

**ВИДІЛЕННЯ І ВЛАСТИВОСТІ ІНГІБІТОРІВ
ТРИПСИНУ ТА ХІМОТРИПСИНУ ПРОДУКТУ
ПЕРЕРОБКИ БОБІВ СОЇ**

П.С. Тихонов

Одеський державний аграрний університет

Наведені дані щодо виділення та вивчення деяких біохімічних властивостей інгібіторів трипсину та хімотрипсину продукту переробки бобів сої.

Вступ. Інгібітори трипсину та хімотрипсину виявлені в насінинах і різних анатомічних частинах багатьох рослин [1-3]. Найбільш високий вміст цих інгібіторів спостерігається в насінинах бобових рослин, зокрема бобах сої [4]. Відомо, що інгібітори рослин широко застосовуються в медичній практиці [5]. В наш час боби сої достатньо широко використовуються для виробництва різних харчових продуктів та кормових домішок. У зв'язку з цим особливої уваги набуває розробка технологій комплексної переробки соєвих бобів з найбільш повною утилізацією побічних продуктів.

Метою роботи є виділення та вивчення окремих біохімічних властивостей інгібіторів трипсину та хімотрипсину продукту переробки бобів сої.

Матеріали і методика досліджень. Об'єктом дослідження були висушені водні екстракти бобів сорту Аркадія одеська. Водні екстракти одержували наступним чином: соєві боби замочували у дистильованій воді при температурі 70⁰ С протягом 2-х годин з постійним перемішуванням. Відношення об'єму води і маси соєвих бобів складало 10:1. Після відстоювання воду з екстрагованими речовинами випарювали. Висушений матеріал дрібнили у лабораторному подрібнювачі до стану порошку. Порошок використовували для виділення білків.

Екстракцію білків проводили дистильованою водою протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Відношення об'єму води і маси висушеного матеріалу у вигляді порошку

становило 10:1. Після фільтрації і центрифугування білки висолювали із супернатанту сульфатом амонію при 80%-ому насиченні і залишали на ніч при 4⁰ С.

Очищення інгібіторів трипсину та хімотрипсину проводили методами гель-фільтрації на *Toyopearl HW-40*, афінної хроматографії на трипсин-сефарозі 4В та хімотрипсин-сефарозі 4В відповідно.

Для гель-фільтрації використовували колонку 2,6'65 см, швидкість елюції складала 0,5 мл/хвилину, елюцію проводили водою, об'єм фракцій складав 10 мл.

Афінну хроматографію проводили з використанням наступних розчинів. Вихідний буфер – 0,05 М трис-НСl, рН7,6; I розчин – 0,05 М трис-НСl, рН7,6, що містить 1М NaCl; II розчин – 0,05 М трис-НСl, що містить 8М мочевиноу; III розчин – 0,2М KCl-НСl, рН 2,0.

Електрофорез білків проводили у 12,5%-ому ПААГ у присутності 0,1%-ого DS-Na [6].

Інгібітор трипсину визначали за ступенем зниження гідролізу БАПА (N- α -бензоіл-1-аргінін-р-нітроанілід) кристалічним трипсином [7]. Інгібітор хімотрипсину визначали за ступенем зниження гідролізу казеїну кристалічним хімотрипсином. Активність відповідних інгібіторів виражали у мікрограмах інактивованого трипсину та хімотрипсину. Вміст білку визначали методом Лоурі, а у хроматографічних фракціях крім того спектрофотометрично при 280 нм.

Результати досліджень. Відомо, що навіть короткочасне нагрівання рослинних екстрактів при 70⁰ С дозволяє видалити з екстрактів високомолекулярні білки. Наші дані також свідчать за це. На електрофореграмах виявляються переважно низькомолекулярні білки.

При гель фільтрації на *Toyopearl HW-40* інгібітори трипсину та хімотрипсину виходять одним піком. При цьому досягається очищення від низькомолекулярних домішок.

Фракції, що були одержані за допомогою гель-фільтрації у подальшому підпадали очищенню на трипсин-сефарозі 4В та хімотрипсин-сефарозі 4В. Елюцію білків проводили ступінчато зазначеними вище розчинами. В обох випадках інгібітори щільно зв'язувалися з сорбентом та елюїровались одним піком. Кожен з одержаних препаратів мав здатність гальмувати активність трипсину та хімотрипсину.

Вихід інгібіторів трипсину та хімотрипсину склав відповідно 5,2% і 19,4% зі ступенем очищення 17,5 і 220 разів (табл.).

Таблиця – Виділення інгібіторів трипсину та хімотрипсину з водного екстракту бобів сої.

| Етапи очищення | Активність інгібіторів | | | | Вихід інгібіторів, % | | Ступінь очищення | |
|----------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|--------------|------------------|--------------|
| | трипсину | | хімотрипсину | | трипсину | хімотрипсину | трипсину | хімотрипсину |
| | загальн. активн., одиниць | питома актив., одиниць | загальна активн., одиниць | питома актив., одиниць | | | | |
| Вихідний екстракт | 685 | 3,5 | 2771 | 14,2 | 100 | 100 | 1,0 | 1,0 |
| Гель-фільтрація | 105,2 | 5,3 | 2513 | 125,7 | 15,4 | 90,7 | 1,5 | 8,8 |
| Афінна хроматографія | 35,6 | 61,6 | 537,6 | 3126 | 5,2 | 19,4 | 17,5 | 220 |

Електрофорез в ПААГ з DS-Na показав, що інгібітор хімотрипсину складається щонайменше з трьох компонентів, два з яких переважали за вмістом та мали близьку молекулярну масу, що дорівнювала 8 кД. Один компонент був мінорним за вмістом і мав молекулярну масу 14,6 кД. Електрофоретичний аналіз інгібітору трипсину показав, що препарат складається з двох компонентів: той, що переважав за вмістом мав молекулярну масу 14,6 кД, мінорний за вмістом компонент мав молекулярну масу 20,4 кД. Можна вважати, що поліпептид з молекулярною масою 14,6 кД, який був присутнім в обох препаратах інгібіторів, насправді є інгібітором трипсину, оскільки він переважав за вмістом в одержаному препараті інгібітору трипсину. Проте, не можна виключити можливість того, що цей поліпептид є одночасно інгібітором трипсину та хімотрипсину.

Одержаний препарат інгібітору хімотрипсину є подібний до інгібітору Баумана-Бирка за антиферментною активністю і містить компоненти, що є близькими за молекулярною масою до зазначеного інгібітору. Препарат інгібітору трипсину виявляє антиферментну активність, що є подібною до активності інгібітору Кунітца, проте містить компоненти з меншою молекулярною масою.

Одержані препарати мали високу стійкість до денатуруючи факторів. Вони витримували нагрів при 70⁰ С протягом 2-х годин і зберігали інгібіторну активність при рН 2,0.

Висновки. Таким чином, наведені результати вказують на можливість одержання термо- та кислото стабільних препаратів інгібіторів трипсину та хімотрипсину, що є близькими за деякими властивостями до інгібіторів Кунітца та Баумана-Бирка з водного екстракту бобів сої, який є побічним компонентом при їх перероблення на харчові та кормові продукти.

Література

1. Мосолов В.В. Белковые ингибиторы как регуляторы процес сов протеолиза. – М.: Наука, 1983. – 40 с.
2. Мосолов В.В. Ингибиторы протеолитических ферментов как защитные белки растений. // Материалы конференции. – К.: Наук. думка, 1990. – С. 50-51.
3. Вовчук С.В., Волчевская Е.А., Левицкий А.П., Адамовская В.Г. Выделение и свойства ингибитора трипсина проростков пшеницы // Прикладная биохимия и микробиология. 1993. – Т.29. – Вып. 1. – С. 91-96.
4. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. – М.: Наука, 1971. – 95 с.
5. Сыновец А.С., Левицкий А.П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. – К.: Здоров'я, 1985. – 72 с.
6. King J., Laemmli U.K. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. // J. Mol. Biol. – 1971 – V. 61. – Pp. 465-477.

7. Левицкий А.П. Методы выделения ингибиторов трипсина // Биохимические методы исследования селекционного материала: Сб. науч. тр. Всес. сел.-генетич. ин-та. – Одесса, 1979. – С. 68–72.

Тихонов П.С. Выделение и свойства ингибиторов трипсина и хемотрипсина продукта переработки бобов сои.

Представлены данные по выделению и изучению некоторых биохимических свойств ингибиторов трипсина и хемотрипсина продукта переработки бобов сои.

Tichonov P.S. Selection and properties of inhibitors of tripsin and chimotripsin of soybean processed product are presented.

Data on isolation and some biochemical characteristics of tripsin and chimotripsin inhibitors of soybean processed product are presented.