

Научная статья
УДК 541.64:547.466

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-642-650>



Роль цистеина в формировании доменных структур папаина и легумина гороха, принимающих участие в ограниченном протеолизе

Юрий Игнатъевич Матвеев*, Елена Витальевна Аверьянова**

*Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля» РАН,
г. Москва, Российская Федерация

**Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный
технический университет им. И. И. Ползунова»,
г. Бийск, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Аверьянова Елена Витальевна, averianova.ev@bti.secna.ru

Аннотация. Ограничение использования растительных белков в пищевых целях обусловлено их низкой биодоступностью и плохой перевариваемостью ферментами желудочно-кишечного тракта. Для повышения пищевых качеств белков семян используют метод их модификации, суть которого заключается в частичном воспроизведении ферментативных процессов ограниченного протеолиза, протекающих при прорастании семян. Целью исследования явилось изучение возможности сокращения продолжительности процессов прорастания семян в технологических целях за счет оптимизации условий и параметров ограниченного протеолиза. При этом подбор ферментов (в дополнение к естественным ферментам, содержащимся в семени) и условий протеолиза (в данном случае температуры), а также добавление веществ – активаторов гидролиза, осуществлялся таким образом, чтобы наиболее эффективным способом обеспечить качество конечного продукта. Рассмотрено влияние цистеина на формирование доменных структур белков (ферментов и глобулинов). С помощью предложенных выражений можно определить те части молекул белков, которые образуют устойчивые домены и находятся в неупорядоченном состоянии, подвергаясь воздействию ферментов. На основании исследования физического механизма воздействия папаиноподобных протеолитических ферментов на легумин гороха LegA (3KSC, CAA10722) определены оптимальные условия ограниченного протеолиза и показано, что продолжительность распада вторичных структур белка фактически в 6–8 раз больше, так как водородные связи, возникающие при формировании вторичных структур, ограничивают доступ фермента к соответствующим аминокислотным остаткам. Также показано, что разрушение водородных связей, например, путем предварительной тепловой обработки белка, позволит расширить область ограниченного протеолиза.

Ключевые слова: цистеин, папаин, легумин гороха, домены, неупорядоченные области, температура денатурации, ограниченный протеолиз

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ (мнемокод 0611-2020-013, номер темы – FZMM-2020-0013, ГЗ № 075-00316-20-01).

Для цитирования: Матвеев Ю. И., Аверьянова Е. В. Роль цистеина в формировании доменных структур папаина и легумина гороха, принимающих участие в ограниченном протеолизе // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 642–650. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-642-650>.

Original article

The role of cysteine in the formation of domain structures of papain and legumin in peas, involved in limited proteolysis

Yuri I. Matveev*, Elena V. Averyanova**

*N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS,
Moscow, Russian Federation

**Biysk Technological Institute (branch) of the Altay State Technical University,
Biysk, Russian Federation

Corresponding author: Elena V. Averyanova, averianova.ev@bti.secna.ru

Abstract. The limited use of plant proteins for food is explained by their low bioavailability and poor digestibility by enzymes of the gastrointestinal tract. Partially reproduced enzymatic processes of limited proteolysis that occur during seed germination are used to modify and improve the edibility characteristics of seed proteins. The present work discusses the possibility of reducing the duration of seed germination processes by optimising the conditions and parameters of limited proteolysis. To optimise manufacturing high-quality final product, enzymes (additional to the natural enzymes in the seed) and proteolysis conditions (in this case, temperature), as well as added substances (hydrolysis activators), were selected. The influence of cysteine on the formation of domain structures of proteins (enzymes and globulins) was evaluated. The proposed expressions can be used to determine those fragments of protein molecules that form stable domains and become unstructured when exposed to enzymes. Optimal conditions for limited proteolysis were identified based on the physical mechanism of action of papain-like proteolytic enzymes on pea legumin LegA (3KSC, CAA10722). It is shown that the decomposition of protein secondary structures takes 6–8 times longer, since the formed hydrogen bonds limit the access of enzymes to the corresponding amino-acid residues. It is also demonstrated that the decomposition of hydrogen bonds, e.g. by preliminary heat treatment of proteins, will broaden the prospects for limited proteolysis.

Keywords: cysteine, papain, pea legumin, domains, unstructured region, denaturation temperature, limited proteolysis

Funding. This work was supported by the project 075-00316-20-01 (FZMMM-2020-0013, mnemonic code 0611-2020-013) from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

For citation: Matveev Yu. I., Averyanova E. V. The role of cysteine in the formation of domain structures of papain and legumin in peas, involved in limited proteolysis. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):642-650. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-642-650>.

ОБОЗНАЧЕНИЯ

N – число аминокислотных остатков;
 N_c – критическая степень полимеризации;
 T_{dn} – температура денатурации;
 $T_{dn,\infty}$ – температура денатурации при молекулярной массе, стремящейся к бесконечности;
 $T_{dn,i}$ – парциальная температура денатурации;
 $T_{des,i}$ – парциальная температура деструкции;
 $\langle T_{dn} \rangle$ – среднее значение температуры денатурации;
 V_p – объем пептида;
 R_p – радиус пептида;
 R_{mv} – радиус микроворсинки.

ВВЕДЕНИЕ

Использование растительных белков для пищевых целей сопряжено с некоторыми проблемами. Так, легумины (11S фракция запасных белков семян зернобобовых и масличных культур) имеют высокую биологическую ценность, но из-за специфического строения, обусловленного компактной жесткой структурой молекул и их

низкой поверхностной гидрофобностью, не полностью перевариваются ферментами желудочно-кишечного тракта.

Для повышения пищевых качеств белков семян используют метод их модификации, суть которого сводится к частичному воспроизведению ферментативных процессов ограниченного протеолиза, протекающих при прорастании семян [1–4] – модификация *in vivo*. В природе время прорастания семян, например, гороха, составляет от 6 до 15 суток при температуре почвы от 6 до 12 °С. Распад запасного белка гороха легумина под действием эндогенных протеиназ начинается на третий день прорастания семян, а на шестой день образуются промежуточные фрагменты белка с молекулярной массой 18–20 кДа, то есть происходит химическое разделение его молекулы на отдельные домены. Основными ферментами эндогенного происхождения, действующими на легумин гороха во время прорастания семян, являются легумаин и цистеиновая протеиназа.

Для развития зародыша растения кроме гид-

ролизованного белка необходимы еще и гликозилированные белки, в синтезе которых активное участие принимают эндогенные ферменты (легумаин и цистеиновая протеиназа). В результате гликозилирования происходит разделение доменов 11S белка, и пространство вокруг них освобождается для протеолиза.

Процесс прорастания можно ускорить путем предварительного прогревания семян в течение 5 ч при температуре до 50 °С, а также путем их замачивания на 2–3 ч с последующим проращиванием в течение 2–3 дней во влажной ткани в теплом месте.

При использовании процессов прорастания семян в технологических целях задача заключается в том, чтобы свести продолжительность ограниченного протеолиза к минимуму. При этом подбор ферментов (в дополнение к естественным ферментам, содержащимся в семени) и условий протеолиза (в данном случае температуры протеолиза) осуществляется таким образом, чтобы наиболее эффективным способом обеспечить качество конечного продукта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе на примере протеолитического фермента папаина КФ 3.4.22.2 показано, как можно интенсифицировать процесс прорастания семян в технологических целях в условиях ограниченного протеолиза белка гороха – легумина. Выбор папаина обусловлен тем, что эндогенные протеазы по своему строению и действию на белок очень похожи на папаин, поэтому их называют папаиноподобными протеиназами.

Решить сформулированную задачу можно двумя способами: эмпирическим путем – за счет подбора необходимых компонентов и оптимизации условий протеолиза, либо на основании исследований физического механизма воздействия фермента и химического строения субстрата определить оптимальные пути решения задачи ограниченного протеолиза. В представленной работе рассмотрен второй путь.

Содержание легумина (11S запасной глобулин), выделенного из различных сортов гороха (*Pisum sativum*), по данным скоростной седиментации, составило не менее 95%. На основании данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей молекулярная масса легумина гороха принята 360 кДа [5]. Аминокислотный состав папаина и легумина гороха определен на аминокислотном анализаторе LC-5000 (Biotronik Se & Ko. KG, Германия) по методике, представленной в работе [5].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

О формировании доменных структур в белках. Согласно экспериментальным данным, реальные молекулы белков, в том числе белки

зерновых и зернобобовых культур, имеют число аминокислотных остатков (а.к.о.) N менее N_c (критической степени полимеризации, при которой температура денатурации T_{dn} не зависит от N), то есть на самом деле их T_{dn} должна зависеть от N . Но даже если учесть влияние N на T_{dn} , то полученные расчетные значения будут отличаться от экспериментальных (T_{dn})_{exp} и их может оказаться несколько. Кроме того, (T_{dn})_{exp} разных белков слабо отличаются друг от друга и могут перекрываться значениями T_{dn} других белков (табл. 1). Так, согласно результатам исследования, приведенным в работе [6], если разница температур денатурации (T_{dn}) белков зерна и белков семени составляет 220–164 = 56 °С при $N > N_c$, то у реальных белков, например, люпина и лизоцима, это значение будет 93–73 = 20 °С.

Причина реализации более низкой температуры денатурации в легумине гороха и папаине – это образование доменов. Существует определенная группа аминокислотных остатков белков (табл. 2), у которых парциальная температура денатурации, $T_{dn,i}$, выше парциальной температуры деструкции, $T_{des,i}$. Для того чтобы структуры таких белков были устойчивы, они должны иметь определенное пространственное строение [9].

Таким образом, из 9 протеиногенных аминокислот, у которых $T_{des,i} < T_{dn,i}$, только две попадают в реальный диапазон изменения T_{dn} белков – метионин и цистеин. Но если метионин как-то укладывается в этот диапазон температур, то белки, содержащие большое количество цистеина, должны быть явно неустойчивыми в области температур выше 322 К (49 °С) – парциальной температуры деструкции цистеина (см. табл. 2). При этом следует отметить, что на данный факт (использование температуры деструкции цистеина при ускорении прорастания семян гороха) давно обратили внимание практики.

В результате ограниченного протеолиза происходит образование плотных глобул-доменов и рыхлых областей между ними, которые можно рассматривать как опушки этих глобул. При этом активные центры ферментов должны находиться в опушках, и воздействовать ферменты будут на опушки субстрата. Так как опушка субстрата более рыхлая, то в первую очередь действию фермента подвергаются входящие в нее наиболее доступные для фермента пептидные связи. Обычно время завершения ограниченного протеолиза (оптимальная продолжительность гидролиза), по данным измерения оптической плотности, составляет от 60 до 90 мин [10]. На продолжительность протеолиза влияет внесение добавок – биологически активных органических молекул, таких как гуминовые вещества, алкилгидроксibenзолы (АГБ) и др. [11, 12]. Так, модификация ряда гидролаз с помощью АГБ приводит к

Таблица 1. Температура денатурации (T_{dn}) некоторых белков

Table 1. Denaturation temperature (T_{dn}) of certain proteins

Белок	Температура денатурации, $T_{dn}, ^\circ\text{C}$	Критическая степень полимеризации, N_c	Число аминокислотных остатков, N	Относительное содержание цистеина, C_{ys}
Лизоцим	73	359	129	8/129 = 0,062
Папаин [7, 8]	83	359	212	7/212 = 0,033
Люпин (7S)	93	348	470	9/470 = 0,019
Легумин гороха (11S)	85	359	338	2/294 = 0,007

Таблица 2. Парциальные температуры ($T_{dn,i}$, $T_{des,i}$) протеиногенных аминокислот, имеющих $T_{des,i} < T_{dn,i}$

Table 2. Partial temperatures ($T_{dn,i}$, $T_{des,i}$) of amino acids of proteins having $T_{des,i} < T_{dn,i}$

Аминокислота	Парциальная температура денатурации $T_{dn,i}, \text{K } (^\circ\text{C})$	Парциальная температура деструкции $T_{des,i}, \text{K } (^\circ\text{C})$
Глицин	898 (625)	531 (258)
Аланин	1141 (868)	533 (260)
Серин	667 (394)	489 (216)
Метионин	527 (254)	367 (94)
Аспарагин	521 (248)	478 (205)
Цистеин	1147 (874)	322 (49)
Аспарагиновая кислота	814 (541)	454 (181)
Глутаминовая кислота	529 (256)	474 (201)
Гистидин	670 (397)	469 (196)

многократному увеличению их активности, изменению субстратной специфичности, расширению температурного и pH-оптимумов гидролиза.

Доменная структура папаина. Папаин является одним из протеолитических ферментов, который преимущественно расщепляет пептидные связи, образованные глицином – Гли (G), лейцином – Лей (L), аргинином – Арг (R), и лизином – Лиз (K) [13, 14]. Папаин относительно устойчив в нейтральной и слабощелочной среде (диапазон pH – 3-12, оптимум pH – 5-8), но быстро и необратимо теряет активность в области кислых значений pH; температурный оптимум составляет 65 °C [15]. Длина молекулы папаина – 212 а.к.о., масса – 23,406 кДа. Рассмотрим доменную структуру папаина.

На рис. 1 представлена аминокислотная последовательность молекулы папаина. Активные центры – Cys-25 и His-159, находятся на поверхности глобулы, остальные активные центры – в опущках глобул: на N-конце – изолейцин, на C-конце – аспарагин. Количество а.к.о. цистеина в молекуле папаина шесть (на рис. 1 показаны малиновым цветом): $N_1 = 21$; $N_2 = 30$; $N_3 = 31$; $N_4 = 57$; $N_5 = 46$; $N_6 = 12$. Участками между цистеинами, содержащими менее 10 а.к.о., можно пренебречь, полагая, что они не могут образовывать домены.

Оценим температуру денатурации доменов ($T_{dn,i}$), воспользовавшись для T_{dn} выражением из работы [7]:

$$(T_{dn})_i = T_{dn,\infty} - \alpha \cdot N_c / N_i,$$

где $T_{dn,\infty} = 167$ °C (рассчитана для папаина на основании подходов авторов работы [6]).

10	20	30	40
IPEYDWRQK	GAVTPVKNQG	S [■] GS [■] CWAFSA	VVTIEGIIKI
50	60	70	80
RTGNLNEYSE	QELLD [■] CDRRS	YG [■] CNGGYPWS	ALQLVAQYGI
90	100	110	120
HYRNTYPYEG	VQRY [■] CRSREK	GPYAAKTDGV	RQVQPYNEGA
130	140	150	160
LLYSIANQPV	SVVLEAAGKD	FQLYRGGIFV	GP [■] C [■] GNKVDHA
170	180	190	200
VAAVGYGPNY	ILIKNSWGTG	WGENGYIRIK	RGTGNSYGV [■]
210			
GLYTSSFYPVKN			

Рис. 1. Последовательность аминокислотных остатков папаина

Fig. 1. Sequence of papain amino acid residues

Так как, согласно [6], у белков $340 \leq N_c \leq 375$, то при дальнейших оценках будем использовать $\langle N_c \rangle = 359$, как у легумина гороха. Величину α найдем из условия, что $T_{dn} = 83$ °C [16] соответствует $N_4 = 57$. Тогда $\alpha = 13,34$ при $N_c = 359$, а $\alpha \cdot N_c = 4789,06$.

По аналогии оценим температуру денатурации для остальных доменов ($T_{dn,i}$), которая соответствует температуре оптимальной активности фермента [14, 15]: $(T_{dn})_1 = -61$ °C, $(T_{dn})_2 = 7,35$ °C, $(T_{dn})_3 = 12,5$ °C, $(T_{dn})_4 = 83$ °C, $(T_{dn})_5 = 63$ °C, $(T_{dn})_6 = -232$ °C. Отрицательные значения ($T_{dn,i}$) свидетельствуют о том, что при $N_i < 30$ образование доменов, скорее всего, невозможно. Доля неупорядоченной части составляет $(N_1 + N_6) / N = 0,15$ (при а.к.о. папаина $N = 212$).

Домены с $(T_{dn})_2 = 7,35$ °C, $(T_{dn})_3 = 12,5$ °C не исследовались в папаине, хотя calorиметрические измерения в этой области температур могут подтвердить их существование или при их отсутствии позволят наложить дополнительные ограничения на число а.к.о., способных образовать домены. Обычно исследования папаина проводят при температурах $T \geq 20$ °C, где эти домены денатурируют и находятся в неупорядоченном состоянии. Тем не менее эта область температур может представлять интерес, так как в реальных условиях прорастание семян (например, гороха) происходит при температурах от 2 до 3 °C, и папаиноподобные эндопротеазы начинают проявлять активность уже в этой области.

Таким образом, в области реально исследуемых температур молекула папаина состоит из двух доменов с температурами денатурации $(T_{dn})_4 = 83$ °C, $(T_{dn})_5 = 63$ °C.

Потеря активности папаина начинается с 55 °C [17]. Максимальная температура, при которой сохраняется нативная структура фермента и его активность, называется оптимальной температурой. Термическая стабильность ферментативной активности папаина при 55 °C (рН=4,0) обеспечивается в течение 6 мин. Скорость ферментативной реакции увеличивается примерно в два раза с повышением температуры на 10 °C. При дальнейшем росте температуры происходит постепенное разрушение фермента, которое приводит к тому, что скорость химического процесса, катализируемого ферментом, замедляется и, наконец, прекращается.

Таким образом, если мы хотим повысить скорость ферментативной реакции, необходимо проводить ее при высоких температурах. В случае папаина это 50 °C. Если мы хотим повысить скорость ферментативной реакции в нативной структуре гороха, эта температура должна быть не более 40 °C. Последнее связано с тем, что эндогенные протеиназы легумина и цистеиновая протеиназа при температуре выше 45 °C инактивируются необратимо.

Доменная структура легумина гороха. Рассмотрим доменную структуру легумина гороха. Согласно [9], его $T_{dn,\infty} = 201$ °C, а $N_c = 359$. Однако, как показывают экспериментальные данные, представленные в работе [5], $\langle T_{dn} \rangle \approx 85$ °C, где $\langle T_{dn} \rangle$ – среднее значение температуры денатурации легуминов гороха различной сортовой принадлежности. Последнее, как это было отмечено выше, связано с образованием доменных структур в белках.

На рис. 2 представлена аминокислотная последовательность молекулы легумина LegA (3KSC, CAA10722), где $N = 496$, $N_c = 359$, подчеркиванием выделены участки последовательности LegA, образующие вторичные структуры, а остатки цистеина, участвующие в формировании дисульфидных связей, показаны красным шрифтом [18].

```
1
LREQPQQNEQLERLDALEPDNRIESEGGIETWNPNNKQFRCAVALSRATLOR
NALRRPYYSNAPQEIFIQQNGYFEMVFFGPETFEPEQSEQGE - 100
GRRYRDRHQVNRFRFEGDIIAVPTGIVFWMYNDQDTPVIAVSTDISSNN
QLDQMPRRFYLAGNHEQEFIQYHQGGKQEQENEGNNIFSGFKRDFLE - 100
DAFNVRHIVDRLOQRNEDEEKGAIVKVKGGLSIISPPEKQARHQRESSRQEED
DEEKQPRHQGSGRQEEDEDEEERQPRHQRRGEEDEEKKERGGS - 100
QCKGSRROQDNGLEETVYAKLRLNIGPSSSPDIYNPEAGRIKTVTSLDLPVLEW
LKI SAEHGSHKNA MFVPHYNTL NANSI IYALKGRARLQVNVNNGN - 100]
TVFDGEL EAGRAL TVPQNYAVAAKSSDRFSYVAFKTNDRAGIARLAE TSSVINN
LPIDVVAATFNLQRNEARQLKSNPPFKFLVPA RESEN RASA - 96
```

Рис. 2. Последовательность аминокислотных остатков LegA (3KSC, CAA10722) [18]

Fig. 2. Sequence of amino acid residues of LegA (3KSC, CAA10722) [18]

Для оценки размеров доменов LegA (3KSC, CAA10722) и характерных температур рассмотрены предложенные выше подходы для папаина.

Аминокислотные остатки цистеина разделяют молекулу LegA (3KSC, CAA10722) на пять областей: $N_1 = 10$; $N_2 = 33$; $N_3 = 43$; $N_4 = 232$; $N_5 = 79$; $N_6 = 99$. Величину α из приведенного выше выражения найдем из условия, что $T_{dn} = 85$ °C, $T_{dn,\infty} = 201$ °C, $N_c = 359$ и $N_4 = 232$. Тогда $\alpha = 74,964$, а соответствующие характерные температуры выделенных областей будут равны: $(T_{dn})_1 = -2490$ °C, $(T_{dn})_2 = -614$ °C, $(T_{dn})_3 = -424$ °C, $(T_{dn})_4 = 85$ °C, $(T_{dn})_5 = -140$ °C, $(T_{dn})_6 = -71$ °C, то есть реализуется один домен с $N_4 = 232$ в диапазоне температур от 0 до 85 °C. В указанном диапазоне температур остальные домены теряют устойчивость и находятся в клубкообразном состоянии, образуя опушку домена N_4 . При этом вторичные структуры сохраняются как в опушке, так и в самом домене.

При протеолизе клубков и домена в первую очередь отщепляются а.к.о. G, L, R, K (на рис. 2 они выделены синим цветом), подвергающиеся воздействию активных центров папаина, которые не входят в состав вторичных структур. В результате образуется раствор, в котором будут присутствовать отщепленные а.к.о. (за исключением а.к.о., потерянных вследствие протеолиза), а также оставшиеся части клубков и домена. На рис. 3 и 4 показаны пептиды и а.к.о. домена и клубков, образующихся на начальной стадии воздействия папаина, когда протеолизу подвергаются а.к.о., не входящие во вторичные структуры. У этой оставшейся части молекулы белка структура будет нарушена, так как она распадается до пептидов, которые образуют клубки. Места гидролизованных а.к.о. обозначены тире. Фактически получена смесь пептидов и отдельных а.к.о.

Так как ферменты не расходуются в ходе катализируемой ими реакции, то после распада домена происходит повторное воздействие фермента на изменившуюся среду, в которой а.к.о. G, L, R, K будут входить в состав вторичных структур, замедляя скорость протеолиза. Таким образом, при ограниченном протеолизе легумина гороха наблюдается процесс, который можно охарактеризовать как двухстадийный гидролиз.

Результатом распада вторичных структур под действием папаина в подвздошной кишке является раствор пептидов и а.к.о. Максимальный размер пептидов образуется при распаде вторичных структур домена (рис. 3) и будет состоять из 17 а.к.о. (IVFWMYNDQDTPVIAVS). Так как пептиды сворачиваются в клубки, то, зная объемы а.к.о. [6], можно вычислить объем V_p , он равен 1804 \AA^3 , и радиус пептида $R_p = 7,55 \text{ \AA}$. Зная минимальный радиус микроворсинки – $R_{mv} = 4 \text{ мкм}$, $R_{mv}/R_p = 53$, то есть самый большой пептид поместится внутри микроворсинки и будет подвержен действию ее ферментов.

C₅₇PETFEPEQSEQ-E-Y-D-HQ-
VNRFRREGDIIAVPTGIVFWMYNDQDTPFVIAVSTTDI-SSNNQ-DQMPRRFYLA-
NHEQEF-QYHQHQGGKQEQENE-NNIFS-F-RDFLEDAFNVNRHIVDRLO-
NEDEE-AIVKV-SIISPPE-QA-HQ-E-S-QEEDDEE-QP-HQ-S-
QEEDDEE-QP-HQ-EEEEED-E-SQ-S-Q-DN-EETV₃₁₉TA₃₂₁

Рис. 3. Аминокислотные остатки домена после действия папаина на аминокислотные остатки, не входящие во вторичные структуры

Fig. 3. Amino acid domain residues after the action of papain on amino acid residues not included in the secondary structures

E₃QPQQNEQLE-DA-EFDPNIESEGGIETWPNPNKQFRCAVALSFA
TLQNALRRPYYSNAPQEIFIQNGYFGMVFP₉₅-
L₃₂₃RLNI-SSSPDIYNPEAGRIKTVTS-D-PV-W-
KLSAEHS₃SHNAMFVPHYNANANSIYALKGRRLQVNVNNGN
TVFDCELEA-RALTVPQNYAVAAKSLSDRFSYVAFKTNDA-IA-A-TSSVINN-
PLDVVAATFN-QRNEARQLKSNPNRFFVPA-ESEN-ASA₄₉₆

Рис. 4. Аминокислотные остатки клубков после действия папаина на аминокислотные остатки, не входящие во вторичные структуры

Fig. 4. Amino acid balls residues after the action of papain on amino acid residues not included in the secondary structures

О влиянии вторичных структур на процесс протеолиза легумина. Характерная особенность легумина гороха – это устойчивость к неограниченному протеолизу. Поскольку ограниченный протеолиз легумина гороха обусловлен присутствием вторичных структур, то полный гидролиз легумина может быть достигнут только после разрушения вторичных структур (при нагревании до 60–70 °С, когда происходит разрыв водородных связей). В связи с этим тепловая обработка при приготовлении пищи является наиболее эффективным технологическим приемом для увеличения биодоступности продуктов. Распад вторичных структур до поперечных размеров микроворсинок позволяет повысить эффективность воздействия их ферментов на ранней стадии переваривания пищи в тонком кишечнике.

Как показывают результаты экспериментов, например [10], протеолиз белков во времени состоит из двух периодов. В первый период, длительность которого составляет примерно 30 мин, скорость протеолиза белок-ферментного комплекса имеет максимальное значение для данной системы. Однако при увеличении продолжительности протеолиза его скорость резко уменьшается (в 6–8 раз), что соответствует длительности переваривания белков в тонком кишечнике – от 3,5 до 4,5 ч. Последнее связано с тем, что в начальный момент времени воздействию фермента подвергаются а.к.о., не входящие во вторичные структуры (будем называть их свободными), а после их расщепления фермент

действует на аналогичные а.к.о., входящие во вторичные структуры. Так как в формировании вторичной структуры белка участвуют водородные связи между а.к.о. полипептидной цепи, то доступ фермента к а.к.о., входящим в состав вторичной структуры, будет затруднен.

Согласно рис. 4, количество вторичных структур в домене LegA (3KSC, CAA10722) будет 8. Остальные 12 вторичных структур находятся в опухке. При этом число а.к.о., не входящих во вторичные структуры и подвергающихся действию фермента (показаны синим цветом), составляет 23 в опухке и 49 в домене. Число а.к.о., входящих во вторичные структуры, составляет 48 в опухке и 16 в домене, то есть отношение суммарно числа а.к.о., не входящих во вторичные структуры, к числу а.к.о., входящих во вторичные структуры, будет порядка единицы. Поэтому при продолжительности распада а.к.о., не входящих во вторичные структуры белка, порядка 30 мин [10], продолжительность распада а.к.о. вторичных структур должна иметь тот же порядок.

Однако, фактически продолжительность распада вторичных структур в 6–8 раз больше в силу того, что водородные связи, возникающие при формировании вторичных структур, ограничивают доступ фермента к соответствующим а.к.о. Разрушение водородных связей, например, путем предварительной тепловой обработки белка, позволит расширить область ограниченного протеолиза.

ВЫВОДЫ

Рассмотренный выше подход позволяет на основании аминокислотного состава белков (фермента и/или субстрата) еще на стадии подготовки к эксперименту выявить наиболее существенные моменты ограниченного протеолиза и подобрать соответствующие модифицирующие добавки для наиболее полной его реализации.

Для реализации процесса с максимальной эффективностью необходимо поддерживать температуру гидролиза 40 °С на стадии использования эндогенных протеиназ и до 50 °С – на стадии использования папаина и биологически активных добавок.

В общем случае температура протеолиза будет определяться оптимальной температурой активности фермента. Дальнейшего сокращения продолжительности гидролиза можно добиться путем использования биологически активных органических молекул (гуминовых веществ и алкилгидроксibenзолов (АГБ)). Модификация ряда гидролаз с помощью АГБ приводит к многократному увеличению их активности, изменению субстратной специфичности, расширению температурного и рН-оптимумов гидролиза [11].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Кердиварэ А. М. Ограниченный протеолиз как способ снижения аллергенности запасных

глобулинов семян (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53, N 3. С. 475–484. <https://>

doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.475rus.

2. Шутов А. Д., Королева Т. Н., Вайнтрауб И. А. Об участии протеаз покоящихся семян вики в распаде запасных белков при прорастании // Физиология растений. 1978. Т. 25, N 4. С. 735–742.

3. Рудакова А. С., Каховская И. А., Шутов А. Д. Легумины, Асп-специфичные протеиназы растений: филогенетический анализ и функции // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: материалы XIII Междунар. конф. (Сочи, 4–8 июня 2018 г.). М.: Изд-во РУДН, 2018. N 13. С. 306–310.

4. Cherdivară A., Rudakova A., Stepurina T., Rudakov S., Wilson K., Shutov A. Limited proteolysis initiates massive degradation of ginnacin, storage 11S globulin from *Ginkgo* seeds // Molecular Life. 2018. Vol. 2, no. 1. 6 p. <https://doi.org/10.26600/MolLife.1.2.1.2018>.

5. Даниленко А. Н., Поляков А. В., Плащина И. Г., Павловская Н. Е. Сравнительный анализ интегральной гидрофобности легуминов гороха различной сортовой принадлежности // Вестник ОрелГАУ. 2013. N 1 (40). С. 77–83.

6. Матвеев Ю. И. Определение температур перехода в вязкотекучее состояние, денатурации и начала интенсивной деструкции белков в зависимости от их химического строения // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 1997. Т. 39, N 4. С. 690–698.

7. Matveev Yu. I., Plashchina I. G. Determination of the main structural parameters of lysozyme that affect its enzymatic activity // Polymer Science. Series A. 2010. Vol. 52, no. 6. P. 610–613. <https://doi.org/10.1134/S0965545X10060064>.

8. Choudhury D., Biswas S., Roy S., Dattagupta J. K. Improving thermostability of papain through structure-based protein engineering // Protein Engineering, Design and Selection. 2010. Vol. 23, no. 6. P. 457–467. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq016>.

9. Лифшиц И. М., Гроссберг А. Ю. Диаграмма состояний полимерной глобулы и проблема самоорганизации ее пространственной структуры // Успехи физических наук. 1974. Т. 113, N 6. С. 331–334. <https://doi.org/10.3367/UFNr.0113.197406f.0331>.

10. Браудо Е. Е., Даниленко А. Н., Елисева Л. Г., Махотина Н. А. Повышение пищевой ценности белков люпина методом ограниченного фермен-

тативного гидролиза // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2006. Т. 54, N 2-3. С. 69–70.

11. Матвеев Ю. И., Плащина И. Г. Динамическая модель воздействия метилрезорцина на ферментативную активность лизоцима // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2011. Т. 53, N 5. С. 696–703.

12. Матвеев Ю. И., Плащина И. Г. Влияние степени полимеризации фермента и субстрата на каталитическую активность фермента // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2012. Т. 54, N 9. С. 1396–1409.

13. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты: монография. М.: Наука, 1971. 412 с.

14. Королева В. А., Холявка М. Г., Артюхов В. Г. Оценка субстратной специфичности растительных цистеиновых протеаз, свободных и иммобилизованных на матрице хитозана // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2020. N 4. С. 50–56.

15. Поляков А. В. Модифицирующее действие ограниченного протеолиза папаином на структуру и свойства легуминов // Биохимическая физика: труды XVI Ежегодной международной молодежной конференции (Москва, 24–26 октября 2016 г.). М.: Изд-во Российского университета дружбы народов (РУДН), 2017. С. 163–167.

16. Sathish H. A., Kumar P. R., Prakash V. Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain // International Journal of Biological Macromolecules. 2007. Vol. 41, no. 4. P. 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.05.009>.

17. Sumner I. G., Harris G. W., Taylor M. A. J., Pickersgill R. W., Owen A. J., Goodenough P. W. Factors effecting the thermostability of cysteine proteinases from *Carica papaya* // European Journal of Biochemistry. 1993. Vol. 214, no. 1. P. 129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17904.x>.

18. Tandang-Silvas M. R. G., Fukuda T., Fukuda C., Prak K., Cabanos C., Kimura A., et al. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics. 2010. Vol. 1804, no. 7. P. 1432–1442. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.02.016>.

REFERENCES

1. Cherdivară A. M. Limited proteolysis as a means to reduce the allergenicity of seed storage globulins (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*. 2018;53(3):475–484. (In Russian). <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.475rus>.

2. Shutov A. D., Koroleva T. N., Weintraub I. A. On the participation of proteases of dormant vetch seeds in the breakdown of storage proteins during germination. *Fiziologiya rastenii*. 1978;25(4):735–742. (In Russian).

3. Rudakova A. S., Kakhovskaya I. A., Shutov A.D.

Legumines, Asn-specific plant proteases: phylogenetic analysis and function. In: *Novye i netraditsionnye rasteniya i perspektivy ikh ispol'zovaniya: Materialy XIII Mezhdunarodnoi konferentsii = New and unconventional plants and prospects for their use: Proceedings of XIII International Conference*, 4–8 June 2018, Sochi. Moscow: RUDN University; 2018;13:306–310. (In Russian).

4. Cherdivară A., Rudakova A., Stepurina T., Rudakov S., Wilson K., Shutov A. Limited proteolysis initiates massive degradation of ginnacin, storage 11S

globulin from *Ginkgo* seeds. *Molecular Life*. 2018;2(1). 6 p. <https://doi.org/10.26600/MolLife.1.2.1.2018>.

5. Danilenko A. N., Polyakov A. V., Plashchina I. G., Pavlovskaya N. E. Comparative analysis of the integral hydrophobicity of legumins of peas of various varietal types. *Vestnik OrelGAU*. 2013;1:77–83. (In Russian)

6. Matveev Yu. I. Determination of the temperatures of the transition into the viscoelastic state, denaturation, and the onset of intensive destruction of proteins with various structures. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A = Polymer Science. Series A*. 1997;39(4):690–698. (In Russian).

7. Matveev Yu. I., Plashchina I. G. Determination of the main structural parameters of lysozyme that affect its enzymatic activity. *Polymer Science. Series A*. 2010;52(6):610–613. <https://doi.org/10.1134/S0965545X10060064>.

8. Choudhury D., Biswas S., Roy S., Dattagupta J. K. Improving thermostability of papain through structure-based protein engineering. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2010;23(6):457–467. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq016>.

9. Lifshits I. M., Grosberg A. Yu. The phase diagram of the polymer globule and the problem of self-organization of its spatial structure. *Uspekhi fizicheskikh nauk = Physics-Uspekhi (Advances in Physical Sciences)*. 1974;113(6):331–334. (In Russian). <https://doi.org/10.3367/UfNr.0113.197406f.0331>.

10. Braudo E. E., Danilenko A. N., Eliseeva L. G., Makhotina N. A. Increasing the nutritional value of lupine proteins by limited enzymatic hydrolysis. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishchevaya tekhnologiya = Food Technology*. 2006;54(2-3):69–70. (In Russian).

11. Matveev Yu. I., Plashchina I. G. Dynamic model of the effect of methylresorcinol on the enzymatic activity of lysozyme. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A = Polymer Science. Series A*. 2011;53(5):696–703. (In Russian).

12. Matveev Yu. I., Plashchina I. G. Influence of the degree of polymerization of the enzyme and substrate on the catalytic activity of the enzyme. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A = Polymer Science. Series A*. 2012;54(9):1396–1409. (In Russian).

13. Mosolov V. V. *Proteolytic enzymes*. Moscow: Nauka; 1971. 412 p. (In Russian).

14. Koroleva V. A., Holyavka M. G., Artyukhov V. G. Estimation of substrate specificity of plant cysteine proteases, free and immobilized on the chitosan matrix. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2020;4:50–56. (In Russian).

15. Polyakov A. V. Modifying effect of limited papain proteolysis on the structure and properties of legumins. In: *Biokhimicheskaya fizika: trudy XVI Ezhгодnoi mezhdunarodnoi molodezhnoi konferentsii = Biochemical Physics: Proceedings of the XVI Annual International Youth Conference*. 24–26 October 2016, Moscow. Moscow: RUDN University; 2017, p. 163–167. (In Russian).

16. Sathish H. A., Kumar P. R., Prakash V. Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007;41(4):383–390. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.05.009>.

17. Sumner I. G., Harris G. W., Taylor M. A. J., Pickersgill R. W., Owen A. J., Goodenough P. W. Factors effecting the thermostability of cysteine proteinases from *Carica papaya*. *European Journal of Biochemistry*. 1993;214(1):129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17904.x>.

18. Tandang-Silvas M. R. G., Fukuda T., Fukuda C., Prak K., Cabanos C., Kimura A., et al. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. 2010;1804(7):1432–1442. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.02.016>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ю. И. Матвеев,

к.ф.-м.н., старший научный сотрудник,
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эммануэля РАН,
117997, г. Москва, ул. Косыгина, 4,
Российская Федерация,
yu.matveev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4670-9846>

Е. В. Аверьянова,

к.х.н., доцент,
Бийский технологический институт
(филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный технический университет
им. И.И. Ползунова»,
659305, г. Бийск, ул. им. Героя Советского

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuri I. Matveev,

Cand. Sci. (Physics and Mathematics),
Senior Scientist,
N.M. Emanuel Institute of Biochemical
Physics RAS,
4, Kosygin St., Moscow, 117997,
Russian Federation,
yu.matveev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4670-9846>

Elena V. Averyanova,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of Biotechnology,
Biysk Technological Institute (branch)
of the Altay State Technical University,
27, Hero of the Soviet Union Trofimov St.,
Biysk, 659305,

Союза Трофимова, 27,
Российская Федерация,
averianova.ev@bti.secna.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2144-1238>

Russian Federation,
averianova.ev@bti.secna.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2144-1238>

Вклад авторов

Оба автора сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

*Поступила в редакцию 28.05.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

*The article was submitted 28.05.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*