

НЕЙТРАЛЬНЫЕ ПРОТЕАЗЫ РЖИ

А. Ж. ТЕР-МОВСЕСЯН, М. П. ПОПОВ, Е. Д. КАЗАҚОВ

Ключевые слова: рожь, протеазы, активаторы, ингибиторы.

Наличие протеолитических ферментов в зерне ржи было показано еще в начале нашего столетия Бокорним и Брэшни. Позднее Благовещенский и Юргенсон [1] провели специальные исследования, посвященные протеолитическим ферментам зерна ржи. Однако до настоящего времени эти ферменты, выполняющие существенную роль в процессе прорастания, а также приготовления ржаного хлеба, остаются недостаточно изученными. Установлено лишь наличие в водном экстракте зерновок ржи протеиназы, активируемой различными сульфгидрильными соединениями [4, 6, 7], а также дипептидазы [5].

Целью данной работы явились разработка методов извлечения протеолитических ферментов из сортового зерна ржи и их характеристика.

Материал и методика. Объектом исследований было сортовое зерно ржи урожая 1978 и 1979 гг. Активность протеаз определяли методом Ансона [3] по начальной скорости реакции и выражали ее в единицах прибора.

В качестве субстрата использовали бычий сывороточный альбумин Олайнского завода. Измельченное зерно ржи экстрагировали водой и раствором соды в соотношении 1:5 при интенсивном перемешивании на мешалке с гибким приводом в течение 3 мин. В вытяжках определяли активность протеаз при разных значениях рН. В водных вытяжках была зарегистрирована небольшая протеолитическая активность (0,040—0,050) с оптимумом рН 3,0. Оптимум рН протеолитических ферментов содовой вытяжки находится вблизи нейтральной зоны при рН 6,75.

Активность протеаз, действующих в нейтральной зоне рН, в несколько раз выше, чем в кислых (0,150—0,160). В дальнейшем мы исследовали нейтральные протеазы зерна ржи, поскольку, обладая высокой активностью, они в наибольшей степени могут определять интенсивность протеолиза запасных белков при прорастании, а также в технологии хлебопечения.

Результаты и обсуждение. По современной номенклатуре, протеолитические ферменты подразделяются на несколько типов, из которых наиболее изучены тиоловые и сериновые. Для установления принадлежности нейтральных протеаз зерна ржи к тому или иному типу мы исследовали их взаимодействие с различными активаторами и ингибиторами. На рис. 1 приведены данные о влиянии цистеина на нейтральные

протеазы ржи и папаин. При концентрации цистеина в инкубационной среде 0,15% активность папаина возрастает на 70, а нейтральных протеаз ржи—на 30%. Таким образом, нейтральные протеазы, по-видимому, можно отнести к тиоловым ферментам.

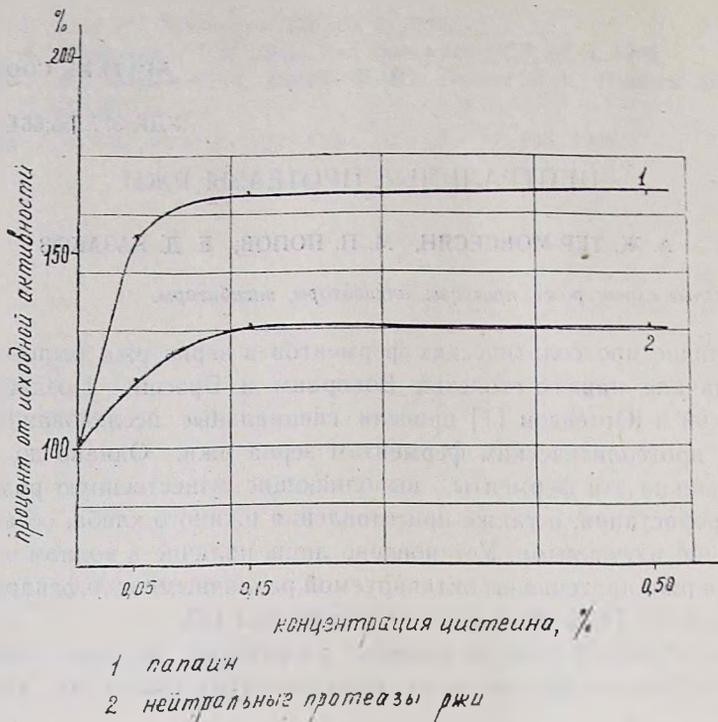


Рис. 1. Влияние цистеина на активность нейтральных протеаз ржи и папаина, 1—папаин, 2—нейтральные протеазы ржи.

Специфичный ингибитор сериновых протеаз PMSF (фенилметилсульфонилфлуорид) в концентрации, полностью подавляющей действие трипсина, не ингибирует протеазы ржи (рис. 2). Аналогичные данные получены в опытах, в которых в инкубационную среду вносили ингибитор трипсина белковой природы, выделенный из семян сои (ингибитор Кунитца).

Следовательно, эти ферменты не являются сериновыми протеазами. Установлено также, что этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) также не подавляет активность этих ферментов, и, следовательно, их нельзя отнести и к металлоэнзимам.

По данным литературы, некоторые аминокислоты ингибируют протеолитические ферменты растительного происхождения. В ранее проведенных работах было показано, что ароматические аминокислоты тирозин и триптофан ингибируют нейтральные протеазы пшеницы. Мы проверили действие этих аминокислот на ферменты зерна ржи. Оказалось, что они подавляют активность протеаз ржи, причем у триптофана ингибирующее действие выражено сильно. При концентрации

его $0,1 \cdot 10^{-6}$ моль в инкубационной среде происходит полное подавление активности протеаз, в то время как для тирозина необходимо $5,0 \cdot 10^{-6}$ моль, т. е. в 50 раз больше.

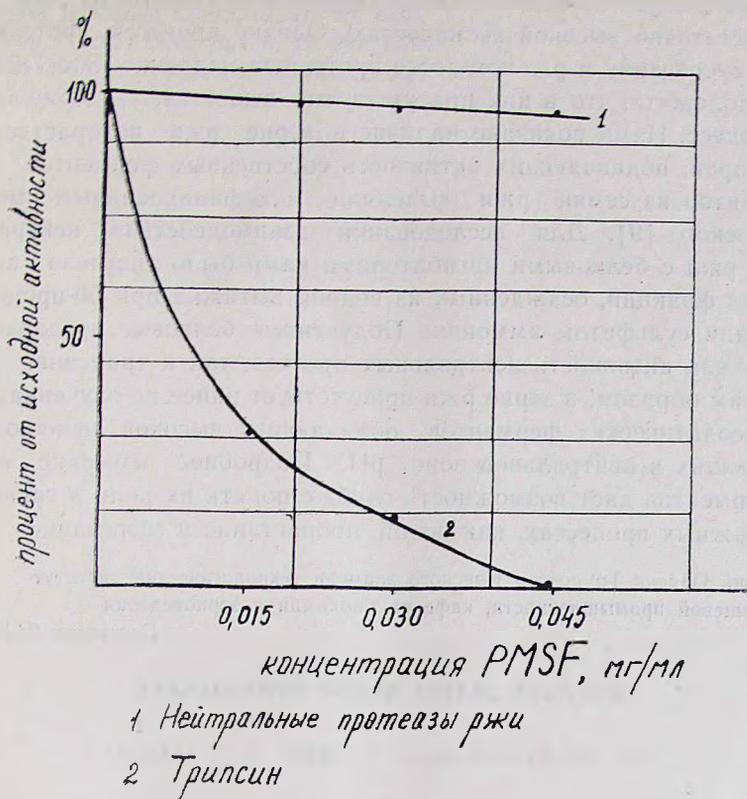


Рис. 2. Действие PMSF на активность нейтральных протеаз ржи и трипсина. 1—нейтральные протеазы ржи, 2—трипсин.

Таблица
Влияние ЭДТА на активность нейтральных протеаз ржи

Концентрация ЭДТА, моль 10^{-6}	Активность протеаз, % от начальной	Концентрация ЭДТА, моль 10^{-6}	Активность протеаз, % от начальной
0	100	0,6	95,2
0,2	97,6	0,8	90,5
0,4	95,2	1	90,5

Роль ингибиторов в физиологических и обменных процессах растительных организмов до сих пор остается малоизученной. Природные ингибиторы протеаз представляют собой специфические белки, способные образовать с ферментами устойчивые комплексы, лишенные ферментативной активности [2].

Из семян растений выделены белковые ингибиторы трипсина и химотрипсина—протеаз животного происхождения. В то же время взаимодействие этих ингибиторов с собственными протеазами не изучено. Как следует из наших данных, нейтральные протеазы ржи обладают достаточно высокой активностью. Однако процессы протеолиза в мучных суспензиях и ржаном тесте протекают медленно. Это позволяет предположить, что в них присутствуют вещества, задерживающие этот процесс. Нами показано наличие в зерне ржи водорастворимых ингибиторов, подавляющих активность собственных ферментов.

Ингибитор из семян ржи выделяли модифицированным методом Поляновского [9]. Для исследования взаимодействия нейтральных протеаз ржи с белковыми ингибиторами нами было изучено влияние белковых фракций, осажденных из водной вытяжки при 50-процентном насыщении сульфатом аммония. Полученные белковые препараты подавляли как активность нейтральных протеаз, так и трипсина.

Таким образом, в зерне ржи присутствует ранее не изученная группа протеолитических ферментов, обладающих высокой активностью и действующих в нейтральной зоне рН. Подробное изучение свойств этих ферментов даст возможность глубже понять их роль в таких жизненно важных процессах, как покой, прорастание и созревание.

Московский Орден Трудового Красного знамени технологический институт пищевой промышленности, кафедра биохимии и зерноводения

Поступило 24.II 1981 г.

ԱՇՈՐԱՅԻ ՀԱՏԻԿԻ ՉԵԶՈՔ ՊՐՈՏԵԱԶՆԵՐԸ

Հ. Ժ. ՏՆՐ-ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ, Տ. Պ. ՊՈՊՈՎ, Ե. Դ. ԿԱԶԱԿՈՎ

Ուսումնասիրվել է աշորայի հատիկի պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների ակտիվությունը՝ կախված տարբեր ակտիվացուցիչների և արգելակիչների առկայությունից: Պրոտեազների գործունեության համար բարենպաստ pH-ը 6,75 է:

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ ցիստեինի առկայությամբ շեղոր պրոտեազների ակտիվությունը բարձրանում է 30 %: Պարզված է, որ սերինային պրոտեազների սպեցիֆիկ արգելակիչները (PMSF և Կունիտցիլի) կոնցենտրատներում լրիվ ճնշում են տրիպտիկ գործունեությունը, սակայն բոլորովին չեն ազդում պրոտեազների ակտիվության վրա: Պրոտեազների ակտիվությունը չի ճնշվում ՅՃԿԱ-ի առկայությունից, բայց արգելակվում է արոմատիկ ամինաթթուներից՝ թիրոզինից և տրիպտոֆանից: Աշորայի հատիկում շրալուծ արգելակիչները ճնշում են սեփական ֆերմենտների ակտիվությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Благовещеский А. В., Юргенсон М. В. Бюлл. экспер. биологии и медицины, 2, 1, 76, 1936.
2. Мосолов В. В. Растительные белки и их биосинтез, 172—184, М., 1975.

3. Anson M. L. A. Gen. Physiol., 22, 79, 1933.
4. Balls A. K., Huls W. S. Cereal Chem., 15, 622—628, 1938.
5. Engel G., Helms J. Biochim Biophys. Acta, 1, 190—196, 1947.
6. Jorgensen H. Biochem., 250, 1, 37, 1935.
7. Jorgensen H. Cereal Chem, 16, 51—60, 1939.
8. Northrop J. H. J. Gen. Physiol, 19, 991, 1936.
9. Polanowski A. Acta Biochim. polon., 14, 389, 1967.