

УДК 577.151:57.05

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРОВ PHASEOLUS VULGARIS

В.А. Сильченко, Е.А. Прутенская, Л.А. Зайцева

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Семена фасоли содержат большое количество белковых веществ и крахмала. Существует много методов для их разделения и некоторые из них нашли широкое применение в промышленности. Белковые вещества фасоли в зависимости от технологии их выделения применяются в разных сферах. При тепловой обработке белкового изолята получается гидролизат, который используется в качестве кормовой добавки, при получении пищевых концентратов, например, в изготовлении специальных добавок в макаронной, кондитерской, хлебопекарной промышленности. Белки фасоли без предварительной обработки используют для выделения ингибиторов ферментов [1, 2].

Большое распространение ингибиторов пищеварительных ферментов и их присутствие в довольно значительных количествах в тканях этих растений свидетельствует о том, что они играют важную роль в регуляции разных физиологических процессов.

В последнее время ингибиторы стали использовать в качестве генетических маркеров при решении вопросов эволюции растений, при идентификации сортовой принадлежности рода в систематике, а также в роли перспективных препаратов, которые используют в медицине [3].

В связи с этим, в настоящее время является актуальным изучение ингибиторов растений и их биологической активности.

Фасоль отличается высоким содержанием хорошо перевариваемого, полноценного по аминокислотному составу растительного белка. Белковый комплекс фасоли в нативном виде содержит антипитательные вещества или так называемые антиалиментарные факторы: лектины, ингибиторы протеиназ и амилаз.

В работе изучалось влияние комплексов белковых ингибиторов из *Phaseolus vulgaris* на α -амилазы *Aspergillus oryzae* и панкреатическую. Опытные образцы были получены по методикам, разработанным на кафедре БТиХ ТвГТУ [4]. Растворы ингибиторов готовили из сухих образцов путем растворения в воде. Амилолитическую активность определяли колориметрическим методом.

При исследовании воздействия ингибиторов на активность ферментов выяснилось, что минимальная каталитическая активность ферментных молекул прослеживается при конкретной насыщенности ингибитора, в результате ее уменьшения или увеличения в сравнении с приемлемым уровнем каталитические свойства фермента усиливаются. Потому как субстрат, так и ингибитор являются структурными аналогами и в процессе реакций они конкурируют за соединение с активным центром фермента, следовательно, уровень ингибирования ферментативного превращения находится в зависимости от пропорции концентраций субстрата и ингибитора. В случае если плотность субстрата будет намного превышать плотность ингибитора, то постоянно лишь малое количество молекул фермента будет связано с ингибитором и воздействие ингибитора практически не обнаружится.

В связи с этим, вначале подбиралось оптимальное соотношение субстрата (крахмал 1 %) и ингибитора. Для исследования использовали в качестве объекта α -амилазу *Aspergillus oryzae*.

В зависимости от величины концентрации белкового вещества наблюдалась различная тенденция. При концентрации раствора ингибитора 0.01 % и выше наблюдалось незначительное снижение активности амилазы. При уменьшении концентрации ингибитора в растворе происходило снижение активности (рисунок 1).

Наибольшее снижение активности наблюдается при добавлении растворов ингибитора концентраций близкой к 0.00001 %. Дальнейшее уменьшение концентрации раствора ингибитора приводило к незначительному увеличению активности α -амилазы *Aspergillus oryzae*. Максимальное подавление ферментативной активности в пробах достигает 29 % от исходной активности фермента.

На рисунке 2 показано влияние белкового комплекса ингибиторов на активность грибной α -амилазы *Aspergillus oryzae* в течение 20 минут. Для опытов брали растворы ингибитора концентрацией 0.000001 % и 0.00001 %. 1 – Активность α -амилазы без добавления ингибитора; 2 – активность α -амилазы при добавлении раствора ингибитора с концентрацией 0.000001; 3 – активность α -амилазы при добавлении раствора ингибитора с концентрацией 0.00001.

Максимальное ингибирование происходит на 10 минутах реакции, затем активность α -амилазы увеличивается, но не достигает контроля. Торможение ферментативной реакции составляет 5 минут, полное разрушение субстрата не происходит даже на 20 минутах. После 15 минут течение ферментативной реакции практически приостанавливается. Таким образом, при уменьшении концентрации субстрата в растворе между ингибитором и ферментом образуется необратимый комплекс, который не позволяет полностью деструктурировать крахмал.

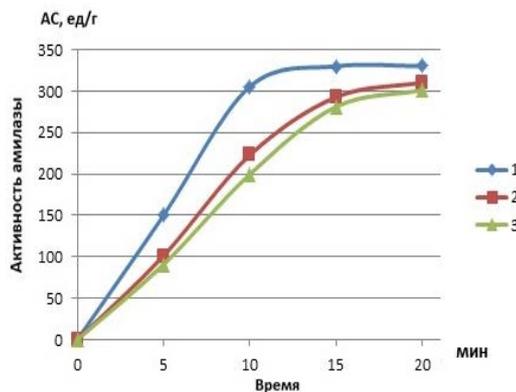
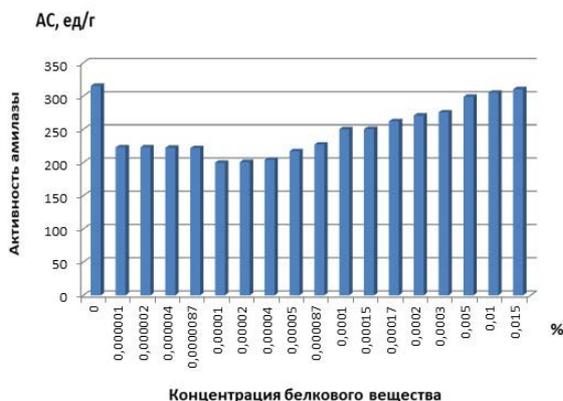


Рисунок 1 – Зависимость активности грибной амилазы при разной концентрации растворов ингибитора (время реакции 10 минут, концентрация крахмала 1 %, температура 30°C)

Рисунок 2 – Зависимость активности грибной α -амилазы *Aspergillus oryzae* при добавлении растворов ингибитора разных концентраций от времени

На основе данных результатов можно сделать вывод, что при добавлении ингибитора активность амилазы падает, но при этом малая концентрация ингибитора оказывает более сильное воздействие на активность. Можно предположить, что при большей концентрации крахмала происходит конкурентное ингибирование или селективное действие ингибитора.

В ходе изучения влияния на панкреатическую амилазу для определения оптимальной концентрации ингибирующего вещества были проведены опыты, в ходе которых было выяснено, что повышение концентрации ингибитора выше 1% никак не влияло на результат ингибирующего действия на фермент. Однако понижение концентрации ингибитора ниже 1% приводило к снижению влияния ингибитора, выделенного из фасоли, на активность панкреатической α -амилазы.

Графические данные о влиянии различных концентраций ингибитора на активность панкреатической α -амилазы представлены на рисунке 3.

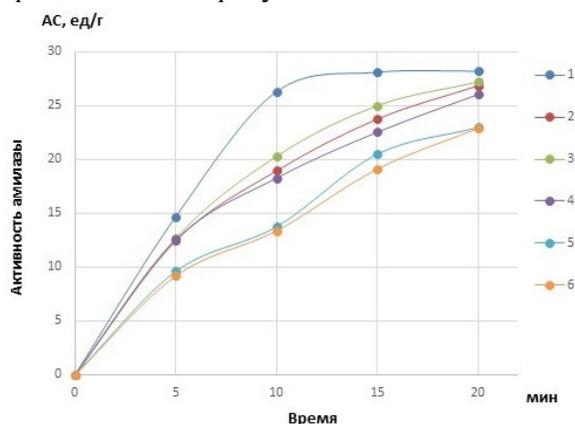


Рисунок 3 – Зависимость активности амилазы при добавлении различной концентрации ингибитора от времени. 1 – Активность амилазы без добавления ингибитора; 2 – Активность амилазы при концентрации ингибитора 0.03; 3 – Активность амилазы при концентрации ингибитора 0.05; 4 – Активность амилазы при концентрации ингибитора 0.1; 5 – Активность амилазы при концентрации ингибитора 1 %; 6 – Активность амилазы при концентрации ингибитора 2 %

Максимальное ингибирование фермента происходит на 10 минуте и составляет 49 % от контроля. На 20 минуте активность фермента увеличивается на 30 %. Таким образом, механизм действия белковых ингибиторов, выделенных из фасоли, одинаков, как для панкреатической амилазы, так и для грибной.

На основании вышеизложенного, можно отметить, что полученные препараты ингибиторов являются антиалиментарными факторами и могут быть использованы для практических целей.

Работа выполнена при финансировании РФФИ (госконтракт 19-08-00185\19).

ЛИТЕРАТУРА

1 Акулов, А.С. Перспективная ресурсосберегающая технология производства фасоли: метод. рекомендации / А.С. Акулов [и др.]. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2010. – 36 с.

2 Чурикова, С.Ю. Разработка технологий производства адаптированных функциональных продуктов питания с использованием злаковых, бобовых и гречишных культур: дис... канд. сель-хоз. наук: 05.18.01: защищена 30.11.11: / Чурикова Светлана Юрьевна. – Воронеж, 2011. – 224 с.

3 Шпирная, И.А. Гидролитические ферменты и их ингибиторы как компоненты системы "насекомое-фитофаг-растение": дис... канд. биолог. наук: 03.00.12 /Уфа, 2006. – 112 с.

4 Сильченко В.А. и др. Разработка технологии выделения ингибиторов пищевых ферментов из растительного сырья для создания диагностических препаратов // Вестник Тверского государственного технического университета. 2017. № 1 (31). – С. 133–137.