



УДК 544.726

## Влияние синтетических и природных ингибиторов на физико-химические свойства глюкоамилазы

Ковалева Т.А.

*ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж*

Макарова Е.Л., Гладнева А.В.

*Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н.Бурденко, Воронеж*

Поступила в редакцию 3.02.2009 г.

### Аннотация

Исследовано воздействие различных четвертичных производных дигидрохинолина без заместителей (ЧСД-1), с группой  $\text{CH}_3$  (ЧСД-2),  $\text{O-CH}_3$  (ЧСД-3),  $\text{O-C}_2\text{H}_5$  (ЧСД-4) на каталитическую активность глюкоамилазы.

Установлено, что наибольшей ингибирующей активностью обладают ЧСД-2, ЧСД-1(Cl). Показано, что модификация четвертичных солей дигидрохинолина различными заместителями приводит к изменению взаимодействия синтетического ингибитора как с активным центром фермента, так и с другими группами полипептидной цепи.

Инкубирование молекулы энзима токсином Т-2 сопровождается возникновением многочисленных гидрофобных взаимодействий, приводящих к изменению третичной структуры глюкоамилазы, ответственной за катализ.

**Ключевые слова:** глюкоамилаза, активность, ингибиторы

We investigated effect of synthetic and natural inhibitors on activity of glucose amylase. It has been discovered that the high inhibitor activity is characteristic for sulfate and salicylate of dihydroxyololins and perchlorate of dihydroxyololin. Are shown, change of activity of enzyme in the presence of various inhibitors is not identical that is connected with presence of various assistants - radicals

By methods of Ultra Red spectroscopy we established that during incubation of enzyme with salt of dihydroxyololin intra-salt bonds between COOH- groups of enzyme are produced.

**Key words:** Glucose amylase, activity, inhibitors

### Введение

В последние годы особое внимание уделяют амилазам, широко распространенным в природе, физико-химические свойства которых были изучены на ранних стадиях развития энзимологии [1,2].

Повышенный интерес к амилазам обусловлен их применением в медицине, тонком органическом синтезе, пищевой и легкой промышленности в качестве эффективных биокатализаторов.

Глюкоамилаза ( $\alpha$ -1,4:1,6 глюкан-4,6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) катализирует реакцию гидролиза крахмала до глюкозы, атакуя только внешние нередуцирующие концы цепей полисахаридов, и широко используется в разработке новых прогрессивных технологий.

Ингибиторы амилолитических ферментов представляют собой одну из основных систем регуляции активности клетки и универсального, оперативного контроля процессов жизнедеятельности.

В настоящее время синтезируется большое количество биологически активных соединений. Среди них особое место занимают природные микотоксины и четвертичные аммониевые соли, которые содержат, по крайней мере, один гидрофобный радикал и оказывают местное раздражающее действие на кожные покровы, слизистые оболочки, органы дыхания [3].

Однако влияние четвертичных производных дигидрохинолина и природных ингибиторов микотоксинов на структурно-функциональные свойства амилазы недостаточно изучены.

## Эксперимент

Объектом исследования послужил фермент: глюкоамилаза из *Aspergillus awamori*, препарат Г20Х производства Ладыжинского завода ферментных препаратов, подвергнутый специальным методом очистки.

Для определения активности глюкоамилазы использовали глюкозооксидазный метод. Принцип метода заключается в том, что глюкоза окисляется кислородом воздуха при каталитическом действии глюкозооксидазы с образованием перекиси водорода и глюконата. Возникшую перекись водорода определяли по реакции окислительного азосочетания с замещенным фенолом и 4-аминоантипирином, которая катализируется пероксидазой.

Расчет каталитической активности производили по формуле:  $A = a \div b \times 180 \times 10$ ;

где  $a$  - количество глюкозы, образовавшейся в 1 мл гидролизата в мкг;

$b$  - количество фермента в 1 мл гидролизата в мг;

10 - время гидролиза в мин;

180 - молекулярная масса глюкозы.

В качестве субстрата использовали растворимый картофельный крахмал ( $5,8 \cdot 10^{-5}$ ;  $11,7 \cdot 10^{-5}$ ;  $17,5 \cdot 10^{-5}$ ;  $23,4 \cdot 10^{-5}$ ;  $23,9 \cdot 10^{-5}$  моль/л).

Взаимодействие четвертичных аммониевых солей дигидрохинолина, синтезированных на кафедре органической ВГУ, микотоксина Т-2 и элюата комбикормов, зараженных плесневыми грибами, осуществляли путем инкубации с раствором глюкоамилазы ( $10^{-6}$  моль/л) в течение 10 минут при комнатной температуре  $40^{\circ}\text{C}$  и рН 4,7.

Регистрацию ИК-спектров поглощения производили на спектрофотометре ИКС-14А в диапазоне  $4-400 \text{ см}^{-1}$ . Подготовку образцов осуществляли путем высушивания фермента до постоянной массы при  $50-60^{\circ}\text{C}$  с дальнейшим растиранием в агатовой ступке до мелкодисперсного состояния, перемешивая с KBr (соотношение  $1=100$ ) и таблетирования в пресс-форме. ИК спектры образцов анализировали по положению, форме и ширине полос поглощения [4].

Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи  $t$ -критерия Стьюдента.

## Обсуждение результатов

Интерес исследователей к четвертичным аммониевым солям, продуктам алкилирования аминов.

Это биологически активные вещества, обладающие бактерицидными свойствами, причем степень антимикробного эффекта возрастает соответственно увеличению плотности зарядов на атоме азота короткоцепочечного амина, входящего в состав молекулы.

Запатентованы соединения, являющиеся эффективными бактерицидными консервирующими составами, а также фунгициды, инсектициды, имеющие низкую токсичность и широкий спектр противомикробного и противогрибкового действия[5].

В ходе исследования установлено, что оптимальными условиями функционирования фермента являются:  $t=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}=4,7$ .

Показано, что инкубация глюкоамилазы с растворами дигидрохинолина (концентрации  $1,6 \cdot 10^{-3}$ ;  $2,1 \cdot 10^{-3}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-3}$  моль/л) приводит к снижению каталитической активности глюкоамилазы на 86%.

Для выявления механизма ингибирования глюкоамилазы дигидрохинолином была изучена зависимость активности фермента от концентрации субстрата в присутствии ингибитора (рис. 1).

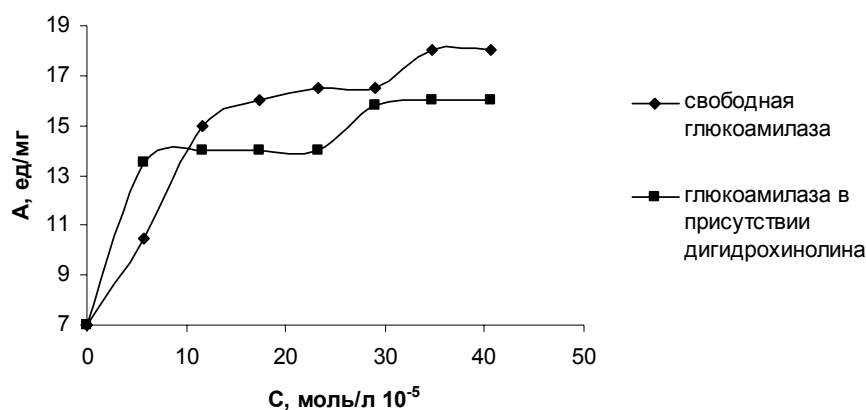


Рис. 1. Зависимость каталитической активности глюкоамилазы от концентрации субстрата в присутствии дигидрохинолина.

Установлено, что кинетика ферментативного гидролиза крахмала при модификации молекулы глюкоамилазы дигидрохинолином не изменяется, имеет место достоверное снижение каталитической активности по всему ходу кривой.

Методом обратных координат Лайнуивера-Берка были рассчитаны кинетические параметры реакции гидролиза субстрата и исследован тип ингибирования глюкоамилазы дигидрохинолином. (Табл.1).

Таблица 1. Кинетические параметры реакции гидролиза крахмала глюкоамилазой в присутствии ДГХ

Фермент	$V_{\text{max}}$ , мкмоль·мг/мин	$K_m$ , $\times 10^{-7}$ моль/л
Глюкоамилаза	17,24	2,50
Глюкоамилаза в присутствии ДГХ	15,52	2,81

Выявлено, что дигидрохинолин уменьшает каталитическую способность глюкоамилазы путем образования как двойного комплекса ингибитор-фермент, так и тройного комплекса ингибитор-фермент-субстрат. При этом уменьшается  $V_{max}$  реакции гидролиза крахмала. Дигидрохинолин, по-видимому, действует на функциональные группы активного центра глюкоамилазы, осуществляющих катализ, и на процесс образования фермент-субстратного комплекса, то есть ингибирование реакции гидролиза крахмала носит смешанный характер.

Далее было исследовано воздействие четвертичных солей дигидрохинолина без заместителей (ЧСД-1), с группой  $CH_3$  (ЧСД-2),  $O-CH_3$  (ЧСД-3),  $O-C_2H_5$  (ЧСД-4) на каталитическую активность глюкоамилазы (Табл.2.).

Обнаружено, что четвертичные соли дигидрохинолина обладают ингибирующими свойствами, что проявляется в снижении каталитической активности глюкоамилазы.

Таблица 2. Влияние четвертичных солей ди- и тетрагидрохинолина с различными заместителями на каталитическую активность глюкоамилазы

Исследуемое вещество	Количество глюкозы в 1 мл гидролизата, мкг	Удельная активность, ед/мг белка	$K_i$	% снижения активности под влиянием ингибитора
Глюкоамилаза без ингибитора	164	70±0,13	—	—
ЧСД-1 (Cl)	62	26,40±0,15	2,90	62
ЧСД-1 (I)	78	33,30±0,001	5,00	53
ЧСД-2	45	21,20±1,07	3,50	70
ЧСД-3	92	37,90±0,13	3,40	46
ЧСД-4	88	36,80±0,48	3,04	47

Изменение активности фермента в присутствии ингибиторов не одинаково, что связано с наличием различных заместителей - радикалов и анионов.

Наибольшей ингибирующей активностью, по нашим данным, обладает ЧСД-2, имеющая в 6 положении метильный радикал ( $-CH_3$ ). Это подтверждают данные литературы, где указывается, что четвертичные аммониевые соли, содержащие хотя бы один метильный радикал, обладают противомикробным действием [5].

Производные дигидрохинолинов отличаются не только радикалами в 6 положении, но и анионами, что было учтено при анализе их ингибиторных свойств.

Наши эксперименты показали, что производные дигидрохинолина, содержащие в качестве заместителей анион Cl<sup>-</sup>, снижают каталитическую активность глюкоамилазы более значительно (62%), чем соединения с подобной структурой, имеющие анион I<sup>-</sup> (53%).

Эти данные согласуются с работами Эпштейна А.Е. и других авторов, где отмечено, что введение в четвертичные аммониевые соли различных функциональных групп оказывает влияние на биологическую активность соединения. Так замена метильных радикалов на этильные снижает антимикробное действие четвертичных аммониевых солей [3,5].

Модификация четвертичной соли дигидрохинолина различными заместителями приводит к изменению взаимодействия синтетического ингибитора, как с активным центром фермента, так и с другими группировками полипептидной цепи.

Далее нами были изучены зависимости активности фермента от

концентрации субстрата при инкубации четвертичными солями дигидрохинолина, имеющими радикал  $\text{CH}_3$  (ЧСД-1) и  $\text{O-CH}_3$  (ЧСД-2) в шестом положении.

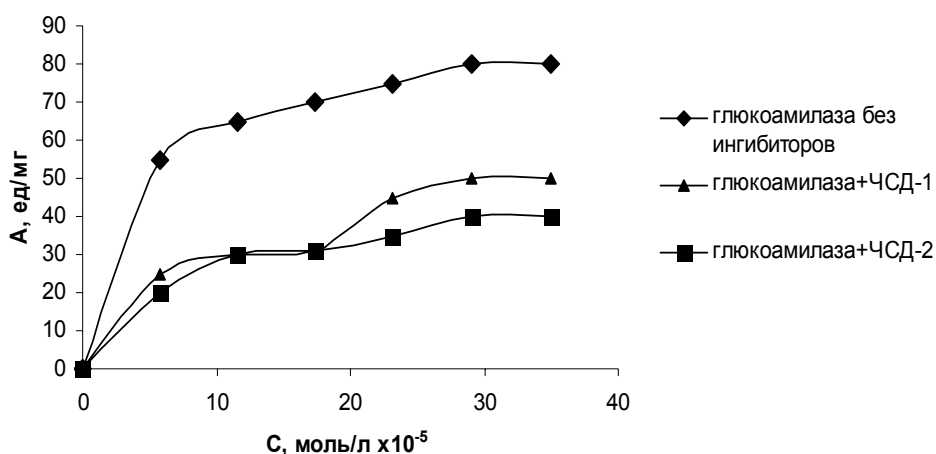


Рис. 2. Зависимость скорости реакции гидролиза крахмала глюкоамилазой от концентрации субстрата в присутствии ингибиторов (ЧСД-1, ЧСД-2)

Показано, что ЧСД-1 и ЧСД-2 достоверно снижают каталитическую активность глюкоамилазы при различных концентрациях субстрата.

При этом кинетика ферментативного гидролиза крахмала, как нативным, так и модифицированным ферментом не соответствует уравнению Михаэлиса. Это позволяет сделать заключение, что инкубация фермента с ЧСД-1 и ЧСД-2 не влияет на состояние четвертичной структуры глюкоамилазы.

Установлено, что ингибиторы ЧСД-1 (I), ЧСД-3, ЧСД-4 являются неконкурентными, а дигидрохинолин, ЧСД-2, ЧСД1(Cl) – смешанного типа. (Табл.2). Об этом свидетельствуют расчеты кинетических параметров реакции ингибирования данными веществами. Показано, что при воздействии ЧСД-3, ЧСД-4  $K_m$  не изменяется по сравнению с нативным ферментом ( $V_{max}$  уменьшается в 2 раза).

Очевидно, что исследованные соединения взаимодействуют либо с ферментом, либо с фермент-субстратным комплексом, при этом возможно локальное изменение распределения заряда на участке связывания, что затрудняет ионизацию групп, существенных для проявления каталитической активности.

Токсические метаболиты плесневых грибов – микотоксины широко распространены в природе, обладают мутагенными, тератогенными и канцерогенными свойствами.

Выделяют четыре основных класса микотоксинов: афлатоксины, охратоксины, зеараленоны и трихотецены.

В качестве природных загрязнителей пищевых продуктов и кормов обнаружено четыре представителя класса трихотеценов: Т-2-токсин, ниваленол, дезоксиниваленол, диацетотоксикирпенол.

Афлатоксины и охратоксины при остром отравлении вызывают очаги некрозов в миокарде, печени, почках, селезенке, желудочно-кишечном тракте.

Зеараленон отличается от других микотоксинов наличием выраженных гормоноподобных свойств и отсутствием летального действия [6,7].

Результаты проведенных исследований показали, что микотоксин Т-2 является ингибитором фермента глюкоамилазы. Минимальная концентрация, при которой обнаруживается ингибирующий эффект,  $10^{-8}$  моль/л. Каталитическая активность глюкоамилазы не зависит от времени инкубирования ее с микотоксинами

в интервале 10-50 минут, поэтому инкубацию фермента с микотоксинами осуществляли в течение 10 минут при 40 °С.

Установлено, что микотоксин Т-2 ( $10^{-4}$  моль/л) вызывает уменьшение каталитической активности глюкоамилазы на 42% по сравнению с нативным энзимом.

Для выяснения характера взаимодействия микотоксина Т-2 и четвертичных солей дигидрохинолина были сняты ИК спектры глюкоамилазы, инкубированной с исследуемыми соединениями и контрольных образцов.

ИК спектр глюкоамилазы имеет четкие полосы поглощения при 3373 - 3254  $\text{см}^{-1}$ , обусловленные растяжением -N-H-связи. Кроме того, слабо проявляется полоса поглощения амид I ( $1650\text{-}1660 \text{ см}^{-1}$ ), отвечающая за растяжение связей- C=O.

Полосы поглощения  $1540\text{-}1550 \text{ см}^{-1}$ , представляющие собой комбинацию примерно одинаковых вкладов от растяжения связей - C-N- и деформации связи -N-H- практически не наблюдаются.

Остальная часть спектра определяется природой составляющих аминокислот. Например, полоса поглощения  $1400 \text{ см}^{-1}$  обусловлена наличием - C-CH<sub>3</sub>- и - C - (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> групп. Пик в области  $1000 \text{ см}^{-1}$  характеризует монозамещенное ароматическое кольцо, входящее в состав фенилаланина, триптофана и гистидина.

При взаимодействии глюкоамилазы с четвертичными аммониевыми солями наблюдается изменение спектров фермента в области  $1400 - 1500 \text{ см}^{-1}$  и  $3200 - 2600 \text{ см}^{-1}$ .

Показано, для полосы амид II ( $1550 \text{ см}^{-1}$ ), что резко увеличивается интенсивность поглощения и четко проявляются полосы поглощения  $1400\text{-}1500 \text{ см}^{-1}$ . При этом полоса  $1400 \text{ см}^{-1}$  сдвигается в сторону меньших длин волн ( $1450 \text{ см}^{-1}$ ), что вероятно, свидетельствует об изменении вторичной структуры глюкоамилазы, связанной с перераспределением  $\alpha$  - спиральных участков,  $\beta$  -слоев и нерегулярных структур.

Данные ИК спектроскопии подтверждаются изменением кинетических закономерностей ферментативного катализа, свидетельствующих о нарушении конформации белковой молекулы.

Аналогичные изменения в ИК спектрах наблюдаются для четвертичных солей дигидрохинолина, которые проявляют высокую ингибирующую активность (ЧСД-2).

При взаимодействии четвертичных солей дигидрохинолина изменения спектров в области  $1440\text{-}1500 \text{ см}^{-1}$  в наших опытах не наблюдалось.

Полоса поглощения  $1500 \text{ см}^{-1}$  незначительно сдвигается в длинноволновую область с изменением интенсивности поглощения, что указывает на смещение кислорода карбонильной группы в направлении азота амидной группы хинолинового кольца, т.е. комплекс фермента и ЧСД поддерживается водородными связями.

Введение в состав производного четвертичных солей дигидрохинолина группы - CH<sub>3</sub> и O-CH<sub>3</sub> приводит к значительному уменьшению константы ингибирования ( $K_i$ ) и изменению полосы поглощения  $3373\text{-}3254 \text{ см}^{-1}$ .

На ИК спектре в области  $3200 - 3600 \text{ см}^{-1}$  имеет место сужение полос поглощения, что может быть обусловлено уменьшением количества водородных связей, стабилизирующих третичную структуру фермента[8,9].

Введение в производные дигидрохинолинов метильных группировок, усиливающих гидрофобное взаимодействие между ферментом и ингибитором, способствует уменьшению  $K_i$  и затруднению процессов образования фермент-субстратного комплекса. Причем производные дигидрохинолина за счет

гидрофобных “сил” сцепления могут быть частично втянутыми в щель активного центра, затрудняя тем самым проникновение высокомолекулярного субстрата к функциональным группам каталитического участка [10].

ИК спектры глюкоамилазы, инкубированной с микотоксином Т-2 ( $10^{-4}$  моль/л) характеризуется заметными изменениями в области поглощения  $\text{CH}_3$ -групп (2900-2920  $\text{cm}^{-1}$ ), интенсивность данного пика увеличена, что может свидетельствовать о появлении гидрофобных групп на поверхности молекулы за счет действия токсина. Полоса амид I смещается из области 1606  $\text{cm}^{-1}$  в 1671  $\text{cm}^{-1}$ .

В ИК спектре модифицированной глюкоамилазы сохраняет свое положение пик при 1000  $\text{cm}^{-1}$ , отвечающий за монозамещенные ароматические группировки, но он несколько меняет свои очертания, что может указывать на новые заместители, появляющиеся в этих группах. Значительно увеличена интенсивность пика на 1353  $\text{cm}^{-1}$ , характеризующего наличие групп  $\text{C}-\text{CH}_3$ .

Анализ ИК спектра глюкоамилазы, модифицированной токсином Т-2, позволяет сделать заключение о том, что между молекулой фермента и микотоксином Т-2 возникают многочисленные гидрофобные взаимодействия, приводящие к значительному изменению конформации белка и выходу на поверхность  $\text{R}$ -радикалов гидрофобных аминокислотных остатков, чем и обусловлено снижение каталитической активности фермента.

Использование молекулярной модели для оценки токсичности позволяет за 3-4 часа получить количественную информацию о содержании микотоксинов, что позволяет считать данный метод экспрессным [11,12].

## Заключение

Наши исследования показали значительное влияние различных заместителей в ряду дигидрохинолинов на ингибиторные свойства по отношению к глюкоамилазе. Наибольшая степень снижения каталитической активности фермента была обнаружена у производных дигидрохинолина, содержащих метильный радикал, а также анионы  $\text{Cl}^-$ , что может быть обусловлено увеличением скорости образования фермент-субстратного комплекса за счет изменения эффективного заряда щели активного центра и появления стерических затруднений при адсорбции молекул крахмала на связывающих функциональных группах.

Результаты наших экспериментов по исследованию микотоксина на каталитическую активность глюкоамилазы позволяют рекомендовать использование данной молекулярной модели для разработки экспресс-метода определения микотоксинов в пищевых продуктах и кормах.

Таким образом, целесообразно изучать влияние синтетических и природных ингибиторов на физико-химические свойства ферментов, представляющее систему контроля, защиты и регуляции активности клетки с целью поиска возможных медицинских препаратов, инновационных методов определения токсичности и усовершенствования многих существенных технологий и созданию новых.

## Список литературы

1. Галич И.П. Амилазы микроорганизмов. – Киев: Наук. Думка, 1987. – 192 с.
2. Жеребцов Н.А. Амилолитические ферменты в пищевой промышленности. – М.: Лег. и пищ. Пром-сть, 1984. – 160 с.

- 3.Эпштейн А. Е., Цвирова И. М., Крученок Г. Б. Сравнительная бактерицидная активность четвертичных аммониевых солей.- Хим. Фарм.ж,1984,№10, с.1218-1224.
- 4.Кучеров А.К., Кочубей Е.М., 1983 диссерт.
- 5.Бактерицидные аммониевые соли на основе эфиров монохлоруксусной кислоты/А.Е.Эпштейн, В.Е.Ливанов, М.Ю.Телегин и др.//хим.-фарм.журнал.- 1980.- №5.-с.23-27.
- 6.Спесивцев Н.А. Микозы и микотоксины.-М.: Мир, 1985.-320с.
- 7.Димитров М.К. К вопросу об алиментарных токсикозах // Гигиена и санитария.- 1966.-№6.-С.21-22.
- 8.Ковалева Т.А., Башарина О.В., Селеменев В.Ф. / Исследование структуры глюкоамилазы методом ИК спектроскопии биополимеров.- Харьков, 1991.- с.134-135.
- 9.Изучение некоторых свойств глюкоамилазы сорбционными и спектральными методами Ковалева Т.А., Селеменев В.Ф., Плохих А.М. и др. Теория и практика сорбционных процессов. – Воронеж, 1985. – Вып. 17. – с. 58-61.
10. Олигомерные белки: структурно – функциональные модификации и роль субъединичных контактов /В. Г. Артюхов (и др.). – Воронеж: Изд-во Воронежского государственного ун-та, 1997. – 264 с.
11. Курмаков И.А., Таланов Г.А. Определение токсичности комбикормов, пораженных микроскопическими грибами // Ветеринария.-1977.-№10.-С.98-99.
12. Афанасьева Г.А., Щербухин В.Д. Исследование возможностей применения глюкозооксидазного метода определения глюкозы // Прикл. Биохимия и микробиол.- 1975.-Т.11, вып.9.-С.460-462.

---

**Ковалева Тамара Андреевна** – профессор кафедры биофизики и биотехнологии, доктор биологических наук Воронежского государственного университета, тел.8(4732)208586

**Макарова Екатерина Леонидовна** – ассистент кафедры биохимии ВГМА, аспирант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

**Гладнева Алла Викторовна** – зав. биохимической лабораторией поликлиники №15 г/.Воронежа

Kovaleva Tamara A.- professor of biotechnology department, doctor of biological science, Voronezh State University, e-mail: [Tamarakovaleva@inbox.ru](mailto:Tamarakovaleva@inbox.ru)

**Makarova Ekaterina L.** – assistant of biochemistry department, Voronezh N.N. Burdenko State Medical Academy, postgraduate (student) of biophysics and biotechnology department, Voronezh State University e-mail: [makarova7809@mail.ru](mailto:makarova7809@mail.ru)

**Gladneva Alla V.** – the manager. Biochemical laboratory of polyclinic of №15 of Voronezh