.20

Хроматографічна крива виходу білка з колонки (рис. 1) характеризується трьома максимумами, з яких лише третій білковій фракції притаманна ІА.

Наведені в табл. 5 результати свідчать, що екстракт з концентрацією білка 1.16 мг/см³ та ІА 0.33 ІО/см³ був очищений до концентрації

білка в активній фракції елюату після афінної хроматографії 0.004 мг/см³ та ІА 0.09 ІО/см³. Ступінь очищення інгібітору складає 92.7. Таким чином, розрахунки дозволяють визначити, що з 100 г борошенець вівса можна отримати 1.85 мг інгібітору панкреатичної α -амілази, питома активність

якого складає 26 ІО/мг білка.

Експериментальні дані свідчать, що отриманий інгібітор знижує активність панкреатичної амілази на 38 % за вагового співвідношення інгібітор : фермент = 1 : 1, в той час як біфункціональний інгібітор із зерна пшениці знижує активність панкреатичної α -амілази на 30 %.

Характеристика інгібітору панкреатичної

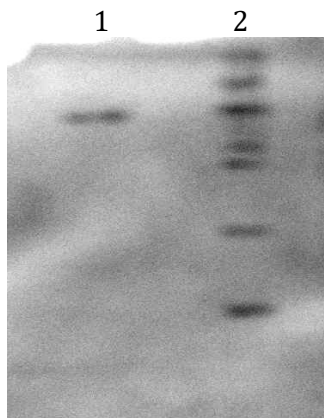


Fig. 2. Electrophoregram of isolated inhibitor: 1 - sample of α -amylase inhibitor; 2 - markers

Рис. 2. Електрофореграма виділеного інгібітора: 1 – зразок інгібітору α -амілази; 2 – маркери



Fig 4. Electrophoregram of isolated inhibitor

Рис. 4. Електрофореграма виділеного інгібітора

Мономерність, тобто відсутність ізоформ, отриманого за допомогою афінної хроматографії препарату активного білка-інгібітора підтверджено наявністю однієї білкової полоси при проведенні електрофорезу в 15 %-ому ПААГ (рис. 4).

Таким чином. методом афінної хроматографії отримано гомогенний інгібітор панкреатичної α -амілази. який має значну

α -амілази з борошенець вівса. Визначення молекулярної маси. Молекулярну масу (Mr) отриманого білка-інгібітора визначали електрофоретичним методом у 15 %-ому ПААГ (рис. 2). За допомогою калібрувальної кривої було визначено молекулярну масу отриманого білка за використання описаного методу очищення інгібітору панкреатичної амілази – 25.11 кДа (рис. 3).

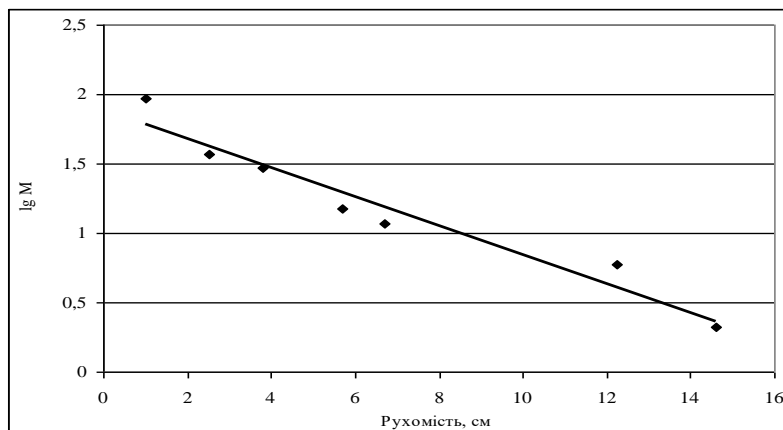


Fig. 3. Calibration curve for molecular weight calculation

Рис. 3. Калібрувальна крива для розрахунку молекулярної маси

інгібіторну активність, яку можна порівняти з інгібіторною активністю відомих рослинних інгібіторів α -амілаз.

Специфічність дії інгібітору. Однією з основних характеристик природних інгібіторів є специфічність їх дії.

В табл.6 наведено дані порівняльних досліджень специфічності дії інгібітору панкреатичної α -амілази з борошенець вівса та біфункціонального інгібітору із зерна пшениці (препарат «Ремоглюкол» (Німеччина)).

Як видно з наведених в табл.6 експериментальних результатів, отриманий інгібітор та інгібітор з препарату «Ремоглюкол» ефективно знижують активність панкреатичної α -амілази, частково знижують активність амілази слини людини і не впливають на активність мікробної α -амілази і протеаз. за винятком трипсину. активність якого знижує «Ремоглюкол». Встановлено, що інгібітор α -амілази з борошенець вівса не є біфункціональним інгібітором, оскільки не впливає на активність протеолітичних ферментів.

Comparative inhibitory activity of preparations from flour of oats and "Remoglucol" (weight ratio inhibitor: enzyme – 1 : 1)

Таблиця 6

Порівняльна інгібіторна активність препаратів з борошенець вівса і «Ремоглюкол» (вагове співвідношення інгібітор:фермент – 1 : 1)

Фермент	Інгібіторна активність, %	
	Інгібітор α -амілази з борошенець вівса	Інгібітор препарату «Ремоглюкол»
Панкреатична α -амілаза	38	30
α -амілаза слини людини	15	13
α -амілаза (<i>Bacillus subtilis</i>)	Не діє	Не діє
Трипсин	Не діє	25
Хімотрипсин	Не діє	Не діє
Пепсин	Не діє	Не діє

Таким чином, з побічного продукту переробки зерна вівса – борошенець вівса – з використанням афінної хроматографії виділено інгібітор панкреатичної амілази, який володіє значною ІА. Цей показник перевищує значення ІА рослинного інгібітору α -амілази із зерна пшениці, що міститься в складі БАД «Ремоглюкол». яку рекомендовано вживати для зниження рівня глюкози та нормалізації вуглеводного обміну в організмі людини.

Характеристика фізико-хімічних властивостей інгібітору. Для прогнозування дії інгібітору, розробки технології БАД та функціонального продукту на його основі необхідно знати, які чинники впливають на його активність. Найважливіше значення мають рН середовища і його температура.

Висновки

В ході даної роботи визначено як ефективно джерело інгібітору α -амілази зерна вівса і вторинну сировину його перероблення – вівсяні борошенця – за результатами проведення скринінгу районованої в Україні рослинної сировини на вміст інгібіторів панкреатичної α -амілази. Одержано препарат інгібітору α -амілази з борошенець вівса із питомою активністю 26 ІО/мг білка, молекулярна маса якого складає 25.11 кДа. Електрофоретичними дослідженнями встановлена його мономерність. Вихід препарату складає 40.2 %. Визначені специфічність дії та основні фізико-хімічні властивості препарату, необхідні для впровадження інгібітору у виробництво та прогнозування перспективності його використання).

References

- Celleno, L., Tolaini, M.V., D'Amore, A., Perricone, N.V., Preuss, H.G. (2007). A Dietary supplement containing standardized Phaseolus vulgaris extract influences body composition of overweight men and women. *Int J Med Sci*, 4(1), 45–52.
- Guariguata, L., Whiting, D.R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., Shaw, J.E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103(2):137–149. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>
- Ulbricht, C., Bryan, J. K., Conquer, J., Costa, D., Stock, T., Tanguay-Colucci, S., Weissner, W. (2010). An Evidence-Based Systematic Review of Amylase Inhibitors by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of Dietary Supplements*, 7(1), 78–95. <https://doi.org/10.3109/19390210903535043>
- Krusir, G.V., Beltyukova, S.V., Liventsova O.O., Prylutsky V.P. (2019). [Isolation and physicochemical properties of tomato seed protease]. *Pharmacol*, 4:28–36. (in Ukrainian).
- Krusir, G., Zakharchuk, V., Sevastyanova, E., Pylypenko, L., Moshtakov, S. (2020). Isolation of Alfalfa Seed Trypsin Inhibitor using Affinity Chromatography. *Journal of Chemistry and Technologies*, 28(3), 269–277. <https://doi.org/10.15421/08202803>
- Tormo, M.A., Gil-Exojo, I., Romero de Tejada, A., Campillo, J. E. (2004). Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an alpha-amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *British Journal of Nutrition (Br J Nutr.)*, 92(5), 785–790. [doi: 10.1079/bjn20041260](https://doi.org/10.1079/bjn20041260)
- Bays, H.E. (2004). Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. *Obes Res*, 12(8), 1197–1211. [doi: 10.1038/oby.2004.151](https://doi.org/10.1038/oby.2004.151)
- Chokshi, D. (2007). Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats. *Food Chem Toxicol*, 45(1), 32–40. [doi: 10.1016/j.fct.2006.06.021](https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.06.021)
- Reshta, S. P., Pylypenko, L. M., Danylova, O. I. (2021). [Physiological aspects of assessing the quality of grub products]. O.LDI-PLYuS: 334. (in Ukrainian).
- Arai, S., Yasuoka, A., Abe, K. (2008). Functional food science and food for specified health use policy in Japan: state of the art. *Current Opinion in Lipidology*, 19(1), 69–73. [doi: 10.1097/MOL.0b013e3282f3f505](https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282f3f505)
- Zoccatelli, G., Pellegrina, C. D., Mosconi, S., Consolini, M., Veneri, G., Chignola, R., Peruffo, A., Rizzi, C. (2007). Full-fledged proteomic analysis of bioactive wheat amylase inhibitors by a 3-D analytical technique: identification of new heterodimeric aggregation states. *Electrophoresis*, 28(3), 460–466. [doi: 10.1002/elps.200600348](https://doi.org/10.1002/elps.200600348)
- Iulek, J., Franco, O. L., Silva, M., Slivinski, C. T., Jr, B. C., Rigden, D. J., Grossi de Sá, M. F. (2000). Purification,

- biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(11-12), 1195-1204.
- [13] Ninomiya, K., Ina, S., Hamada, A., Yamaguchi, Y., Akao, M., Shinmachi, F., Kumagai, H. and Kumagai, H. (2018). Suppressive Effect of the α -Amylase Inhibitor Albumin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) on Postprandial Hyperglycaemia. *Nutrients*, 10(10), 1503; <https://doi.org/10.3390/nu10101503>
- [14] McCue, P.P., Shetty, K. (2004). Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. *Asia Pac J Clin Nutr.*, 13(1), 101-106.
- [15] Svensson, B., Fukuda, K., Nielsen, P. K., Bønsager, B. C. (2004). Proteinaceous alpha-amylase inhibitors. Review. *Biochim. Biophys. Acta*, 1696(2), 145-156. doi: [10.1016/j.bbapap.2003.07.004](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.07.004).
- [16] Rekha, M. R., Padmaja, G. (2002). Alpha-amylase inhibitor changes during processing of sweet potato and taro tubers. *Plant Foods Hum Nutr.*, 57(3-4), 285-294.
- [17] Cavalot, F., Petrelli, A., Traversa, M., Bonomo, K., Fiora, E., Conti, M., Anfossi, G., Costa, G., Trovati, M. (2006). Postprandial Blood Glucose is a Stronger Predictor of Cardiovascular Events Than Fasting Blood Glucose in Type 2 Diabetes Mellitus, Particularly in Women: Lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(3), 813-819, <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1005>
- [18] Morton, R. L., Schroeder, H. E., Bateman, K. S., Chrispeels, M. J., Armstrong, E., Higgins, T. J. (2000). Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *PNAS (Proc Natl Acad Sci U S A)*, 97(8), 3820-3825. <https://doi.org/10.1073/pnas.070054597>
- [19] Ostapchenko, L. I. (2012). [*Biochemistry*]. Kiev:NAU. (in Ukrainian).
- [20] Krusir, G., Zakharchuk, V., Sevastyanova, E., Pylypenko, L., Mazurenko, K. (2021). Isolation of lysozyme of Black sea mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Chemistry and Technologies*, 29(3), 410-416. doi: [10.15421/jchemtech.v30i1.255480](https://doi.org/10.15421/jchemtech.v30i1.255480).