



УДК 577.112.088.3:577.152.342.042

© 1994 И. П. Гладышева, Т. З. Шарафутдинов,
Н. И. Ларионова

**ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕВЫЕ ИЗОИНГИБИТОРЫ ТИПА
БАУМАНА — БИРК. ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА,
КИНЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ПРОТЕИНАЗАМИ**

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Ключевые слова: ингибиторы белковые, ингибиторы Баумана — Бирк, протеиназы.

Из коммерческой соевой муки выделены изоингибиторы типа Баумана — Бирк (ВВИ). Определены аминокислотный состав и изоэлектрические точки изоингибиторов (pI 4,8—8,1). Изоингибитор 2-II (M 8000 Да) относится к классическим ВВИ, а 3-II и 5-II (M 17 000 Да) — к высокомолекулярным глицинбогатым ВВИ. Ингибитор 2-II является двухцентровым и связывает трипсин на одном реактивном центре, а α -химотрипсин и лейкоцитарную эластазу — на другом. По кинетике установления стационарного состояния в тройной системе ($I + S + E$) при разных концентрациях ингибитора определены кинетические константы скоростей ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) фермент-ингибиторного комплекса.

Белковые вещества, способные подавлять активность протеолитических ферментов, были впервые обнаружены в экстрактах бобовых и охарактеризованы как ингибиторы трипсина [1, 2]. Эти ингибиторы разделяют на два основных семейства — типа Кунитца [1, 3] и типа Баумана — Бирк [2, 3], положив в основу классификации их молекулярную массу, первичную аминокислотную последовательность, антипротеиназную активность и иммунохимическое поведение.

Семейство ингибиторов Баумана — Бирк (ВВИ) включает в себя ингибиторы из бобовых, злаковых и тыквенных культур [4]. Классический соевый ингибитор типа Баумана — Бирк, обозначаемый в литературе ВВИ-А, — родоначальник ингибиторов данного семейства — был выделен из бобов сои Д. Бауманом в 1946 г. [2] и охарактеризован Й. Бирк с соавт. [3, 5]. ВВИ-А — «двуглавый» ингибитор, способный одновременно и независимо связывать на одном центре (Lys^{16} — Ser^{17}) трипсин, а на другом (Leu^{43} — Ser^{44}) — эластазу лейкоцитов человека (далее — эластаза) и химотрипсиноподобные протеиназы [6, 7]. Кроме ВВИ-А из широкого спектра сортов соевых бобов выделен ряд его изоформ [8—12]. Показано, что соотношение форм ВВИ существенно зависит от условий выращивания растений (длина светового дня, температура, влажность и др.), а также сорта соевых бобов [13—15]. Ранее нами был изучен изоформный состав ВВИ из соевых бобов

Сокращения: ВВИ — ингибиторы типа Баумана — Бирк, SBTI — соевый ингибитор типа Кунитца.

Очистка ингибиторов типа Баумана — Бирк из коммерческой соевой муки (300 г обезжиренной муки)

Стадия	Белок, мг	Антиэластазная активность*		Выход, %	Степень очистки
		удельная, ед. инг./мг I	суммарная, ед. инг.		
Экстракт	6800	0,0047	32,1	100	1
Сефадекс G-15	2400	0,014	32,8	102,4	3
СМ-целлюлоза					
Активные пики					
2	31,5	0,12	3,8	11,8	25
3	38,5	0,14	5,6	17,4	31
4	30,0	0,11	3,3	10,3	23
5	73,2	0,07	5,1	16,0	15
6	29,2	0,03	0,9	2,8	6
7	16,5	0,03	0,5	1,6	6
DEAE-ToyoPearl					
пик 2-II	7,5	0,45	3,4	10,6	96
3-II	7,1	0,39	2,8	8,7	83
4-II	8,0	0,3	2,4	7,5	64
5-II	8,5	0,13	1,1	3,4	28
6-II	8,0	0,09	0,7	2,2	20
7-II	4,0	0,09	0,4	1,1	20

* За единицу антиэластазной активности (ед. инг.) принимается количество эластазы (мг), заингибированное в стандартных условиях (см. «Экспер. часть»).

отечественной селекции (ВНИИС-2, Крапинка, Приморская-1) и получен ряд их характеристик [7, 16, 17]. В данной работе впервые выделены и изучены изоингибиторы типа Баумана — Бирк из коммерческой соевой муки, используемой в кондитерском производстве.

Выделение, очистка и характеристика соевых изоингибиторов типа Баумана — Бирк

В литературе описано несколько методов выделения соевых изоингибиторов типа Баумана — Бирк [15, 18—20]. Нами за основу выбран метод, включающий в себя экстракцию этиловым спиртом и осаждение белков ацетоном [18]. Ацетон осаждает только ВВ1 и не осаждает ингибиторы семейства Кунитца, также содержащиеся в бобах сои [3, 21]. После отделения низкомолекулярных компонентов и пигментов гель-фильтрацией на сефадексе G-15 множественные формы соевых ВВ1 разделяли ионообменной хроматографией на СМ-целлюлозе (табл. 1, рис. 1а). Выделены шесть изоформ соевого ВВ1 (пики 2—7).

Для дальнейшей очистки изоингибиторов использовали анионообменную хроматографию на DEAE-ToyoPearl 650 M (см., например, рис. 1б); значения pH элюентов варьировали от 5,0 до 7,5 в зависимости от основности очищаемых пиков. К сожалению, наши данные невозможно сопоставить с данными других авторов, поскольку в литературе отсутствуют таблицы выделения изоформ ВВ1. Гомогенность полученных нами белков доказана отсутствием примесных пиков при капиллярном электрофорезе и обращенно-фазовой гидрофобной ВЭЖХ. Все выделенные изоингибиторы способны подавлять активность трипсина, химотрипсина, лейкоцитарных эластазы и катексина G. Наиболее подробно изучены изоингибиторы 2-II, 3-II, 5-II.

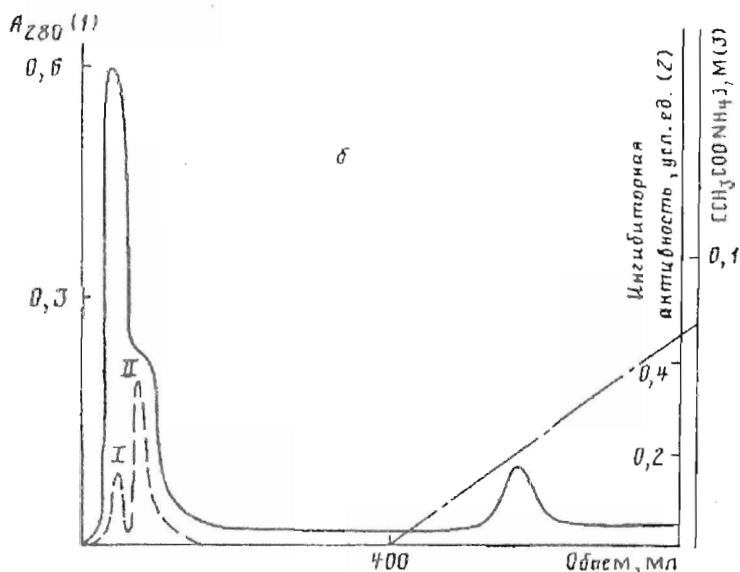
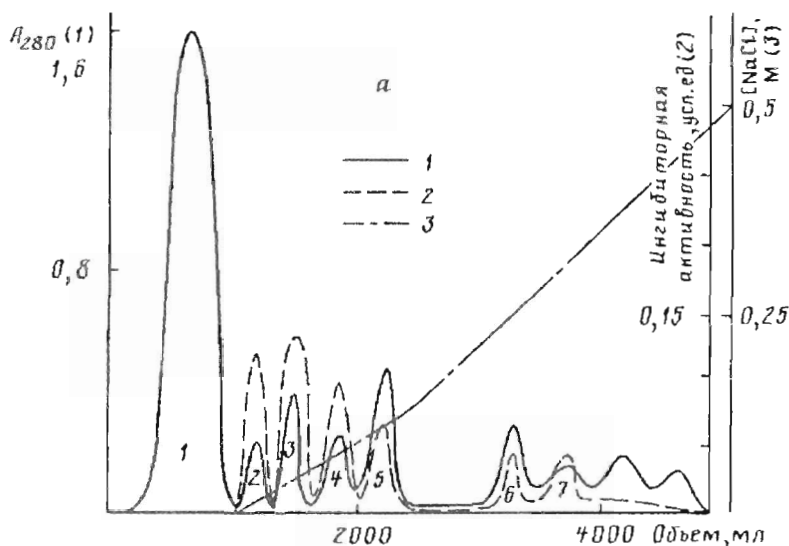


Рис. 1. Выделение соевого ингибитора Баумана — Бирк (на примере изоформы 3-II): а — хроматография соевого экстракта на CM-целлюлозе CM-32 в 0,005 M ацетате натрия, pH 4,0, 0—0,5 M NaCl; б — хроматография пика 3 на DEAE-ToyoPearl 650 M в 0,05 M ацетате аммония, pH 7,0—5,0. I и II — номера белковых пиков, обладающих ингибирующей активностью

Молекулярные массы ингибиторов, определенные с помощью электрофореза, равны 8000 ± 500 (для изоформы 2-II) и $17\ 000 \pm 1000$ Да (для 3-II и 5-II). Следует отметить полное совпадение аминокислотного состава ингибитора 2-II и классического ингибитора BVI-A [6] (табл. 2). Судя по значениям молекулярной массы, изоэлектрической точки, аминокислотному составу (табл. 2) и антипротеиназному спектру действия, ингибиторы 3-II и 5-II аналогичны впервые выделенным нами из соевых бобов сорта ВНИИС-2 высокомолекулярным, богатым глицином изоингибиторам типа Баумана — Бирк [7], однако отличаются от выделенных А. Тэн-Вильсон высокомолекулярных форм изоингибиторов данного семейства (BVI-A') [13].

Аминокислотный состав изоингибиторов протеиназ типа Баумана — Бирк, выделенных из коммерческой соевой муки (моль/моль белка)*

Аминокислота	2-II	3-II	5-II	ВВІ-А [6]	ВВІ-А' [13]	SBTI [22]
Asx	12	16	16	12	16	26
Thr	2	12	12	2	9	9
Ser	8	10	12	8	40	11
Glx	7	24	39	7	31	18
Pro	6	12	14	6	8	10
Gly	0	19	20	0	42	16
Ala	4	12	10	4	13	8
1/2 Cys	14	4	4	14	2	4
Val	1	7	5	1	8	14
Met	1	3	3	1	1	2
Ile	2	7	4	2	5	14
Leu	2	10	6	2	7	15
Tyr	2	2	4	2	4	4
Phe	2	2	1	2	4	9
Lys	5	10	14	5	6	10
His	1	4	4	1	3	2
Arg	2	7	5	2	4	9
Всего остатков	71	161	173	71	203	181

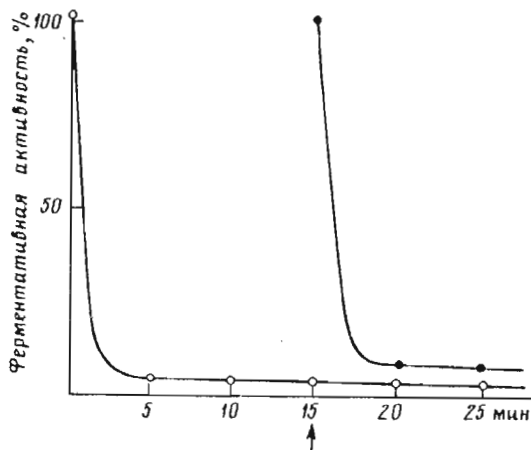
* По составу 2-II, 3-II и 5-II идентичны соответственно изоингибиторам 2-IV, 3-II и 4-II из соевых бобов сорта ВНИИС-2 [7].

Для доказательства «двузначности» полученного нами ВВІ (2-II) проведены эксперименты по ингибированию α -химотрипсина (или эластазы) комплексом трипсин—ингибитор (рис. 2). Известно [6, 22], что реактивные центры классического ингибитора ВВІ-А локализованы в гомологичных доменах в N- и C-концевых частях полипептидной цепи, поэтому стерически возможно образование тройного комплекса трипсин—ВВІ-А—химотрипсин (эластаза). Из приведенных на рис. 2 данных следуют независимость и одновременность ингибирования двух протеиназ, которые демонстрируются способностью комплекса трипсин—(2-II) ингибировать α -химотрипсин без увеличения активности трипсина. При проведении аналогичных опытов с эластазой в качестве второго субстрата использовали MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA. (В контрольном эксперименте определяли скорость гидролиза Bz-Tyr-OEt (MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA), катализируемого комплексом трипсин—(2-II), и Bz-Arg-OEt, катализируемого α -химотрипсином (эластазой), при соответствующих концентрациях.)

Кинетические параметры взаимодействия высокомолекулярных соевых изоингибиторов типа Баумана — Бирк с сериновыми протеиназами

В то время как классические ингибиторы известны очень давно, представления об эффекторах, вызывающих ингибирование ферментов во времени, были развиты сравнительно недавно [23]. Такие вещества были названы медленно взаимодействующими ингибиторами: для них равновесие между ферментом, ингибитором и фермент-ингибиторным (EI) комплексом устанавливается медленно (от секунд до минут) в отличие от классических ингибиторов, где скорости достижения равновесия лежат в миллисекундном диапазоне. Поведение этого класса ингибиторов не может быть описано кинетикой Михаэлиса — Ментен.

Рис. 2. Кинетика ингибирования α -химотрипсина комплексом трипсин—соевый ингибитор (2-II): 1 — активность трипсина по гидролизу Bz-Arg-OEt; 2 — активность α -химотрипсина по гидролизу Bz-Tyr-OEt. Стрелкой показан момент добавления α -химотрипсина. Условия реакции: [трипсин] = [химотрипсин] = [2-II] = 34 нМ; [Bz-Arg-OEt] = $6 \cdot 10^{-4}$ М; [Bz-Tyr-OEt] = $4 \cdot 10^{-4}$ М; 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 8,0), 0,02 М CaCl₂, 25° С



Для определения кинетических параметров медленно протекающих процессов ингибирования разработан метод, заключающийся в изучении скорости установления равновесия при одновременном присутствии в реакционной среде субстрата, ингибитора и фермента [23]. Данный подход был использован нами для кинетического изучения взаимодействия высокомолекулярных соевых ВВ1 3-II и 5-II с сериновыми протеиназами. Реакции, протекающие в системе, можно описать схемой 1, которая согласуется с «каноническим» механизмом взаимодействия белковых ингибиторов с сериновыми протеиназами [24]:



На рис. 3 приведен веер кинетических кривых, отражающий накопление во времени *n*-нитроанилида в реакции гидролиза MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, катализируемого эластазой, в присутствии ингибитора 3-II (аналогичные данные были получены для других пар ингибитор—протеиназа). Каждая кривая содержит начальный участок, длина и наклон которого уменьшаются с увеличением концентрации ингибитора. Исследуемый процесс отличается наличием у кривых ингибирования асимптот при достаточно высоких значениях [I]₀. Эти асимптоты, представляющие стационарную скорость, показывают, что падение скорости ферментативной реакции происходит не из-за инактивации фермента, расходования субстрата или ингибирования продуктом (надо отметить, что при малых концентрациях ингибитора стационарную скорость невозможно наблюдать из-за существенного уменьшения концентрации субстрата).

В качестве модельной функции, описывающей связь между значением концентрации продукта [P] и временем реакции *t*, было использовано уравнение (2) [23]:

$$[P] = v_3 t + (v_0 - v_3) [1 - \exp(-k_{набл} t)] / k_{набл} + d, \quad (2)$$

где *v*₀ — начальная скорость ингибируемой реакции; *v*₃ — стационарная скорость; *k*_{набл} — константа скорости первого порядка, описывающая достижение процессом стационарного состояния; *d* — отклонение [P] от нуля при *t* = 0.

Расчет кинетических констант по уравнению (2) проведен методом нелинейного регрессионного анализа. Начальные приближения оптимизируемых параметров (*v*₀, *v*₃, *k*_{набл}) находили графическим методом [25].

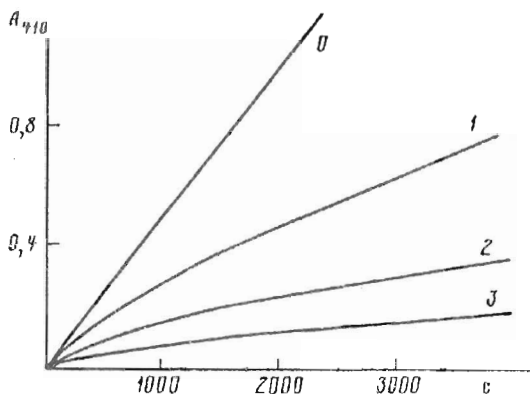


Рис. 3. Прогрессивные кривые гидролиза MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, катализируемого эластазой, в присутствии различных концентраций соевого ВВИ 3-II. Условия реакции: $[E] = 7,3 \cdot 10^{-9}$ М; $[S] = 8,3 \cdot 10^{-4}$ М; $[3-II] = 0$ (0), 2 (1), 4 (2), 5 мкМ (3); 0,1 М НЕРЕС (рН 7,5), 0,5 М NaCl, 0,005% тритон X-100, 25° С

Кинетические константы скоростей k_a и k_d определены с использованием рассчитанных значений v_0 , v_s и $k_{набл}$ согласно уравнениям

$$k_{набл} = k_a [I]_0 / (1 + [S]/K_m) + k_d, \quad (3)$$

$$k_d = k_{набл} v_s / v_0. \quad (4)$$

Константы ингибирования (K_i) рассчитаны соответственно уравнению

$$K_i (1 + [S]/K_m) = [I]_0 / (v_c/v_s - 1) - v_s [E]_0 / v_c, \quad (5)$$

где v_c — контрольная скорость гидролиза субстрата в отсутствие ингибитора.

Полученные константы (табл. 3) свидетельствуют о том, что исследуемые ингибиторы малоспецифичны и связывают все протеиназы примерно с одинаковым средством. Отметим, что значения констант скоростей диссоциации характеризуют изучаемые фермент-ингибиторные комплексы как комплексы средней стабильности, равновесие в которых может быть смещено, например, под действием субстрата. Сравнивая кинетические и равновесные константы взаимодействия высокомолекулярных изоингибиторов 3-II и 5-II с сериновыми протеиназами с соответствующими константами для классического соевого ВВИ 2-II, измеренными нами ранее [7, 17], можно сделать вывод, что классический ВВИ — значительно более эффективный ингибитор трипсина, α -химотрипсина и эластазы ($K_i = 0,14, 6,4$ и 2 нМ соответственно), чем высокомолекулярные ингибиторы.

Следует обратить внимание на тот факт, что, по имеющимся в литературе данным [4], только два представителя семейства ВВИ — классический соевый ингибитор ВВИ-A (реактивный центр Leu-Ser) [6] и ингибитор из лимской фасоли

Таблица 3

Константы скоростей ассоциации и диссоциации комплексов высокомолекулярных соевых изоингибиторов типа Баумана — Бирк с сериновыми протеиназами

Протеиназа	3-II			5-II		
	$k_a \cdot 10^{-3}$ М ⁻¹ с ⁻¹	$k_d \cdot 10^4$, с ⁻¹	$K_i \cdot 10^8$, М	$k_a \cdot 10^{-4}$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_d \cdot 10^4$, с ⁻¹	$K_i \cdot 10^8$, М
Трипсин			2,0 ± 0,4 [7]	5,1 ± 0,7	6,0 ± 1,0	1,2 ± 0,2
Химотрипсин	2,8 ± 0,4	0,6 ± 0,1	2,1 ± 0,3	0,13 ± 0,02	3,9 ± 0,6	30,0 ± 5,0
Эластаза	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,4	11,0 ± 2,0 [7]	1,0 ± 0,2	14,0 ± 2,0	14,0 ± 2,0
Катепсин G			8,0 ± 1,5 [7]			

LBI-IV (реактивный центр Leu-Ser) [26] — способны ингибировать как эластазу, так и катепсин G гранулоцитов человека. Кроме того, известно, что эластазу (но не катепсин G) ингибируют соевый ингибитор SBI-C-II (Ala-Ser) [8], ингибиторы из фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) GBI-II (Ala-Ser) [27] и бараньего нута (*Cicer arietinum* L.) CI (Tyr-X) [28]. В этой связи способность выделенных здесь и в работе [7] высокомолекулярных, богатых глицином соевых ВВИ связывать лейкоцитарные эластазу и катепсин G человека довольно нетривиальна.

Экспериментальная часть

Соевые изоингибиторы типа Баумана — Бирк выделяли из коммерческой соевой муки по модифицированному методу [18].

В работе использованы трипсин (КФ 3.4.21.4; Spofa, Чехия) с содержанием активных центров 57% [29]; α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1; Олайне, Латвия; очищен гель-фильтрацией на ToyoPearl HW-50, содержание активных центров 75% [30]), трис-HCl (Олайнский завод химреактивов, Латвия); сефадекс G-15 и «низкомолекулярные» маркеры для электрофореза (Pharmacia, Швеция); Bz-Arg-OEt, Bz-Tyr-OEt, MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, α -антитрипсин (содержание активного белка 49,5%, определено титрованием трипсином с известным содержанием активных центров), HEPES, DMSO, SDS, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), акриламид, N, N'-метиленбисакриламид (Sigma, США); DEAE-ToyoPearl 650 M, HW-50 (Toyosoda MFG, Япония); CM-целлюлоза CM-32 (Whatman, Великобритания); тритон X-100 (Serva, Германия); кумасси G-250 (Reanal, Венгрия). Соли, использованные в работе, имели марку х. ч.

Молекулярную массу белков определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS по методу Лэммли [31]. Фиксацию осуществляли 25% раствором изопропанола, содержащим 10% уксусную кислоту. Гели окрашивали свежеприготовленным 0,2% раствором кумасси G-250 в 7% уксусной кислоте в течение 1 ч, затем промывали 7% уксусной кислотой.

Аминокислотный анализ белков выполнен на анализаторе KLA-3 (Hitachi, Япония); гидролиз в 6 н. HCl проводили 24 ч в запаянных и вакуумированных ампулах. Содержание цистеиновой кислоты определяли после окисления белка надмуравьиной кислотой.

Концентрацию белка измеряли по методу Лоури [32].

pI определяли методом изоэлектрофокусирования в присутствии полиамфолинов на приборе фирмы Bio-Rad (США). Полиамфолины отделяли гель-фильтрацией на колонке Esopo-Pac 10DG (Bio-Rad, США).

Капиллярный электрофорез проводили при pH 8,3 на приборе HPE-10 (Bio-Rad, США).

Обращенно-фазовую гидрофобную ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе (Du Pont, Франция) на колонке Zorbax C8 (Du Pont, Франция) в системе ацетонитрил — вода при скорости элюирования 1 мл/мин.

О наличии ингибиторов в хроматографических фракциях судили по подавлению амидазной активности эластазы (КФ 3.4.21.11), используя в качестве субстрата MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA [33]. Концентрацию исходного раствора эластазы определяли тремя независимыми способами: по скорости гидролиза субстрата ($k_{кат}$ и K_m равны 10 с^{-1} и $0,55 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ [34]); титрованием α -антитрипсином; титрованием ВВИ-А с известной активностью.

Для определения ингибирующей активности смесь фермент—ингибитор инкубировали 15 мин в рабочем буфере (0,1 М HEPES, pH 7,5, содержащий 0,5 М NaCl и 0,005% тритон X-100). Реакцию начинали добавлением раствора субстрата ($3,2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ в DMSO). Регистрировали изменения оптического поглощения во времени при 410 нм на спектрофотометре UV-265 FW (Shimadzu, Япония).

Содержание активного белка в лиофилизированных препаратах ингибитора оп-

ределяли титрованием трипсином с известным содержанием активных центров. Для кинетических измерений использованы препараты соевых ВВИ с содержанием активных ингибиторов 100% по белку.

Авторы выражают благодарность Т. В. Тихоновой за предоставление очищенного препарата эластазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kunitz M.//Science. 1945. V. 101. P. 668—669.
2. Bowman D.//Proc. Soc. Exp. Biol. 1946. V. 63. № 3. P. 547—550.
3. Birk Y.//Meth. Enzymol. 1976. V. 45. P. 696—716.
4. Ларионова Н. И., Гладышева И. П.//Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1990. № 8. С. 20—80.
5. Birk Y., Gertler A., Khalef S.//Biochem. J. 1963. V. 87. № 2. P. 281—284.
6. Odani S., Ikenaka T.//J. Biochem. 1972. V. 71. № 5. P. 839—848.
7. Ларионова Н. И., Гладышева И. П., Тихонова Т. В., Казанская Н. Ф.//Биохимия. 1993. Т. 58. № 9. С. 1439—1446.
8. Odani S., Ikenaka T.//J. Biochem. 1977. V. 82. № 6. P. 1523—1531.
9. Hwang D. L. R., Yang W. K., Foard D. E.//Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 495. № 2. P. 369—382.
10. Foard D., Gutay P., Ladin B., Beachy R., Larkins B.//Plant. Mol. Biol. 1982. V. 1. P. 127—143.
11. Stahlhut R., Hymowitz T.//Crop. Sci. 1983. V. 23. P. 766—769.
12. Tan-Wilson A. L., Cosgriff S., Duggan M., Obach R., Wilson K. A.//J. Agric. Food Chem. 1985. V. 33. № 3. P. 389—393.
13. Tan-Wilson A. L., Chen J., Duggan M., Chapman C., Obach R., Wilson K. A.//J. Agric. Food Chem. 1987. V. 35. N 6. P. 974—981.
14. Tan-Wilson A. L., Wilson K. A.//Phytochemistry. 1982. V. 21. № 7. P. 1547—1553.
15. Tan-Wilson A. L., Right B., Wilson K. A.//J. Plant Physiol. 1982. V. 70. P. 493—498.
16. Larionova N. I., Vartanov S. S., Sorochinskaya E. A., Malitskaya E. A., Sorokina N. V., Gladysheva I. P.//Russian Biochem. and Biotechnol. Express. 1991. V. 1. № 1. P. 27—33.
17. Larionova N. I., Gladysheva I. P., Tikhonova T. V.//Proceeding of the International Conference «Modern Enzymology Problems and Trends». Nova Science Publisher, 1993. In press.
18. Odani S., Ikenaka T.//J. Biochem. 1977. V. 82. № 6. P. 1513—1522.
19. Sessa D., Glantous P.//J. Amer. Oil Chem. Soc. 1987. V. 64. P. 1682—1687.
20. Norioka N., Hara S., Ikenaka T., Abe I.//Agric. Biol. Chem. 1988. V. 52. № 5. P. 1245—1252.
21. Нортрон Д., Кунитц М., Херриот Р. Кристаллические ферменты. М.: Изд-во иностр. лит., 1950. С. 148—156.
22. Koide T., Ikenaka T.//Eur. J. Biochem. 1973. V. 32. P. 417—431.
23. Morrison J. F., Walsh C. T.//Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol. V. 61/Ed. A. Meister. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: Intersci. Publ., 1988. P. 201—301.
24. Luthy J. A., Praissman M., Finkenstadt W. P., Laskowski M., Jr.//J. Biol. Chem. 1978. V. 248. № 9. P. 1760—1771.
25. Levillers N., Peron-Renner M., Pudles J.//Bayer-Symposium V «Proteinase Inhibitors». B.: Springer-Verlag, 1974. P. 432—444.
26. Fritz H., Schissler H., Geiger R.//Agents and Actions. 1978. V. 8. P. 757—764.
27. Schmidtson M.//Phytochemistry. 1977. V. 16. P. 159—169.
28. Smirnov P., Khalef S., Birk Y., Appelbaum S. W.//Biochem. J. 1976. V. 157. P. 745—751.
29. Chase T., Shaw E.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1967. V. 29. P. 508—514.
30. Shonbaum J., Zerner B., Bender M.//J. Biol. Chem. 1961. V. 236. P. 2930—2935.
31. Laemmli U. K.//Nature. 1970. V. 227. P. 680—685.
32. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.//J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265—275.
33. Bieth J. G.//Regulation of Matrix Accumulation/Ed. R. P. Mecham. N. Y.: Acad. Press, 1986. P. 217—320.
34. Stein R. L., Strimpler A. M., Hori H., Powers J. C.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 1301—1305.

Поступила в редакцию
2.VII.1993

I. P. Gladysheva, T. Z. Sharafutdinov, N. I. Larionova

**HIGH MOLECULAR MASS BOWMAN — BIRK SOYABEAN
ISOINHIBITORS: ISOLATION, CHARACTERIZATION
AND KINETICS OF THEIR INTERACTION WITH PROTEINASES**

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Multiple forms of Bowman — Birk soyabean inhibitor have for the first time been isolated from commercial soya flour and purified to homogeneity. Amino acid compositions and isoelectric points of the inhibitors were determined. The isolated inhibitors are shown to be related to classic (M 8000 Da, 2-II) and high molecular mass glycine-rich (M 17 000 Da, 3-II, 5-II) Bowman — Birk inhibitors. The inhibitor (2-II) was found to have two reactive sites and bind trypsin at one centre and α -chymotrypsin, cathepsin G and human leukocyte elastase at the other. Rate constants of the complex formation (k_a) and complex dissociation (k_d) were determined by following the kinetics of approaching to the steady state in a system including the enzyme, the substrate and various concentrations of the inhibitor.