

Rastlinné inhibitory α -amylázy a ich vplyv na využiteľnosť polysacharidov obsiahnutých v strave

Plant α -amylase inhibitors and their effect on the utilization of polysaccharides contained in the diet

Slavomír Kurhajec • Aleš Franc

Došlo 7. července 2019 / Prijato 27. července 2019

Súhrn

S rozvojom civilizačných chorôb, ako je diabetes mellitus, metabolický syndróm, prípadne obezita, rastie aj úsilie nachádzať nové liečivá predovšetkým z prírodných zdrojov. Patria medzi ne aj inhibitory α -amylázy, enzýmu, ktorý v tele zdravého človeka štiepi polysacharidy na jednoduchšie cukry. Vzhľadom k tomu, že toto štiepenie ovplyvňuje glykémiu, ktorú je snaha terapeuticky meniť, vzrastá aj záujem o tieto látky. Tento prehľadový článok mapuje druhy inhibitorov amylázy vrátane ich prírodných zdrojov.

KLúčové slová: inhibitory amylázy • α -amyláza • rastlinné inhibitory • štiepenie škrobu

Summary

Development of civilization diseases such as diabetes mellitus, metabolic syndrome or obesity, enforces the increasing effort to find new drugs, especially from natural sources. These include α -amylase inhibitors, which break down polysaccharides into simple sugars in the body of a healthy person. As this cleavage affects the level of blood sugar, which is sought to be therapeutically influenced, there is a growing interest in these substances. This review maps the types of amylase inhibitors, including their natural resources.

Key words: amylase inhibitors • α -amylase • inhibitors in plants • breakdown of starch

Metabolizmus polysacharidov a α -amyláza

K tomu, aby vôbec došlo k resorpcii polysacharidov z gastrointestinálneho traktu do krvného riečiska, musí najskôr prebehnúť ich premena na monosacharidy. Tento dej sa odohráva pomocou dvoch hlavných enzýmov. Jedným z nich je **amyláza**, glykoproteín patriaci do skupiny α -1,4-glukozidáz. Je lokalizovaný v slinách a v tráviacej šťave, ktorú do tenkého čreva vylučuje pankreas. Katalyzuje hydrolytickú degradáciu polysacharidov, a to škrobu (amylózy i amylopektínu) a v potrave obsiahnutého glykogénu. Naštiepením α -1,4-glykozidických väzieb vznikajú rôzne produkty ako maltóza, izomaltóza, maltotrióza, no predovšetkým dextríny. Tie sú tvorené značne vetvenými molekulami s minimálne piatimi glukózovými jednotkami. α -amyláza nedokáže štiepiť α -1,6-glykozidické a ani β -1,4-glykozidické väzby celulózy. Jej účinok stabilizujú ióny vápnika a chloridové, bromidové, jodidové či dusičnanové anióny zvyšujú aktivitu tohto enzýmu¹. Trávenie polysacharidov už teda začína v ústnej dutine prostredníctvom slinnej amylázy. Tá je schopná naštiepiť asi len 5 % škrobu obsiahnutého v potrave. Jeho trávenie v žalúdku už ďalej neprebíha, nakoľko sa pri pH nižšom než 3,5 úplne inaktivuje^{2,3}. Zvyšné kyseliny obsiahnuté v žalúdočnej trávenine sú neutralizované bikarbonátom, ktorý do tenkého čreva vylučuje pankreas. Tejto neutralizácii napomáha aj alkalický hlien pokrývajúci povrch tenkého čreva. Výkyvy v hodnotách pH, ktorým je trávenina vystavená, slúžia k jej lepšiemu spracovaniu a zefektívňujú tak aj činnosť vyššie spomínaných enzýmov². Amyláza pankreatickej šťavy v porovnaní s amylázou slín je síce o niečo účinnejšia, avšak zo štruktúrneho hľadiska je s ňou viac-menej zhodná. Rozdielna účinnosť sa vysvetľuje tým, že pH pankreatickej šťavy sa takmer zhoduje s optimálnym pH enzýmu (6,8–7,1)⁴. Ďalším enzýmom, ktorý sa uplatňuje pri trávení sacharidov je **α -glukozidáza**. Nachádza sa v kefkovom leme buniek mikrokľkov, v sliznici tenkého čreva. Vyvoláva rozklad všetkých oligosacharidov s obsahom glukózy naviazanej α -glykozidovou väzbou na akúkoľvek hexózu. V organizme sa uplatňuje pri hydrolyze disacharidov, predovšetkým sacharózy, maltózy či laktózy. Z produktov štiepneho procesu polysacharidov, ktoré nachádzame na konci duodena sú najviac zastúpené doposiaľ nehydrolyzované disacharidy (α -maltóza, sacharóza) a pochopiteľne aj nestráviteľné

S. Kurhajec

Department of Pharmacognosy and Botany

University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice

Slovakia

Assoc. prof. PharmDr. Aleš Franc, Ph.D. (✉)

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences

Palackého 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic

e-mail: franca@vfu.cz

sacharidy (celulóza, pektín)⁵⁾. Nestrávené zvyšky vysokomolekulárneho škrobu a glykogénu z potravy ako posledná štiepi **glukoamyláza**, ktorá z neredukujúceho konca odstraňuje koncové jednotky glukózy. Vzniknuté monosacharidy organizmus už dokáže absorbovať. Zaujímavosťou je, že slinná amyláza úplne chýba u malých detí a niektorých zvierat ako pes, mačka, koň a vtáky, no napriek tomu to pre ne nepredstavuje žiadne závažné ťažkosti v trávení^{6, 7)}.

Inhibitory α -amylázy

K najznámejším inhibítorm α -amylázy patrí **akarbóza**. V mnohých štúdiách je považovaná za štandard pri hodnotení inhibičného účinku rozličných látok na tento enzým⁸⁾. Jedná sa o aminocyklitolovú zlúčeninu, u ktorej bol zaznamenaný účinok aj na α -glukozidázu. Zo štruktúrneho hľadiska je pseudotetrasacharidom zahŕňajúcim jeden atóm dusíka. K jej prednostiam patrí to, že sa po perorálnom podaní vôbec nevstrebáva a pôsobí tak len v zažívacom trakte, kde kompetitívne inhibuje oba vyššie spomínané enzýmy. Nakoľko je produkovaná vláknitými baktériami (*Actinoplanes* sp. a *Streptomyces diastaticus*) dá sa považovať za prírodnú látku⁹⁾. Používa sa u diabetických pacientov na zníženie výkyvov postprandiálnej glykémie a nakoľko pomáha redukovať nadváhu, je v kombinácii s racionálnou stravou mimoriadne vhodná pre obéznych diabetikov¹⁰⁾. Po požití preparátov na báze akarbózy sa často stretávame so zvýšenou produkciou črevných plynov, čo samozrejme súvisí s malabsorpciou sacharidov a s činnosťou baktérií. Nežiaduce účinky, ku ktorým patrí nauzea, flatulencia a hnačky, sa u pacientov objavujú predovšetkým pri nedodržaní diétnych opatrení¹¹⁾. V kultúre *Streptomyces dimorphogenes* boli nájdené zložky so štruktúrou pseudosacharidov tak isto s viazaným dusíkom. Jedná sa o zlúčeniny označované ako **trestatín A, B, C**¹²⁾. Sú to účinné inhibítory, o ktorých sa špekuluje, že by mohli v terapii nahradiť akarbózu a zmierniť tak jej nežiaduce účinky. K sekundárnym metabolitom kultúry *Streptomyces coelico flavus* zg0656 okrem iného spadajú aj **akarvirostatíny**¹³⁾. Patria do skupiny trestatínov a tak isto vykazujú inhibičný účinok na α -amylázu¹⁴⁾. V súčasnosti sa uvažuje o zavedení medicínovaných potravín s obsahom inhibítorm α -glukozidázy, čo by mohlo pohodlne a bezpečne znížiť postprandiálnu hyperglykémiu diabetických pacientov. V poslednej dobe sa pozornosť venuje skôr rastlinným derivátom opísaným nižšie¹⁵⁾.

Rastlinné inhibitory α -amylázy

Rastliny v rámci svojho metabolizmu produkujú široké spektrum látok, ktoré im pomáha chrániť sa pred škodcami¹⁶⁾. Niektoré druhy dokážu produkovať aj inhibítory α -amylázy, o čom svedčia testy *in vitro* vykonané na rozličných extraktoch¹⁷⁾. Keďže ide o rôznorodé látky a každá má o čosi inú rozpustnosť, účinok rastlinného výťažku na enzým závisí aj od rozpúšťadla, ktoré sa použilo pri jeho príprave. V experimentoch sa zvyknú používať metanolové, etanolové, chloroformové, prípadne etylacetátové výluhy, no pomerne často sa stretávame s metodikou, ktorá pracuje s vodnými výťažkami s prídavkom

pufru. Najlepšie inhibičné účinky vykazovali extrakty z rastlín ako *Amaranthus caudatus* L. (*Amaranthaceae*), *Cajanus cajan* Millsp. (*Fabaceae*), *Tamarindus indica* L. (*Fabaceae*), *Hibiscus sabdarifa* L. (*Malvaceae*), *Psidium guajava* L. (*Myrtaceae*), *Syzygium cumini* Skeels. (*Myrtaceae*), *Bergenia ciliata* Sternb. (*Saxifragaceae*). Z druhov, ktoré sú na našom území prirodzené, alebo sa tu umelo vysádzajú ako okrasné rastliny je možné spomenúť *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgoaceae*), kde etanolový extrakt z listov o koncentrácii 50 mg/ml vykazoval až 70% schopnosť inhibovať α -amylázu. Vodný výluh vňate *Taraxacum officinale* Wigg. (*Asteraceae*) o koncentrácii 200 mg/ml dokáže spomínaný enzým inhibovať v intervale od 20 do 45 %. Vodný výťažok z listov druhu *Vaccinium myrtillus* L. (*Ericaceae*) s koncentraciou 200 mg/ml preukázal 75% inhibíciu. Vodný extrakt z *Rosmarinus officinalis* L. (*Lamiaceae*), ktorého koncentrácia je 200 mg/ml dokáže inhibovať α -amylázu s účinnosťou 60 %. Inhibícia vodného extraktu pripraveného z oplodia *Phaseolus vulgaris* L. (*Fabaceae*) s koncentraciou 200 mg/ml sa pohybovala od 45 do 75 %¹⁸⁾. Inhibítory niektorých rastlín vykazujú rozdielnu afinitu k slinnej a rozdielnu afinitu k pankreatickej α -amyláze. Tento jav bol pozorovaný na roztoku inhibítora α -amylázy získaného zo semien prosa, *Panicum miliaceum* L. (*Poaceae*). Takéto látky by sa teoreticky mohli využiť na odlišenie slinnej a pankreatickej amylázy v diagnostike séra¹⁹⁾. Poznáme už aj konkrétne molekuly, ktoré priamo zodpovedajú za účinok spomínaných extraktov. Ide predovšetkým o látky polyfenolickej povahy, kde za vysokú inhibičnú aktivitu priamo zodpovedajú zlúčeniny s väčším počtom hydroxylových skupín. Inhibítory amylázy je možné podľa štruktúry rozdeliť na **neproteínové** a **proteínové**²⁰⁾.

Inhibítory s neproteínovou štruktúrou

K rastlinným inhibítorm nebielkovinového typu patria organické zlúčeniny rôznorodej chemickej štruktúry, no najčastejšie sa jedná o látky patriace k **flavonoidom**, **prokyanidínom** a antokyánom, trieslovinám, terpenoidom, alebo to môžu byť rozmanité druhy organických kyselín, akou je **kyselina ibišková**. Nebielkovinové štruktúry majú aj **cyklodextríny** (α - , β - a γ -)^{18, 20)}.

Flavonoidy

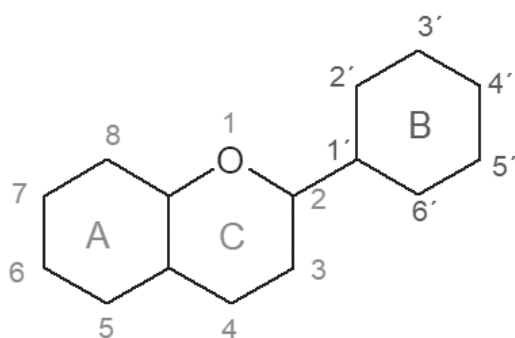
V pokusoch mali zlúčeniny ako **luteolín**, **myricetín** a **quercetín** pomerne výrazný inhibičný účinok na prasaciu pankreatickú α -amylázu (IC_{50} dosahovala hodnoty menšie než 500 μ mol)²¹⁾. Sila inhibičného účinku flavonolov a flavónov priamo závisí od množstva hydroxylových skupín na B-kruhu. Pri interakcii dochádza k vytvoreniu vodíkových väzieb medzi hydroxylovými skupinami flavonoidu v pozícii R6, R7 a-kruhu a R4' alebo R5' kruhu B spolu s katalytickými zvyškami väzobného miesta enzýmu. Zároveň sa pri tomto procese vytvorí konjugovaný π -systém, ktorý celý vzniknutý komplex stabilizuje^{18, 22)}. Pri podrobnejšom zaoberaní sa vzťahom medzi štruktúrou a účinkom bolo dokázané, že dvojité väzby C_2-C_3 ,

Tab. 1. Inhibičný účinok najčastejšie opisovaných flavonoidov na prasaciu pankreatickú α -amylázu²¹⁾

Flavonoid	Inhibícia α -amylázy ¹ (%)	IC ₅₀ ² (mm)
flavonoly		
myricetín	64	0,38
kvercetin	50	0,50
kempferol	18	> 0,5
fisetín	33	> 0,5
flavóny		
luteolín	61	0,36
apigenín	21	> 0,5
baikaleín	31	> 0,5
flavanóny		
naringenín	5	> 0,5
hesperetín	16	> 0,5
izoflavóny		
daidzeín	19	> 0,5
genisteín	33	> 0,5
flaván-3-oly		
katechín	4	> 0,5
epikatechín	14	> 0,5
epigallokatechín	5	> 0,5
epigallokatechín gallát	21	> 0,5
antokyanidíny		
kyanidín	37	> 0,5

¹Je stanovená pri koncentrácii 0,5 mmol · dm⁻³ príslušného flavonoidu.

²IC₅₀ je koncentrácia ktorej zodpovedá 50 % inhibície enzýmovej aktivity pri určitých podmienkach.

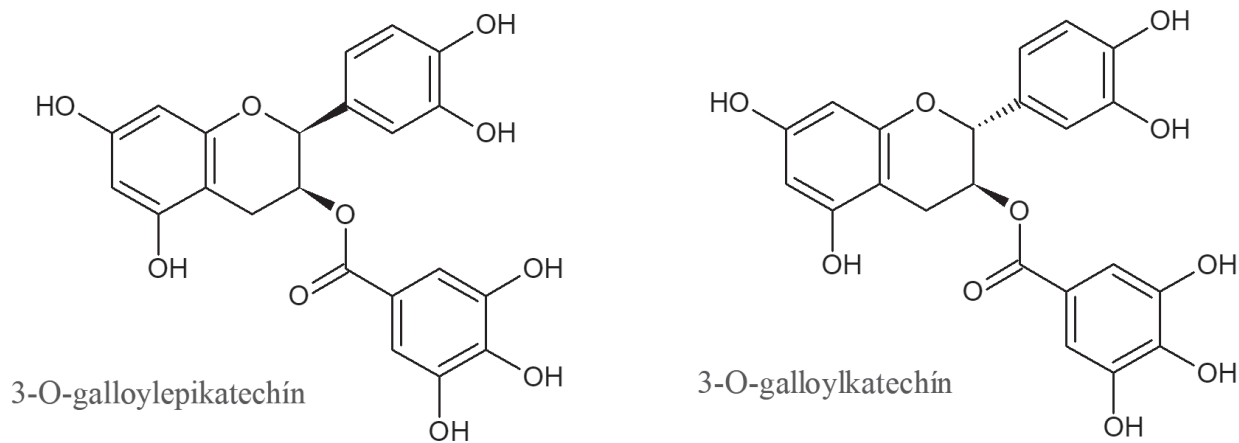
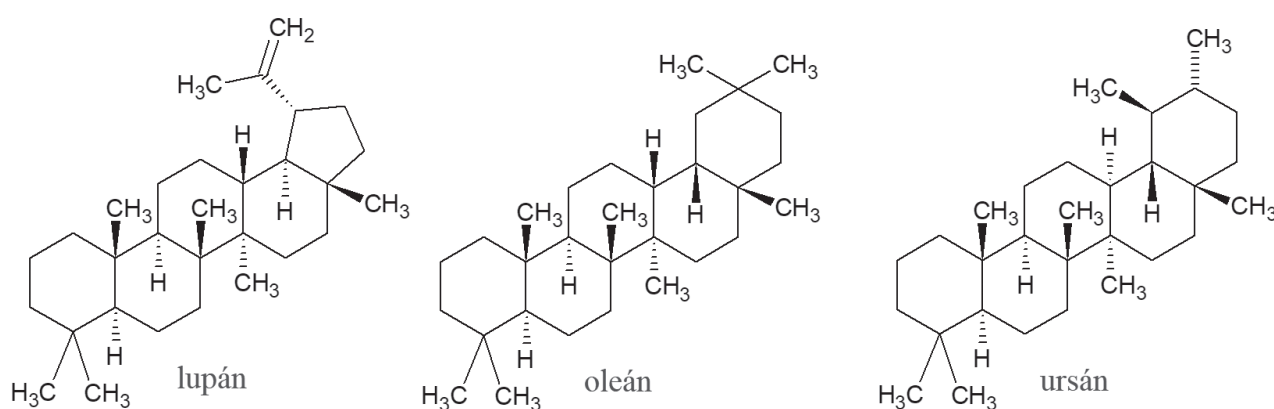


Obr. 1. Základný skelet flavonoidov

5-OH, väzba s B kruhom v polohe TRI a substitúcia hydroxylom na B-kruhu zväčšuje inhibičnú aktivitu, zatiaľ čo 3-OR ju redukuje²¹⁾. Najnovšia literatúra sa orientuje na štúdium zložitejších derivátov flavonoidových štruktúr s obsahom transchalkónov²³⁾ (obr. 1, tab. 1).

Prokyanidíny a antokyány

Zistilo sa, že etanolicke extrakty z kôry a ihličia niektorých druhov borovic (*Pinus densiflora* Siebold, Zucc., *Pinus thunbergii* Parl., *Pinus koraiensis* Siebold, Zucc.) majú enormnú schopnosť kompetitívne inhibovať slinnú a pankreatickú α -amylázu ošípaných²⁴⁾. Pri použití mikrobiálnych amyláz a glukozidáz je inhibícia zmiešaná, teda nekompetitívna a kompetitívna. Dokonca u *Pinus densiflora* Siebold, Zucc. a *Pinus koraiensis* Siebold, Zucc. je účinok extraktu z kôry rovnaký ako je účinok akarbózy²⁵⁾. Výhodou extraktov je aj to, že sú relatívne stabilné v podmienkach ľudského tráviaceho systému (vyššie teploty a nízke hodnoty pH)²⁶⁾. Konkrétne molekuly, ktorým vďačíme za vyššie opísané účinky, zatiaľ známe nie sú, avšak doterajšie štúdie naznačujú, že sa s najväčšou pravdepodobnosťou jedná o látky zo skupiny **prokyanidínov** (tiež sa označujú ako proantokyány či leukoantokyány). Polyfenolické látky inhibujú skôr α -amylázu zatiaľ čo antokyány sú účinnejšie pri α -glukozidáze²⁷⁾.

Obr. 2. Štruktúra trieslovín zo zeleného čaju s inhibičným účinkom na α -amylázu

Obr. 3. Štruktúra lupánu, oleánu a ursánu

Triesloviny

V celej rastlinnej ríši sú pomerne hojne rozšírené triesloviny, ktoré zo štruktúralného hľadiska zaraďujeme k polyfenolom. Často sa vyskytujú v nezrelých plodoch, no v priebehu dozrievania môžu vymiznúť²⁸⁾. Nie všetky triesloviny patria k účinným inhibítorom α -amylázy, no už dávno je známe, že tie z nich, ktoré nachádzame v červenom víne, dokážu po požití potravy bohatej na škrob mierniť výkyvy v hladinách krvného cukru²⁹⁾. Presný mechanizmus tohto účinku nie je známy, no predpokladá sa, že ich silná schopnosť denaturovať bielkoviny a vytvárať tak nerozpustné komplexy je práve základným princípom inhibičného pôsobenia¹⁸⁾. Zelený nefermentovaný čaj (*Camelia sinensis* Kuntze) obsahuje (-)-3-O-galloylepikatechín a (-)-3-O-galloylkatechín, ktoré v súčinnosti s flavonoidmi a ďalšími katechínmi disponujú antioxidantnými a antiflogistickými vlastnosťami³⁰⁾ (obr. 2). Nakoľko inhibujú α -amylázu a zároveň aj α -glukozidázu, efektívne znižujú postprandiálnu hyperglykémii. U týchto látok je pre inhibičný účinok nevyhnutná esterifikácia kyselinou gallovou²⁷⁾.

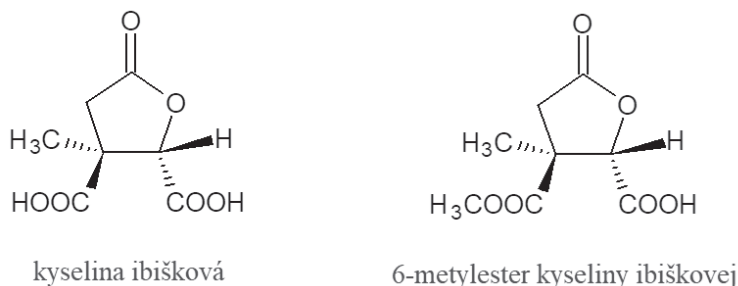
Terpenoidy

Napriek tomu, že triterpenoidy tvoria pestrú škálu látok, inhibičná aktivita voči α -amyláze bola zazname-

naná, len u **oleanových, ursánových a lupánových typov**. Mechanizmus účinku, ktorý by bližšie vysvetľoval toto pozorovanie, zatiaľ nie je jasný¹⁸⁾ (obr. 3).

Kyselina ibišková

V Afrike sa už od nepamäti používa ibištek sudánsky (*Hibiscus sabdarifa* L.), pretože jeho diuretické vlastnosti napomáhajú pri hypertenzii, ľadvinových a močových kameňoch³¹⁾. Existujú však štúdie, ktoré popisujú pozitívny vplyv aj na pacientov trpiacich obezitou³²⁾. Za tento účinok sú zodpovedné dve obsahové látky, a sice **kyselina ibišková** a jej **6-metyles-ter**²⁷⁾ (obr. 4). Sú vysoko účinné voči ľudskej a prasacej pankreatickej α -amyláze. S ostatnými substrátmi pre α -amylázu majú podobnú cyklickú štruktúru a práve tá im zaručuje schopnosť viazať sa na katalytické miesto tohto enzýmu a následne ho aj inhibovať²⁰⁾. Pri kyseline ibiškovej sa uvažovalo o jej schopnosti ovplyvňovať aj α -glukozidázu, no pri bližšom skúmaní bolo dokázané, že je tento účinok neobyčajne malý. Keďže extrakty z ibišteka obsahujú antokyány, predpokladá sa ich pozitívny vplyv aj na metabolizmus tukov a cholesterolu³³⁾. Napriek tomu, že presnejšie informácie o tomto účinku ešte nie sú celkom známe, odporúča sa prípravky z ibišteka zahrnúť do terapie obéznych pacientov³⁴⁾.



Obr. 4. Štruktúra kyseliny ibiškovej a jej 6-metylésteru

Kurkuminoidy

Podzemok z rastliny *Curcuma longa* je často používaný pri príprave orientálnych jedál. Obsahuje kurkuminoidy, látky u ktorých boli pozorované antioxidačné, protinádorové a protizápalové vlastnosti³⁵. Pri dôkladnejšom skúmaní sa zistilo, že jedna z molekúl, **bidesmetoxykurkumín**, dokáže nekompetitívne inhibovať ľudskú pankreatickú α -amylázu už pri koncentrácii 0,026 prípadne 0,025 mmol \times l⁻¹. Z experimentov je zrejmé, že molekula môže zohrať dôležitú úlohu pri vývoji nových liečiv ovplyvňujúcich trávenie škrobu³⁶.

Inhibítory s proteínovou štruktúrou

Proteínové inhibítory α -amylázy nachádzame vo viacerých zdrojoch. Sú produkované rastlinami, živočíchmi ale aj mikroorganizmami. Z rastlín je možné spomenúť obilniny ako pšenica (*Triticum aestivum* L.), jačmeň (*Hordeum vulgare* L.), cirok (*Sorghum bicolor* Moench), žito (*Secale cereale* L.) a ryža (*Oryza sativa* L.). Z čeľade bôbovitých (*Fabaceae*) je možné zmieniť sa o kajane indickom (*Cajanus cajan* Millsp.), vigne čínskej (*Vigna unguiculata* Walp.) a fazuli obyčajnej (*Phaseolus vulgaris* L.)³⁷. Rozdielne rastlinné inhibítory sa vyznačujú odlišnou špecificitou k α -amyláze získanej z rôznych zdrojov²¹) (tab. 2).

Proteínové inhibítory α -amylázy obsiahnuté v rastlinných zdrojoch sa na základe terciárnej štruktúry rozdeľujú do šiestich skupín. Poznáme tak **inhibítory cereálneho typu, deriváty lektínu, knottínu, purotionínu, thaumatínu a kunitzove inhibítory**. Niektoré z nich,

ako napríklad inhibítory podobné lektínu, účinkujú na α -amylázu škodcov, iné ako napríklad **jačmenný inhibítor α -amylázy a subtilizínu (*basi*)**, dokáže špecificky inhibovať len α -amylázy z rastlinných zdrojov. Najviac popísanými skupinami sú inhibítory cereálneho typu (patrí do skupiny cm proteínov) a inhibítory lektínového typu obsiahnuté v semenách fazuli³⁸.

Lektínu podobné inhibítory α -amylázy

Semená fazule obyčajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) obsahujú krátke lektíny, u ktorých bola popísaná schopnosť inhibovať nielen α -amylázu cicavcov, ale aj hmyzu. Účinok na rastlinné enzýmy však u nich pozorovaný nebol^{39, 40}. Nachádzame tu tri rozdielne izoformy inhibítora, ktoré označujeme **α -AI1, α -AI2 a α -AI3**. V najväčšom množstve je zastúpená práve **izoforma α -AI1** s molekulovou hmotnosťou 43 kda⁴¹). Je obsiahnutá len v zárodke a v kľúčnych listoch semien, kde pravdepodobne vykonáva ochrannú funkciu. Jedná sa o dimerický glykoproteín (A2H2) a zároveň je homológom fytohemaglutinínu (PHA). Dokáže inhibovať slinnú a pankreatickú α -amylázu cicavcov a hmyzu⁴²). Zabraňuje tráveniu škrobu tak, že úplne blokuje prístup substrátu k aktívnemu miestu enzýmu. Aktivita inhibítora izoformy α -AI je ovplyvňovaná viacerými faktormi, no najväčší vplyv má na neho teplota, pH, inkubačná doba či prítomnosť jednotlivých iónov. Optimum pre účinok inhibítora je pH v rozmedzí 4,5–5,5 a teplota od 22 do 37 °C. Pri teplote 0 °C nepozorujeme žiadnu aktivitu. Úpravou vzorky 10-minútovým varením, dôjde k denaturácii a úplnej inaktivácii inhibí-

Tab. 2. Rozdielna inhibičná aktivita vybraných inhibítorov α -amylázy²⁰

Zdroj inhibítora	Inhibítor	Inhibičná aktivita
<i>Phaseolus vulgaris</i>	A-AI1	PPA
	A-AI2	–
<i>Triticum aestivum</i>	extrakt zo žita	PPA, HSA
<i>Secale cereale</i>	1,2 a 3	HSA
	BIII	HSA, PPA
<i>Cajanus cajan</i>	PAI	HSA, PPA
<i>Zea mays</i>	zeamatín	–

PPA – prasacia pankreatická amyláza, HSA – ľudská slinná amyláza

tora. Inkubačná doba závisí od reakčných podmienok, pričom pri pH 6,9 bola stanovená na 120 minút a pri pH 4,5 na 10 minút³⁹). **Izoforma α -AI2** sa nachádza v niektorých divo rastúcich druhoch fazule. Na rozdiel od izoformy α -AI1 dokáže inhybovať amylázu zrnokaza mexického (*Zabrotes subfasciatus* Boheman), avšak účinok na prasaciu pankreatickú amylázu je minimálny²⁰). Tretiu **izoformu α -AI3** predstavuje molekula proteínu s jednoduchým reťazcom, u ktorej nebola zaznamenaná aktivita k doposiaľ testovaným α -amylázam. S najväčšou pravdepodobnosťou je vývojovým medziproduktom medzi PHA a spomínanými dvoma účinnými izoformami. Molekuly s obdobnou štruktúrou základného reťazca vykazujú inhibičnú aktivitu k α -amylázam húb. To naznačuje, že takáto izoforma by mohla zvyšovať obranyschopnosť rastlín voči plesniam. Rozdiely v inhibičnej špecificke spomínaných izoform sa vysvetľujú štruktúrnymi zmenami v cieľových proteínoch³⁹). V rámci štúdia inhibičného účinku α -amylázy sa zistilo, že počiatočné reakcie medzi enzýmom a inhibítorom sú pomalé. Inhibícia bola efektívnejšia v prípade, keď sa inhibítor nechal vopred inkubovať so samotným enzýmom po dobu desiatich minút a až potom sa pridal substrát³). Potkanom, ktorým sa do krmiva pridával extrakt z fazuľových semien s obsahom spomínaných inhibítorov α -amylázy (v krmive dosahoval koncentráciu 3,3 a 6,6 g/kg), došlo k viditeľnému spomaleniu rastu v porovnaní s kontrolnými zvieratami. Výrazná strata hmotnosti bola spôsobená nedostatočnou využiteľnosťou – predovšetkým škrobu a z časti aj proteínov. Zároveň u týchto pokusných zvierat dochádzalo k stratám dusíka, lipidov a karbohydrátov. Pri pitve im bola zistená hypertrofia a hyperplázia tenkého čreva a pankreasu, no hmotnosť týmusu a pečene bola menšia než v kontrolnej skupine potkanov. Existuje tu však aj riziko blokády čreva zhustenou tráveninou. Použitie týchto prírodných látok teda nie je vždy bez zdravotného rizika⁴³). Z klinických štúdií pre ľudí po požití extraktov z fazule nevyplývajú závažné nežiaduce účinky. Vzhľadom k tomu, že α -amyláza zabraňuje degradácii polysacharidov na oligosacharidy, dostávajú sa vo väčšej miere do hrubého čreva. Tam sa vplyvom baktérií rozkladajú a môžu navodiť gastrointestinálne potiaže ako flatulenciu či diareu⁴⁴). Surové semená fazule obsahujú **fytohemaglutinín (PHA)**, ktorého vysoké dávky sa u zvierat prejavujú toxickými účinkami a u ľudí vyvolávajú závažné poruchy zažívania⁴⁵). Nakoľko je termolabilný, jeho účinky sa dajú úplne eliminovať varom⁴⁶). Semená bielej fazule majú v porovnaní s farebnými semenami zanedbateľný obsah fytohemaglutinínu, no pri výrobe rôznych prípravkov je nevyhnutný postup zaručujúci inaktiváciu tejto zlúčeniny⁴⁷). V osemdesiatych rokoch 20. storočia na americký trh prichádzalo veľké množstvo preparátov zaručujúcich chudnutie, ktoré boli práve na báze fazuľových extraktov. Vtedajšie klinické štúdie poukázali na ich neuspokojivú účinnosť, a preto v roku 1982 FDA (Americká správa pre potraviny a liečivá v USA) pozastavila predaj týchto produktov³). V poslednej dobe sa stretávame s opätovným zavádzaním prípravkov na báze vodného extraktu zo semien fazule – *Phase 2*[®]. Používa

sa ako doplnok výživy napomáhajúci redukovať hmotnosť⁴⁸). Býva formulovaný do rôznych liekových foriem zahrňujúc prášky, tablety, tobolky či žuvacie tablety. Extrakt je tiež možné pridávať aj formou medikovaných potravín bez toho, aby ovplavňoval vzhľad, konzistenciu či chuť daného jedla⁴⁴).

Knottínu podobné inhibitory α -amylázy

Zo semien láskavca červenoklasého (*Amaranthus hypochondriacus* L.) bol získaný doteraz najmenší proteínový inhibítor α -amylázy – **AAI**. Obsahuje totiž len 32 aminokyselinových zvyškov a tri disulfidické väzby⁴⁹). V rámci jeho molekuly nachádzame knottínovú časť tvorenú tromi antiparalelnými β -vláknami a charakteristické rozmiestnenie disulfidických väzieb. Vykazuje štruktúrnu podobnosť s proteínmi, ako je charybdotoxín a conotoxín⁵⁰). Má špecifickú schopnosť inhybovať α -amylázu hmyzu, avšak voči cicavcej α -amyláze nie je účinný. Mechanizmus pôsobenia tohto inhibítora je podobný tomu, s ktorým sa stretávame u lektínových inhibítorov. Spočíva teda v blokáde katalytického miesta enzýmu²⁰).

Inhibitory cereálneho typu

Inhibitory tejto skupiny sú zložené zo 120 až 160 aminokyselinových zvyškov tvoriacich päť disulfidických väzieb. Tieto inhibitory sú taktiež známe senzibilizujúce látky. Pri opakovanej expozícii totiž u ľudí môžu vyvolať alergickú reakciu, dermatitídu či takzvanú „pekársku astmu“, ktorej spúšťačom je cereálna múka. Z tejto skupiny je najviac preskúmaný pšeničný α -amylázový inhibítor, ktorý na základe gélovej elektroforetickej mobility dostal označenie **inhibítor 0,19**. Jedná sa o dimér obsiahnutý v zrnách pšenice (*Triticum aestivum* L.)⁵¹). Dokáže ovplyvňovať účinok α -amylázy vtákov, hmyzu, cicavcov, niektorých baktérií a ľudských slín. Obsahuje 124 aminokyselinových zvyškov a je homologický (štruktúrálne podobný) s **RBI**⁵²). Táto zlúčenina bola izolovaná z indického prosa (*Panicum indicum* L.) a tak isto patrí do skupiny inhibítorov cereálneho typu⁵³). RBI je bifunkčný, nakoľko inhybuje α -amylázu ale aj trypsín. Pozostáva zo 122 aminokyselín s piatimi disulfidickými väzbami. Je odolný voči tepelnej denaturácii, močovine a guanidínhydrochloridu. Podobne ako ostatné inhibitory tejto skupiny môže kompetitívne inhybovať viaceré druhy α -amyláz vrátane tej, ktorú nachádzame v prasacej pankreatickej šťave²⁰). Pšeničná múka obsahuje aj ďalšie štyri druhy inhibítorov α -amylázy. Ide o molekuly s označením **WRP24**, **WRP25**, **WRP26** a **WRP27**⁵⁴). Tie, vďaka svojej polypeptidickej štruktúre a molekulovej hmotnosti, ktorá sa pohybuje okolo hodnoty 14 kDa patria do rodiny inhibítorov cereálneho typu. Analýza sedimentačnej rýchlosti dokazuje, že WRP25 a WRP27 sú monoméry, zatiaľ čo WRP24 patrí medzi diméry. Zistilo sa, že zlúčenina WRP24 má spolu s vyššie spomínanou látkou označovanou ako inhibítor 0,19 totožnú istú časť n-koncovkej aminokyselinovej sekvencie. Dokáže rovnako dobre inhybovať amylázu hmyzu ako aj človeka. WRP25 a WRP26 inhybujú však len α -amylázu hmyzu

(zrniar ryžový – *Sitophilus oryzae* L., poterník hnedý – *Tribolium castaneum* Herbst, múčiar obyčajný *Tenebrio molitor* L.), teda bez účinku na enzýmy obsiahnuté v ľudských slinách⁴⁷).

Kunitzove inhibítory

Kunitzove inhibítory α -amylázy sú tvorené približne 180 aminokyselinovými zvyškami so štyrmi molekulami cystínu. Proteázové inhibítory tejto skupiny sú zastúpené vo viacerých rastlinných druhoch, no predovšetkým v obilninách ako pšenica (**WASI**), ryža (**RASI**) a prípadne aj raž či jačmeň²⁰. **BASI** je jačmenný inhibítor α -amylázy a subtilizínu s molekulovou hmotnosťou 20 kDa. Nachádza sa vo vnútri zrn jačmeňa, pričom v zreých zrnách tvorí 0,5 % z celkového množstva obsiahnutých proteínov. Primárne bol označený ako inhibítor subtilizínu a až neskôr sa prišlo na to, že má dvojaký účinok a tak isto pôsobí aj na izoenzým 2 jačmennej α -amylázy (na izoenzým 1 neúčinkuje)⁴². **BASI**, **WASI** a **RASI** vykazujú charakteristické kvantitatívne rozdiely v účinkoch s α -amylázou. **WASI** má o niečo nižšiu afinitu v porovnaní s **BASI**. Izoenzýmová špecificita týchto homológov je rovnaká. **RASI** ochotne inhibuje α -amylázu hmyzu, no disponuje len veľmi slabou inhibičnou aktivitou k α -amyláze, ktorá pochádza z ryži či jačmenného sladu. Tento špecifický rozdiel medzi **RASI** a **BASI** môže vychádzať z toho, že **BASI** má v rámci svojej molekuly zachované zvyšky, ktoré nepriamo interagujú s katalytickými skupinami väzobného miesta α -amylázy⁵⁵. Predpokladá sa, že úloha inhibítorov α -amylázy závisí od rastlinného druhu, v ktorom sú obsiahnuté. **RASI** ponúka rastline ochranu pred hmyzom, čo prostredníctvom schopnosti ovplyvňovať subtilizín to tak isto dokáže aj **BASI** a **WASI**. Špecifickosť týchto zlúčenín k endogénnej α -amyláze naznačuje schopnosť podieľať sa na ovplyvňovaní predčasného klíčenia⁵⁶.

Taumatínu podobné inhibítory α -amylázy

K tejto skupine inhibítorov zaraďujeme proteíny s molekulovou hmotnosťou približne 22 kDa so značnou podobnosťou na **taumatín**. Jedná sa o obzvlášť sladký proteín obsiahnutý v plodoch rastliny *Thaumatococcus danielli* Benth⁵⁷. Z tejto skupiny látok je však najviac opisovaný **zeamatín**, inhibítor izolovaný z kukurice siatej (*Zea mays* L.). Je homológom taumatínu⁵⁸. Na povrchu tohto proteínu sa nachádzajú bohato zastúpené zvyšky arginínu a lyzínu. Napriek svojej podobnosti s taumatínom nemá sladkú chuť. **Zeamatín** je schopný inhibovať prasací trypsin a α -amylázu z niektorých druhov hmyzu. Je známy predovšetkým kvôli antifungálnemu účinku, ale ten nesúvisí so schopnosťou inhibovať hydrolytické enzýmy. **Zeamatín** sa dokáže viazať na β -1,3-glukány, následne zvyšuje permeabilitu plesňových membrán, čo v konečnom dôsledku vedie k bunkovej smrti. Ostatné proteíny z tejto skupiny, ako napríklad **proteíny R a S** získané zo semien jačmeňa, nevykazujú inhibičnú aktivitu proti trypsinu alebo α -amyláze²⁰.

Purotionínu podobné inhibítory α -amylázy

Inhibítory so štruktúrou γ -purotionínu tvorí spravidla 47 alebo 48 aminokyselinových zvyškov. Tieto

proteíny obsahujú veľký podiel síry, ktorá je obsiahnutá predovšetkým v γ -tioníne⁵⁹). Rastlinám ponúkajú ochranu sprostredkovanú viacerými mechanizmami. Ovpływujú napríklad membránovú permeabilitu, inhibujú syntézu proteínov, alebo zastávajú funkciu inhibítorov proteínáz. V rastline známej pod názvom cirok (*Sorghum bicolor* Moench) sa nachádzajú tri izoformy inhibítorov amylázy – **SIa-1**, **SIa-2** a **SIa-3**⁶⁰. Bola u nich zistená výrazná inhibičná aktivita k α -amyláze kobyliiek a švábov, avšak schopnosť inhibovať tento enzým v ľudských slinách či v prasacej pankreatickej šťave je nepatrná⁶¹).

Záver

Ako je uvedené v samotnom článku, rastlinné inhibítory α -amylázy je možné získať z viacerých zdrojov, pričom ich účinnosť je rôzna a nie všetky nachádzajú uplatnenie práve v ľudskom organizme. Napriek tomu môžu byť niektoré z nich súčasťou perorálne podávaných liekov či už v pevnej alebo tekutej liekovej forme, prípadne tvoriť vhodné potravinové doplnky na zníženie hmotnosti alebo aspoň posprandiálnej hyperglykémie. Tento prehľadový článok sa snaží poskytnúť prehľad nielen týchto inhibítorov, ale aj ich prírodných zdrojov, a to vrátane náčrtu chemickej štruktúry a účinnosti.

Stret zájmu: žiadny.

Literatura

1. **Bush D. S., Sticher L., Van Huystee R., Wagner D., Jones R. L.** The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone alpha-amylase. *J. Biol. Chem.* 1989; 32, 19392–19398.
2. **Suržin J., Ledvina M.** Lekárska biochémia. Košice a Hradec Králové: Michal Vaško 2002.
3. **Preuss H. G.** Bean amylase inhibitor and other carbohydrate absorption blockers: effects on diabetes and general health. *J. Am. Coll. Nutr.* 2009; 28, 266–276.
4. **Perry G. H., Dominy N. J., Claw K. G., Lee A. S., Fiegler H., Redon R., Carter N. P.** Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat. Genet.* 2007; 39, 1256.
5. **Tan K., Tesar C., Wilton R., Keigher L., Babnigg G., Joachimiak A.** Novel α -glucosidase from human gut microbiome: substrate specificities and their switch. *Faseb. J.* 2010; 24, 3939–3949.
6. **Bush D. S., Sticher L., van Huystee R., Wagner D., Jones R. L.** The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone alpha-amylase. *J. Biol. Chem.* 1989; 32, 19392–19398.
7. **Boehlke C., Zierau O., Hannig C.** Salivary amylase – the enzyme of unspecialized euryphagous animals. *Arch. Oral. Biol.* 2015; 60, 1162–1176.
8. **Kim M. J., Lee S. B., Lee H. S., Lee S. Y., Baek J. S., Kim D., Park K. H.** Comparative study of the inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and cyclomaltodextrin glucanotransferase by acarbose, isoacarbonyl, and acarviosine – glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; 371, 277–283.

9. Mahmud T., Tornus I., Egelkrout E., Wolf E., Uy C., Floss H. G., Lee S. Biosynthetic studies on the α -glucosidase inhibitor acarbose in actinoplanes sp.: 2-epi-5-epi-valiolone is the direct precursor of the valienamine moiety. *JACS* 1999; 121, 6973–6983.
10. Chiasson J. L., Josse R. G., Gomis R., Hanefeld M., Karasik A., Laakso M. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the stop-niddm randomised trial. *Lancet* 2002; 363, 2072–2077.
11. Laube H. Acarbose. *Clin. Drug Investig.* 2002; 22, 141–156.
12. Truscheit E., Frommer W., Junge B., Müller L., Schmidt D. D., Wingender W. Chemistry and biochemistry of microbial α -glucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1981; 20, 744–761.
13. Geng P., Qiu F., Zhu Y., Bai G. Four acarviosin-containing oligosaccharides identified from streptomyces coelicoflavus zg0656 are potent inhibitors of α -amylase. *Carbohydr. Res.* 2008; 343, 882–892.
14. Kuhlmann J., Pils J. Oral antidiabetics. Berlin: Springer 1996.
15. Agnieszka S. Food biofortification technologies. Boca Raton, Florida: CRC Press 2017.
16. Barbosa A. E., Albuquerque É. V., Silva M. C., Souza D. S., Oliveira-Neto O. B., Valencia A., Grossi-De-Sá M. F. α -amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in coffee arabica plants inhibits α -amylases from the coffee berry borer pest. *BMC Biotechnol.* 2010; 10, 44.
17. Jbilou R., Amri H., Bouayad N., Ghailani N., Ennabili A., Sayah F. Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development, α -amylase activity and offspring production of *Tribolium castaneum*. *Bioresour. Technol.* 2008; 99, 959–964.
18. Sales P. M., Souza P. M., Simeoni L. A., Magalhães P. O., Silveira D. α -amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012; 15, 143–183.
19. Nagaraj R. H., Pattabiraman T. N. Purification and properties of an α -amylase inhibitor specific for human pancreatic amylase from proso (*Panicum miliaceum*) seeds. *J. Biosci.* 1985; 7, 257–268.
20. Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Grossi-de-Sá M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269, 397–412.
21. Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka T. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2006; 52, 149–153.
22. lo Piparo, E., Scheib H., Frei N., Williamson G., Grigorov M., Chou C. J. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. *J. Med. Chem.* 2008; 51, 3555–3561.
23. Buchtová E., Šturdíková M. Mikrobiálně produkované inhibitory hydroláz a ich terapeutický potenciál. *Chem. Listy* 2013; 107, 30–36.
24. Kim Y. M., Wang M. H., Rhee H. I. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr. Res.* 2004; 339, 715–717.
25. Shpatov A. V., Popov S. A., Salnikova O. I., Kukina T. P., Schmidt E. N., Um B. H. Composition and bioactivity of lipophilic metabolites from needles and twigs of Korean and Siberian pines (*Pinus koraiensis siebold* & Pucc. and *Pinus sibirica* du tour). *Chem. Biodivers* 2017; 14, e1600203.
26. Arabshahi-D S., Devi D. V., Urooj A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chem.* 2007; 100, 1100–1105.
27. Martin J., Dušek, J. Inhibice α -amylázy a α -glukosidázy přírodními látkami. *Prakt. Lékárenství* 2009; 5, 92–95.
28. Zheng H. Z., Hwang I. W., Kim, S. K., Lee S. H., Chung S. K. Optimization of carbohydrate-hydrolyzing enzyme aided polyphenol extraction from unripe apples. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 2010; 53, 342–350.
29. Ujwala T. K., Tomy S., Celine S., Chander J. S. J. U., Udaya S. J. A systematic review of some potential anti-diabetic herbs used in India characterized by its hypoglycemic activity. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2015; 12, 4940–4957.
30. Kania M., Baraniak J. Wybrane właściwości biologiczne i farmakologiczne zielonej herbaty (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze). *Post. Fitoter.* 2011; 1, 34–40.
31. Jiménez-Ferrer E., Alarcón-Alonso J., Aguilar-Rojas A., Zamilpa A., Tortoriello J., Herrera-Ruiz M. Diuretic effect of compounds from hibiscus sabdariffa by modulation of the aldosterone activity. *Planta Med.* 2012; 78, 1893–1898.
32. Alarcon-Aguilar F. J., Zamilpa A., Perez-Garcia M. D., Almanza-Perez J. C., Romero-Nunez E., Campos-Sepulveda E. A., Roman-Ramos R. Effect of hibiscus sabdariffa on obesity in MSG mice. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 114, 66–71.
33. Mozaffari-Khosravi H., Jalali-Khanabadi B. A., Afkhami-Ardekani M., Fatehi F. Effects of sour tea (hibiscus sabdariffa) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II diabetes. *J. Altern. Complement. Med.* 2009; 15, 899–903.
34. Chang H. C., Peng C. H., Yeh D. M., Kao E. S., Wang C. J. Hibiscus sabdariffa extract inhibits obesity and fat accumulation, and improves liver steatosis in humans. *Food Funct.* 2014; 5, 734–739.
35. Darvesh A., Aggarwal B., Bishayee A. Curcumin and liver cancer: a review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012; 13, 218–228.
36. Ponnusamy S., Zinjarde S., Bhargava S., Rajamohanam P. R., RaviKumar A. Discovering bisdemetoxycurcumin from curcuma longa rhizome as a potent small molecule inhibitor of human pancreatic α -amylase, a target for type-2 diabetes. *Food Chem.* 2012; 135, 2638–2642.
37. Kalve N. D., Lomate P. R., Hivrale, V. K. A proteinaceous thermo labile α -amylase inhibitor from *Albizia lebbek* with inhibitory potential toward insect amylases. *Arthropod Plant Interact.* 2012; 6, 213–220.
38. Pusztai A., Bardocz S. Lectins: biomedical perspectives. London: Taylor & Francis 1995.
39. Fabre C., Causse H., Mourey L., Koninkx J., Rivière M., Hendriks H., Rougé P. Characterization and sugar-binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Raz-2) seeds. *Biochem. J.* 1998; 329, 551–560.
40. Kluch I., Horn M., Hýblová J., Hubert J., Dolečková-Marešová L., Voburka Z., Mareš M. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochem.* 2005; 66, 31–39.
41. le Berre-Anton V., Bompard-Gilles C., Payan F., Rouge P. Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor (α -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *BBA. Prot. St.* 1997; 1343(1), 31–40.
42. Bellincampi D., Camardella L., Delcour J. A., Desseaux V., D'Ovidio R., Durand A., Sørensen J. F. Potential physiological

- role of plant glycosidase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 2004; 1696, 265–274.
43. **Pusztai A., Grant G., Duguid T., Brown D. S., Peumans W. J., van Damme E. J., Bardocz S.** Inhibition of starch digestion by α -amylase inhibitor reduces the efficiency of utilization of dietary proteins and lipids and retards the growth of rats. *J. Nutr.* 1995; 125, 1554–1562.
 44. **Barrett M. L., Udani J. K.** A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *J. Nutr.* 2011; 10, 24.
 45. **Kumar S., Verma A. K., Das M., Jain S. K., Dwivedi P. D.** Clinical complications of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Consumption. *Nutrition* 2013; 29, 821–827.
 46. **Confalonieri M., Bollini R., Berardo N., Vitale A., Allavena A.** Influence of phytohemagglutinin on the agronomic performance of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Breeding* 1992; 109, 329–334.
 47. **Feng G. H., Richardson M., Chen M. S., Kramer K. J., Morgan T. D., Reeck G. R.** α -amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1996; 26, 419–426.
 48. **Celleno L., Tolaini M. V., D'Amore A., Perricone N. V., Preuss, H. G.** A dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. *Int. J. Med. Sci.* 2007; 4, 45.
 49. **Lu S., Deng P., Liu X., Luo J., Han R., Gu X., Patthy A.** Solution structure of the major α -amylase inhibitor of the crop plant amaranth. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 20473–20478.
 50. **Carugo O., Lu S., Luo J., Gu X., Liang S., Strobl S., Pongor S.** Structural analysis of free and enzyme-bound amaranth α -amylase inhibitor: classification within the knottin fold superfamily and analysis of its functional flexibility. *Protein Eng.* 2001; 14, 639–646.
 51. **Heidari R., Zareae S., Heidarizadeh M.** Extraction, purification, and inhibitory effect of alpha-amylase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum* var. Zarrin). *Pakistan. J. Nutr.* 2005; 4, 101–105.
 52. **Strobl S., Maskos K., Wiegand G., Huber R., Gomis-Rüth F. X., Glockshuber R.** A novel strategy for inhibition of α -amylases: yellow meal worm α -amylase in complex with the ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. *Struct.* 1998; 6, 911–921.
 53. **Wang J., Yang L., Zhao X., Li J., Zhang D.** Characterization and phylogenetic analysis of allergenic tryp alpha amyl protein family in plants. *J. Agric. Food. Chem.* 2013; 62, 270–278.
 54. **Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch Jr, C., Silva C. P., Grossi-de-Sá M. F.** Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267, 2166–2173.
 55. **Yamagata H., Kunimatsu K., Kamasaka H., Kuramoto T., Iwasaki T.** Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998; 62, 978–985.
 56. **Nielsen P. K., Bønsager B. C., Fukuda K., Svensson B.** Barley α -amylase/subtilisin inhibitor: structure, biophysics and protein engineering. *BBA-Proteins. Proteom. J.* 2004; 1696, 157–164.
 57. **Liu J. J., Sturrock R., Ekramoddoullah A. K.** The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports* 2010; 29, 419–436.
 58. **Batalia M. A., Monzingo A. F., Ernst S., Roberts W., Roberts J. D.** The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, pr-5 protein family. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1996; 3, 19.
 59. **Colilla F. J., Rocher A., Mendez E.** Γ -purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.* 1990; 270, 191–194.
 60. **Kotkar H. M., Sarate P. J., Tamhane V. A., Gupta V. S., Gir A. P.** Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. *J. Insect Physiol.* 2009; 55, 663–670.
 61. **Mehrabadi M., Franco O. L., Bandani A. R.** Plant proteinaceous alpha-amylase and proteinase inhibitors and their use in insect pest control. In *New perspectives in plant protection*. Intechopen. 2012; 11, 230–246.