

## ТРИПСИНИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМ. *FABACEAE*

О. В. Дорогина, Е. В. Жмудь

Проведено исследование трипсинингибирующей активности (ТИА) в листьях представителей 12 видов из 3 родов (*Astragalus* L., *Hedysarum* L., *Trifolium* L.) сем. *Fabaceae*. Обнаружено, что самой низкой ТИА в листьях характеризовались растения 4 исследованных видов рода *Astragalus* L. Исследование сезонной динамики признака показало, что величина ТИА у интродуцированных образцов *Hedysarum alpinum* L. и *H. flavescens* Regel et. Shmalh. достигала максимума в фазе бутонизации растений.

В результате скрининга по ТИА у представителей 4 видов рода *Hedysarum* было обнаружено, что наибольшая средняя величина признака (29.8 мг/г сухой массы) и высокая амплитуда межпопуляционной изменчивости характерны для дикорастущих представителей полиморфного вида *H. gmelinii* Ledeb. По результатам оценки индивидуальной изменчивости в листьях растений этого вида выявлены формы с низкой ТИА.

Ключевые слова: *Astragalus*, *Hedysarum*, *Trifolium*, трипсинингибирующая активность.

Доля белков растительного происхождения в рационе животных составляет 95 %. Особенно им богаты растения из сем. *Fabaceae*. Так, например, его содержание в семенах разных видов вики колеблется от 28.5 до 37.3 % в пересчете на сухую массу, чечевицы — от 24 до 30.5 и чины — от 28.2 до 32.2 % (Агафонова и др., 1981; Бенкен и др., 1977; Roy, Rao, 1971). Однако пищевую ценность этих белков в значительной степени снижают природные биологически активные антиалиментарные вещества: ингибиторы протеиназ, фитогемагглютинины и др. Из всего спектра антиалиментарных факторов наибольший интерес представляют ингибиторы протеиназ, в частности трипсина, из-за их широкого распространения и высокого содержания в различных частях растений (Rackis, 1972; Kakade et al., 1973). Взаимодействуя с протеазами, и в частности с трипсином и химотрипсином, они значительно снижают усвоение белка, что приводит к обострению его дефицита. Например, при скармливании чины, когда ее доля в рационе составляет 50—100 %, отмечается угнетение роста животных (Мосолов, Валуева, 1993).

Физиологическая роль ингибиторов трипсина в растениях общеизвестна: они выполняют функцию запасных белков, регулируют активность протеолитических процессов, предотвращая преждевременный распад резервных белков; подавляют активность протеиназ внедряющихся насекомых и фитопатогенных микроорганизмов, тем самым защищая растения от поражения (Мосолов, 1990; Валуева, Мосолов, 1995). Вместе с тем ингибиторы протеиназ обладают свойством существенно снижать каталитическую активность протеолитических ферментов (трипсина и химотрипсина) желудочно-кишечного тракта животных организмов, образуя с ними неактивные комплексы (Химия..., 1986). Поступление в организм повышенного количества этих антиалиментарных веществ приводит к уменьшению процесса гидролиза белков пищи, снижению эффективности их усвоения и, как следствие, приводит к гипертрофии поджелудочной железы, нарушению функции печени, задержке роста и т. д. (Раджабов и др., 1980).

Эффективным путем устранения этих факторов является инактивация ингибиторов протеиназ, вызванная их разрушением. Следует отметить, что по сравнению с другими антиалиментарными факторами ингибиторы трипсина обладают достаточно высокой стойкостью к инаktivации. Например, после обработки водного экстракта, содержащего ингибиторы трипсина, в течение часа при температуре 120 °С активность сохранялась на 65—70 % (Раджабов и др., 1980).

Таким образом, определяющим этапом в технологическом процессе переработки зернобобовых и прежде всего сои является максимальное удаление ингибиторов трипсина путем термообработки исходного сырья (Адамень, Письменков, 1995). Однако следует иметь в виду, что тепловую обработку проходят семена, используемые для производственных целей (горох, фасоль, соя и др.), а зернофураж и сено, как правило, не подвергаются термическому воздействию. Отсюда понятно, почему для кормовых целей важно использовать такие формы и сорта диких и культурных растений, особенно бобовых, которые отличаются сравнительно низким содержанием ингибиторов протеаз при сохранении остальных положительных качеств.

Одним из эффективных путей получения форм и сортов с низкой активностью ингибиторов является использование методов гибридизации и мутагенеза. Так, с помощью обработки метилэтансульфонатом и гамма-лучами были получены формы горошка пестроцветного с пониженной активностью ингибиторов трипсина (Агафонова и др., 1980, 1981). Другой путь — анализ природных популяций и отбор форм с наименьшей трипсинингибирующей активностью (Дорогина и др., 2003).

Целью настоящей работы было выявление растений с пониженной трипсинингибирующей активностью для использования в практических целях. При решении поставленной цели были изучены трипсинингибирующая активность в листьях некоторых кормовых растений из родов *Astragalus* L., *Hedysarum* L. и *Trifolium* L., проведена оценка межвидовой и внутривидовой изменчивости ингибиторов трипсина, а также на примере некоторых видов рода *Hedysarum* изучена сезонная динамика трипсинингибирующей активности.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в Горном Алтае и Хакасии в 54 природных и интродуцированных популяциях 12 видов родов *Trifolium*, *Hedysarum* и *Astragalus*.

Трипсинингибирующую активность (ТИА) определяли в миллиграммах чистого трипсина, связанного ингибитором, на 1 г воздушно-сухой муки (мг/г сухой массы) по методу Ю. Я. Гофмана и И. М. Вайсблая (1975) и другим методикам (Методы..., 1987). Для анализа использовали листья средневозрастных генеративных растений, находящихся в фазе цветения. Для сравнения определяли ТИА в семенах сои сорта «Приморская».

Изучение сезонной динамики ТИА проводили у растений из двух интродуцированных видов рода *Hedysarum*: *H. alpinum* L. и *H. flavescens* Regel. et Schmalh. Образцы листьев собирали в фазы начала вегетации, бутонизации, цветения и плодоношения растений.

Оценку межвидовой изменчивости активности ингибиторов трипсина по средней пробе листьев проводили в средних выборках ценопопуляций (ЦП) четырех видов рода *Hedysarum*: *H. neglectum* Ledeb., *H. gmelinii* Ledeb., *H. austrosibiricum* B. Fedtsch. и *H. consanguineum* DC. Изучение внутривидовой (межпопуляционной) изменчивости этого признака были исследованы сред-

ние пробы листьев *H. neglectum* (6 ЦП), *H. gmelinii* (14 ЦП), *H. austrosibiricum* (7 ЦП) и *H. consanguineum* (3 ЦП).

Оценку величины индивидуальной изменчивости ТИА проводили в двух ценопопуляциях *H. gmelinii* (ЦП 5, 9) и двух ценопопуляциях *H. neglectum* (ЦП 15, 16). В каждой ценопопуляции было проанализировано 12—15 средне-возрастных генеративных особей, находящихся в фазе конца цветения—начала плодоношения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования было выявлено, что самой низкой ТИА (0.2—2.1 мг/г сухой массы) характеризовались виды рода *Astragalus*, а высокой активностью (10.0—65.5 мг/г) — виды рода *Hedysarum* (табл. 1), но по сравнению с исследованными семенами сои (150—230 мг/г) она была ниже. Наличие высокой ТИА в листьях растений рода *Hedysarum* по сравнению с другими как интродуцированными растениями, так и растениями природной флоры определяет необходимость проведения скрининга у представителей этого рода для отбора форм с низкой активностью.

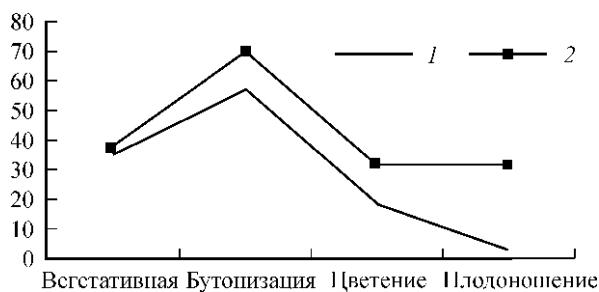
Изучение сезонной динамики ТИА листьев интродуцированных растений *H. alpinum* и *H. flavescens* показало, что в фазу бутонизации она достигает максимальных значений, затем наблюдается снижение и к фазе плодоношения активность имеет минимальные показатели (см. рисунок). Аналогичные результаты были получены нами ранее для интродуцированного в ЦСБС СО РАН *Trifolium pannonicum* Jacq. (Агафонова (Дорогина), Жмудь и др., 2002). Наибольшее различие (в 21 раз) по трипсинингибирующей активности в течение вегетационного периода было выявлено для листьев *H. alpinum* в фазах бутонизации и плодоношения растений. В то время как ТИА в этих же фазах у растений *H. flavescens* различалась в 2.3 раза. Таким образом, растения, нахо-

ТАБЛИЦА 1

### Трипсинингибирующая активность (ТИА) в листьях растений сем. *Fabaceae* в фазе цветения

Вид	Число исследованных ценопопуляций	Местонахождение ценопопуляций	ТИА, мг/г сухой массы
<i>Astragalus adsurgens</i>	1	Хакасия	0.8
<i>A. austrosibiricus</i>	8	Горный Алтай	0.8—2.1*
<i>A. frigidus</i> L.	1	» »	0.5
<i>A. membranaceus</i> Bunge	7	Бурятия	0.9—0.2*
	1	Интродуцент	0.2
<i>Hedysarum alpinum</i> L.	1	»	54
<i>H. austrosibiricum</i>	7	Горный Алтай	12.9—27.0*
<i>H. consanguineum</i>	3	» »	10.5—51.5*
<i>H. flavescens</i> Regel. et Schmalh.	1	Интродуцент	53.9
<i>H. gmelinii</i> Ledeb.	14	Горный Алтай	2.7—65.5*
<i>H. neglectum</i> Ledeb.	6	» »	13.7—29.6*
<i>H. theinum</i> Krasnob.	1	» »	34.1
<i>Trifolium pannonicum</i> Jacq.	2	Интродуцент	4.3—11.5*

Примечание. \* — максимальные и минимальные значения ТИА для различных популяций одного вида.



Сезонная динамика трипсинингибирующей активности (ТИА) листьев *Hedysarum alpinum* (1) и *H. flavescens* (2), интродуцированных в ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск).

По оси абсцисс — фаза сезонного развития растений; по оси ординат — ТИА, %

дящиеся в фазах цветения и плодоношения можно использовать на корм животным с меньшим риском.

Листья *H. gmelinii* в природных популяциях характеризовались определенными показателями активности: низкой — до 20 мг/г сухой массы (ЦП 4, 5 и 8), высокой — 40—60 мг/г (ЦП 3 7 9), средней (ЦП 1, 2, 6, 10—14) (табл. 2). Следует отметить, что максимальные и минимальные значения ТИА в исследованных ценопопуляциях этого вида различались в 24.2 раза.

Каждая из исследованных ценопопуляций *H. neglectum* также характеризовалась определенной величиной ТИА (табл. 2). При этом низкая активность (до 20 мг/г) была выявлена в ценопопуляциях 15, 18—20, а средняя величина ТИА, не превышающая 30 мг/г сухой массы, — в ценопопуляциях 16 и 17. Максимальные и минимальные значения ТИА различались в 2.2 раза, что свидетельствует о невысокой внутривидовой изменчивости этого показателя.

Незначительное варьирование величины ТИА установлено для исследованных ценопопуляций *H. austrosibiricum* (табл. 2). Различия между граничными значениями активности составляли 2.1 раза. Минимальной активностью характеризовались ценопопуляции 22, 25 и 27 (12.9—18.9 мг/г), в остальных ценопопуляциях была зафиксирована средняя величина активности (23.1—27.0 мг/г).

Пределы изменчивости ТИА трех ценопопуляций *H. consanguineum* были меньше, чем у *H. gmelinii*, но больше, чем у *H. austrosibiricum*: величины ТИА в ценопопуляциях с высокой (ЦП 28) и низкой (ЦП 29 и 30) активностью различались в 5.1 раза (табл. 2).

Размах индивидуальной изменчивости ТИА в ценопопуляциях с наименьшим и наибольшим средним значением признака был неодинаковым у представителей двух видов рода *Hedysarum*. Так, ценопопуляция *H. gmelinii* (ЦП 5), имеющая наименьшую среднюю величину ТИА, амплитуда изменчивости признака колебалась в широких пределах (0.7—4.9 мг/г), верхний и нижний пределы варьирования различались в 6.6 раза, а ценопопуляция 9, характеризующаяся высокими средними значениями ТИА (50.9—78.3 мг/г), — всего в 1.5 раза. Максимальные и минимальные значения ТИА в листьях *H. neglectum* (ЦП 15) с наименьшими средними значениями активности (2.7—19.3 мг/г) различались в 7.1 раза, а с более высокими средними значениями признака (13.5—37.8 мг/г, ЦП 16) — в 2.8 раза. Таким образом, у ценопопуляций обоих изученных видов с низкой ТИА интервалы варьирования этого показателя различаются более существенно, по сравнению с ценопопуляциями с высокой активностью.

ТАБЛИЦА 2  
**Местонахождение ценопопуляции (ЦП) некоторых видов р. *Hedysarum*  
 в Горном Алтае и Хакасии и трипсинингибирующая активность  
 их листьев (ТИА, мг/г сухой массы)**

Номер ЦП	Год исследования	Местонахождение	ТИА
<i>H. gmelinii</i>			
1	1999	Горный Алтай, Онгудайский р-н, долина р. Кадрин	22.7
2	1999	Там же, устье р. Чуи	33.7
3	2000	Там же, окрестности с. Иня	46.4
4	2000	Там же, Кош-Агачский р-н, долина р. Шавла	15.3
5	2000	То же	2.7
6	2000	» »	31.0
7	2000	Горный Алтай, Онгудайский р-н, окрестности д. Малый Яломан	49.2
8	2000	Там же, Усть-Канский р-н, окрестности с. Яконур	18.9
9	2001	Там же, Онгудайский р-н, устье р. Башкаус	65.5
10	2003	Там же, Кош-Агачский р-н, окрестности пос. Кош-Агач	27.0
11	2003	Там же, Онгудайский р-н, у перевала Чике-Таман	26.7
12	2003	Там же, окрестности д. Ело	21.0
13	2003	Там же, Усть-Канский р-н, окрестности д. Оро	37.4
14	2003	Там же, окрестности г. Усть-Кан	20.3
<i>H. neglectum</i>			
15	2000	Там же, Кош-Агачский р-н, Северо-Чуйский хребет, перевал Ачик	13.7
16	2000	Там же, Онгудайский р-н, окрестности д. Малый Яломан	29.6
17	2000	Там же, Усть-Канский р-н, оз. Мультиинские	24.5
18	2001	Там же, Улаганский р-н, в 15 км от пос. Улаган	16.0
19	2001	Там же, берег оз. Мертвое	14.9
20	2001	То же	16.7
<i>H. austrosibiricum</i>			
21	1999	Там же, Онгудайский р-н, долина р. Айлюгуш, лог Кызыл-Арт	26.9
22	1999	Там же, Айлюгушский хребет, перевал Арамза	12.9
23	1999	Там же, Кош-Агачский р-н, вершина г. Кош-Агаш	27.0
24	1999	Там же, долина р. Малый Дыралу	25.7
25	1999	То же	18.9
26	2000	Там же, Кош-Агачский р-н, окрестности оросительной системы Кызыл-Шин	23.1
27	1982	Хакасия, Орджоникидзенский р-н, окрестности пос. Приисковый	17.0
<i>H. consanguineum</i>			
28	2000	Горный Алтай, Кош-Агачский р-н, окрестности оросительной системы Кызыл-шин, берег оз. Бугузун	51.5
29	2001	Там же, Улаганский р-н, окрестности оз. Узуккель	11.4
30	1983	Хакасия, Таштыбский р-н, 12 км до оз. Улук-Мангышхоль	10.0

Анализ природных ценопопуляций по средним величинам ТИА в листьях показал, что небольшую величину активности (16.5 мг/г) имеет *H. neglectum*, а средние величины — эндемичный вид *H. austrosibiricum* (21.6 мг/г) и *H. consanguineum* (24.3 мг/г). Более высокая активность обнаружена у полиморфного вида *H. gmelinii*, представленного наибольшим числом исследованных популяций. Граничные значения пределов изменчивости ТИА этого вида различались в 29.8 раза.

Следует подчеркнуть, что характеристика ценопопуляций и тем более видов, данная только по средним величинам ТИА, очень приближительна. С этой точки зрения, более информативными являются результаты анализа индивидуальной изменчивости этого признака. Такой подход позволяет выявлять формы с наименьшей трипсинингибирующей активностью. В результате проведенных исследований в ценопопуляции *H. gmelinii* (ЦП 5) были выделены формы, характеризующиеся наименьшей ТИА, равной 0.7 мг/г сухой массы. Эти формы можно использовать в качестве доноров генов для создания сортов с пониженной ТИА.

Перспективными в кормовом отношении являются ценопопуляции (ЦП 15, 18, 19 и 20) *H. neglectum*, ценопопуляции (ЦП 4, 5 и 8) *H. gmelinii*, ценопопуляции (ЦП 22, 25 и 27) *H. austrosibiricum* и ценопопуляции (ЦП 29 и 30) *H. consanguineum*, характеризующиеся относительно небольшой ТИА.

### ВЫВОДЫ

1. Наибольшей активностью ингибиторов трипсина характеризуются виды рода *Hedysarum* (10.0—65.5 мг/г сухой массы),<sup>1</sup> а наименьшей — виды рода *Astragalus* (0.2—2.1 мг/г). Границы изменчивости по этому признаку у видов рода *Hedysarum* значительно шире, чем у видов рода *Astragalus*.

2. Наименьшую трипсинингибирующую активность (ТИА) имеет *H. neglectum* Ledeb. (16.5 мг/г), а наибольшую — полиморфный вид *H. gmelinii* Ledeb. (29.8 мг/г).

3. В фазу бутонизации растений *H. alpinum* L. и *H. flavescens* Regel et Schmalh., интродуцированных в ЦСБС СО РАН, отмечается максимальное значение ТИА.

4. Эндемичный вид *H. austrosibiricum* В. Fedtsch. характеризуется наименьшим диапазоном внутривидовой изменчивости по ТИА, причем граничные значения по этому признаку различаются в 2.1 раза.

5. В ценопопуляциях *H. gmelinii* выделены формы с наименьшей активностью (0.7 мг/г), перспективные для использования в качестве доноров с низкой ТИА. Кроме этого, перспективными в кормовом отношении можно считать ценопопуляции других видов рода *Hedysarum* с трипсинингибирующей активностью, не превышавшей 20 мг/г.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность за любезно предоставленный материал канд. биол. наук Н. А. Карнаухова и за помощь в экспериментальной работе канд. биол. наук Т. С. Черниковой. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 11.13 президиума РАН «Биоразнообразие генофондов».

---

<sup>1</sup> От редакции. Обращаем внимание читателей на обнаруженный авторами важный факт — высокую трипсинингибирующую активность у ряда изученных видов (*H. alpinum* L. и *H. flavescens* Regel et Schmalh.). Перспективно изучение этих растений как потенциальных ингибиторов протеиназ, необходимых для лечения панкреатитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агафонова (Дорогина) О. В., Тарасенко Н. Д. Изменчивость трипсинингибирующей активности в М1 *Vicia picta* L. после обработки семян мутагенами // Сиб. вестн. с.-х. науки. 1980. № 2. С. 24—27.
- Агафонова (Дорогина) О. В., Агафонов А. В., Тарасенко Н. Д. Разделение ингибиторов трипсина из семян мутантных форм горошка пестроцветного (*Vicia picta* L.) на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой // Сиб. вестн. с.-х. науки. 1981. № 4. С. 109—110.
- Агафонова (Дорогина) О. В., Жмудь Е. В., Крогулевич Р. Е., Черникова Т. С. Содержание флавоноидов, белка и активность ингибиторов трипсина в листьях *Trifolium pannonicum* Jacq., выращиваемого в Новосибирске // Раст. ресурсы. 2002. Т. 38, вып. 1. С. 86—91.
- Адамень Ф. Ф., Письменов В. Н. Использование сои в народном хозяйстве. Симферополь, 1995.
- Бенкен И. И., Волузнева Т. А., Мирошниченко И. И. Активность ингибиторов трипсина и содержание белка в семенах чечевицы и чины // Бюл. ВИР. 1977. Т. 73. С. 29—34.
- Валуева Т. А., Мосолов В. В. Белки-ингибиторы протеолитических ферментов у растений // Прикл. биохимия и микробиология. 1995. Т. 31, № 6. С. 579—589.
- Гофман Ю. Я., Вайсблай И. М. Определение ингибитора трипсина в семенах гороха // Прикл. биохимия и микробиология. 1975. Т. 11, № 5. С. 777—783.
- Дорогина (Агафонова) О. В., Жмудь Е. В., Карнаухова Н. А., Черникова Т. С. Изменчивость морфологических признаков и активности ингибиторов трипсина в листьях растений природных популяций *Hedysarum gmelinii* Ledeb., произрастающих в различных экологических условиях Горного Алтая // Сиб. экол. журнал. 2003. № 1. С. 29—32.
- Методы биохимического исследования растений / Под ред. А. И. Ермакова. Л., 1987.
- Мосолов В. В. Ингибиторы протеолитических ферментов как защитные белки растений // Фитонциды. Бактериальные болезни растений: Материалы конф. Ч. 1. Киев, 1990. С. 50—51.
- Мосолов В. В., Валуева Т. А. Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов. М. 1993.
- Раджабов Л. Р., Нигмонов М., Шибнев В. А. Содержание белка, масла и активность ингибитора трипсина в различных сортах сои // Химия природ. соединений. 1980. № 1. С. 84—88.
- Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства *Hydrangeaceae—Haloragaceae*. СПб., 1987.
- Химия и биохимия бобовых растений / Пер. с англ. К. С. Спектрова; Под ред. Д. В. Хлуднева М., 1986.
- Хлуднев Д. В., Мосолов В. В. Поведение белка-ингибитора  $\alpha$ -амилазы 2 из зерна пшеницы при прорастании // Физиология растений. 1992. Т. 39. С. 120—125.
- Kakade M. L., Hoffa D. E., Liener I. E. Contribution of trypsin inhibitors to the deterioration effects of unheated soybeans fed to rats // J. Nutr. 1973. Vol. 103. P. 1772—1778.
- Rackis J. J. Biologically active components // Soybeans: chemistry and technology / Eds A. K. Smith, S. J. Circle. Connecticut, 1972.
- Roy D. N., Rao S. P. Evidence isolation, purification and properties of a trypsin inhibitor in *Lathyrus sativus* // J. Agr. Food. Chem. 1971. Vol. 19, N 2. P. 257—261.

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН  
г. Новосибирск  
root@botgard.nsk.ru

Поступило 18 VI 2007

TRYPSIN INHIBITOR ACTIVITY SOME  
OF SPECIMENTS OF *FABACEAE*

*O. V. Dorogina, E. V. Zhmud*

S U M M A R Y

In 12 species of 3 genera (*Astragalus* L., *Hedysarum* L., *Trifolium* L.) of *Fabaceae* trypsin inhibitor activity (TIA) in leaves was studied. In leaves of species of *Astragalus* TIA was found out to be the lowest. An investigation of the seasonal variation of TIA in cultivated *Hedysarum alpinum* L. and *H. flavescens* Regel et Shmalh. showed that TIA was maximal in the budding. The high average value of TIA (28.8 mg/g dry weight) and high amplitude of intraspecific variability TIA was peculiar to *Hedysarum gmelinii* Ledeb. Forms with low TIA were revealed for practical purposes as a result of this investigation of individual variability.

---