

УДК 577.15.02

БИОХИМИЯ

И. Д. БЕРЕШ, А. Б. ВАКАР, Н. И. СОСЕДОВ

НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРОРАСТАЮЩЕГО ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 18 V 1971)

За последние годы был опубликован ряд работ, посвященных выделению, очистке и характеристике протеолитических ферментов зерна пшеницы (¹⁻⁵). Нами было показано, что при прорастании пшеницы происходит значительное изменение реологических свойств клейковины (ослабление) в результате повышения протеолитической активности в зерне, измеряемой в автолитических опытах (^{6, 7}).

Задачей данной работы являлось экстрагирование протеолитических ферментов из проросшего зерна и изучение некоторых кинетических свойств этих ферментов в диализованных экстрактах.

Озимую пшеницу сорта Московская 2453 проращивали в течение 3 и 5 суток, лиофилизировали, размалывали целиком и обезжиривали муку серным эфиром. Биохимическая характеристика полученного материала приведена в работе (⁷).

Для приготовления ферментных экстрактов материал извлекали 0,01 М раствором пирогосфата натрия (рН 7,0), содержащим 0,82 ммоль цистеина и 0,03 ммоль ЭДТА. Экстракцию проводили в течение 4 час. на холоду, при соотношении муки и растворителя 1 : 3. После центрифугирования экстракты диализовали в течение 18 час. на холоду против 0,005 М фосфатно-цитратного буферного раствора, рН 5,5, содержащего 0,1 ммоль ЭДТА. Диализаты центрифугировали и разбавляли вдвое тем же буфером. Полученные диализаты служили источником протеолитических ферментов для всех дальнейших опытов.

Для приготовления субстрата 1 г лиофилизированной клейковины, полученной из исходного, непроросшего зерна, диспергировали в 25 мл 0,1 М раствора уксусной кислоты в течение 20 час. на холоду. После центрифугирования дисперсию разбавляли тем же растворителем до концентрации белка, равной 18 мг/мл.

Протеолитическую активность диализованных экстрактов определяли методом Ансона в модификации Петровой (⁸) с тем лишь отличием, что вместо казеина в качестве субстрата применялась дисперсия клейковины в уксусной кислоте.

Реакционная смесь имела состав: 5 мл дисперсии клейковины + 1,25 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буфера рН 4,9 + 2,5 мл диализованного ферментного экстракта + цистеин до конечной концентрации 1,65 ммоль. Добавлением нескольких капель лимонной кислоты реакционная смесь доводилась до рН 3,7—3,9. Общий объем смеси 8,75 мл. Реакционную смесь

Таблица 1

Активность протеолитических ферментов
в экстрактах из зерна разной степени
прорастания

Продолжительность прорастания, сутки	Белок, мг/мл	Общая активность, мг тирозина	Удельная активность, мг тирозина на 1 мг белка
0	2,45	0	0
3	2,58	2236,5	693,5
5	2,90	2933,0	809,1

с несколькими каплями толуола инкубировали при 33° в течение 14 час., затем осаждали белок равным объемом 5% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и в фильтрате определяли количество тирозина с помощью реактива Фолина.

Одновременно ставили два контрольных опыта: в первом из реакционной смеси исключали ферментный раствор, а во втором — клейковинный субстрат. Из количества тирозина, найденного в опыте, вычитали сумму тирозина обоих контролей и таким образом определяли степень протеолиза клейковинного белка при действии на него ферментного экстракта. Прокси-

Таблица 2

Влияние некоторых активаторов и ингибиторов на удельную активность протеолитических ферментов проросшего зерна

Эффектор	Концентрация, мм	Удельная активность, μ г тирозина на 1 мг белка	
		3 суток прорастания	5 суток прорастания
Контроль (без эффектора)	—	594,2	735,5
Цистеин	1,65	693,5	809,1
Глютатион	0,33	667,9	870,8
Глютатион	0,65	755,5	921,2
Иодат калия	0,28	57,5	152,6
Парахлормеркурибензоат	0,35	0	66,1

пиченные ферментные экстракты из проросшего зерна не обладали протеолитической активностью.

Белок определяли методом Лоури после осаждения его 5% ТХУ и растворения осадка щелочью. Удельную активность протеолитических ферментов выражали в микрограммах тирозина на 1 мг белка. Продолжительность протеолиза 14 час. была выбрана на основании данных, приведенных ниже.

Продолжительность протеолиза, час.	0	1	3	5	14
Активность, μ г тирозина на 1 мг белка	0	0	145,9	281,1	451,8

Определение удельной активности протеолитических ферментов в экстрактах из проросшего зерна при разных значениях pH в диапазоне 2,32—12,0 показало, что оптимум pH для ферментов из зерна, прораставшего 3 и 5 суток, соответственно равен 3,90 и 3,70.

Сравнительное определение протеолитической активности в зерне разной степени прорастания показало, что экстракт из непроросшего зерна практически не содержит активных протеолитических ферментов, способных расщеплять клейковинный белок. Из проросшего зерна извлекаются протеолитические ферменты, активность которых в полученных экстрактах увеличивается по мере прорастания (табл. 2).

В следующей серии опытов изучалась зависимость удельной активности протеолитических ферментов в экстрактах из проросшего зерна от концентрации субстрата. В этих опытах продолжительность протеолиза составляла 4 часа. Полученные результаты, представленные на рис. 1, показывают, что максимальная скорость протеолиза клейковины наблюдается при концентрации клейковинного белка 10,2 мг/мл для ферментного экстракта из зерна, прорастающего 3 суток, и 10,6 мг/мл для зерна 5-суточного прорастания.

Соответствующие концентрации субстратного белка, при которых скорость протеолиза составляет половину от максимальной, равны 4,5 мг/мл

и 5,3 мг/мл. Если условно принять, в соответствии с литературными данными, молекулярный вес клейковинного белка равным 10^5 , то величины кажущихся констант Михаэлиса для ферментов из зерна, проросшего 3 и 5 суток, будут соответственно равны $4,5 \cdot 10^{-5}$ мол/л и $5,3 \cdot 10^{-5}$ мол/л. Эти значения получены путем обработки экспериментальных данных методом двойных обратных величин Лайнуивера — Берка ⁽⁹⁾.

При увеличении концентрации клейковинного белка свыше 11 мг/мл наблюдается значительное субстратное ингибирование протеолитических ферментов зерна, проросшего 3 суток.

По литературным данным ⁽²⁾, зерно пшеницы содержит протеолитические ферменты, близкие по своим свойствам к папаину. Чтобы выяснить природу протеолитических ферментов, экстрагируемых из проросшего зерна, были проведены определения их активности в присутствии специфических активаторов и ингибиторов сульфгидрильных ферментов. Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что удельная активность экстрактов из зерна, проросшего 3 и 5 суток, заметно возрастает под влиянием цистеина и глутатиона. Иодат калия и особенно парахлормеркурибензоат сильно ингибируют протеолитические ферменты проросшего зерна.

Полученные данные подтверждают, что протеолитические ферменты проросшего зерна пшеницы близки по своей природе к протеолитическим ферментам типа папаина.

В специальной серии опытов была исследована протеолитическая активность ферментных экстрактов из проросшего зерна по их способности разжижать дисперсию клейковины в 0,1 М уксусной кислоте ⁽¹⁰⁾.

Реакционная смесь содержала 5 мл уксуснокислой дисперсии клейковины (147,5 мг белка), 4,13 ммоль цистеина, фосфатно-цитратный буфер и 2,5 мл ферментного экстракта из зерна. Общий объем смеси 8,75 мл, pH 3,90. Вязкость смеси измеряли с помощью вискозиметра Оствальда в ультратермостате при температуре $33^\circ \pm 0,02^\circ$.

Полученные результаты, представленные на рис. 2, показывают, что изменение вязкости дисперсии клейковины под влиянием экстракта из непроросшего зерна лишь незначительно отличается от изменения вязкости в контрольном опыте (без ферментного экстракта). В то же время до-

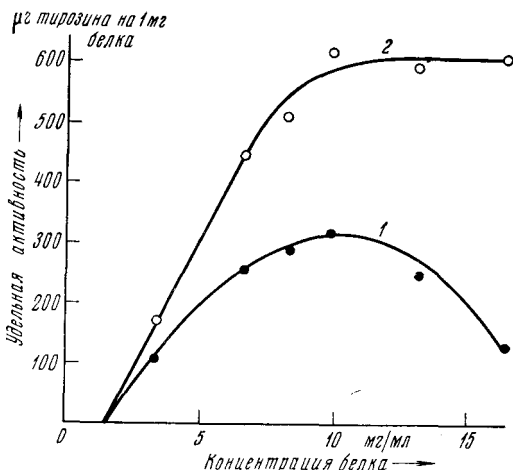


Рис. 1. Зависимость удельной активности протеолитических ферментов проросшего зерна от концентрации субстрата. 1 — зерно 3-суточного прорастания, 2 — зерно 5-суточного прорастания

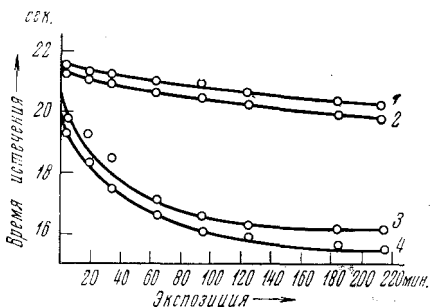


Рис. 2. Изменение вязкости уксуснокислых дисперсий клейковины под влиянием протеолитических ферментов проросшего зерна. 1 — контроль (без фермента), 2 — непроросшее зерно, 3 — зерно 3 суток прорастания, 4 — зерно 5 суток прорастания

бавление к субстрату экстрактов из проросшего зерна вызывает немедленное уменьшение вязкости дисперсий, измеряемой временем их истечения в вискозиметре. Через 3,5 часа снижение вязкости дисперсий в процентах от их исходных значений составило: контроль (без фермента) 6,7; непроросшее зерно 7,8; зерно 3 суток прорастания 21,8; зерно 5 суток прорастания 23,9.

Таким образом, результаты этих опытов подтвердили, что экстракты из проросшей пшеницы содержат протеолитические ферменты, активность которых закономерно возрастает в процессе прорастания зерна.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт зерна и продуктов его переработки

Поступило
17 V 1971

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. П. Сафонова, Эволюционная биохимия растений, «Наука», 1964. ² С. Е. McDonald, L. L. Chen, Cereal Chem., 41, № 6, 443 (1964). ³ E. Kaminski, W. Bushuk, Cereal Chem., 46, № 3, 317 (1969). ⁴ G. K. Chua, W. Bushuk, Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, № 3, 545 (1969). ⁵ C. C. Wang, D. R. Grant, Cereal Chem., 46, № 5, 537 (1969). ⁶ О. С. Шорина, А. Б. Вакар, Изв. высш. учебн. завед., № 4 (1965). ⁷ И. Д. Береш, Тр. Всесоюз. н.-п. инст. зерна и продуктов его переработки, № 66, 111 (1969). ⁸ И. С. Петрова, М. М. Винцуняйте, Прикладная биохимия и микробиология, 2, № 3, 322 (1966). ⁹ В. Л. Кретьевич, Введение в энзимологию, «Наука», 1967. ¹⁰ Н. И. Соседов, А. Б. Вакар, З. Б. Дроздова, Биохимия, 5, № 4, 464 (1940).