

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Розробка способу отримання рослинних протеаз з проростків насіння
соняшника**

Допущена до захисту
«__»_____ 2023 р.

Кваліфікаційна робота бакалавра
кафедри
Дем'янова Поліна Артемівна

Завідувач кафедри

Оцінка «_____»
Голова ЕК _____
«__»_____ 2023 р.

Науковий керівник:
к.б.н., доцент Ковальова М.К.

Харків 2023

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Розробка способу отримання рослинних протеаз з проростків насіння соняшника».

Робота включає: 56 сторінки, використаних джерел – 64.

Мета роботи: провести літературний аналіз щодо способів отримання рослинних протеаз з насіння соняшника.

Для досягнення мети було проведено літературний аналіз щодо властивостей та застосування рослинних протеаз. Проаналізовано спосіб отримання ферментного екстракту зі шроту соняшнику, визначені умови виділення білкового екстракту та проведено аналіз отриманого ферментативного екстракту щодо активності згортання молока. Отримані результати порівнювали з отриманими раніше експериментальними даними інших дослідників.

Проста і дешева процедура часткового очищення ферменту, яка була застосована в проаналізованому дослідженні, разом з доступністю шроту соняшника, може бути використана для широкомасштабного виробництва ферменту.

Ключові слова: *рослинні протеази, насіння соняшника, ферментативна активність щодо згортання молока*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ЗМІСТ	3
ВСТУП	5
Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Роль білків у розвитку рослин.....	6
1.2. Характеристика деяких рослинних протеаз	9
1.3. Використання рослинних протеаз	11
1.4 Отримання рослинних протеаз.....	18
1.5. Фізичні та хімічні характеристики насіння соняшника.....	21
1.6 Активація ферментів в процесі проростання насіння соняшника.....	22
1.7. Способи отримання нативних ферментів з проростків насіння соняшника.....	27
1.8. Методи оцінки протеолітичної активності ферментів.	28
1.9 Отримання рослинних протеаз з проростків насіння соняшника	35
2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ.....	37
2.1 Об'єкт дослідження.....	37
2.2 Екстрагування сирого екстракту ферменту згортання молока.....	37
2.3. Часткове очищення сирого ферменту згортання молока.....	38
2.4 Концентрування частково очищеного сирого ферменту згортання молока.....	38
2.5 Ферментний аналіз ферментного екстракту соняшника.....	39
2.6 Визначення активності згортання молока (МЗА).....	39
2.7 Оцінка концентрації загального білка в екстракті ферменту згортання молока.....	40
2.8 Характеристика соняшникового ферментного екстракту.....	40
3. РЕЗУЛЬТАТИ	
3.1 Визначення активності згортання молока (МЗА) ферментного екстракту соняшника.....	41

3.2 Оцінка концентрації загального білка у ферментному екстракті соняшнику.....	42
3.3 Характеристика СФЕ (соняшникового ферментного екстракту).....	43
3.4 Фізико-хімічні властивості очищеного соняшникового ферментного екстракту.....	45
3.5 Вплив температури на активність згортання молока (МЗА).....	46
3.6 Вплив концентрації ферментативних екстрактів на активність згортання молока.....	48
<u>ВИСНОВКИ</u>	50
<u>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</u>	51

ВСТУП

Відомо, що протеази — це ферменти, які гідролізують білкові молекули до пептидів і амінокислот. Протеази є найбільш комерційно важливими ферментами через їх багаторазове застосування в харчовій та інших галузях промисловості. Рослини є важливим джерелом протеаз, оскільки рослини потребують протеази протягом усього життєвого циклу. Вони присутні у всіх видах рослинних тканин і, таким чином, можуть бути отримані з природних джерел або отримані за допомогою методів *in vitro* [1].

Одним з перспективніших рослинних джерел щодо отримання протеаз можуть бути насіння соняшника. Цей род рослин широко використовується в нашій країні в сільськогосподарській діяльності. Після отримання олії з насіння соняшника залишається побічний продукт – шрот. Шрот олійних культур містить білок, який можна використовувати для отримання нових продуктів [2].

Тому, метою роботи було провести літературний аналіз щодо використання насіння соняшника в якості джерела рослинних протеаз .

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні задачі:

1. Провести літературний аналіз щодо властивостей рослинних протеаз.
2. Розглянути галузи використання рослинних протеаз.
3. Проаналізувати на прикладі експериментальних робіт способи отримання рослинних протеаз з насіння соняшника.
4. Проаналізувати методи, які використовують для оцінки ферментативної активності рослинних протеаз.

Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Роль білків у розвитку рослин

Білки є важливою складовою рослин, виконуючи різноманітні функції у клітинах рослин. Вони відповідають за ріст, розвиток, фотосинтез, дихання та регуляцію метаболізму рослин.

Однією з основних функцій білків в рослинах є забезпечення підтримки структури клітин та органів рослин. Наприклад, целюлоза - це рослинний білок, який складається з глікозидних одиниць та є основною компонентою клітинної стінки рослин. Целюлоза забезпечує міцність та стійкість клітинної стінки рослини, дозволяючи їй зберігати форму та захищати внутрішні органи. Тобто, білки є компонентами біологічних оболонок, таких як клітинні стінки та мембрани. Вони можуть впливати на проникнення речовин у клітину, захищати її від зовнішніх факторів та регулювати обмін речовин між клітинами [3].

Білки беруть участь у процесах розвитку та диференціації рослинних тканин. Білки, які входять до класу транскрипційних факторів, регулюють транскрипцію генів, що контролюють різноманітні процеси у рослині, такі як ріст та розвиток кореневої системи, регулювання квіткової морфології та формування плодів. Наприклад, фізалін - це рослинний білок, який бере участь у формуванні та диференціації корневих волосків рослин. Він допомагає корневим волоскам проникати у ґрунт та забезпечує їм необхідні поживні речовини та воду. Деякі білки можуть бути відповідальні за розвиток квітки та плодоношення, а інші можуть регулювати зародкову розвиток на початкових стадіях життєвого циклу рослини. Це відбувається завдяки тому, що білки можуть взаємодіяти з іншими молекулами, такими як ДНК та РНК. Певні білки можуть взаємодіяти з регуляторними послідовностями ДНК та відігравати важливу роль у регулюванні генної

експресії. Інші білки можуть брати участь у процесі транскрипції та трансляції, тобто у перетворенні інформації з генів у білкові молекули [4]. Крім того, білки відповідають за процеси фотосинтезу та дихання рослин. Фотосинтетичні білки, такі як хлорофіл, допомагають рослинам перетворювати енергію сонячного світла на хімічну енергію, необхідну для росту та розвитку. Дихальні білки забезпечують утворення енергії шляхом окислювання органічних речовин, яка використовується для клітинних процесів [3].

Рослинні білки регулюють метаболізм рослин та захищають їх від стресових факторів. Фермент кіназа, який знаходиться в мембранах клітин, допомагає передавати сигнали зовнішнього середовища в клітину та регулювати функції рослин. Таким чином, регуляція активності ферменту кінази може вплинути на ріст та розвиток рослини [5].

Білки відіграють важливу роль у захисті рослин від нападів шкідників, вірусів, грибків. Наприклад, білок лектин здатний зв'язуватися зі шкідниками та запобігають їхньому поширенню в рослинах. Білки стресової відповіді також допомагають рослинам пристосовуватись до несприятливих умов, таких як засуха, холод, та інші стресові фактори, забезпечуючи їм необхідний захист та виживання.

З іншого боку, білки приймають участь у зберіганні та використанні поживних речовин. Наприклад, в зернових культурах білки є важливим джерелом білка для людей та тварин, а також можуть бути використані для виробництва біопалива та інших продуктів.

Отже, білки є невід'ємною частиною життєдіяльності рослин та виконують різноманітні функції [6].

Дослідження білків у рослинах має великий потенціал для подальшого розвитку агрономії та створення більш стійких та продуктивних рослинних культур. Вивчення функцій та взаємодії білків у рослинах має великий потенціал для покращення врожайності та стійкості до стресових умов

різних рослинних культур. Збільшення розуміння функцій білків у рослинах може допомогти розробити нові методи контролю за ростом та розвитком рослин, що може бути корисним у сільському господарстві та біотехнології. Інженерна модифікація рослин з використанням генетичних методів може призвести до створення нових білків з певними властивостями, такими як збільшення вмісту білків в плодах або покращення стійкості рослин до шкідників та стресових умов [4].

Крім того, дослідження білків у рослинах може мати практичне застосування в агропромисловому секторі, допомагаючи вирішувати проблеми, пов'язані зі збільшенням врожайності, покращенням якості продукції та зменшенням впливу на навколишнє середовище. Наприклад, дослідження білків може допомогти вивчати механізми взаємодії рослин з мікроорганізмами та розробляти нові методи боротьби з патогенами та шкідниками [4]

1.2 Характеристика деяких рослинних протеаз

Протеази необхідні рослинам у всіх аспектах їхнього життєвого циклу. Вони задіяні від мобілізації запасних білків під час проростання насіння до ініціації програм клітинної смерті та старіння [7].

Протеази - це ферменти, які гідролізують білкові молекули до пептидів та амінокислот. Вони утворюють різноманітну групу ферментів. Специфічність ензимів визначається типом амінокислот, які входять до активного центру та типом зв'язків, які вони можуть гідролізувати [8].

Залежно від місця дії протеази поділяються на екзопротеази та ендопротеази. Екзопротеази можуть розщеплювати N- або C-кінцеві пептидні зв'язки, тоді як ендопептидази розщеплюють внутрішні пептидні зв'язки [9].

Екзопротеази можна поділити на амінопептидази та карбоксипептидази за здатністю розщеплювати N-кінцевий та C-кінцевий пептидний зв'язок.

Ендопротеази класифікують на основі їхнього каталітичного механізму, тобто активного центру ферменту. В залежності від будови каталітичного центру. Основними амінокислотами, які входять у склад каталітичного центру протеаз, є аспартат, серин, цистеїн. Тому виділяють аспарагінові протеази, серинові протеази, цистеїнові і ще металопротеаз [10] (Bah S, 2006). В базі даних MEROPS можна знайти сім родин протеаз: аспарагінові, цистеїнові, глютамінові, метало-, аспарагінові, серинові та татреонін [11]. Але в рослинах виявлено не всі типи ендопротеаз.

Будова каталітичного центру визначає галузь, в якій використовують ці ферменти. Наприклад, як коагулянти молока використовують рослинні протеази перших трьох типів використовуються, в той час як металопротеази для цього не використовують. Серинові та цистеїнові протеази каталітично дуже відрізняються від аспарагінових протеаз та металопротеаз тим, що нуклеофіл каталітичного сайту є частиною амінокислоти, тоді як у двох інших групах він є активованою молекулою води [7].

Аспарагінові протеази мають два аспарагінові залишки в своєму каталітичному сайті. Вони найбільш активні при кислому рН і виявляють переважну специфічність щодо розщеплення пептидних зв'язків між гідрофобними амінокислотними залишками [12].

Протеази можна отримувати з різних частин рослин, а також з різних видів рослин. Наприклад, аспарагінові протеази, що мають активність згортання молока, були виділені з артишоку, розторопши та рисових зерен. З квітів *Cynaracardunculus* було виділено аспарагінову протеазу, яка мала спільну специфічність і кінетичні параметри з хімозином і пепсином [7].

Цистеїнові протеази, також відомі як тіолові протеази, містять в своєму активному центрі цистеїн. Цистеїнові протеази завдяки тому, що вони можуть бути активними в широкому діапазоні температур і рН використовуються у харчовій, біотехнологічній та фармацевтичній

промисловості. Цистеїнові протеази містяться у великій кількості в різних тканинах рослин, що робить їх привабливими для виробництва [13]. Наприклад, фіцин, який має здатність перетравлювати казеїн, був виділений з латексу *Ficus racemosa* [14]. Були протестовані білкові екстракти насіння соняшнику та альбіції і було виявлено, що вони впливали на цільний казеїн великої рогатої худоби. Актинідин був виділений зі стиглих свіжих плодів ківі (*Actinidia chinensis*) [7]. Імбирна протеаза була виділена з кореневищ імбиру (*Zingiber officinale*) з молекулярною масою 36 кДа [14].

Серинові протеази мають залишок серину в своєму активному центрі і мають ряд біохімічних і фізіологічних особливостей. У рослинах вони широко розповсюджені серед таксономічних груп, від дерев і зернових до бобових і трав, і присутні майже у всіх частинах рослин, але найбільш поширені у плодах.

Рослинні серинові протеази були знайдені і виділені з латексу, насіння, квітів, стебел, листя і коренів. Неріфолін, хімотрипсиноподібна серинова протеаза, була очищена з латексу молочаю (*Euphorbia neriiifolia*). Інший фермент неріфолін S, димерна серинова протеаза з молекулярною масою 94 кДа, що має активність згортання молока, був очищений з латексу *E. Neriiifolia* [15]. Релігіозин (43,3 кДа), релігіозин В (63 кДа) та релігіозин С (80 кДа) були виділені з латексу *Ficus religiosa*. Стреблін, термостабільний фермент з молекулярною масою 63 кДа, був очищений з *Streblus asper*. Дубіумін був очищений з насіння *Solanum dubium*, що має молекулярну масу 66 кДа. Кукумізин з *Cucumis melo* та летуцин з *Lactuca sativa* були виділені та використані як коагулянти молока [7].

1.3 Використання рослинних протеаз

Протеазигідролізуютьбілковімолекулидопептидівтаамінокислот.

Рослиниєпривабливимджереломрослиннихпротеаз. Вони присутні у всіх

видах рослинних тканин і, таким чином, можуть бути вилучені з природних джерел або отримані за допомогою різних методів культивування клітин. Найпоширенішими рослинними протеазами є папаїн, бромелайн, фіцін, Найчастіше рослинні протеази використовуються в молочній промисловості, виробництві м'яса, при виробництві біологічно активних пептидів та в хлібопекарській промисловості [1].

Молочна промисловість.

Рослинні протеази мають здатність згортати молочні білки, тому їх використовують для згортання молока, як зманніник телячого сичуга. Обмеженнями щодо використання телячого сичуга може бути його доступність і висока ціна, релігійні погляди, дієта або заборона на отримання рекомбінантного телячого сичугу у деяких країнах. Тобто, рослинні протеази мають певні переваги над телячим сичугом.

Більшість протеаз, що використовуються як ферменти для згортання молока, є аспарагіновими протеазами, але протеази, що належать до цистеїнової та серинової груп, також мають активність щодо згортання молока, але за певних умов [7].

Рослинні протеази використовуються для виготовлення різних сортів сиру в Середземномор'ї, Західній Африці та країнах Південної Європи. Іспанія та Португалія є найбільшими виробниками сирів з використанням рослинних протеаз з *Cynara spp.* [16].

В результаті досліджень були виявлені певні відмінності фізико-хімічних властивостей сирів при використанні тваринного (сичужного ферменту) та рослинних протеаз (отримані з *Cynaracardunculus*). В роботі [17]. Було показано, що в сирах LosPedroches вміст вологита білка були вищими, а вміст жиру та розчинного азоту був нижчим в сирах, виготовлених за допомогою тваринного сичужного фермента, порівняно з сирами, виготовлених з використанням рослинних білків.

В роботі [18] показано, що сири MurciaalVino, виготовлені з козячого молока та з використанням сичужного фермента, мали менш виражений запах та смак, мали трохи чистіший колір, були твердішими та зернистішим, але менш кремоподібні, ніж сири, виготовлені з рослинним коагулянтном.

В роботі [19] показано, що використання рослинного коагулянту для виробництва козячого сиру прискорювало дозрівання сиру і впливало на смакові характеристики сиру [19].

Pinota ін. [20] виявили, що рослинний коагулянт при рН 4,6 приводив до збільшення кількості розчиненого азоту в молоці, більшому розщепленню α -казеїну та утворенню гідрофобних пептидів, а також більш високому співвідношенню гідрофобних/гідрофільних пептидів протягом всього періоду дозрівання, ніж телячий сичуг.

Лібурді та ін. [21] розробили ферментний біореактор, з використанням іммобілізаційної телячої сичужної ферменту та рослинного коагулянту з *Cynar acardunculus* на магнітних носіях CLEA®. Розроблену технологію вони рекомендували використовувати для виробництва м'яких сирів шляхом безперервного процесу коагуляції молока.

Еспозіто та ін. [22] виділили аспарагінову протеазу з квітів розторопші альпійської та іммобілізували її на поліакриловому носії. Фермент мав активність та стабільність у часі при рН 5,0, що найчастіше використовується для згортання молока під час виробництва сиру,

В роботі Сальвадор та ін. [23] виділили та очистили аспарагінові протеази з насіння *Centaurea calcitrapa* під час проростання. Було виявлено, що очищений фермент має оптимальний діапазон дії при рН 3,5-4,5, (тести щодо розщеплення білків проводили на FTS-гемоглобіні та при температурі 52°C). Час згортання білка екстрактами насіння був подібним до часу згортання білка екстрактами, отриманими з квітів.

Egito та ін. [24] вивчали активність згортання молока екстрактами насіння альбіції (*Albizia lebeck*) та соняшника (*Helianthus annuus*). Було показано, що

екстракт з насіння альбіції показав вищу питому активність згортання, ніж екстракт з насіння соняшнику. Екстракт альбіції та соняшнику гідролізують κ-казеїн на Lys116-Thr117 та Phe105-Met106 відповідно.

Таким чином, використання рослинних ферментів для гортання молока призводить до протеолізу білків, зміни фізико-хімічних властивостей сирів і, як результат, до зміни смакових характеристик. Тому постійно досліджуються нові рослинні коагулянти щоб задовольнити зростаючий світовий попит на різноманітне та високоякісне виробництво сирів [25, 7].

Тендеризація м'яса.

Відомо, що в харчовій галузі широко використовують тендеризацію м'яса – це хімічні або фізичні способи його розм'якшення. Протеази, отримані з різних рослинних джерел, також застосовуються для розм'якшення м'яса [26, 27]. Тому проводяться різні дослідження щодо отримання, використання рослинних протеаз для даного процесу.

В роботі [28] досліджували вплив різних рослинних протеаз (папаїн, бромелайн, актинідин та зінгібаїн) на яловичі білки і виявили, що ці протеази мають різну активність щодо тваринних білків. Білки міофібрил найефективніше гідролізувалися актинідином, а білки сполучної тканини – зінгібаїном. Таким чином, ці ферменти мають потенціал для специфічного застосування в тендеризації.

В іншому дослідженні [29] показано, що протеазна активність екстракту протеази ківі була більше ефективною гідролізувала яловичі (міофібрилярні та колагенові) білки, ніж екстракт протеази спаржі. Ці протеази мали різну активність щодо гідролізу міофібрилів та колагену. Тобто, рослинні протеази можуть бути використані для пом'якшення певних видів м'яса, базуючись на їхньому внутрішньому білковому складі. Було виявлено, що використання хімічного способу (ферментів) разом з фізичним чинником (ультразвуком) приводило до більш ефективного гідролізу тваринних білків. Найвища протеолітична активність і ніжність

м'яса спостерігалися при використанні комбінованої обробці ультразвуком потужністю 100 Вт протягом 20 хв. [30]ю

Модифікація борошна/тіста

Ферментативна модифікація харчових компонентів є ефективним засобом покращення їх техніко-функціональних властивостей. Протеази

використовуються в хлібопекарській промисловості для гідролізу глютену для виробництва безглютенових продуктів. Також протеази використовують для модифікації обробки тіста, зміни еластичності клейковини та текстури, що може привести до скорочення часу перемішування та збільшення об'єму буханки буханця хлібу [7]

Чента ін. [31] вивчали вплив папаїну на властивості пшеничного борошна. Було показано, що гідроліз під дією папаїну мав великий вплив на клейстеризаційні властивості борошна шляхом зміни його структурних характеристик особливо на ранній стадії гідролізу. Параметри клейстеризації (пік і спад) значно знижувалися зі збільшенням концентрації папаїну. Температура склеювання і час склеювання значно зростали зі збільшенням концентрації папаїну.

Відомо, що фермент поліфенолоксидаза в присутності кисню утворює окрашені продукти, що впливає на зовнішній вигляд продуктів. В результаті хімічних реакцій хлібобулочні вироби темнішають та не мають непривабливий вигляд. В роботі [32] вивчали вплив папаїну а активність поліфенооксидази. Біло показано, що висока концентрація папаїну (0,010%, мас.) знижувала активність поліфенооксидази, що може бути пов'язано зі зв'язуванням, або з гідролізом специфічних амінокислотних ділянок поліфенооксидази. Також, папаїн зменшував швидкість підрум'янювання цільнозернового тіста порівняно з контрольним тістом. Наявність папаїну призводила до зниження пружності та в'язкості тіста, що може бути пов'язано з деградацією білка борошна та вивільненням амілолітичних ферментів під дією папаїну.

Ще в роботі Tanabe та ін. [33] використовували бромелайн для гідролізу епітопу IgE пшеничного глютеніну та для отримання гіпоалергенного пшеничного борошна. Хліб, приготований з гіпоалергенного пшеничного борошна, мав кращі смакові характеристики, ніж хліб, який був виготовлений з м'якого борошна.

Natta та ін. [34] показали, що фермент папаїн збільшив питомий об'єм безглютенового рисового хліба та зменшив твердість м'якушки порівняно з контрольним хлібом. В результаті проведення сканувальної електронної мікроскопії було виявлено багато дрібних бульбашкових клітин у м'якушці рисового хліба, обробленого папаїном. За результатами електрофорезу білка з рисового тіста було показано, що концентрація низькомолекулярних білків (ММ менше 10 кДа) зростає при використанні папаїну порівняно з контрольним рисовим тістом. Були виявлені невеликі білкові агрегати, які утворювалися завдяки дисульфідним зв'язкам, що допомагало утримувати газ CO₂ під час процесу ферментації. Це призводило до збільшення питомого об'єму та зменшення твердості м'якушки безглютенового рисового хліба.

Li та ін. [35] оцінювали вплив різних ферментів на пшеничне борошно і показали, що алкалаза і папаїн мають більшу здатність зменшувати кількість гліадину (компонент глютену) у пшеничному борошні. Послідовна обробка пшеничного борошна алкалазою-папаїном була більш ефективною для зниження вмісту гліадину, ніж обробка одним ферментом. Оптимізовані умови послідовної ферментативної обробки призвели до повного видалення гліадину з борошна, що може бути використаний для приготування низькоалергенних пшеничних продуктів.

Використання протеаз для отримання біоактивних пептидів

Біоактивні пептиди - це специфічні білкові фрагменти, які мають позитивний вплив на стан та функції організму [36]. Це короткі послідовності амінокислот (~2-30) з низькою молекулярною масою, які можуть бути отримані як з тваринних [37] та рослинних джерел [38].

Амінокислотний склад і їх послідовність визначає біологічну активність пептиду

Біоактивні пептиди мають високий потенціал для використання їх в якості біологічно активних сполук або в якості функціональних продуктів харчування для покращення здоров'я та зменшення ймовірності виникнення захворювань. Ці пептиди позитивно впливають на імунну, серцево-судинно-нервову системи [39]. Вони мають гіполіпемічну, антигіпертензивну, антитромботичну, імуномодулюючу та антикаріогенну дію [40].

Біоактивні пептиди утворюються під час переробки харчових продуктів або з побічних продуктів харчування шляхом мікробної ферментації або хімічного/ферментативного гідролізу з використанням протеолітичних ферментів, отриманих з тварин, мікроорганізмів або рослин [41]. Ферментативний гідроліз є найпоширенішим способом, який використовується для виробництва біологічно активних пептидів. Такі рослинні протеази як папаїн, бромелайн, фіцин, актинідин, зінгібаїн, сальпіхроїн, помоферин, ципрозин, кардозин, цинарази та онопордозин були використані для виробництва біологічно активних пептидів [8].

Щодо біологічної активності рослинних протеаз є різні експериментальні дані. Показано, що рослинні протеази (папаїн і бромелайн) утворюють гідролізати плазми різних тварин (оленів, овець і свиней) з меншим виходом розчинних пептидів порівняно з грибовими протеазами. Гідролізати, отримані за допомогою рослинних протеаз, показали нижчу здатність до поглинання DPPH-радикалів, поглинання кисневих радикалів та ферумвідновлювальну антиоксидантну здатність порівняно з гідролізатами, отриманими з грибовими протеазами [8].

В іншому дослідженні білкові гідролізати з фракцій еритроцитів, виділених з крові різних тварин (оленів, овець, свиней і великої рогатої худоби) з використанням рослинних і грибових протеаз показали, що гідролізати з

фракцій еритроцитів, отримані за допомогою папаїнових протеаз, мали вищу залізовідновлювальнуантиоксидантну здатність та здатність поглинання кисневих радикалів порівняно з тими, що згенерованими за допомогою бромелаїну та грибкових протеаз [8].

В роботі [42] використовували протеазу з плодів *Salpichroaoriganifolia* для гідролізу концентратів сироваткових білків і показали, що ця протеаза гідролізувала α -лактальбумінбілок з більшою спорідненістю, ніж β -лактоглобулін. Фракція, що містила пептидиз молекулярною масою менше 3 кДа демонструвала сильне DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозил) радикальний ефект.

1.4 Отримання рослинних протеаз

Виробництво з природних джерел

Рослинні протеази можуть бути отримані з природних джерел шляхом водної мацерації різних органів рослин, таких як квіти, насіння, коріння та листя [7]. Отриманий таким чином сирій екстракт може бути додатково очищений для отримання частково очищеного ферменту або чистого ферменту, залежно від ступеня очищення. Осадження сульфатом амонію сульфатом амонію є ефективним способом отримання значних кількостей активних протеаз [8].

Протеазу тамарилін екстрагували з плодів (*CyphomandrabetaceaCav.*) і очистили осадженням сульфатом амонію та хроматографією на діетиламіноетилсефарозі. Аналіз електрофорезу в додецилсульфатно-поліакриламідному гелі натрію показав, що пік з найвищою протеазною активністю складався з одного білка з молекулярною масою близько 70 кДа. Оптимальну активність протеаза проявляла при 11 та 60 °C [43].

Века та ін. [44] виділили екстракт протеази з м'якоті плодів *Balanitesaegyptiaca*. Ці плоди дезінфікували, очищали від лушпиння та замочували в різних буферах і фізіологічних розчинах та сольових розчинах.

Отримані екстракти діафільтрували, концентрували та знебарвлювали активованим вугіллям.

Gagaoua та ін. [45] виділили зінгібаїн з кореневищ *Zingiber officinale*. Подрібнені кореневища імбиру гомогенізували з 50 мМ натрій фосфатним буфером (рН 7,0), що містить 10 мМ L-цистеїну. Отриманий таким чином гомогенат перемішували безперервно протягом 45 хв при 4 С, а потім фільтрували. Фільтрат центрифугували та концентрували за допомогою сульфату амонію до 80% насичення. Після нічного осаду, діалізований екстракт піддавали триразовому очищенні. Максимальна протеолітична активність ферменту була при температурі 60 °С та рН 7,0.

Рослинні протеази також можна отримати в системі *in vitro*, тому що рослинні клітини є тотипотентними і, таким чином, здатні виробляти однакові хімічні сполуки як *in vitro*, так *in vivo*. Відрізняється тільки вихід ферментів. Як правило, вихід рослинних протеаз, отриманих *in vitro*, нижче, ніж *in vivo*. Різні органи рослин продукують протеази з різною активністю [46].

Для отримання ферментів *in vitro*, можна, наприклад використовувати калусні культури та культури клітинних суспензій. Так, протеази були отримані з культури *Mirabilis jalapa*, з культури клітинної суспензії *Centaurea calcitrapa* та з культури калусу *Silybum marianum* та *Cynara cardunculus* [8].

Калусну культуру отримували з сім'ядолей *Cynara cardunculus*. Калуси субкультивували щомісяця на середовищі Гамборга В5 та додавали дихлорфеноксоцтову кислоту (1 мг/л), бензиладенін (0,1 мг/л), аскорбінову кислоту (5 мг/л) та лимонну кислоту (5 мг/л). Культури підтримували при температурі 24 °С і в темряві [47].

Умови для отримання клітинної суспензії *Centaurea calcitrapa* були наступні: гомогенізували в 50 мМ трис-НСl, рН 8,1, 1 мМ ЕДТА та 3 мМ

меркаптоетанолу (буфер А), при 4 °С, і обробляли ультразвуком. Гомогенат центрифугували при 4 °С, щоб отримати сирий екстракт [48].

З використанням методів молекулярної біології було отримано фермент з квіток *Cirsium vulgare* [49]. Також було отримано рекомбінантний прогалін В, аспарагінову протеазу з *Galium verum*, експресовану в дріжджах *Pichia pastoris* [8].

Методи *in vitro* мають певні переваги. По-перше, виробництво рослинних протеаз за допомогою методів *invitro* призводить до більшого виходу ферментів і мінімізує кількість процедур екстракції при вилученні ферментів з природних джерел. По-друге, в данному випадку відсутній вплив кліматичних і сезонних чинників на процес синтезу ферментів, а також зменшує гетерогенність ферментів, які отримані з різних частин рослини [8].

1.5 Фізичні та хімічні характеристики насіння соняшника

Насіння соняшника - це продукт, що містить багато корисних поживних речовин і використовується в різних галузях промисловості.

Склад насіння соняшника може залежати від сорту та умов його вирощування, але загалом насіння соняшника складається з наступних поживних речовин:

- Білки: насіння соняшника містить близько 20-25% білків, що є важливим джерелом білків для людей та тварин.
- Жири: насіння соняшника містить близько 45-55% жирів, зокрема багато ненасичених жирних кислот, таких як лінолева та олеїнова кислоти, що допомагають підтримувати здоров'я серцево-судинної системи.
- Вуглеводи: насіння соняшника містить близько 15-25% вуглеводів, зокрема цукри, крохмал та дієтичні волокна.

- Вітаміни та мінерали: насіння соняшника містить багато вітамінів та мінералів, зокрема вітамін Е, вітаміни групи В, магній, фосфор, калій, залізо та інші.
- Розмір та форма: насіння соняшника має довгасту форму та завдовжки близько 1-2 см.
- Колір: насіння соняшника може мати різний колір, зазвичай вони жовтого або коричневого кольору.

Насіння соняшника є корисним та поживним продуктом, який використовується як у харчовій промисловості, так і у тваринництві та промисловості виробництва олії. Також, насіння соняшника використовується для виробництва різних продуктів, таких як насінний шрот, який є важливим компонентом в раціонах тварин, для приготування різних харчових продуктів для людей.

Наприклад, олія з насіння соняшника має світлу жовтувату барву та нейтральний смак, вона широко використовується в готуванні та кондитерській промисловості. Крім того, олія з насіння соняшника є дешевшою, ніж інші рослинні олії, тому вона часто використовується у виробництві маргарину та інших продуктів з високим вмістом жирів.

Насіння соняшника також містить антиоксиданти, які допомагають захистити організм від вільних радикалів та запобігти пошкодженню клітин. Крім того, дослідження показали, що споживання насіння соняшника може допомогти знизити ризик розвитку серцево-судинних захворювань, цукрового діабету та деяких типів раку [50].

1.6 Активація ферментів в процесі проростання насіння соняшника

Активація ферментів - це процес збільшення активності ферментів в організмі. Ферменти - це білкові каталізатори, що прискорюють хімічні реакції в клітинах організму. Активність ферментів може змінюватися в

залежності від різних факторів, таких як температура, рН, концентрація субстрату та інші.

У процесі проростання насіння соняшника, активація ферментів є важливим етапом, що дозволяє здійснити необхідні хімічні реакції для подальшого розвитку рослини. Зокрема, ферменти відповідають за розщеплення складних молекул, таких як білки, вуглеводи та жири, на менші компоненти, що можуть бути використані для росту та розвитку рослини [51].

Дослідження динаміки активації ферментів в процесі проростання насіння соняшника можуть дати більш детальне розуміння фізіологічних процесів, що відбуваються в клітинах рослини. Це може допомогти в покращенні методів вирощування рослин, збільшенні врожайності та покращенні якості продукції. Наприклад, знання про активність ферментів можуть допомогти в оптимізації режиму поливу, добрив та інших агротехнологій для отримання максимального врожаю. Крім того, дослідження активації ферментів можуть мати застосування в медицині та промисловості, наприклад, в розробці нових методів біотехнологічної виробництва [51].

Дослідження динаміки активації ферментів в процесі проростання насіння соняшника можуть проводитися з використанням різних методів, таких як спектрофотометрія, електрофорез, флюоресценційні методи та інші. Для вивчення активності ферментів можуть використовуватися різні субстрати, які залежать від конкретного ферменту [51].

Наприклад, для вивчення активності амілази, яка розщеплює крохмаль на мальтозу, можуть використовуватися спеціальні тест-системи з додаванням індикаторів, що змінюють колір під впливом мальтози. Для вивчення активності протеаз, які розщеплюють білки, можуть використовуватися спеціальні білкові субстрати, які забарвлюються під впливом розщеплених білків [51].

Під час проростання насіння соняшника відбувається активація різних ферментів, що впливає на метаболізм рослини та її розвиток. Основними

ферментами, які активуються в процесі проростання насіння соняшника, є амілаза, протеази, ліпаза та фосфатаза [51].

Амілаза розщеплює крохмаль на мальтозу, яка є важливим джерелом енергії для розвитку проростка. Протеази розщеплюють білки на амінокислоти, що є необхідним для будівельних блоків рослини та розвитку кореневої системи. Ліпаза розщеплює жири на гліцерин та жирні кислоти, що є важливими для забезпечення енергією для росту проростка. Фосфатаза розщеплює органічні фосфати на неорганічні, що сприяє накопиченню необхідних поживних речовин у рослині.

Фітази є ферментами, що розкладають фітин у насінні. Фітин є недоступним джерелом фосфору для рослин, оскільки він зв'язаний з іншими компонентами у клітинній стінці насіння. Фітази допомагають розкласти фітин, що звільняє фосфор, необхідний для росту проростків.

Каталази є ферментами, що каталізують розклад перекису водню водою та киснем. Перекис водню утворюється в клітинах проростків як небезпечний побічний продукт метаболізму, оскільки він може пошкодити клітини. Каталази допомагають знизити рівень перекису водню в клітинах проростків, що зменшує його шкідливий вплив на клітини.

Динаміка активації цих ферментів залежить від багатьох факторів, таких як температура, вологість, освітлення, наявність поживних речовин тощо. Наприклад, збільшення температури може спричинити прискорення реакцій, що залежать від ферментів, але занадто висока температура може спричинити їхню денатурацію та втрату активності [51].

Також важливо зазначити, що динаміка активації ферментів може різнитися в залежності від стадії проростання насіння соняшника. Наприклад, на початковій стадії проростання активність амілази може бути дуже високою, оскільки це дозволяє рослині швидко накопичувати енергію. Але з розвитком проростка та збільшенням його розмірів активність амілази може зменшуватися, оскільки більші розміри проростка дозволяють йому

зберігати більше енергії. Також, збільшення активності протеаз та ліпаз може сприяти формуванню кореневої системи та забезпеченню рослини необхідними поживними речовинами.

Основні етапи проростання насіння соняшника та активація ферментів можуть бути представлені наступною послідовністю:

1. Під час першого етапу проростання насіння соняшника відбувається активація ферментів.
2. Активність амілаз збільшується, що допомагає у розкладі крохмалю на прості цукри.
3. Протеази та ліпази також починають розкладати запаси білків та ліпідів відповідно.
4. Фосфатази допомагають у звільненні фосфору, який є важливим для синтезу нуклеїнових кислот та інших сполук.
5. Під час другого етапу проростання насіння, коли проросток починає фотосинтезувати та отримувати енергію з сонячного світла, активація ферментів стабілізується та зменшується.
6. У цей період активність ферментів залежить від умов навколишнього середовища, таких як температура та вологість.
7. На кінцевих етапах проростання насіння активність ферментів зазвичай знижується до мінімуму, коли проросток стає здатним до самостійного життя.
8. Якщо проросток не отримує достатньої кількості світла або харчових речовин, активність ферментів може знову збільшуватись, аби компенсувати дефіцит.

Слід зауважити, що динаміка активації ферментів може відрізнитися в залежності від стадії проростання. Наприклад, на початковій стадії проростання активність гідролаз, таких як α -амілаза та протеази, може бути високою для розкладу запасів енергії та білків у насінні, але з часом активність цих ферментів може зменшуватись, оскільки наявність інших

джерел енергії та поживних речовин збільшується. На пізніших стадіях проростання, активність ферментів, що стимулюють клітинний дихання та синтез білків, може збільшуватись [52].

У процесі проростання насіння соняшника, також відбуваються інші біохімічні процеси, такі як фотосинтез та гліколіз. Фотосинтез є процесом, за якого соняшникові проростки здатні синтезувати органічні речовини з використанням світла. Гліколіз є процесом розкладу глюкози для отримання енергії та побічним продуктом є лактат або спирт.

Динаміка активації ферментів у процесі проростання насіння соняшника також може бути вплинута зовнішніми факторами, такими як хімічні речовини, які використовуються для обробки насіння або ґрунту, у якому вони ростуть. Наприклад, деякі добрива можуть сприяти активації ферментів, які стимулюють ріст та розвиток рослин, в той час як інші речовини можуть знижувати активність ферментів або навіть знищувати їх [52].

Важливо зазначити, що динаміка активації ферментів в процесі проростання насіння соняшника може відрізнятися в залежності від сорту соняшника.

Динаміка активації ферментів у процесі проростання насіння соняшника також може бути пов'язана з регуляторними факторами, такими як гормони росту та інші біологічно активні сполуки. Наприклад, гібереліни є гормонами, які стимулюють ріст та розвиток рослин, включаючи проростання насіння. Ці гормони можуть впливати на активність ферментів, які беруть участь у метаболічних процесах, що відбуваються під час проростання.

Слід зазначити, що динаміка активації ферментів у процесі проростання насіння соняшника може бути пов'язана з його харчовою цінністю. Наприклад, дослідження показують, що активність ферментів у насінні соняшника впливає на його вміст білка та інших корисних речовин, таких як амінокислоти та вітаміни. Вивчення динаміки активації ферментів може

допомогти визначити оптимальний час для збирання насіння, що забезпечить максимальну якість та кількість корисних речовин у ньому.

Дослідження динаміки активації ферментів можуть бути корисні для розробки нових методів обробки насіння та розвитку нових продуктів на основі соняшника. Наприклад, на основі знань про динаміку активації ферментів можуть бути розроблені нові методи отримання олії з насіння соняшника, які дозволяють зберегти більше корисних речовин та знизити витрати енергії на виробництво.

Таким чином, динаміка активації ферментів у процесі проростання насіння соняшника є важливим об'єктом дослідження в біохімії та сільському господарстві, який може мати практичне застосування у виробництві продуктів харчування та розвитку нових технологій вирощування рослин [52].

1.7 Способи отримання нативних ферментів з проростків насіння соняшника

Нативні ферменти можна отримати з проростків насіння соняшника за допомогою різних методів. Основні способи отримання нативних ферментів з проростків насіння соняшника наведені нижче:

1. Метод екстракції: полягає в розмелюванні проростків насіння соняшника та екстрагуванні ферментів з отриманої маси за допомогою різних розчинників, таких як буферні розчини, фізіологічні розчини та інші. Після екстракції ферментів проводять очищення та фракціонування отриманої суміші.
2. Метод фракціонування: полягає в розщепленні отриманої суміші ферментів на окремі фракції за допомогою різних методів, таких як хроматографія, електрофорез та інші.

3. Метод сушіння: полягає в сушінні проростків насіння соняшника та отриманні нативних ферментів шляхом вилучення води з клітин та тканин рослини.

4. Метод відновлення: полягає в відновленні ферментів з інактивованих станів шляхом зміни рівня рН, температури та інших факторів.

5. Метод ферментації: полягає в збільшенні кількості ферментів у проростках насіння соняшника за допомогою мікроорганізмів або додаткових факторів, таких як різноманітні ростові стимулятори.

Нативні ферменти з проростків насіння соняшника мають декілька переваг порівняно з ферментами, отриманими з інших джерел. Вони більш стабільні при високих температурах та різних рівнях рН, а також мають більш високу активність при більш низьких концентраціях [53].

1.8 Методи оцінки протеолітичної активності ферментів.

Протеолітична активність ферментів може бути оцінена за допомогою різних методів.

- Метод з використанням пептону.

Цей метод полягає у додаванні ферменту до розчину пептону та спостереженні за змінами у концентрації пептону після певного часу. Пептон - це суміш пептидів та амінокислот, які можуть бути розщеплені протеазами. Ферменти, що мають високу протеолітичну активність, здатні розщеплювати пептон на більш малі пептиди та амінокислоти.

Метод може бути якісним або кількісним. У якісному варіанті, реакція ферменту з пептоном оцінюється візуально на зміну кольору, яка пов'язана зі зміною концентрації пептону. У кількісному варіанті, концентрація пептону визначається спектрофотометрично за допомогою стандартної кривої калібрування, що побудована з відомих концентрацій пептону.

Цей метод є досить простим та швидким, а також він може бути використаний для оцінки протеолітичної активності різних типів ферментів.

Однак, його недоліком є те, що пептон є досить простим субстратом, що не відображає повної складності пептидних субстратів, які фермент може зустріти в біологічних системах. Тому, деякі дослідники використовують більш складні субстрати для оцінки протеолітичної активності ферментів [54].

- Метод з використанням казеїну.

Це метод оцінки протеолітичної активності ферментів. Казеїн є білком, який міститься у молоці та є підходящим субстратом для багатьох протеаз.

Цей метод полягає у додаванні ферменту до розчину казеїну та спостереженні за змінами у концентрації казеїну після певного часу. Казеїн може бути розщеплено на більш малі пептиди та амінокислоти ферментами, що мають протеолітичну активність.

Як і у випадку з методом з використанням пептону, метод з казеїном може бути якісним або кількісним. У якісному варіанті, зміни у концентрації казеїну оцінюються візуально на зміну кольору, який пов'язаний зі зміною концентрації казеїну. У кількісному варіанті, концентрація казеїну визначається спектрофотометрично за допомогою стандартної кривої калібрування, що побудована з відомих концентрацій казеїну.

Цей метод є досить простим та швидким, а також він може бути використаний для оцінки протеолітичної активності різних типів ферментів, включаючи комерційні препарати ферментів. Однак, його недоліком є те, що казеїн є досить простим субстратом, який не відображає повної складності пептидних субстратів, які фермент може зустріти в біологічних системах. Тому, деякі дослідники використовують більш складні субстрати для оцінки протеолітичної активності ферментів [54].

- Метод з використанням зеленого еритрозину.

Зелений еритрозин є білкометричним індикатором, який змінює свій колір в залежності від рівня протеолітичної активності.

Цей метод полягає у додаванні ферменту до розчину зеленого еритрозину та спостереженні за змінами у колірній інтенсивності після певного часу. Якщо протеолітична активність ферменту присутня, то він здатен розщеплювати зелений еритрозин на менші фрагменти, що призводить до зміни його кольору з зеленого до рожевого.

Метод може бути якісним або кількісним. У якісному варіанті, зміни у колірі оцінюються візуально, а у кількісному варіанті, колірна інтенсивність визначається спектрофотометрично за допомогою стандартної кривої калібрування. Цей метод є досить чутливим та специфічним для оцінки протеолітичної активності ферментів, оскільки зміни у колірі пов'язані зі змінами в структурі та конформації зеленого еритрозину. Однак, його недоліком є те, що зелений еритрозин не є природнім субстратом для більшості протеаз, тому він може не відображати повної складності пептидних субстратів, які фермент може зустріти в біологічних системах. Також, використання зеленого еритрозину може бути дорогим та не дуже практичним для використання в більш широкому масштабі [54].

*Метод з використанням спектрофотометрії.

Цей метод полягає у вимірюванні зміни в поглинанні світла ферментом за певних умов. Зазвичай використовують спектрофотометри з ультрафіолетової або видимої області спектру. Фермент додається до розчину реактиву, що змінює своє поглинання світла під впливом ферменту. Час вимірювання залежить від конкретного ферменту та умов експерименту. Кількісна оцінка протеолітичної активності ферменту здійснюється шляхом порівняння поглинання зі стандартом або контрольним зразком, що не містить ферменту. Цей метод є дуже точним та надійним, але він також може бути досить складним та часовим затратним у порівнянні з іншими методами оцінки протеолітичної активності ферментів. Тому, вибір методу залежить від конкретної ситуації та завдання дослідження.

Ці методи можуть бути використані як окремо, так і в поєднанні з іншими методами для більш точної оцінки протеолітичної активності ферментів.

Також для оцінки протеолітичної активності ферментів використовують кількісний та якісний аналіз.

Кількісний аналіз передбачає вимірювання швидкості реакції розкладу білків під дією ферменту. Цей метод зазвичай використовується для порівняння протеолітичної активності різних ферментів, які можуть виконувати однакову функцію.

Якісний аналіз передбачає визначення наявності протеолітичної активності у ферментів шляхом спостереження за змінами у реакційному середовищі. Цей метод зазвичай використовується для виявлення наявності ферменту з протеолітичною активністю в зразках.

Інші методи оцінки протеолітичної активності ферментів включають метод з використанням зон прозорості на гелі, електрофорез та імуноензимний аналіз [56].

Наприклад, метод з використанням зон прозорості на гелі дозволяє визначати активність ферменту шляхом вимірювання зони прозорості в гелі, яка з'являється після розкладу білка ферментом. Електрофорез дозволяє розділити ферменти за їхньою молекулярною масою та оцінити їхню протеолітичну активність у різних умовах. Імуноензимний аналіз використовується для виявлення наявності конкретного ферменту у зразках та оцінки його активності.

Загалом, вибір методу оцінки протеолітичної активності ферментів залежить від багатьох факторів, включаючи тип ферменту, його концентрацію, реакційні умови та інші фактори.

Детальніше про кількісний аналіз протеолітичної активності ферментів:

Цей метод базується на вимірюванні швидкості реакції розкладу білків під дією ферменту. Існує кілька способів вимірювання швидкості реакції розкладу білків, наприклад:

*Спектрофотометричний аналіз – це метод вимірювання поглинання або прохідності світла речовинами у певному діапазоні довжин хвиль. У біохімії та молекулярній біології спектрофотометрія є одним з найважливіших методів дослідження, особливо для вивчення білків та нуклеїнових кислот.

*Електрофоретичний аналіз - цей метод базується на розділенні ферментів за їхньою молекулярною масою та оцінці їхньої протеолітичної активності у різних умовах. Цей метод може бути використаний для визначення активності ферментів, які розкладають білки на високому рівні. Наприклад, для визначення активності ферменту папаїну можна використовувати електрофорез у поліакриламідному гелі з використанням субстрату, який містить білки, і спостерігати за розщепленням субстрату ферментом. Потім проводять електрофорез гелю та аналізують результати, щоб визначити активність ферменту та його відношення до інших ферментів. Також електрофорез може бути використаний для визначення генетичних властивостей ферментів, таких як ізоензими. Це дозволяє встановити різницю в генетичному складі ферментів у різних організмах, що може бути корисним для таких галузей, як медицина та сільське господарство.

Електрофоретичний аналіз може бути використаний для визначення ензимної активності у зразках, таких як кров або тканини. Наприклад, для визначення активності амінотрансфераз, таких як аланінамінотрансфераза та аспартатамінотрансфераза, можна використовувати електрофорез з використанням специфічних субстратів. Також, електрофоретичний аналіз може бути використаний для дослідження різноманітних ензимних процесів, наприклад, глюкозидазної активності при розкладанні цукрів.

Для проведення електрофоретичного аналізу необхідно підготувати пробу, змішавши її з буфером та додатковими компонентами, які допоможуть зберегти структуру білків та їхню активність. Пробу потім поміщають у жорсткий гель, який містить полімер, такий як поліакриламід, та катіонний детергент, такий як додецилсульфат натрію. Після цього гель піддають

електрофорезу за допомогою електричного поля. Ферментну активність можна визначити, додавши до гелю підходящий субстрат, який за допомогою ферменту буде розкладатися на фрагменти. Результати електрофоретичного аналізу можна оцінити, вимірявши інтенсивність сигналу на гелі з використанням фотодетектора або іншого подібного пристрою.

*Імунологічний аналіз вивчення взаємодії між антигенами та антитілами, що може бути використаний для визначення наявності та концентрації різних білків, включаючи ферменти. Існують різні імунологічні методи, такі як імуноблоттинг, імуофлюоресценція, імунохімічний аналіз та імуноензимний аналіз (ELISA).

Імунологічний аналіз є потужним інструментом для визначення протеолітичної активності ферментів, оскільки деякі ферменти можуть бути визначені з використанням специфічних антитіл.

*Існує також метод оцінки протеолітичної активності ферментів за допомогою зоно-електрофорезу. Цей метод базується на розділенні ферментів на електрофоретичні зони у гелі зі спеціальним субстратом для кожного ферменту. Потім зони покриваються реактивами, які змінюють колір в залежності від протеолітичної активності ферментів. Цей метод дозволяє визначити не тільки наявність ферментів, але й їхню активність.

*Одним з найбільш поширених методів визначення протеолітичної активності ферментів є метод з використанням флуоресцентних субстратів. Цей метод полягає у використанні спеціальної речовини, яка під впливом ферменту видає флуоресцентне світло. Чим більше активність ферменту, тим більше світла видає субстрат. Цей метод дозволяє вимірювати протеолітичну активність різних ферментів одночасно та в режимі реального часу.

Також, існує метод використання гелю з підсилювачем сигналу, який дозволяє визначити активність ферменту з використанням малої кількості

субстрату. Цей метод дозволяє отримувати точні результати вимірювання при мінімальному використанні дорогоцінного субстрату.

Загалом, оцінка протеолітичної активності ферментів є важливим етапом в дослідженні біологічних процесів та може використовуватись у багатьох галузях науки, таких як медицина, харчова промисловість та біотехнології. Вибір методу оцінки протеолітичної активності ферменту залежить від конкретної дослідницької задачі та доступної технічної бази. Наприклад, у біотехнологічній промисловості для виробництва білків можуть використовуватись ферменти з високою протеолітичною активністю, тому оцінка цих параметрів є особливо важливою [56].

1.9 Отримання рослинних протеаз з проростків насіння соняшника

Етапи отримання рослинних протеаз з проростків насіння:

1. Підготовка сировини. Насіння соняшника потрібно добре промити та замочити у воді на декілька годин або навіть на ніч, щоб вони розм'якли. Потім насіння слід промити знову, відкинути ті, які не проростили, та висушити.
2. Проростання насіння. Насіння слід посіяти на піддон або в мішки для проростання і залишити на добу-дві в теплом, вологому місці. Після цього насіння слід регулярно поливати водою та відкидати ті, які не проростили.
3. Збір проростків. Пророщені насіння слід зібрати та змелювати у блендері або м'ясорубці до отримання однорідної маси.
4. Вилучення протеаз. Отриману масу проростків потрібно розмістити у контейнері та додати до неї фосфатний буфер (наприклад, 0,1 М фосфатний буфер рН 6-7). Контейнер слід помістити на добу в холодильник, після чого отриману рідину потрібно розділити від осаду та фільтрувати через фільтр з порошком кремнезему для вилучення залишків рослинних клітин.
5. Очищення протеаз. Отриману рідину слід перенести у інший контейнер та додати до неї ацетон у співвідношенні 1:4. Потім рідину

потрібно розмістити в місці з низькою температурою (наприклад, у холодильнику) на 12-24 години, щоб відбулось відшарування протеаз від інших компонентів.

6. Фракціонування протеаз. Після очищення розчин протеаз потрібно розділити на фракції. Для цього можна використовувати катіонний обмінний кутикул, який можна придбати в спеціалізованих магазинах.

7. Оцінка активності протеаз. Для оцінки активності отриманих протеаз потрібно провести електрофорез на поліакриламідному гель-фосфаті. Результати досліджень можуть вказати на наявність різних фракцій протеаз та їх активності.

8. Використання протеаз. Отримані рослинні протеази можна використовувати у багатьох галузях, таких як харчова промисловість (наприклад, для виготовлення сирів), медицина (наприклад, для лікування захворювань шлунково-кишкового тракту), а також у косметичній промисловості (наприклад, для виготовлення кремів та лосьйонів для обличчя) [55].

2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ

Шрот - це побічні продукти, отримані після вилучення олії з насіння. Подібно до хімозину, екстракт насіння *Helianthus annuus* виявляє протеолітичну активність щодо к-казеїну, α -казеїну та β -казеїну [56]. Тому ферменти, отримані зі шроту соняшникової олії, можуть бути потенційними коагулянтами молока для задоволення попиту сироварної промисловості. Також шрот олійних культур багат на білок і може бути використан для розробки нових продуктів [57].

В роботі наводили приклад способу отримання протеаз зі шроту насіння *Helianthus annuus* [58].

2.1 Об'єкт дослідження

В роботі [58] використовували шрот соняшника (*Helianthus annuus*), який був закуплений у компанії "Pari Animal Nutrition", Ханна, штат Лудхіана. Сухе знежирене молоко (СЗМ) використовували компанії Sterling Agro Industries Ltd.

Мікробний сичужний фермент використовували у вигляді (Madmillie, Мікробний вегетаріанський сичужний фермент).

2.2 Екстрагування сирого екстракту ферменту згортання молока

Екстракцію сирого ферменту проводили згідно з [58]. Соняшниковий шрот -50 г подрібнювали і змішували з 500 мл 5% NaCl при 9 °C. Потім безперервно струшували протягом 12 годин, а потім зразки фільтрували для отримання сирого екстракту. Отриманий екстракт центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хвилин, а надосадову рідину збирали, діалізували при 4 °C. Отриману фракцію використовували як сирий ферментний препарат [58].

2.3. Часткове очищення сирого ферменту згортання молока

Білки з сирих екстрактів осаджували за допомогою сульфату амонію при 30% насиченні. Суміш витримували при 4 °С протягом 45 хвили перед центрифугуванням. Умови центрифугування -10 000 об/хв при 4 °С протягом 10 хв. Отримані гранули відкидали, а до надосадової рідини додавали сульфат амонію для досягнення 60% насичення. Після 45 хвилин інкубації при 4 °С суміші знову центрифугували (10 000 об/хв при 4 °С протягом 10 хвилин). Отримані гранули розчиняли в 7,5 мл дистильованій воді, а потім діалізували при 4 °С для видалення солей згідно з [56].

2.4 Концентрування частково очищеного сирого ферменту згортання молока

Частково очищені ферментні екстракти концентрували за допомогою відцентрових концентраторів Vivaspin® 20 (рис. 2.1) [58].



Рис. 2.1 Центробіжний концентратор Vivaspin® 20.

2.5 Ферментний аналіз ферментного екстракту соняшника

Для оцінки протеолітичної активності отриманого рослинного ферментного екстракту соняшника проводили ферментативний аналіз з використанням розчину, який містив молочний субстрату для його згортання, так званого молокозгортуючого субстрату (МЗС). В якості субстрату для визначення

активності згортання молока використовували знежирене молоко. Розчин готували за методом [58].

12 г сухого знежиреного молока розчиняли у 100 мл розчину, що містив 0,1 М ацетатний буфер, рН = 5 та 0,11 г CaCl₂ (кінцева концентрація 0,01 М). РН розчину доводили до рН = 6,0 і використовували як субстрат для визначення активності згортання молока [58].

2.6 Визначення активності згортання молока (МЗА)

Отриманий ферментний рослинний екстракт, який містив протеази, досліджували на здатність проявляти молокозгортуючу активність (МЗА), використовуючи процедуру, описану [58] з невеликими модифікаціями. Реакційну суміш, яка містила 1,0 мл розчину рослинного ферменту, додавали до 10 мл розчину молочного субстрату, який попередньо вже інкубували при 37 °С протягом 15 хвилин. Кінцевою точкою згортання молока вважали період, коли можна було розрізнити окремі білкові частинки.

Розраховували проводили згідно з:

$$\text{МЗА} = 2400/T \times S/E, \text{ де}$$

T - час згортання (у секундах).

S - об'єм (мл) субстрату (молока).

E = об'єм (в мл) ферменту або ферментного екстракту [58].

2.7 Оцінка концентрації загального білка в екстракті ферменту згортання молока

Концентрацію загального білка в соняшниковому ферментному екстракті (СФЕ) визначали за методом Lowry et al. [58].

2.8 Характеристика соняшникового ферментного екстракту

Молекулярну масу поліпептидів у СФЕ визначали методом гелелектрофорезу в додецилсульфатному поліакриламідному гелі [58].

3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1 Визначення активності згортання молока (МЗА) ферментного екстракту соняшника

В результаті експериментальної роботи, проведеної дослідниками [58] було показано, що середні значення молокозгортуючої активності (МЗА) частково очищеного та концентрованого ферментного екстракту із шроту соняшника наведено в таблиці 1, рис. 3.1. Активність згортання молока (МЗА) у контролі (мікробний сичужний фермент) становила 550,00 од/мл МЗС і виявилася достовірно ($P \leq 0,01$) вищою порівняно з МЗА СФЕ (соняшникового ферментного екстракту) (210,00 од/мл). Це може бути пов'язано з тим, що мікробний сичужний фермент (СФ) є очищеним молокозготуючим ферментом, тоді як молокозгортуючий екстракт, використаний в даному дослідженні (рослинного походження), є частково очищеним ферментом, отриманим зі шроту соняшnikової олії.

Табл. 1

Молокозгортуюча активність (Mean \pm SD, n=6) ферментних екстрактів сичужного фермента (СФ) та соняшника (СФЕ)

Фермент/ Екстракт ферменту	МЗА (од/мл)
ферментного екстракту соняшника	210.00 \pm 0,55
Сичужний фермент	550.00 \pm 1.15



Рис. 3.1 Згортання молока

Зліва – використовували мікробний сичужний фермент, справа – використовували ферментативний екстракт соняшника

В інших роботах [56] було показано, що МЗА в осаджених сульфатом амонію білкових екстрактах з насіння *Albizia lebbbeck* і *Helianthus annuus*, і становили 155 і 3,9 одиниць (мг екстракту/мл МЗС) відповідно. В роботі [59], характеризували частково очищений фермент згортання молока з насіння *Solanum dubium Fresen*. Було показано, що МЗА ферментного екстракту становила 880 одиниць/мл, а для *Mucor rennet* і *Papain* - 551 і 216 одиниць/мл відповідно.

3.2 Оцінка концентрації загального білка у ферментному екстракті соняшнику

В роботі [58] концентрація загального білка у СФЕсклаала 100,00 мг/мл, що було значно вище порівняно з концентрацією білка у розчині сичужного фермента (табл. 2)

Табл. 3.2

Концентрація білків ферментних екстрактів сичужного фермента (СФ) та соняшника (СФЕ) (Mean±SD,n=6)

Фермент/ Екстракт ферменту	Концентрація білка (мг/мл)
ферментного екстракту соняшника	100.00±01.17
Сичужний фермент	15.04 ±1.01

Концентрація очищеного розчину СФ, рекомендованого для сироваріння, становить лише 15 мг/мл ферментного розчину для згортання 1 л молока (як описано в роботі [60]) Це свідчить про те, що дуже низька концентрація очищеного ферменту мікробного сичужного ферменту є достатньою для згортання молока з метою отримання якісного сиру.

Концентрація білка в ферментному екстракті, отриманому з соняшникового шроту, була визначена за допомогою методу Лоурі. На основі цих даних можна потім стандартизувати оптимальну концентрацію білка в екстракті, для того щоб відбілося згортання заданої кількості молока.

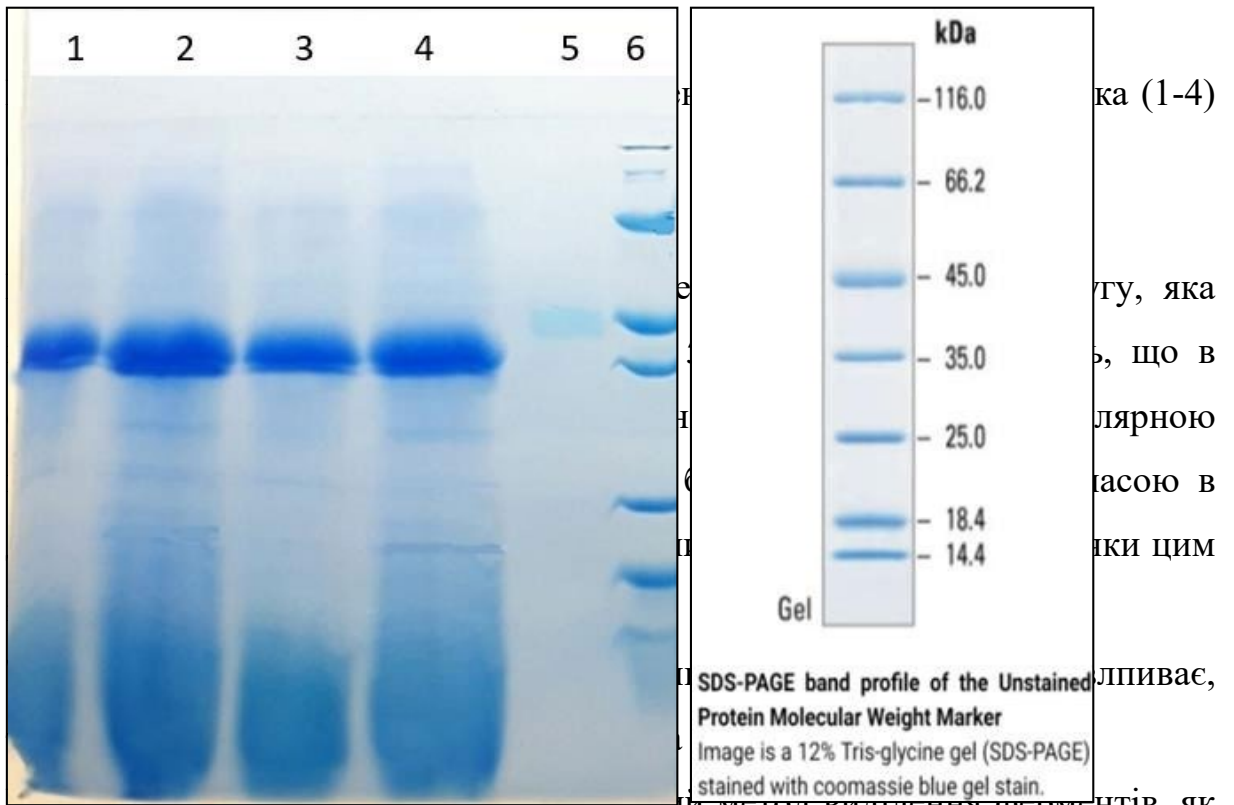
Так, наприклад в роботі [56] отримували білковий екстракт для осадження молока з насіння *Albizia lebbek* та *Helianthus annuus* за допомогою осадження сульфата амонію було показано, що загальна концентрація білка в цих екстрактах була оцінена як 263,9 і 100,8 мг/мл, відповідно.

3.3 Характеристика СФЕ (соняшникового ферментного екстракту)

В роботі [58] проводили електрофорез білкового рослинного екстракту, отриманого зі шроту соняшника. Контролем був мікробний сичужний фермент (МСФ). Результати електрофорезу показані на рис 3.2

Смуга 5 результат розгонки сичужного ферменту, смуга 6 - це білкового молекулярного маркера. Смуги 1, 2, 3 і 4 представляють картину білкових смуг ферментативного екстракту зі соняшнику.

Смуги 1 і 3 (СФЕ) - це смуги екстрактів зі шроту соняшнику, які екстрагували 3 місяці тому і які зберігалися в замороженому стані, тоді як смуги 2 і 4 - це смуги свіжих екстрактів ферментів.

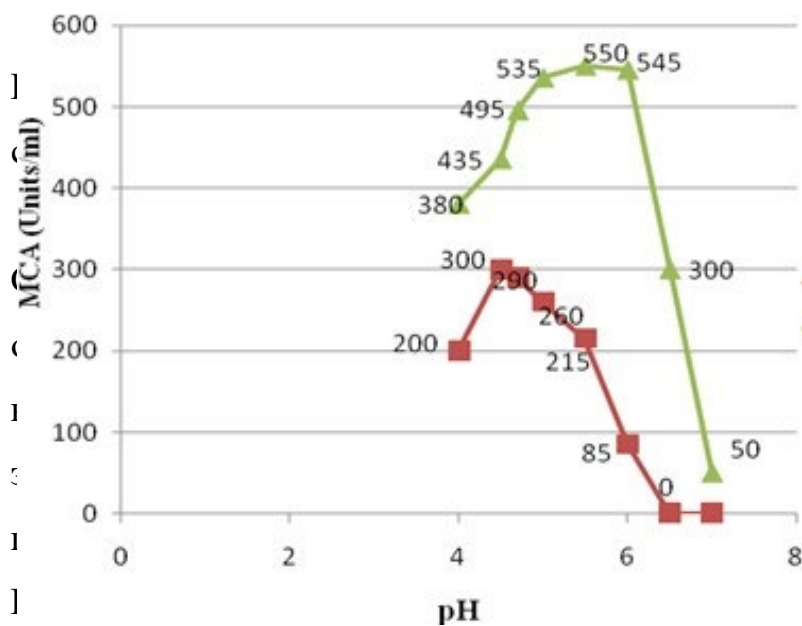


В роботі [57] було показано, що саме таким методом виділення ферментів, як фракціонування 35-55% сульфатом амонію як перший етап очищення ферментів, приводив до висалювання понад 86% загальної кількості протеаз. Після проведення електрофорезу показано, що ці частково очищені фракції, містили кілька смуг поліпептидів.

3.4 Фізико-хімічні властивості очищеного соняшникового ферментного екстракту

В роботі [58] вивчали вплив рН на активність згортання молока (МЗА) ферментного екстракту соняшника.

На рисунку 3.3 показано вплив рН на активність згортання молока як для ферментного екстракта соняшника (СФЕ) так і для сичужного ферменту (СФ). Для СФЕ при рН =6,5 і вищезгортання молока не відбувалося, тобто ферментний екстракт зі шроту не згортав молоко. Максимальна МЗА для нього була виявлена при рН =4,5-5,0. Для СФ максимальна МЗА виявлена при рН=5-6. Це свідчить про те, що ферменти, відповідальні за цей процес, є кислими протеазами, які проявляють повну активність при низьких значеннях рН.



ферментного екстракта
при різних значеннях рН

СФЕ [58], які на
СФ [58] дійшли
згортання молока
МЗА відбувається

протеаза з *Helianthus*

annuus показала майже незначну активність згортання молока, при температурі 35 °С і рН=6,0.

Втрата активності ферментів (до 87 %) щодо згортання молока, виділених з рослин, таких як квітки *Cynara scolymus L.*, відбивалася при рН=7 [63].

3.5 Вплив температури на активність згортання молока (МЗА)

В роботі [58] аналізували вплив температури на МЗА ферментного екстракту соняшнику та сичужного ферменту (рис.3.4). Показано, що МЗА зростала з підвищенням температури реакційної суміші (суміші МЗС та розчину ферменту), досягаючи найвищого значення МЗА при Т=55°С для СФЕ та при Т=35-45 °С для СФ. При збільшенні температури до 65-

70°C свідбувалося зниження активності ферментів, тобто втрата їх активності.

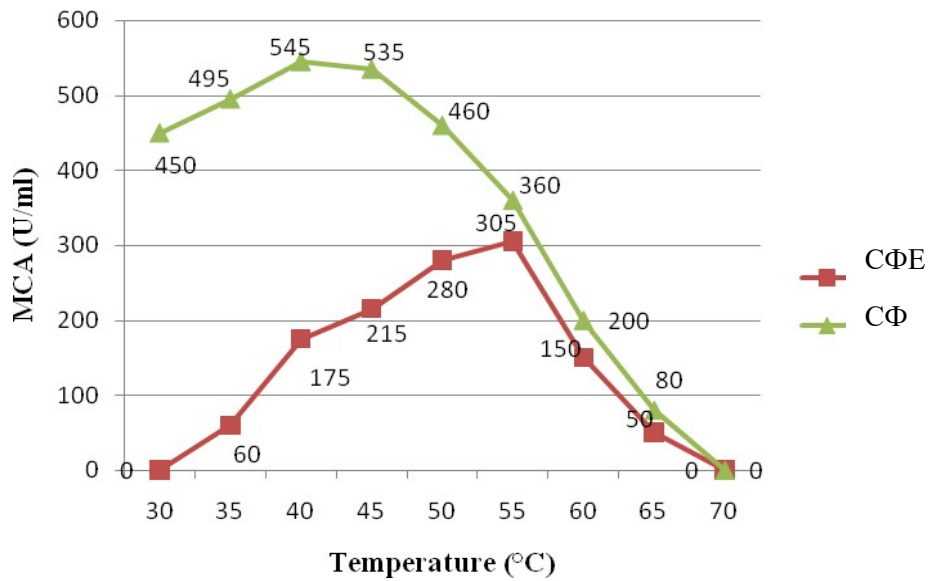


Рис. 3.4 Молокозгортаюча активність (МЗА) екстракта соняшника (СФЕ) та сичужного ферменту (СФ) при різних значеннях рН

Температурний профіль ферментних екстрактів з соняшника узгоджується з даними [58], які вивчали вплив температури на МЗА очищеного ферменту, отриманого з насіння *Brassica napus*. За їхніми даними, МЗА збільшувалася з підвищенням температури інкубації, досягаючи найвищого значення МЗА при $T=60^{\circ}\text{C}$. При більш високих температурах інкубації було виявлено повну втрату МЗА.

3.6 Вплив концентрації ферментативних екстрактів на активність згортання молока

В роботі [58] МЗА ферментних екстрактів визначали при різних концентраціях ферментних екстрактів у діапазоні 0,1-0,7% об/об (мл/100 мл) реакційної суміші. Для очищеного сичужного ферменту максимальну МЗА спостерігали при його вже рекомендованій концентрації в молоці, тобто 0,0015% (1,5 г/100 л молока) [60].

Для ферментних екстрактів зі шроту було визначено, що МЗА збільшувалася пропорційно зі збільшенням його концентрації до 0,7% об/об реакційної суміші. Однак МЗА СФ (контроль) у концентрації 0,0015% була значно вищою (550 од/мл), ніж МЗА рослинного екстракту ферменту (СФЕ) при всіх значеннях концентрацій (рис. 3.5).

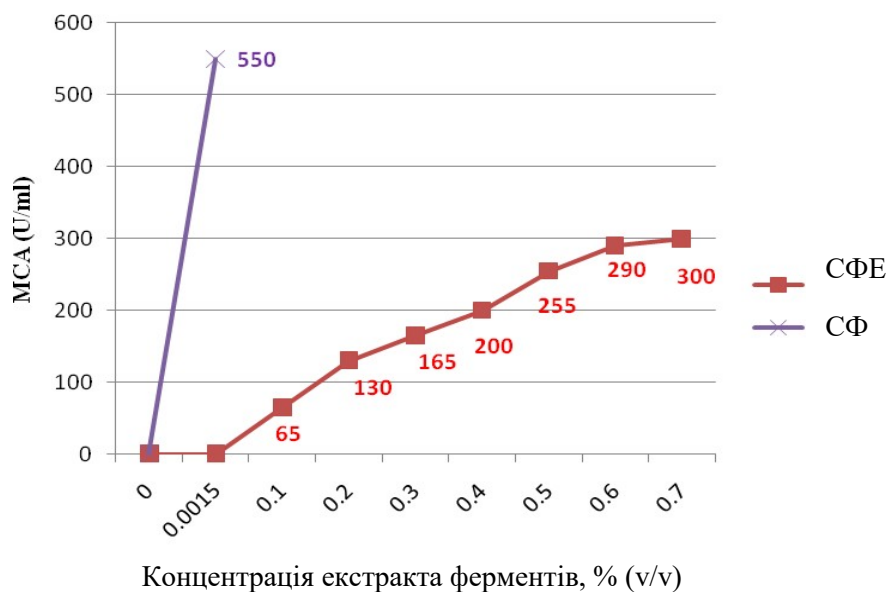


Рис. 3.5 Молокозгортаюча активність (МСА) екстракту соняшника (СФЕ) та сичужного ферменту (СФ) при різних концентраціях молокозгортаючого екстракту

Щодо літератури, то показно, що за даними Chitipinyol та Crabbe [64], час згортання молока зменшується зі збільшенням концентрації ферменту.

Таким чим, представлена схема отримання ферментного екстракту зі шроту соняшнику *Helianthus annuus* дозволяє отримати екстракт, який має молокозгортуючу активність. Отриманий ферментний екстракт можна використовувати як альтернативу сичужному ферменту.

ВИСНОВКИ

1. Білкові екстракти зі шроту соняшника, які фільтрували та фракціонували сульфатом амонію (30-60%) містили ферменти, які мали властивість щодо згортання молока.
2. Було показано, що оптимальними умовами для згортання молока це концентрація 5 мл ферментного екстракту на літр молока при рН=4,5-5,0 та при $T = 45-55$ °С.
3. Ферментативний екстракт зі шроту соняшника можна використовувати як замітник сичужного ферменту в молочній промисловості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Shah, M.A., Mir, S.A. Plant Proteases in Food Processing // Reference Series in Phytochemistry. 2019. P. 443–464.
2. Jain Sh., Gupta S., Kumar A., Bangar Y., Ahlawat S.S. Extraction and partial purification of a novel enzyme from oil seed cakes of Sunflower and assessing its use for milk clotting activity // The Pharma Innovation Journal. 2020. V. 9(1). P. 224-229.
3. Barlow P. W. The role of proteins in plant growth and development // Annual Plant Reviews. 2019 V. 2. P. 1-26.
4. Chen J., Zuo J., Zhao W. Roles of plant small heat shock proteins in development, stress tolerance, and stress responses // Plant Signaling & Behavior. 2019. V. 14(10). P. e1654592.
5. Kornfeld A., Avin-Wittenberg T. Metabolism in plant autophagy // Seminars in Cell & Developmental Biology. 2019. V. 92. P. 115-122.
6. Domínguez F., Moreno J., Cejudo F. J., Pérez-Pérez M. E. Nitrogen metabolism and its regulation in plants // International Journal of Molecular Sciences. 2020. V. 21(21). P. 7992.
7. Shah M.A., Mir, S.A, Paray, M.A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review // Dairy Sci. & Technol. 2014. V. 94. P. 5-16.
8. Shah, M.A., Mir, S.A. Plant Proteases in Food Processing // Reference Series in Phytochemistry. 2019. P. 443–464.
9. Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I., Del Rio L.A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes // Plant Physiol Biochem. 2002. V. 40. P. 521–530.
10. Bah S., Paulsen B.S., Diallo D., Johansen H.T. Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants // J. Ethnopharmacol. 2006. V. 107. P. 189–198.
11. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. P. 227–233.

12. Domingos A., Cardos P.C., Xue Z.T., Clemente A., Brodelius P.E., Pais M.S. Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa* // *Eur J Biochem.* 2000. V. 267. P. 6824–6831.
13. Gonzalez-Rabade N., Badillo-Corona J.A., Aranda-Barradas J.S., Oliver-Salvador M.C. Production of plant proteases in vivo and in vitro—a review // *Biotechnol Adv.* 2011. V. 29. P. 983–996.
14. Devaraj K.B., Gowda L.R., Prakash V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.) // *Phytochem.* 2008. V. 69. P. 647–655.
15. Yadav R.P., Patel A.K., Jagannadham M.V. Neriifolin S. A dimeric serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn.: purification and biochemical characterisation // *Food Chem.* 2012. V. 132. P. 1296–1304.
16. Roseiro L.B., Barbosa M., Ames J.M., Wilbey R.A. Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine cheeses // *Int J Dairy Technol.* 2003. V. 56. P. 76–85.
17. Sanjuan E., Millan R., Saavedra P., Carmona M.A., Gomez R., Fernandez-Salguero J. Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening // *Food Chem.* 2002. V. 78. P. 281–289.
18. Tejada L., Abellan A., Cayuela J.M., Martinez-Cacha A. Sensorial characteristics during ripening of the Murcia al Vino goat's milk cheese. The effect of the type of coagulant used and the size of the cheese // *J Sens Stud.* 2006. V. 21. P. 333–347.
19. Tejada L., Abellan A., Cayuela J.M., Martinez-Cacha A., Fernandez-Salguero J. Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant // *Int Dairy J.* 2008. V. 18. P. 139–146.
20. Pino A., Prados F., Galan E., McSweeney P.L.H., Fernandez-Salguero J. Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet // *Food Res Int.* 2009. V. 42. P. 324–330.

21. Liburdi K., Spinelli S.E., Benucci I., Lombardelli C., Esti M. A preliminary study of continuous milk coagulation using *Cynara cardunculus* flower extract and calf rennet immobilized on magnetic particles // *Food Chem.* 2018. V. 239. P. 157–164.
22. Esposito M., Di Pierro P., Dejonghe W., Mariniell L., Porta R. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease // *Food Chem.* 2016. V. 204. P. 115–121.
23. Salvador S.M., Novo C., Domingos A. Evaluation of the presence of aspartic proteases from *Centaurea calcitrapa* during seed germination // *Enzym Microb Technol.* 2006. V. 38. P. 893–898.
24. Egito A.S., Girardet J.M., Laguna L.E., Poirson C., Molle D., Miclo L., Humbert G., Gaillard J.L. Milkclotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein // *Int Dairy J.* 2007. V. 17. P. 816–825.
25. Hashim M.M., Mingsheng D., Iqbal M.F., Xiaohong C. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease // *Phytochemistry.* 2011. V. 72. P. 458–464.
26. Zhang B., Sun Q., Liu H.J., Li S.Z., Jiang Z.Q. Characterization of actinidin from Chinese kiwifruit cultivars and its applications in meat tenderization and production of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides // *LWT Food Sci Technol.* 2017. V. 78. P. 1–7.
27. Wang J., Liu H., Wang H., Cui M., Jin Q., Jin T., Cui F., Cui T., Liang C., Kim B., Li G. Isolation and characterization of a protease from the *Actinidia arguta* fruit for improving meat tenderness // *Food Sci Biotechnol.* 2016. V. 25(4). P. 1059–1064.
28. Ha M., Bekhit A.E.D.A., Carne A., Hopkins D.L. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins // *Food Chem.* 2012. V. 134. P. 95–105.

29. Ha M., Bekhit A.E.D.A., Carne A., Hopkins D.L. Characterisation of kiwifruit and asparagus enzyme extracts, and their activities toward meat proteins // *Food Chem.* 2013 136:989–998
30. Barekat S, Soltanizadeh N (2017) Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment // *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2017. V. 39. P. 223–229.
31. Chen J.S., Tian J.C., Deng Z.Y., Zhang Y.X., Feng S.L., Yan Z.C., Zhang X.Y., Yuan Q. Effects of papain hydrolysis on the pasting properties of wheat flour // *J Integr Agric/* 2012. V. 11(12). P. 1948–1957.
32. Yang T., Bai Y., Wu F., Yang N., Zhang Y., Bashari M., Jin Z., Xu X. (2014) Combined effects of glucose oxidase, papain and xylanase on browning inhibition and characteristics of fresh whole wheat dough // *J Cereal Sci.* 2014. V. 60. P. 249–254.
33. Tanabe S., Arai S., Watanabe M. (1996) Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients // *Biosci Biotechnol Biochem.* 1996. V. 60(8). P. 1269–1272.
34. Hatta E., Matsumoto K., Honda Y. (2015) Bacillolysin, papain, and subtilisin improve the quality of gluten-free rice bread // *J Cereal Sci.* 2015. V. 61. P. 41–47.
35. Li Y., Yu J., Goktepe I., Ahmedna M. The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour // *Food Chem.* 2016. V. 196. P. 1338–1345.
36. Kitts D.D., Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery // *Curr Pharm.* 2003. P. 1309–1323
37. Di Bernardini R., Harnedy P., Bolton D., Kerry J., O'Neill E., Mullen A.M., Hayes M. (2011) Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products // *Food Chem.* 2011. V. 124(4). P. 1296–1307.

38. Maestri E., Marmiroli M., Marmiroli N. Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs // *J Proteome*. 2016. V. 147. P. 140–155.
39. Udenigwe .CC., Aluko R.E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits // *J Food Sci*. 2012. V. 71. P. 11–24.
40. Mazorra-Manzano M.A., Ramirez-Suarez J.C., Yada R.Y. Plant proteases for bioactive peptides release: a review // *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1308312>
41. Korhonen H., Pihlanto A. (2006) Bioactive peptides: production and functionality // *Int Dairy J*. 2006. V. 16. P. 945–960.
42. Rocha G.F., Kise F., Rosso A.M., Parisi M.G. Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits // *Food Chem*. 2017. V. 237. P. 350–355.
43. Li Z., Scott K., Hemar Y., Zhang H., Otter D. Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit // *Food Chem*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.091>
44. Beka R.G., Krier F., Botquin M., Guiama V.D., Donn P., Libouga D.G., Mbofung C.M., Dimitrov K., Slomianny M.C., Guillochon D., Vercaigne-Marko D. (2014) Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp // *Int Dairy J*. 2014. V. 34. P. 25–31.
45. Gagaoua M., Hoggas N., Hafid K. Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes // *Int J Biol Macromol*. 2015. V. 73. P 245–252.
46. Perez A., Laudat T., Mora M., Carvajal C., Aragon C., Gonzalez J., Escalona M., Daquinta M., Trujillo R., Hernandez M., Lorenzo J.C. Micropropagation of *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. for sustainable production of plant proteases // *Acta Physiol Plant*. 2013. V. 35. P. 2525–2537.

47. Oliveira A., Perira C., Soares da Costa D., Teixeira J., Fidalgo F., Pereira S., Pissarra J. Characterization of aspartic proteinases in *C. cardunculus* L. callus tissue for its prospective transformation // *Plant Sci.* 2010. V. 178. P. 140–146.
48. Raposo S., Domingos A. Purification and characterization milk-clotting aspartic proteases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures // *Process Biochem.* 2008. V. 43. P. 139–144.
49. Lufrano D., Faro R., Castanheira P., Parisi G., Verissimo P., Vairo-Cavalli S., Simoes I., Faro C. (2012) Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease pre-cursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae) // *Phytochemistry.* 2012. V. 81. P. 7–18.
50. Martínez-Force E., Dunford N. T., Salas J. J. *Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization.* 2015. p. 93.
51. Gorina M. M., Blume V. M., Korneva T. V. Investigation of proteolytic enzymes from sunflower cotyledons // *Phytochemistry.* 1988. V. 27, No. 4. -P. 1031-1034.
53. Brusovanik M. P., Gavrilova V. A., Kurenkov A. S. Purification and Properties of Pectinesterase from Sunflower Seedlings // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2012. V. 48, No. 2. P. 169-174.
54. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry.* 1976. V. 72(1-2). P. 248-254.
55. Barros A. F., Costa T. F., Oliveira, J. T., Pereira, H. D. Characterization of protease activity and protease gene expression during germination of *Vigna unguiculata* seeds // *Plant Physiology and Biochemistry.* 2016. V. 107. P. 158-165.
56. Egito A.S, Girardet J.M., Laguna L.E., Poirson C., Molle D., Miclo L. *et al.* Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein // *International Dairy Journal.* 2007. V. 17. P 816-825.

57. Sunil L., Prakruthi A., Prasanth P.K., Gopala Krishna A.G. Preparation of food supplements from oilseed cakes // *Journal of Food Science and Technology*. 2015. V.52. P. 2998-3005.
58. Jain Sh., Gupta S., Kumar A., Bangar Y., Ahlawat S.S. Extraction and partial purification of a novel enzyme from oil seed cakes of Sunflower and assessing its use for milk clotting activity // *The Pharma Innovation Journal*. 2020. V. 9(1). P. 224-229.
59. Ahmed I.A.M., Morishima I., Babiker E.E., Mori N. Characterization of partial purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds // *Food Chemistry*. 2009. V. 116(2). P. 395-400.
60. Jana A.H., Mandal P.K. Manufacturing and Quality of Mozzarella Cheese: A Review // *International Journal of Dairy Science*. 2011. V. 6(4). P. 199-226.
61. Elmazar M.M.E., El-Sayed S.T., Al-Azzouny R.A. Screening some local Egyptian seeds extract for milk-clotting activity and physicochemical characterization of *Brassica Napus* seed extract // *Journal of Agriculture and Food Technology*. 2013. V. 2(2) P. 28-34.
62. Park H, Yamanaka N, Mikkonen A, Kusakabe I, Kobayashi H. Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2000; 64:931-939.
63. Chazara S.L., Sidrach D., Lo'pez-Molina, Rodr'iguez- Lo'pez J.N. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers // *International Dairy Journal*. 2007. V. 17. P. 1393-1400.
64. Chitipinityol S., Crabbe M.J.C. Chymosin and aspartic proteinases // *Food Chemistry*. 1998. V. 61. P. 395-418.