

Протеолитические ферменты и их белковые ингибиторы из зерна тритикале

Витол Ирина Сергеевна

*кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник
ВНИИЗ – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
Адрес: 127434, город Москва, Дмитровское шоссе, 11
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»
Адрес: 125080, город Москва, Волоколамское шоссе, д. 11
E-mail: vitolis@yandex.ru*

Мелешкина Елена Павловна

*доктор технических наук, директор
ВНИИЗ – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
127434, г. Москва, Дмитровское шоссе, 11
E-mail: mep5@mail.ru*

Известно, что протеолитические ферменты играют значительную роль в различных физиологических процессах: деградации запасных белков, в посттрансляционном процессинге белков, активации неактивных предшественников физиологически активных белков и пептидов, участвуют в процессах секреции, транспорта, адаптации клеточного метаболизма к изменениям внешней среды, в осуществлении защитных функций. Наряду с причинами физиологического характера интерес к протеолитическим ферментам обусловлен еще и тем, что они являются удобным объектом для изучения структуры белков, активных центров ферментов, механизмов регуляции ферментативной активности, других важных вопросов энзимологии и белковой химии. С практической точки зрения интерес к протеолитическим ферментам связан с их непосредственным участием в процессах, протекающих при хранении и переработке растительного сырья, а также применением препаратов протеаз в различных отраслях: сельском хозяйстве, пищевой промышленности, медицине. На современном этапе приоритетами любой пищевой технологии является сохранение нативных свойств биологически ценных компонентов сырья, обладающих лечебно-профилактическими свойствами, и модификация пищевого сырья, в том числе и растительного, с целью получения компонентов с определенными технологическими и функциональными свойствами. В настоящее время наибольшее распространение получили методы ферментативной модификации зернового сырья с использованием микробных ферментных препаратов протеолитического и целлюлолитического действия. В то же время исследование собственных протеолитических ферментов, их выделение и очистка, с целью их применения для модификации эндогенных белков, к которым они проявляют наибольшее сродство, представляется весьма интересной задачей, в плане использования всего биопотенциала зерна и «экологичности» получаемых продуктов. Такое исследование неразрывно сопряжено с изучением белковых ингибиторов протеиназ, которые традиционно рассматривались лишь как антиалиментарные компоненты сырья и пищевых продуктов, но представляют исключительный интерес как фактор регуляции процесса протеолиза, не только *in vivo*, но и *in vitro*. В статье приведены экспериментальные данные по выделению, частичной очистке и характеристике протеолитических ферментов зерна тритикале, действующих в кислой нейтральной и щелочной областях pH. Показано, что кислые и нейтральные протеиназы зерна тритикале являются ферментами тиолового типа, поскольку активируются цистеином и ингибируются п-хлормеркурий бензоатом – специфическим ингибитором тиоловых ферментов. Щелочные протеиназы относятся к сериновым протеиназам, поскольку ингибируются специфическими ингибиторами сериновых ферментов – диизопропил-фторфосфатом и фенолметилсульфонилфторидом. Методом гель-хроматографии определена молекулярная масса протеиназ зерна тритикале: кислые – 75000 Да, нейтральные – 250000 Да, щелочные – 50000 Да. Предложена схема выделения и очистки белковых ингибиторов эндогенных протеиназ из зерна тритикале. Показана их способность подавлять активность собственных протеиназ и трипсина. Методом гель-хроматографии проведено разделение ингибиторов трипсина и щелочных протеиназ тритикале (с молекулярной массой 30000 ÷ 35000 Да) и ингибиторов кислых и нейтральных протеиназ тритикале (с молекулярной массой 15000 ÷ 20000 Да). Частично очищенные препараты протеиназ и их белковых ингибиторов, полученные по предложенным схемам в дальнейшем могут быть использованы для ферментативной модификации растительных белков и регуляции процессов протеолиза в различных пищевых технологиях, использующих зерновое сырье.

Ключевые слова: зерно тритикале, протеолитические ферменты, белковые ингибиторы, выделение, очистка, гель-хроматография

Протеолитические ферменты играют значительную роль в различных физиологических процессах. Ключевая роль протеиназ проявляется не только в процессах деградации запасных белков, удалении “неправильных” белков, образующихся в результате мутаций и ошибок биосинтеза, но и участии в посттрансляционном процессинге белков, активации неактивных предшественников физиологически активных белков и пептидов, что свидетельствует о том, что протеиназы во многих случаях являются “пусковыми механизмами” ряда каскадных процессов и выполняют различные регуляторные функции. В настоящее время установлено, что протеолитические ферменты участвуют в процессах секреции, транспорта белковых веществ через биологические мембраны, адаптации клеточного метаболизма к изменениям внешней среды, в осуществлении защитных функций (Браудо, Даниленко, Дианова, Кроха, 2000; Мосолов, 1983).

Наряду с причинами физиологического характера интерес к протеолитическим ферментам обусловлен еще и тем, что они являются удобным объектом для изучения структуры белков, активных центров ферментов, механизмов регуляции ферментативной активности, других важных вопросов энзимологии и белковой химии. С практической точки зрения интерес к протеолитическим ферментам связан с их непосредственным участием в процессах, протекающих при хранении и переработки растительного сырья, а также применением препаратов протеаз в различных отраслях: сельском хозяйстве, пищевой промышленности, медицине.

На современном этапе развития наших представлений о роли пищи как фактора профилактики и лечения различных хронических заболеваний многочисленные открытия в пищевых продуктах веществ, обладающих профилактическими и лечебными свойствами (нутрицевтики), предопределили пересмотр приоритетов в пищевой технологии: если традиционно основной целью питания считалось удовлетворение потребностей человека в макро- и микронутриентах, то сегодня наряду с этим пищевые технологии должны ориентироваться на сохранение нативных свойств биологически ценных компонентов, в том числе и из растительного сырья, обладающих лечебно-профилактическими свойствами.

Все это в полной мере относится к технологиям получения белковых продуктов (концентратов и

изолятов), которые не во всем отвечают указанной цели. Очевидно, что задача освобождения растительного сырья от нежелательных компонентов и обеспечения определенных функциональных свойств получаемых белковых продуктов сохраняет свою актуальность, однако необходим компромисс между сохранением пищевой ценности и улучшением функционально-технологических свойств растительных белковых продуктов.

В связи с этим большие возможности по модификации растительного сырья, в том числе зерна и продуктов его переработки, заключены в методах пищевой биотехнологии, которые принято подразделять на три группы: первая предусматривает модификацию сырья под действием микроорганизмов, вторая – использование экзогенных ферментных препаратов, третья – использование собственных ферментов, преимущественно гидролитического действия.

На современном этапе наибольшее распространение получили методы ферментативной модификации зернового сырья с использованием микробных ферментных препаратов протеолитического и целлюлолитического действия. Так, во Всероссийском НИИ зерна и продуктов его переработки – филиале “ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова” РАН разработаны способы ферментативной модификации биополимеров зерна тритикале и продуктов его переработки (отруби), которые позволяют получать продукты с различной степенью гидролиза белка и некрахмальных полисахаридов, обладающих определенными функционально-технологическими свойствами, что в конечном счете позволяет предположить широкий спектр областей их возможного применения – от хлебобулочных и мучных кондитерских изделий до мясных и молочных продуктов, напитков и соков (Витол, Мелешкина, Карпиленко, 2016; Витол, Мелешкина, Карпиленко, 2017; Meleshkina, Pankratov, Vitol, Kandrov, Tulyakov, 2017).

В то же время исследованием собственных протеолитических ферментов, их выделение и очистка с целью использования для модификации эндогенных белков, к которым они проявляют наибольшее сродство, представляется весьма интересной задачей, в плане использования всего биопотенциала зерна и “экологичности” получаемых продуктов. Такое исследование неразрывно сопряжено с изучением белковых

ингибиторов протеиназ, которые традиционно рассматривались лишь как антиалиментарные компоненты сырья и пищевых продуктов, но представляют исключительный интерес как фактор регуляции процесса протеолиза, не только *in vivo*, но и *in vitro*.

Таким образом, ферментативная модификация пищевого сырья, осуществляемая экзогенными ферментными препаратами или эндогенными ферментами может приводить к созданию продуктов с определенными функционально-технологическими свойствами и дополнительными физиологическими активностями, которые каждый раз должны быть предметом специального исследования.

Цель исследования – выделение, очистка и характеристика протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов из зерна тритикале.

Материалы и методы

В работе использовали зерно тритикале урожая 2016 г., предоставленное Донским зональным научно-исследовательским институтом сельского хозяйства.

Содержание растворимого белка определяли по методу Лоури, активность протеаз модифицированным методом Ансона с использованием в качестве субстрата бычьего сывороточного альбумина. Ингибирующую активность определяли по остаточной активности протеиназ (Нечаев, Траубенберг, Кочеткова, Колпакова, Витол, Кобелева, 2006). Фракционирование ферментов и их белковых ингибиторов проводили на колонке (2,3 x 35), заполненной гелем Toyopearl HW-55F, гель этой марки позволяет разделять белки с молекулярной массой от 1000 до 700000 Да. Предварительно колонку откалибровали для определения свободного (V_{св.}) и общего (V_{общ.}) объема колонки. Свободный объем определяли по выходу декстрана синего (молекулярная масса около 2 млн. Да). Он составил 44 мл. Общий объем по выходу тирозина. Он составил 140 мл. Для определения молекулярной массы белков графическим методом колонку маркировали стандартными метчиками с известной молекулярной массой фирмы «Merck» (Германия) (Нечаев, Траубенберг, Кочеткова, Колпакова, Витол, Кобелева, 2006).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ имеющихся в литературе данных по выделению и очистке эндогенных протеаз зерна свидетельствует о том, что пик исследований в этой области пришелся на 70-е – 80-е годы 20-ого века. Работами отечественных и зарубежных исследователей показано наличие протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в покое и прорастающих семенах зерновых (пшеница, ячмень, рожь, тритикале) (Исламов, Хахимжанов, Фурсов, 2004; Исламов, Хахимжанов, Фурсов, 2005; Meleshkina, Pankratov, Vitol, Kandrov, Tulyakov, 2017) и бобовых культур (соя, фасоль, горох, маш, нут) (Асатулов, Карпиленко, Витол, 2008; Мосолов, 1983). Некоторые из них выделены и очищены в достаточно высокой степени, доказана способность эндогенных протеиназ активно гидролизовать собственные белки, оказывать влияние не только на биохимические процессы при созревании и прорастании зерна, но и на процессы, связанные с деградацией белков зерна при его переработке. Выявлена регуляторная роль белковых ингибиторов в процессе протеолиза в покое и при прорастании зерна.

Новый виток интереса к эндогенным протеиназам и их белковым ингибиторам связан, как уже отмечалось выше, с возможностью их использования для ферментативной модификации биополимеров зерна и зернопродуктов.

Работы, проводимые во Всероссийском НИИ зерна и продуктов его переработки, показали, что в зерне тритикале наряду с кислыми протеиназами с оптимумом pH 3,5 присутствуют нейтральные и щелочные протеиназы с оптимумами pH 6,8 и 9,5 соответственно при гидролизе стандартного субстрата бычьего сывороточного альбумина (Витол, Кандроков, Стариценков, Коваль, Жильцова, 2015). Кроме того, выявлено, что активность кислых и нейтральных протеиназ в большей степени связана с белками, сосредоточенными в периферийных частях зерновки, очевидно, с белками алейронового слоя (Витол, Кандроков, Стариценков, Коваль, Жильцова, 2015).

Схема выделения эндогенных протеаз в виде комплексного препарата включала следующие стадии:

- Зерно тритикале подвергалось измельчению. К измельченному материалу (100% проход сита

с диаметром 1 мм) добавляли 0,35% раствор Na_2CO_3 , в соотношении 1:10. Экстракцию проводили при интенсивном перемешивании на мешалке с гибким приводом при 4000 об/мин в течение 5 мин.

- Полученную суспензию центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 минут. Осадок отбрасывали, надосадочную жидкость (супернатант) использовали для осаждения ферментов (протеаз).
- Осаждение проводили путем подкисления 5% лимонной кислотой до pH 4,5. Ранее было показано, что при таком значении pH осаждаются все протеолитические ферменты (кислые, нейтральные, щелочные).
- Формирование осадка проводили при температуре 4-6°C в течение 1 часа.
- Полученный осадок отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 минут, замораживали и высушивали из замороженного состояния (лиофильная сушка), что позволило сохранить активность выделяемых ферментов.

На всех этапах выделения активность протеаз определяли модифицированным методом Ансона, в качестве субстрата использовали бычий сывороточный альбумин.

Таблица 1

Очистка кислых, нейтральных и щелочных протеиназ в составе комплексного препарата протеиназ зерна тритикале

№ Стадия очистки	Активность протеаз, ΔA_{280}			Белок, мг/мл	УА* протеаз ΔA_{280} /мг белка			Степень очистки		
	К*	Н*	Щ*		К	Н	Щ	К	Н	Щ
1 Экстракция, 35% Na_2CO_3	0,15	0,25	0,15	0,41	0,37	0,61	0,37	1	1	1
2 Осаждение 5% лимонной кислотой	0,48	0,78	0,64	0,24	2,00	3,25	2,67	5,41	5,32	7,22

* УА – удельная активность, К – кислые, Н – нейтральные, Щ – щелочные протеиназы.

Таблица 2

Характеристика кислых, нейтральных и щелочных протеиназ тритикале

Показатель	Кислые протеиназы (степень очистки 17 раз)	Нейтральные протеиназы (степень очистки 15 раз)	Щелочные протеиназы (степень очистки 27 раз)
Оптимум pH	3,5	6,8	9,5
Влияние цистеина, 2,0 мг/мл	активирует на 80%	активирует на 100%	активирует на 30%
Влияние п-ХМБ, 1,0 мг/мл	ингибирует на 100%	ингибирует на 100%	ингибирует на 40%
Влияние ДФФ, 0,54 мМ	не ингибирует	не ингибирует	ингибирует на 100%
Влияние ФМСФ, 1,82 мМ	не ингибирует	не ингибирует	ингибирует на 100%
Влияние ингибитора Кунитца из сои, 0,8 мг/мл	не ингибирует	не ингибирует	ингибирует на 100%
Влияние ЭДТА, от 2,0 до 8,0 мМ	не влияет	не влияет	не влияет
Молекулярная масса, Дальтон	75 000	250 000	50 000

В Таблице 1 приведены данные по содержанию белка, активности и степени их очистки на разных стадиях.

Данные Таблицы 1 показывают, что при осаждении нейтральных и кислых протеиназ подкислением происходит их очистка примерно в 5 – 5,5 раз.

Использование метода фракционирования белков, основанное на различиях в физико-химических свойствах отдельных белков, в частности метода гель-хроматографии на колонке с Toyopearl gel HW-55F, позволило разделить кислые, нейтральные и щелочные протеиназы зерна тритикале и определить их молекулярную массу в составе комплексного препарата. Для этого на колонку, заполненную гелем Toyopearl gel HW-55F, наносили 5 мл комплексного препарата протеиназ, перерастворенного в 0,35%-ном растворе Na_2CO_3 и сконцентрированного в 10 раз. Объем собираемых фракций составлял 4 мл. Регистрацию оптической плотности элюата во фракциях осуществляли при длине волны 280 нм на спектрофотометре. Профили элюции и активность протеиназ представлены на Рисунке 1.

По результатам гель-хроматографии молекулярная масса кислых протеиназ – 75000 Да, нейтральных протеиназ – 250000 Да, щелочных – 50000 Да. При этом степень очистки составила соответственно 17,03; 15,03 и 27,03 раз.

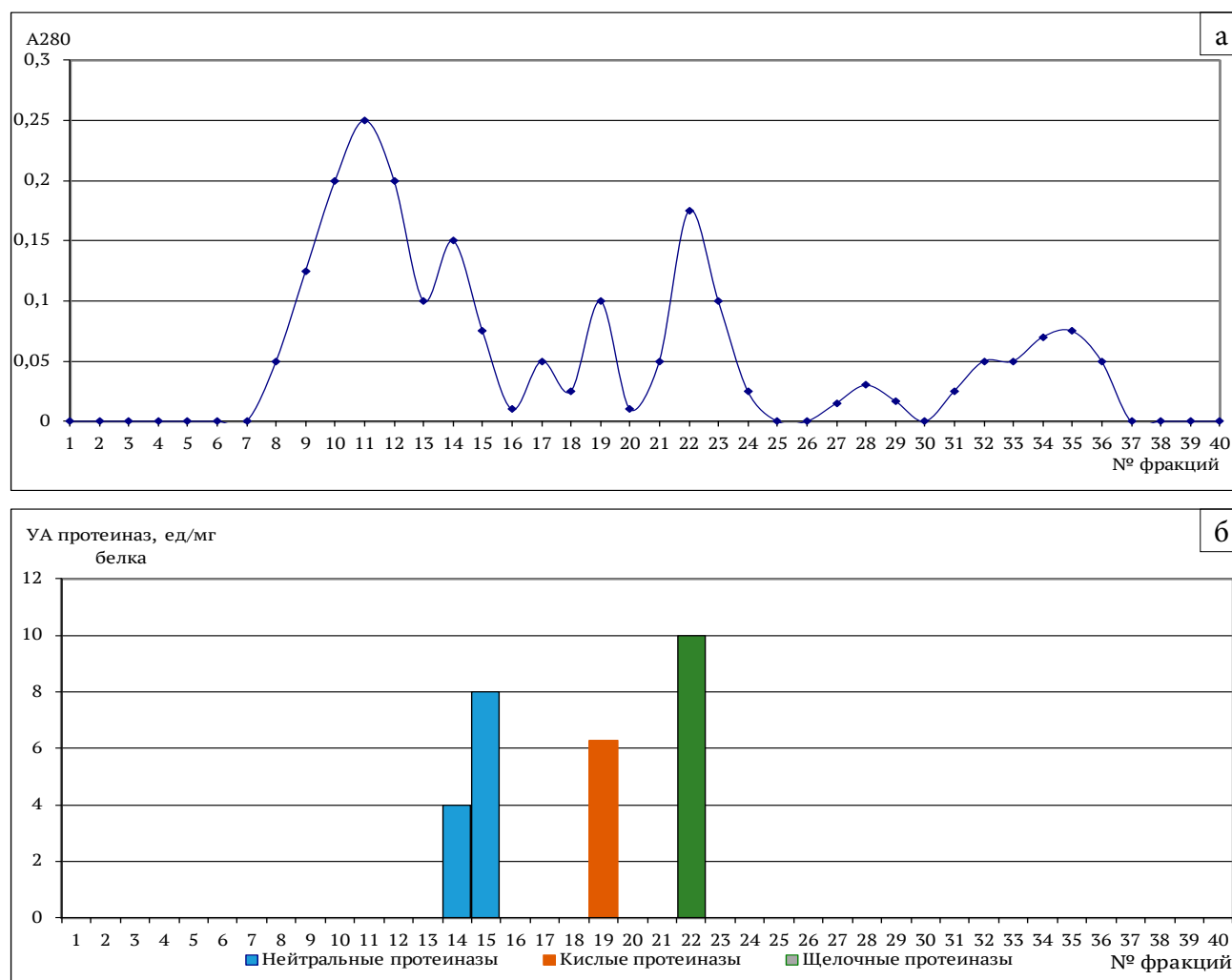


Рисунок 1. Фракционирование комплексного препарата протеиназ из зерна тритикале методом гель-хроматографии на колонке с Toyopearl gel HW-55F.

(а) – профиль элюции; (б) – активность протеиназ

Результаты исследований по характеристике очищенных препаратов протеаз из зерна тритикале суммированы в Таблице 2. Они свидетельствуют о том, что кислые и нейтральные протеиназы тритикале следует отнести к ферментам тиолового типа, поскольку они активируются цистеином и ингибируются п-хлормеркурийбензоатом (п-ХМБ) – специфическим ингибитором тиоловых ферментов; а щелочные протеиназы – к сериновым ферментам, поскольку они ингибируются специфическими ингибиторами сериновых ферментов – диизопропилфторфосфатом (ДФФ) и фенилметилсульфонилфторидом (ФМСФ). При этом их нельзя отнести к металлозависимым ферментам, так как этиленаминтетраацетат (ЭДТА) не оказывает влияния на их активность.

На следующем этапе работы проводили выделение и частичную очистку белковых ингибиторов эндогенных протеиназ из зерна тритикале. При

разработке схемы выделения ингибиторов мы ориентировались на данные отечественных исследователей о том, что в надосадочной жидкости после экстракции водой из зерна пшеницы, ржи, сои, фасоли и осаждения протеаз при подкислении остаются белковые ингибиторы, подавляющие активность собственных протеолитических ферментов и активность трипсина (Мосолов, 1983). Аналогичные результаты были получены нами при изучении взаимодействия ингибиторов, выделенных подкислением в интервале pH от 4,5 до 3,0 с протеиназами тритикале и трипсина (Рис. 2).

При этом степень очистки белковых ингибиторов кислых и нейтральных протеиназ составила 26,6 раз; щелочных протеиназ – 25,0 раз; трипсина – 21,9 раз.

Выделенные таким образом белковые ингибиторы

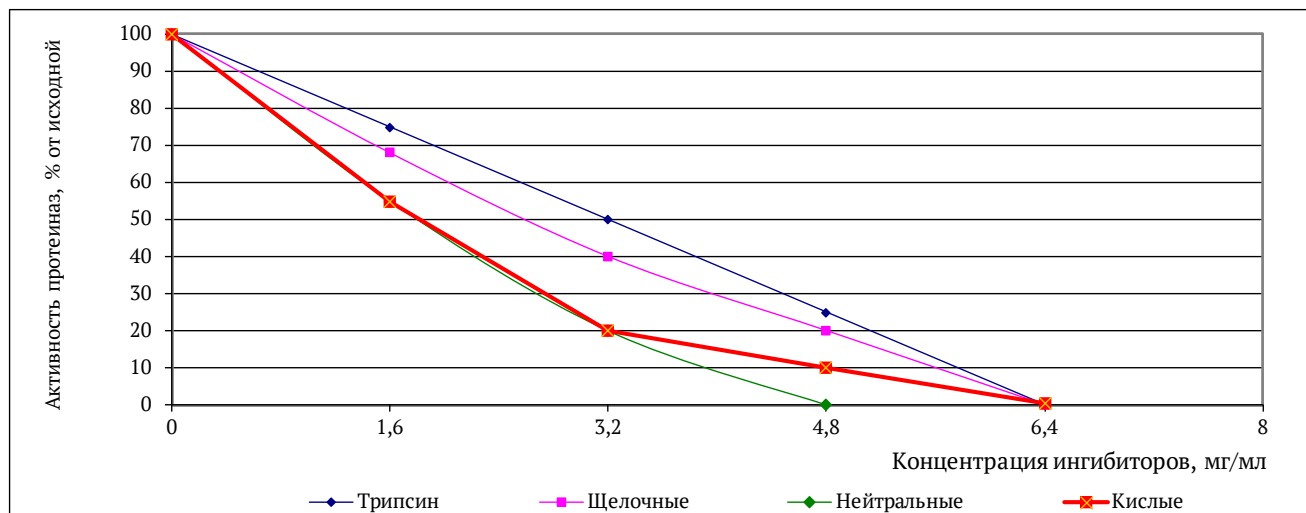


Рисунок 2. Влияние ингибиторов, выделенных при подкислении в интервале pH от 4,5 до 3,0, на протеиназы тритикале и трипсина.

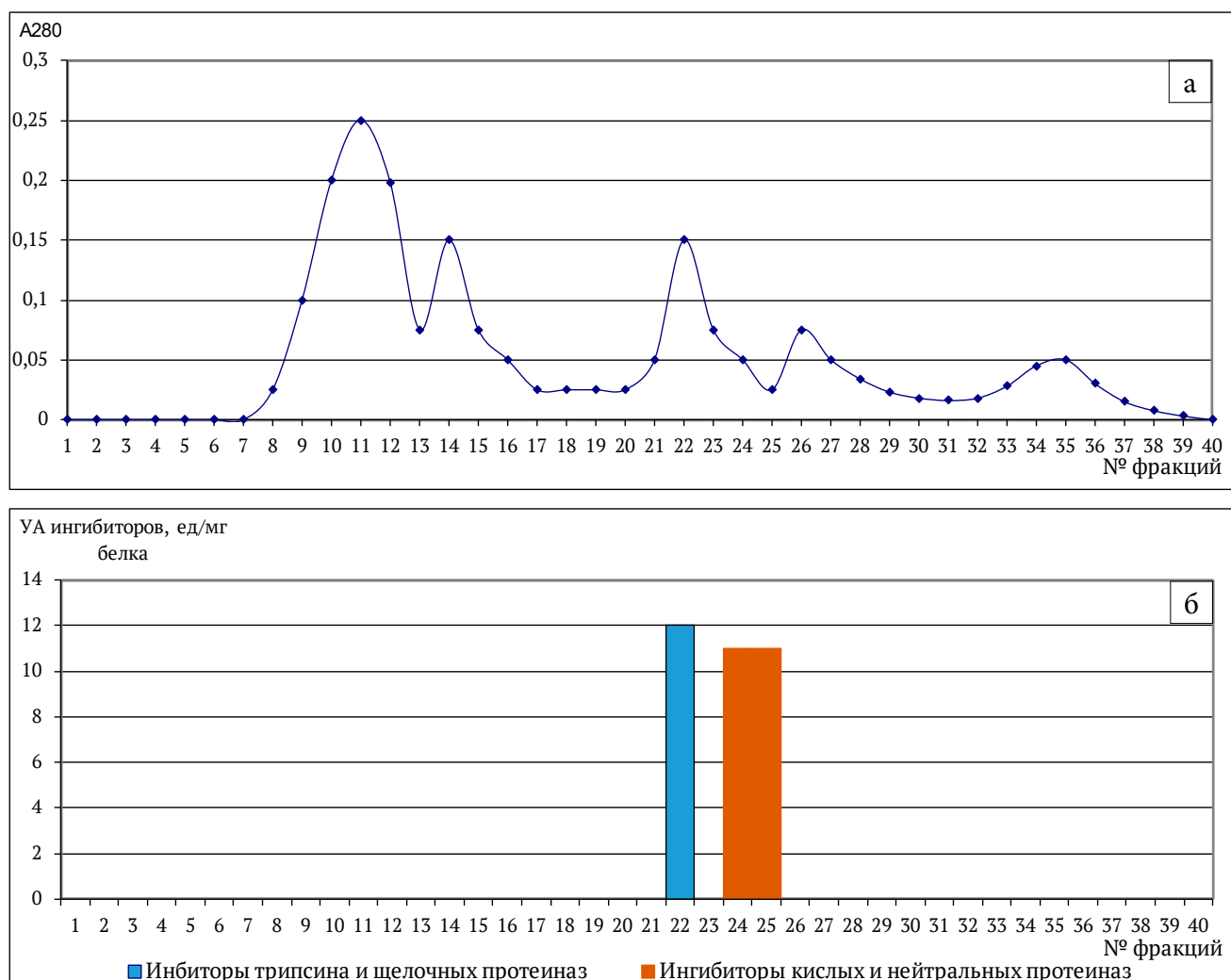


Рисунок 3. Фракционирование белковых ингибиторов из зерна тритикале методом гель-хроматографии на колонке с Toyopearl gel HW-55F.

(а) – профиль элюции; (б) – ингибирующая активность

фракционировали на колонке с Toyopearl gel HW-55F. Полученные фракции анализировали на ингибирующую активность по отношению к собственным протеиназам и трипсину (Рис. 3).

Полученные данные показывают, что ингибитор трипсина и ингибитор щелочных протеиназ выходят в одной фракции с объемом элюции 88 мл и имеет молекулярную массу $30000 \div 35000$ Да. Ингибиторы кислых и нейтральных протеиназ по данным метода гель-хроматографии, выходят с колонки с объемом элюции 96-100 мл и имеют молекулярную массу $15000 \div 20000$ Да. Это является дополнительным косвенным подтверждением того, что ферменты, относящиеся к одному типу (трипсин и щелочные протеиназы тритикале – сериновые ферменты; кислые и нейтральные протеиназы тритикале – тиоловые ферменты) специфически ингибируются различными ингибиторами по конкурентному механизму ингибирования, то есть в образовании комплекса фермент-ингибитор участвуют активные центры изучаемых ферментов и ингибиторов.

На основании проведенных экспериментов разработана схема выделения белковых ингибиторов из зерна тритикале. Она включает следующие этапы:

Экстракция измельченного материала водой в соотношении 1:10 при интенсивном перемешивании на мешалке с гибким приводом при 4000 об/мин в течение 5 мин. Центрифугирование при 6000 об/мин в течение 10 мин.

Подкисление водного экстракта до pH 4,5. Формирование осадка в течение 1 часа при температуре 4-6°C. Центрифугирование при 6000 об/мин в течение 10 мин (осадок – протеиназы; надосадочная жидкость – белковые ингибиторы).

Дальнейшее подкисление надосадочной жидкости до pH 3,0. Формирование осадка в течение 1 часа при температуре 4-6°C. Центрифугирование при 6000 об/мин в течение 10 мин. Перерастворение осадка в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5.

Фракционирование белковых ингибиторов методом гель-хроматографии на колонке с Toyopearl gel HW-55F. Разделение ингибиторов трипсина и щелочной протеиназы тритикале и ингибиторов кислой и нейтральной протеиназ тритикале.

Заключение

В работе представлены экспериментальные данные по выделению, частичной очистке и характеристике протеолитических ферментов зерна тритикале, действующих в кислой нейтральной и щелочной областях pH.

Показано, что кислые и нейтральные протеиназы зерна тритикале являются ферментами тиолового типа, поскольку активируются цистеином и ингибируются п-хлормеркурий бензоатом – специфическим ингибитором тиоловых ферментов. Щелочные протеиназы относятся к сериновым протеиназам, поскольку ингибируются специфическими ингибиторами сериновых ферментов – диизопропилфторфосфатом и фенилметилсульфонилфторидом. Методом гель-хроматографии определена молекулярная масса протеиназ зерна тритикале: кислые – 75000 Да, нейтральные – 250000 Да, щелочные – 50000 Да.

Предложена схема выделения и очистки белковых ингибиторов эндогенных протеиназ из зерна тритикале. Показана их способность подавлять активность собственных протеиназ и трипсина. Методом гель-хроматографии проведено разделение ингибиторов трипсина и щелочных протеиназ тритикале (с молекулярной массой $30000 \div 35000$ Да) и ингибиторов кислых и нейтральных протеиназ тритикале (с молекулярной массой $15000 \div 20000$ Да).

Принимая во внимание все вышеперечисленное, следует отметить, что частично очищенных препараты протеиназ и их белковых ингибиторов, полученные по предложенным схемам в дальнейшем могут быть использованы для ферментативной модификации растительных белков и регуляции процессов протеолиза в различных пищевых технологиях.

Литература

- [1] Асатулов И. А., Карпиленко Г. П., Витол И. С. Белковые ингибиторы протеаз из семян нута // Хлебопродукты. 2008. № 1. С. 58-59.
- [2] Браудо Е. Е., Даниленко А. И., Дианова В. Т., Кроха Н. Г. Альтернативные подходы к получению растительных белковых продуктов / в кн.: Растительный белок: новые

- перспективы (под ред. Е.Е. Браудо). М.: Пищепромиздат, 2000. С. 6-23.
- [3] Витол И. С., Кандроков Р. Х., Стариченков А. А., Коваль А. И., Жильцова Н. С. Белково-протеиназный комплекс зерна тритикале // Хранение и переработка сельхозсырья. 2015. № 8. С. 36-39.
- [4] Витол И. С., Мелешкина Е. П., Карпиленко Г. П. Биоконверсия тритикалевых отрубей с использованием ферментных препаратов целлюлолитического и протеолитического действия // Хранение и переработка сельхозсырья. 2016. № 10. С. 35-38.
- [5] Витол И. С., Мелешкина Е. П., Карпиленко Г. П. Функциональные свойства модифицированных продуктов переработки зерна тритикале // Хранение и переработка сельхозсырья. 2017. № 2. С. 27-29.
- [6] Исламов Р. А., Хакимжанов А. А., Фурсов О. В. Выделение ингибиторов сериновых протеаз и амилаз из зерна пшеницы // Биотехнология. Теория и практика. 2004. № 4. С.117-122.
- [7] Исламов Р. А., Хакимжанов А. А., Фурсов О. В. Ингибитор трипсина из зерна пшеницы, выделенный аффинной хроматографией на трипсин-сефарозе // Биотехнология. Теория и практика. 2005. № 2. С. 71-75.
- [8] Meleshkina E. P., Pankratov G. N., Vitol I. S., Kandrov R. H., Tulyakov D. G. Innovative Trends in the Development of Advanced Triticale Grain Processing Technology // Foods and Raw Materials. 2017. Vol.5. № 2. P. 70-82. DOI: 10.21179/2308-4057-2017-2-70-82.
- [9] Мосолов В. В. Белковые ингибиторы как регуляторы процессов протеолиза. М.: Наука, 1983. 40 с.
- [10] Нечаев А. П., Траубенберг С. Е., Кочеткова А. А., Колпакова В. В., Витол И. С., Кобелева И. Б. Пищевая химия. Лабораторный практикум. СПб.: ГИОРД, 2006. 304 с.

Proteolytic Enzymes and their Protein Inhibitors from Triticale Grain

Irina S. Vitol

*All-Russian Scientific Research Institute of Grain and Products of Its Processing – branch «V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems» of the Russian Academy of Sciences.
11 Dmitrov highway, 11, Moscow, Russia Russian Federation, 127434
Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, Russian Federation, 125080
E-mail: vitolis@yandex.ru*

Elena P. Meleshkina

*All-Russian Scientific Research Institute of Grain and Products of Its Processing – branch «V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems» of the Russian Academy of Sciences.
11 Dmitrov highway, 11, Moscow, Russia Russian Federation, 127434
E-mail: mep5@mail.ru*

It is known, that proteolytic enzymes play a significant role in various physiological processes: the degradation of reserve proteins, the post-translational process of proteins, the activation of inactive precursors of physiologically active proteins and peptides, participate in the processes of secretion, transport, adaptation of cellular metabolism to changes in the environment. Along with the reasons for the physiological character, interest in proteolytic enzymes is also due to the fact that they are a convenient object for studying the structure of proteins, active enzyme centers, mechanisms for the regulation of enzymatic activity, other important issues of enzymology and protein chemistry. From a practical point of view, interest in proteolytic enzymes is associated with their direct participation in processes that take place during the storage and processing of plant raw materials, as well as the use of protease preparations in various sectors: agriculture, food industry, medicine. At the present stage, the priority of any food technology is the preservation of the native properties of biologically valuable components of raw materials that possess therapeutic and prophylactic properties and the modification of food raw materials, including vegetable raw materials, in order to obtain components with certain technological and functional properties. Currently, the most widely used methods of enzymatic modification of grain raw materials using microbial enzyme preparations of proteolytic and cellulolytic action. At the same time, the study of their own proteolytic enzymes, their isolation and purification, with the aim of using them to modify the endogenous proteins to which they show the greatest affinity, seems to be a very interesting task, in terms of using the entire grain biopotential and ecofriendly products. Such a study is inextricably linked with the study of protein protease inhibitors, which have traditionally been considered only as antialimentary components of raw materials and food products, but are of exceptional interest as a factor in the regulation of the proteolysis process, only in vivo, but also in vitro.

The article presents experimental data on the isolation, partial purification and characterization of proteolytic enzymes of triticale grain acting in acidic neutral and alkaline pH regions. It is shown that acid and neutral proteinases of triticale grain are thiol type enzymes, since they are activated by cysteine and is inhibited p-chloromercuribenzoate, a specific inhibitor of thiol enzymes. Alkaline proteinases belong to serine proteinases because they are inhibited by specific inhibitors of serine enzymes: diisopropylfluorophosphate and phenylmethylsulfonyl fluoride. The molecular mass of triticale grain proteinases was determined by gel chromatography: acidic - 75000 Da, neutral - 250000 Da, alkaline - 50000 Da. A scheme is proposed for the isolation and purification of protein inhibitors of endogenous proteinases from triticale grain. Their ability to inhibit the activity of their own proteinases and trypsin is shown. The separation of inhibitors of trypsin and alkaline proteinases with triticale (with a molecular weight of 30000 ÷ 35000 Da) and inhibitors of acidic and neutral proteinases of triticale (molecular weight 15000 ÷ 20000 Da) was carried out by gel chromatography. Partially purified proteinase preparations and their protein inhibitors obtained by the proposed schemes can be used subsequently for enzymatic modification of plant proteins and regulation of proteolysis processes in various food technologies using grain raw materials.

Keywords: triticale grain, proteolytic enzymes, protein inhibitors, isolation, purification, gel chromatography

References

- [1] Asatuloev I. A., Karpilenko G. P., Vitol I. S. Belkovye ingibitory proteaz iz semyan nuta [Protein protease inhibitors from seeds of chickpea]. *Hleboprodukty*, 2008, no. 1, 58-59.
- [2] Braudo E. E., Danilenko A. I., Dianova V. T., Kroha N. G. Alternativnye podhody k polucheniyu rastitelnyh belkovykh produktov [Alternative approaches to obtaining vegetable protein products]. In *Rastitel'nyj belok: novye perspektivy* (ed. by E. E. Braudo). M.: Pishchepromizdat, 2000. S. 6-23.
- [3] Vitol I. S., Kandrov R. H., Starichenkov A. A., Koval A. I., Zhilcova N. S. Belkovo-proteinaznyj kompleks zerna tritikale [Protein-proteinase complex of triticale grain]. *Hranenie i pererabotka sel'hozsyrya*, 2015, no. 8, 36-39.
- [4] Vitol I. S., Meleshkina E. P., Karpilenko G. P. Biokonversiya tritikalevykh otrubej s ispolzovaniem fermentnykh preparatov celljuloliticheskogo i proteoliticheskogo dejstviya [Bioconversion triticale bran using enzymatic preparations cellulolyticus and proteolytic activities]. *Hranenie i pererabotka sel'hozsyrya*, 2016, no. 10, 35-38.
- [5] Vitol I. S., Meleshkina E. P., Karpilenko G. P. Funkcionalnye svoystva modificirovannykh produktov pererabotki zerna tritikale [Functional properties of modified products of grain processing triticale]. *Hranenie i pererabotka sel'hozsyrya*, 2017, no. 2, 27-29.
- [6] Islamov R. A., Hakimzhanov A. A., Fursov O. V. Vydelenie ingibitorov serinovykh proteaz i amilaz iz zerna pshenicy [Isolation of serine protease and amylase inhibitors from wheat grain]. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika*, 2004, no. 4, 117-122.
- [7] Islamov R. A., Hakimzhanov A. A., Fursov O. V. Ingibitor tripsina iz zerna pshenicy, vydelennyy affinnoy hromatografiej na tripsin-sefaroze [Wheat grain trypsin inhibitor isolated by affine chromatography on trypsin-sepharose]. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika*, 2005, no. 2, 71-75.
- [8] Meleshkina E. P., Pankratov G. N., Vitol I. S., Kandrov R. H., Tulyakov D. G. Innovative Trends in the Development of Advanced Triticale Grain Processing Technology. *Foods and Raw Materials*, 2017, vol. 5, no. 2, 70-82. DOI: 10.21179/2308-4057-2017-2-70-82.
- [9] Mosolov V. V. Belkovye ingibitory kak regulatory processov proteoliza [Protein inhibitors as regulators of proteolysis]. M.: Nauka, 1983. 40 p.
- [10] Nechaev A. P., Traubenberg S. E., Kochetkova A. A., Kolpakova V. V., Vitol I. S., Kobeleva I. B. Pishchevaya himiya. Laboratornyj praktikum [Food chemistry. Laboratory workshop]. SPb.: GIOR, 2006. 304 p.