

**Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля
(ИБХФ)**

На правах рукописи

ПОЛЯКОВ АЛЕКСАНДР ВИКТОРОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА ПАПАИНОМ НА СТРУКТУРУ, ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕГУМИНОВ**

Специальности

02.00.04 – Физическая химия

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Плащина Ирина Германовна

Москва 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Характеристика белков семян зернобобовых и масличных культур	12
1.1.1. Общие сведения о содержании, составе и функциях белков	12
1.1.2. Пищевая и биологическая ценность	12
1.1.3. Антиалиментарные компоненты	15
1.1.4. Аллергенность	15
1.1.5. Атакуемость ферментами желудочно-кишечного тракта	17
1.1.6. Тенденции в выращивании зернобобовых культур	18
1.2. Структура легуминов	19
1.3. Физико-химические свойства легуминов	23
1.3.1. Конформационная стабильность	23
1.3.2. Поверхностная активность и свойства адсорбционных слоев	26
1.4. Функциональные свойства легуминов	29
1.4.1. Природные легумины	29
1.4.1.1. Растворимость	30
1.4.1.2. Эмульгирующая способность	31
1.4.1.3. Пенообразующая способность	32
1.4.1.4. Гелеобразование	33
1.4.2. Мутантные и рекомбинантные легумины	34
1.5. Модификация структуры легуминов с целью регулирования функциональных свойств	36
1.5.1. Химическая модификация	36
1.5.2. Физическая модификация	37
1.5.3. Биотехнологическая модификация	38
1.5.3.1. Генная инженерия	38
1.5.3.2. Проращивание бобов	38
1.5.3.3. Индуцированный автолиз	39
1.5.4. Ферментативная модификация	39
1.5.4.1. Ограниченный протеолиз легуминов	41
1.5.4.2. Изменение структуры и физико-химических параметров	41
1.5.4.3. Изменение функциональных свойств	42
1.5.4.4. Кинетика ограниченного протеолиза глицинина папаином	44

1.6. Заключение	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1. Материалы	50
2.1.1. Объекты исследования	50
2.1.2. Ферменты	50
2.1.3. Реактивы и вода	50
2.2. Препаративные методы	50
2.2.1. Выделение интактных легуминов	50
2.2.2. Получение модифицированных легуминов	51
2.2.3. Приготовление растворов белков	51
2.2.4. Определение концентрации белка в растворе	52
2.3. Методы исследования	52
2.3.1. Статическое светорассеяние	52
2.3.2. Динамическое светорассеяние	53
2.3.3. Электрофорез по Допплеру	54
2.3.4. Малоугловое рентгеновское рассеяние	54
2.3.5. Высокочувствительная сканирующая калориметрия	55
2.3.6. Динамическая капельная тензиометрия и двумерная дилатометрия	56
2.3.7. Определение атакуемости белков ферментами желудочно-кишечного тракта	57
2.3.8. Определение пенообразующей способности	58
2.3.9. Электрофорез в полиакриламидном геле	59
2.3.10. Скоростная седиментация	59
2.3.11. Потенциометрия	59
2.3.12. Денситометрия	59
2.3.13. Рефрактометрия	59
2.3.14. Спектрофотометрия	60
2.3.15. Флуоресцентная спектроскопия	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	61
3.1. Влияние ограниченного протеолиза на молекулярные параметры легуминов в растворе	61
3.1.1. Молекулярная масса и второй вириальный коэффициент	62
3.1.2. Спектральные свойства	66
3.1.3. ξ -потенциал	68
3.1.4. Константа диффузии и эффективный гидродинамический размер	69

3.1.5. Радиус инерции	71
3.1.6. Парциальный удельный объем	72
3.1.7. Коэффициенты седиментации и фрикционные отношения	72
3.2. Влияние ограниченного протеолиза на термодинамическую стабильность легуминов	76
3.2.1. Термодинамические параметры денатурации	76
3.2.2. Расчет свободной энергии денатурации Гиббса	82
3.2.3. Анализ термограмм	87
3.3. Влияние ограниченного протеолиза на адсорбционное поведение легуминов на границе воздух/раствор	90
3.3.1. Динамика формирования адсорбционных слоев	91
3.3.2. Изотермы адсорбции	97
3.3.3. Реологические свойства адсорбционных слоев	101
3.4. Влияние ограниченного протеолиза на функциональные свойства легуминов	106
3.4.1. Атакуемость ферментами желудочно-кишечного тракта	107
3.4.2. Пенообразующие свойства	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ВЫВОДЫ	118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	124
БЛАГОДАРНОСТИ	151

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Проблема обеспечения мирового населения полноценным пищевым белком не только сохраняет актуальность в третьем тысячелетии, но и в значительной степени обостряется. Человечество столкнулось с ограниченностью природных ресурсов (пресная вода, пахотные земли, пастбища) на фоне быстрого роста населения в экономически слабо развитых странах и увеличения числа техногенных катастроф [1, 2]. По оценкам ООН, численность населения Земли к 2050 году составит 9,7 млрд человек, что в несколько раз превышает порог устойчивости биосферы [3].

В настоящее время более половины населения планеты испытывает острый дефицит пищевого белка в рационе питания, который составляет 10-25 млн. т/год [4]. Дефицит в пище многих эссенциальных нутриентов (в частности, белка), ускорение темпа современной жизни и стрессовые нагрузки приводят к истощению адаптационных возможностей организма человека и возникновению широкого спектра алиментарнозависимых заболеваний [5-7]. Целями государственной политики в области здорового питания являются сохранение и укрепление здоровья населения, профилактика заболеваний, обусловленных неполноценным и несбалансированным питанием. Основными задачами государственной политики в области здорового питания являются расширение отечественного производства основных видов продовольственного сырья, отвечающего современным требованиям качества и безопасности; развитие производства пищевых продуктов, обогащенных незаменимыми компонентами, специализированных продуктов детского питания, продуктов функционального назначения, диетических (лечебных и профилактических) пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище [8].

В этой связи одним из приоритетных направлений современной пищевой индустрии является развитие технологий новых эссенциальных ингредиентов с высокими функциональными свойствами для обогащения традиционных пищевых продуктов, а также создания продуктов лечебного и функционального питания на их основе, обеспечивающих снижение риска развития заболеваний [9, 10].

Известно, что 80 % мировых запасов пищевого белка имеют растительное происхождение, при этом 50 % составляют зерновые, 25 % – зернобобовые и масличные культуры [11, 12].

Растительное сырье, благодаря короткому циклу воспроизводства и доступности, по экономическим и экологическим показателям является перспективным источником пищевого белка. В настоящее время большая часть этого ресурса используется лишь косвенно – путем скармливания сельскохозяйственным животным. Ежегодно в Западной Европе и США на

кормовые нужды расходуется до 60 % потребляемого в стране зерна, в основном бобовых и зерновых культур. В среднем для производства 1 кг животного белка расходуется около 8 кг белка растительного [13, 14]. Затраты энергии при производстве животного белка в 19-164 раз выше, чем при производстве растительного белка [15]. Таким образом, все более актуальной становится проблема увеличения пищевого использования растительного белка.

В 1960-е годы была сформулирована и впоследствии реализована стратегия сокращения пищевой цепи за счет прямой переработки растительного белка в пищевые продукты промышленными методами [15, 16]. К настоящему времени в мире создано крупнотоннажное производство муки, концентратов, изолятов, гидролизатов и текстуратов пищевых белков, а также пищевых продуктов преимущественно на основе переработки соевых бобов. Продемонстрирована возможность диверсификации сырьевой базы производства пищевого белка за счет использования семян других зернобобовых и масличных культур (например, безалкалоидного люпина), а также белков зеленой биомассы и листьев растений, белков микроорганизмов [17-19]. Возрастающее значение для производства пищевого белка приобретает использование вторичных сырьевых ресурсов (солодовая дробина, пшеничные отруби, подсолнечный шрот и др.) [20].

Одним из возможных решений проблемы дефицита белка является сформировавшееся в последние десятилетия новое биотехнологическое направление – создание трансгенных растений с повышенным содержанием и улучшенным качеством белка [21, 22]. Однако в виду недостаточности информации о последствиях пищевого использования трансгенных продуктов в России принят закон «О государственном регулировании в области генной инженерной деятельности», ограничивающий их производство и использование [23].

Необходимо отметить, что в питании населения России весьма значительна доля растительных белков, подавляющее большинство которых имеет несбалансированный аминокислотный состав (зерновые культуры, картофель, овощи). При этом удельный вес в питании бобовых культур, содержащих белки с более высокой биологической ценностью, является незначительным [24]. Вместе с тем, именно семена зернобобовых (soя, горох, фасоль, люпин, кормовые бобы, чечевица, вика, нут, чина, арахис и др.) и масличных культур (подсолнечник, арахис, конопля, лен, кунжут, рапс, хлопчатник и др.) являются наиболее перспективными источниками пищевого белка вследствие его высокого содержания и сбалансированности по содержанию незаменимых аминокислот [25].

Использование растительного белка для пищевых целей сопряжено с некоторыми проблемами. В частности, легумины (11S фракция глобулинов), являющиеся основной фракцией запасных белков зернобобовых и масличных культур, имеют высокую

биологическую ценность, но недостаточно высокие функциональные свойства (эмульгирующая и пенообразующая способность), обусловленные компактной жесткой структурой молекул и их низкой поверхностной гидрофобностью. Сложные растительные белки, в частности, запасные белки зернобобовых культур, не полностью перевариваются ферментами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [26]. Кроме того, существует проблема аллергенности некоторых фракций белков зернобобовых культур [27].

Степень разработанности темы исследования

Одним из наиболее эффективных и мягких способов регулирования функциональных свойств растительных глобулинов является ферментативная модификация, в частности, ограниченный протеолиз. К настоящему времени установлено, что общей закономерностью ограниченного протеолиза легуминов является отщепление на начальном этапе С-концевых участков α -цепей [28]. При этом образуется высокомолекулярный стабильный продукт [29-31]. Показано, что продукты ограниченного протеолиза обладают, как правило, более высокими функциональными свойствами по сравнению с интактными легуминами [32]. Ограниченный протеолиз также способствует снижению иммуногенных свойств легуминов и повышению их атакуемости ферментами желудочно-кишечного тракта [32, 33].

Наиболее изученным является процесс ограниченного протеолиза легуминов трипсином [34-36]. Несмотря на множество работ, посвященных ограниченному протеолизу легуминов, большая их часть выполнена на суммарных препаратах глобулинов, что не позволяет установить взаимосвязь между структурой и функциональными свойствами и, таким образом, целенаправленно регулировать последние.

Цель и задачи

Цель работы заключалась в установлении связи между изменением структуры легуминов в результате ограниченного протеолиза папаином и изменением их физико-химических и функциональных свойств.

Для достижения поставленной цели было необходимо провести сравнительное исследование следующих характеристик интактных и модифицированных легуминов:

- 1) молекулярных параметров в растворе (молекулярной массы, поверхностного заряда, термодинамического сродства к растворителю, гидродинамических параметров);
- 2) конформационной стабильности;
- 3) поверхностной активности на границе воздух/раствор, динамики формирования и реологических свойства адсорбционных слоев;

4) функциональных свойств (атакуемости ферментами желудочно-кишечного тракта *in vitro*, пенообразующей способности).

Научная новизна

1) Систематически изучено влияние ограниченного протеолиза папаином на структуру, термодинамическую стабильность и адсорбционное поведение (поверхностную активность, динамику формирования и дилатационные свойства адсорбционных слоев) на границе воздух/раствор легуминов бобов *Glycine max* и *Vicia faba*.

2) Установлена связь между структурными, термодинамическими и поверхностными свойствами легуминов, модифицированных ограниченным протеолизом папаином. Найденные закономерности имеют общий характер. Это позволяет прогнозировать изменения функциональных свойств легуминов и использовать ограниченный протеолиз для их регулирования.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в установлении взаимосвязи между изменением структурных, гидродинамических и термодинамических параметров легуминов в результате ограниченного протеолиза папаином и их адсорбционным поведением и функциональными свойствами. Показано, что изменение этих параметров (понижение молекулярной массы, термодинамического сродства к растворителю, гидродинамического размера и конформационной стабильности) приводит к повышению поверхностной активности глицинина и легумина *V.f.*, увеличению скорости формирования ими адсорбционных слоев на границе воздух/раствор и повышению вязкоупругости адсорбционных слоев. Повышение адсорбционных свойств легуминов коррелирует с увеличением их пенообразующей способности. Ограниченный протеолиз сопровождается повышением скорости атакуемости модифицированных легуминов ферментами желудочно-кишечного тракта.

Изменения структуры легуминов под влиянием папаиноподобных эндогенных протеиназ происходят при таких процессах, как прораствание семян и индуцированный автолиз. Можно полагать, что наблюдаемые эффекты изменения структуры и свойств легуминов будут представлять интерес и для этих областей исследования.

Практическая значимость работы заключается в возможности использовать установленные закономерности для регулирования функциональных свойств легуминов и

повышения эффективности их использования для целей традиционного, функционального и лечебного питания.

Полученные результаты имеют принципиальное значение для повышения технофункциональных свойств и биологической ценности растительных глобулинов и, таким образом, для диверсификации сырьевой базы производства пищевого белка.

Методология и методы исследования

В качестве объектов исследования служили свежевыделенные препараты 11S фракции растительных глобулинов (легуминов) соевых бобов *Glycine max* и кормовых бобов *Vicia faba* и продукты их ограниченного протеолиза папаином после исчерпывающего диализа против рабочего растворителя и определения концентрации белка в растворе.

Для сравнительной характеристики структуры и свойств интактных и модифицированных легуминов использован широкий набор физико-химических методов исследования: статическое и динамическое светорассеяние, малоугловое рентгеновское рассеяние, электрофорез по Доплеру, электрофорез в полиакриламидном геле, скоростная седиментация, ультрафиолетовая и флуоресцентная спектроскопия, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия, динамическая тензиометрия, двумерная динамическая дилатометрия, рефрактометрия, денситометрия и др. Для исследования функциональных свойств использованы методы, основанные на известных из литературы подходах. Используются химические методы количественного анализа белка. Обработка полученных результатов проведена с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Влияние ограниченного протеолиза глицинина и легумина *V.f.* (легуминов *Glycine max* и *Vicia faba*, соответственно) папаином на:
 - молекулярные параметры в растворе;
 - термодинамическое сродство к растворителю;
 - конформационную стабильность;
 - поверхностную активность на границе раздела фаз воздух/раствор, скорость формирования и вязкоупругие дилатационные характеристики адсорбционных слоев;
 - атакуемость ферментами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека *in vitro*;
 - пенообразующую способность и стабильность пен.
2. Связь между изменением структурных, гидро- и термодинамических параметров легуминов в результате ограниченного протеолиза папаином, их адсорбционным поведением

и функциональными свойствами.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивали использованием общепринятых методов и аттестованных средств измерения, удовлетворительной оценкой погрешности измерений, согласованием полученных результатов с литературными данными, а также согласованием данных, полученных различными методами исследования.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на IX, X, XI, XV, XVI Ежегодных Международных конференциях ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Россия, Москва, 9-11 ноября 2009, 8-10 ноября 2010 г., 9-11 ноября 2011 г., 23-25 ноября 2015 г., 24-26 октября 2016 г.), 54-й научной конференции МФТИ "Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе" (Долгопрудный, 2011), VI Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 21-25 марта 2011), 6-м Международном симпозиуме «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов» (Москва, 25-26 апреля 2012 г.), Международной научно-практической Конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 18-20 марта 2014).

Автор был удостоен 1-го места на Конкурсе молодых ученых на лучшую научно-исследовательскую работу в рамках XI Международной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (2011 г.), 1-го места на Конкурсе научных работ по 54-й научной конференции МФТИ (2011 г, секция биохимической физики).

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 6 статей (из них 5 – в изданиях, рекомендованных ВАК) и 9 публикаций в сборниках материалов конференций

Личный вклад автора

Планирование эксперимента, полученный экспериментальный материал, его обработка, анализ и интерпретация являются результатом деятельности диссертанта. Формулирование цели и задач исследования, основных выводов и научных положений проводилась совместно с руководителем – к.х.н., И.Г. Плащиной. В работах, выполненных в соавторстве, диссертант

внес основной вклад, принимая участие на всех этапах исследования – от планирования эксперимента, получения образцов для исследования и проведения эксперимента до обсуждения, оформления и публикации результатов.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка цитируемой литературы, включающего 357 ссылок. Работа изложена на 151 странице, содержит 37 рисунков и 12 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика белков семян зернобобовых и масличных культур

1.1.1. Общие сведения о содержании, составе и функциях белков

Белковая фракция составляет 20-30 % от массы семени зернобобовой культуры и на 70-80 % состоит из запасных белков [37]. К запасным белкам растений относятся те белки, которые при прорастании семян гидролизуются до пептидов и аминокислот, используемых для синтеза новых белков. Ранее полагали, что запасными белками являются исключительно глобулины. Впоследствии было обнаружено, что в семенах бобовых в процессе созревания также происходит накопление альбуминов, которые гидролизуются при прорастании семян [38]. Тем не менее, количественно преобладающей фракцией запасных белков в семенах зернобобовых и масличных культур являются глобулины, на долю которых в общем белковом комплексе семян приходится 60-70 %.

Запасные белки зернобобовых культур были классифицированы Осборном на основе их растворимости и экстрагируемости в различных растворителях [39]. Глобулины зернобобовых культур являются смесью белков, различающихся по физико-химическим свойствам [40]. В их состав входят четыре фракции с коэффициентами седиментации 2S, 7S, 11S и 15S. Фракционный состав белков зависит от природы образца и факторов окружающей среды.

В случае соевых бобов на долю 7S фракции (бета-конглицинина) и 11S фракции (глицинина) приходится суммарно до 70 % от общего растворимого белка [32]. Содержание глицинина составляет 40-52 % от общего количества белка соевых бобов. Содержание легумина (11S фракции) кормовых бобов *Vicia faba* может достигать до 55 % от общего содержания белка [32, 41, 42].

11S фракция глобулинов зернобобовых и масличных культур представлена исключительно запасными белками, в то время как 7S и 2S фракции содержат некоторые не запасные белки. Так, например, фракция 7S зернобобовых культур содержит лектины, которые, предположительно, участвуют в прорастании семени. Фракция 2S, кроме запасных белков в виде альбуминов, содержит различные ферменты и ингибиторы некоторых протеолитических ферментов [43].

1.1.2. Пищевая и биологическая ценность

Пищевая ценность представляет собой комплекс свойств пищевых продуктов, обеспечивающих физиологические потребности человека в основных питательных веществах и источниках энергии (белки, жиры, углеводы), а также других необходимых для полноценного питания веществ, таких как витамины и микроэлементы. Пищевая ценность белков

определяется их биологической ценностью и степенью их усвоения организмом. Последняя складывается из перевариваемости белка ферментами пищеварительного тракта и доли их всасывания в тонком отделе кишечника. Как правило, растительные белки усваиваются организмом человека в меньшей степени, чем животные. Например, белки молока, молочных продуктов, яиц усваиваются на 96 %, мяса и рыбы – на 93-95 %, белки хлеба – только на 62-86 %, овощей – на 80 %, картофеля и некоторых бобовых – на 70 % [24, 44].

В таблице 1.1 представлены данные по содержанию белков, жиров, углеводов и витаминов в зрелых семенах разных видов зернобобовых культур [45-48].

Таблица 1.1. Содержание макромолекулярных компонентов, минеральных веществ и витаминов в спелых семенах зернобобовых культур. Данные из [45-48].

Зернобобовая культура	Содержание макромолекулярных компонентов и минеральных веществ, %				Содержание витаминов, мг/кг				
	Белки	Углеводы	Липиды	Минеральные вещества	А (ретинол)	В ₁ (тиамин)	В ₂ (рибофлавин)	В ₃ (ниацин)	В ₆ (пиридоксин)
Горох	22,9	41,2	1,4	2,7	7,0	5,1	0,76	-	1,0
Фасоль	21,3	40,1	1,6	4,0	4,0	4,6	1,6	20,8	2,8
Соя	33,7	26,3	18,1	4,7	3,8	9,9	5,2	25,1	11,9
Кормовые бобы	23,0	55,0	2,0	3,1	-	3,8	2,4	21,0	-
Чечевица	23,5	52,0	1,4	3,2	1,0	4,3	2,6	22,0	-
Нут	19,8	41,2	3,4	2,7	1,8	4,8	1,8	16,0	-
Чина	23,0	55,0	1,5	3,2	-	8,3	1,4	27,6	3,2

Семена зернобобовых в значительной мере удовлетворяют потребности человека в белке, углеводах и витаминах, особенно группы В [49].

По сравнению со всеми зерновыми, семена зернобобовых имеют наивысшее содержание белка, что обеспечивается их симбиозом с клубеньковыми бактериями, способными фиксировать азот из воздуха.

Белки семян зернобобовых растений более сбалансированы по содержанию незаменимых аминокислот по сравнению с другими растительными белками (таблица 1.2) и имеют высокую

биологическую ценность. В наибольшей степени это относится к сое, которая по содержанию лизина не уступает сухому молоку и куриному яйцу [45].

Таблица 1.2. Содержание незаменимых аминокислот в семенах зерновых бобовых культур, г/кг сухого вещества. Данные из [45].

Аминокислота	Зернобобовые культуры						
	Горох	Фасоль	Соя	Кормовые бобы	Чечевица	Нут	Чина
Лизин	22,7	23,3	24,0	14,5	22,3	20,7	18,4
Метионин	1,0	1,5	5,0	3,3	4,0	5,2	4,5
Цистеин	2,8	6,2	4,6	4,2	6,3	4,8	3,0
Аргинин	19,7	16,5	25,6	17,0	21,6	24,4	23,1
Лейцин	31,8	44,0	41,6	24,8	38,8	39,6	33,5
Фенилаланин	11,6	14,6	16,0	6,2	13,0	11,3	10,0
Треонин	11,7	11,0	13,0	9,8	10,9	10,5	12,0
Валин	11,0	16,0	16,5	9,6	15,8	11,5	12,5
Триптофан	1,8	4,4	3,6	1,6	5,3	3,0	2,9
Гистидин	4,9	6,5	8,0	7,0	9,0	6,0	6,1
Сумма	120,0	144,0	158,0	107,0	147,0	128,0	126,0

Современным стандартом качества пищевых белков является показатель PDCAAS – скорректированный аминокислотный коэффициент усвояемости белков, рекомендованный для применения при оценке качества белков Объединенным экспертным советом ФАО/ВОЗ [50]. Этот показатель включает в себя три основных параметра оценки качества белка: содержание незаменимых аминокислот, усвояемость и способность поставлять незаменимые аминокислоты в необходимом для человека количестве. При этом PDCAAS пищевых белков измеряется путем сравнения содержания незаменимых аминокислот в пище, скорректированного с учетом усвояемости и модели потребностей в аминокислотах для детей в возрасте 2-5 лет (данная возрастная группа имеет наивысшие потребности в белке). PDCAAS прямо пропорционален качеству белка из конкретного источника для питания человека. Продукты, содержащие наиболее качественные белки, имеют PDCAAS = 1,0.

В отличие от других часто используемых в питании продуктов растительного происхождения, изолят белка соевых бобов по показателю PDCAAS эквивалентен белкам мяса, молока и яйца (таблица 1.3).

Таблица 1.3. Оценка качества белка по данным Объединенного экспертного совета ФАО/ВОЗ. Взято из [51].

Продукт	PDCAAS	Продукт	PDCAAS
Изолированный соевый белок «СУПРО»	1,00	Гороховая мука	0,69
Казеин	1,00	Консервированные бобы	0,68
Яичный белок	1,00	Арахис	0,57
Обезжиренное сухое молоко	1,00	Чечевица	0,52
Сывороточный белковый концентрат	1,00	Кукуруза	0,42
Соевая мука	0,92	Цельная пшеница	0,40

1.1.3. Антиалиментарные компоненты

Важным аспектом проблемы выделения белка из растительного сырья является присутствие природных компонентов, способных избирательно ухудшать или блокировать усвоение нутриентов [52]. Эти соединения принято называть антиалиментарными факторами питания. Они включают в себя различные классы веществ: ингибиторы протеаз, лектины, авитамины, алкалоиды, гликозиды (цианиды и сапонины), полифенолы, олигосахариды рафинозной группы (α -галактозиды – раффиноза, стахиоза, вербаскоза), фитаты.

Содержание антиалиментарных компонентов в составе белковых препаратов необходимо контролировать не только с точки зрения физиологии питания, а также ввиду их возможного влияния на функциональные свойства белков [53]. Для устранения антиалиментарных факторов питания используют различные технологические приемы: вымачивание бобов, гидротермическая обработка, ферментация, проращивание и др.

1.1.4. Аллергенность

Аллергенность – способность факторов различной природы (физических, химических и биологических) вызывать гиперактивный иммунный ответ организма (аллергию). Высокий уровень содержания иммуноглобулина Е (IgE) является определяющей характеристикой такого ответа [54].

В сое обнаружено 42 белка, вызывающих аллергию, при этом β -конглицинин и глицинин относят к основным аллергенам соевых бобов [27, 55]. Аллергены сои могут вызывать иммунные реакции различной степени остроты, вплоть до угрожающих жизни [56]. В ряде обзоров обобщены данные о природе, содержании, механизмах действия, методах идентификации и

способах понижения активности аллергенных компонентов семян зерновых и зернобобовых культур [57-59].

В работе [60] методами сканирующей калориметрии и Фурье спектроскопии показано, что иммунореактивность глицинина может подвергаться существенным изменениям вследствие нарушения нативной структуры белка (например, при варьировании pH и ионной силы раствора). Агрегация и/или увеличение компактности субструктур глицинина может предотвращать реакцию аллергенных участков (эпитопов) с IgG антителами. Существенное понижение иммуногенности глицинина выявлено при значениях pH ниже 2,0 и выше 11,0. В нейтральной среде глицинин сохраняет свои иммунореактивные свойства при нагревании вплоть до 80°C, выше 90°C эти свойства начинают понижаться [61]. Потерю антигенных свойств связывают с разрушением четвертичной структуры и возможными изменениями вторичной и третичной структур белка.

В последние десятилетия разработан ряд методов уменьшения аллергенности соевых белков, таких как использование микроволн, ультрафиолета, ультрафильтрации, ультразвука, генетической и химической модификаций [56, 62]. Однако многие из указанных методов либо не полностью разрушают эпитопы, либо по настоящий момент не в полной мере изучены.

Одним из наиболее эффективных методов понижения аллергенности соевых белков, не приводящим к существенным ухудшениям их функциональных свойств, является ограниченный протеолиз – обработка протеазами до определенной степени гидролиза [33]. Обработка трипсином уменьшает иммунореактивность глицинина в 10 раз по сравнению с интактным глобулином [63]. Ограниченный протеолиз глицинина пепсином и химотрипсином также приводит к уменьшению аллергенности этого белка [64]. Исследованы стабильность и иммунореактивность глицинина и β -конглицинина при протеолизе пепсином, трипсином и их совместном действии для различных временных интервалов при различных соотношениях фермент/субстрат. Наибольший эффект гидролиза получен при совместном действии двух ферментов на глицинин и действии трипсина на β -конглицинин [65]. В этом исследовании продемонстрировано, что пищеварительные ферменты оказывают различные эффекты на стабильность и иммунореактивность глицинина в зависимости от времени инкубации и соотношении фермент/субстрат. В работе [33] установлено, что среди ряда изученных экзопептидаз и эндопептидаз папаин проявляет наиболее эффективное действие в снижении аллергенности изолятов белков сои при сопутствующем повышении сенсорных и технофункциональных свойств.

1.1.5. Атакуемость ферментами желудочно-кишечного тракта

Одним из наиболее важных показателей качества пищевого белка является его перевариваемость. Определение перевариваемости методом биопроб на крысах является дорогостоящей и длительной процедурой [66], что привело к разработке методик, имитирующих переваривание белка *in vitro*.

В желудочно-кишечном тракте человека белки пищи начинают расщепляться под действием пепсина, действующем в желудке в кислой области значений pH. В кислой среде пепсин по большей части атакует пептидную связь рядом с объемной гидрофобной аминокислотой, такой как лейцин и фенилаланин, а также рядом с триптофаном и тирозином. Пептидные связи при аргинине, лизине и гистидине расщепляются пепсином довольно редко [67]. Дальнейшее расщепление белков в организме человека происходит в щелочной среде двенадцатиперстной кишки под действием других эндопептидаз (пептидаз, гидролизующих преимущественно пептидные связи внутри пептидной цепи) – трипсина и химотрипсина. Эти ферменты относятся к сериновым протеазам, их первичные структуры похожи. Химотрипсин связывается с крупными ароматическими остатками аминокислот, таких как фенилаланин, тирозин и триптофан. Карман связывания субстрата у трипсина более глубокий и узкий и имеет отрицательно заряженный аспартат, что обуславливает связывание трипсина положительно заряженными аминокислотными остатками, такими как у лизина и аргинина [68]. Дальнейший гидролиз образованных пептидов до свободных аминокислот происходит под действием экзопептидаз.

Некоторые белки, в том числе и легумины, гидролизуются ферментами желудочно-кишечного тракта не полностью. Существует несколько основных причин, влияющих на низкую подверженность легуминов протеолизу ферментами желудочно-кишечного тракта. Среди них – большое количество внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей, поддерживающих компактную и устойчивую к разрушению структуру молекул легуминов (в частности, глицинина) [26, 69]. Гидрофобность основных субъединиц обуславливает способность глицинина к агрегации, что, в свою очередь, также отрицательно сказывается на интенсивности действия ферментов [70, 71].

Примечательна взаимосвязь сложности переваривания белка с его аллергенностью, впервые установленная Аствудом [72]. Им было показано, что ряд аллергенных белков (белки арахиса, сои, молока) проявляют особую устойчивость к протеолитическому действию пепсина, по сравнению с неаллергенными белками.

Для целей улучшения атакуемости легуминов ферментами желудочно-кишечного тракта применяются различные подходы. В частности, несколько большей атакуемости легуминов

удается достичь их предварительной термообработкой при определенных температурах [73, 74], приводящей к частичной или полной денатурации белков, и, как следствие, экспанированию труднодоступных в интактном состоянии специфических участков. Стоит отметить, что избыточная денатурация легуминов при более высоких температурах приводит к понижению их атакуемости ферментами из-за процесса агрегации белка [74]. Перспективным подходом к улучшению перевариваемости легуминов в желудочно-кишечном тракте человека является их предварительная обработка протеазами [32].

1.1.6. Тенденции в выращивании зернобобовых культур

Во многих странах с высокой плотностью населения (Китай, Индия и другие страны юго-восточной Азии) зернобобовые и масличные культуры являются основными источниками пищевого белка.

Мировое производство сои увеличивается высокими темпами. В настоящее время самые большие посевные площади сои находятся в США (около 35-40 % от мировых), Бразилии (20 %), Аргентине (12 %), Китае (12-13 %) и Индии (8 %). В Европе сосредоточено около 2 % от общей площади мировых посевов сои. Посевные площади соевых бобов в России составляют 0,7-1 % от общей посевной площади сои в мире [75], однако в последние десятилетия посевные площади и валовый сбор сои в России увеличился в несколько раз. В 2015 году соя в России выращивалась на площади около 2 млн га, урожай составил 2,7 млн тонн. В феврале 2016 года экспорт соевых бобов из России впервые в истории превысил их импорт [76]. Лидерами по валовому сбору сои в России являются Амурская и Белгородская области, Краснодарский край [76].

Из зернобобовых культур наиболее выращиваемой в России является горох. По данным 2015 года, он занимает 67 % (1,1 млн га) от посевной площади зернобобовых культур с долей производства 76 % (1,6 млн тонн) [77].

На несколько меньших площадях в России высеваются фасоль, используемая в питании еще более широко, чем горох, люпин, богатый белком и лишенный ингибитора трипсина, и кормовые бобы, которые все чаще рассматриваются как потенциальные заменители мяса в диетических продуктах рациона человека [78]. На данный момент в России сбор зернобобовых составляет 2,4 % (2,0 млн тонн) от сбора зерновых и зернобобовых культур, однако в последние годы наметилась тенденция к его увеличению [77].

Анализируя приведенные данные, можно сделать вывод о возрастающих объемах производства зернобобовых и масличных культур, и, в частности, соевых бобов в нашей стране.

1.2. Структура легуминов

Согласно современным представлениям, различают четыре уровня структурной организации белков: первичная структура – последовательность аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями; вторичная структура – локально упорядоченное пространственное расположение звеньев цепи; третичная структура – полная трехмерная структура единичной цепи либо нескольких цепей, связанных дисульфидными связями, которая не может быть разделена без разрушения ковалентных связей; четвертичная структура – размещение в пространстве взаимодействующих между собой субъединиц (элементов третичной структуры) [79, 80]. Выделяют еще два уровня организации: сверхвторичные структуры – для обозначения энергетически предпочтительных агрегатов вторичной структуры, и домены – для обозначения областей в третичной структуре, которым свойственна определенная автономия структурной организации [81].

Установлено, что структура легуминов семян различных видов зернобобовых и масличных культур гомологична на всех уровнях организации [82]. Отличительными особенностями первичной структуры легуминов является низкий уровень серосодержащих аминокислот (цистеина и метионина) и высокий уровень содержания лизина [83]. Известно, что глобулины семян характеризуются высоким содержанием глутаминовой и аспарагиновой кислот – от 7 до 15 % [84]. Для легуминов зернобобовых и масличных культур характерна высокая степень амидирования этих аминокислот. Так в глициине около 50 % карбоксильных групп указанных аминокислот находятся в виде амидов, что характерно и для запасных белков других зернобобовых [85]. Такое высокое содержание дикарбоновых аминокислот и их амидов в запасных белках объясняется важной ролью этих аминокислот при прорастании семян как резерва азота [86].

Согласно [87], содержание гидрофобных (Ala, Val, Ile, Leu и Phe) и гидрофильных (Lys, His, Arg, Asp и Glu) аминокислотных остатков в составе глицинина составляет 23,5 % и 46,7 %, соответственно. Молекула глицинина содержит в среднем 5,6 молей SH-групп и 37,3 молей SS-групп на 1 моль белка (соответственно, 1,1 SH- и 10,1 SS- на поверхности; 4,5 SH- и 27,2SS- групп внутри молекулы) [82]. Изоэлектрическая точка легуминов находится в области значений pH 4,6-5,0 [69, 85, 88-90].

Гомология вторичной структуры легуминов семян зернобобовых и масличных культур (рапс, подсолнечник, соя, конопля, кормовые бобы) проявляется в том, что для нее характерно высокое содержание неупорядоченных структур и β -слоев (30-50 %) при относительно низком содержании α -спиралей (около 10 %) [91]. Так, например, легумин гороха содержит не более 10 % α -спиралей и около 40 % β -слоев [92]. В молекуле глицинина доля α -спиралей составляет

около 5-6 %, β -слоев – около 35-40 %, и бóльшая часть молекулы представлена неупорядоченными структурами [82].

Субъединицы нативных легуминов имеют компактную глобулярную конформацию. Характерной чертой структуры субъединиц является, наряду с наличием доменной структуры, наличие мобильных неупорядоченных участков в составе α -цепей, образующих гидрофильные слои на поверхности гексамерной молекулы, при этом нейтральные и основные участки цепей скрыты внутри субъединицы [93]. Для субъединиц глобулинов установлены следующие особенности: С-концевой участок кислой полипептидной цепи имеет слабовыраженную структуру; остальная часть кислой цепи и основная полипептидная цепь содержат хорошо выраженную β -структуру.

С точки зрения четвертичной структуры легумины представляют собой олигомеры, а именно, гетерогексамеры. Они состоят из 12 полипептидных цепей: шести кислых (α) и шести основных (β) с молекулярными массами 23-58 и 20-23 кДа, соответственно, попарно связанных дисульфидными связями, образующими 6 субъединиц [86]. Структурное сходство 11S глобулинов проявляется в единообразном способе объединения субъединиц в гексамерную четвертичную структуру, что послужило основанием для разработки общей структурной модели белков этой группы. В модели четвертичной структуры, разработанной Плицем и сотр. на основе данных малоуглового рассеяния [94], предполагается, что два структурных домена образованы консервативными N-концевыми участками последовательностей α - и β -цепей. Гидрофобный С-концевой участок β -цепи связывает 6 субъединиц посредством гидрофобных взаимодействий. Что же касается гидрофильных С-концевых участков α -цепей, то структурная модель постулирует их расположение на поверхности белковой молекулы. Было показано, что 11S глобулины семян подсолнечника, капусты, сои и конопли обладают одинаковой четвертичной структурой и лишь немного отличаются по размерам [85]. Некоторые характеристики четвертичной структуры легуминов в растворе будут приведены ниже.

Наиболее изученной является структура глицинина – легумина бобов сои *Glycine max*. Глицинин сои состоит из пяти видов субъединиц [95, 96]. На основании первичной структуры, субъединицы относят к типу I (A1aB1b, A1bB2 и A2B1a) и типу II (A3B4 и A5A4B3). Согласно современным представлениям, основанным на данных рентгено-структурного анализа, олигомерная молекула глицинина образуется в результате соединения двух структурно эквивалентных тримеров субъединиц (проглицининов) [95, 97]. Каждая субъединица глицинина синтезируется единой полипептидной цепью, посттрансляционно расщепляющейся с образованием α -цепей (N-концевой домен) и β -цепей (С-концевой домен), соединенных

дисульфидной связью. Полагают, что N- и C-концевые домены гомологичны и структурно эквивалентны. Структурной основой доменов является β -баррель из антипараллельных β -стрендов BCDEFGHI, соединенный с группой α -спиралей. Такова структура глицинина в соответствии с результатами рентгеноструктурного анализа гомо-олигомеров двух типов субъединиц: A1aB1b (pdb|1fxz) [95] и A3B4 (pdb|1od5) [97].

Тримеры субъединиц (протомеров) глицинина, состоящие из кислых и основных цепей в составе субъединиц, соединяются с образованием гексамера таким образом, что плоскости тримеров ориентируются параллельно, а их субъединицы оказываются попарно связанными (рисунок 1.1) [97].

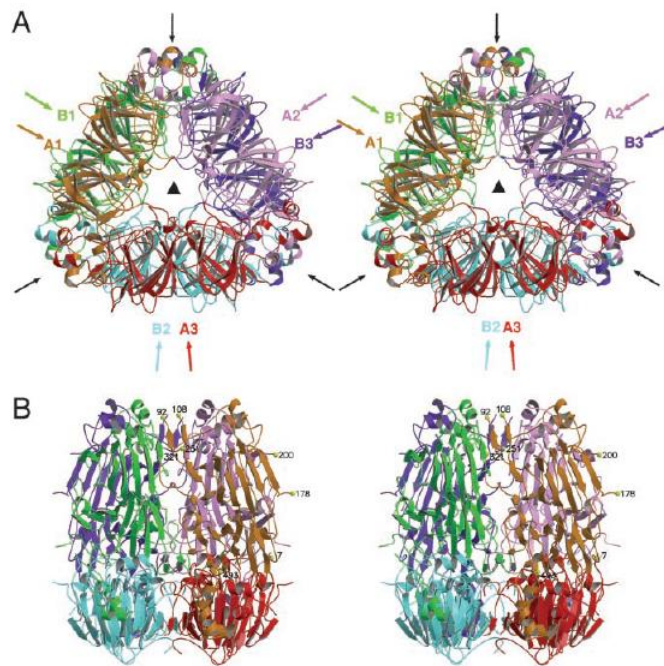


Рисунок 1.1. Стереобразия ленточной диаграммы молекулы гомогексамера глицинина A3B4. Шесть протомеров изображены оранжевым (A1), розовым (A2), красным (A3), зеленым (B1), голубым (B2) и синим (B3) цветами. Черными стрелками указаны оси симметрии второго порядка. Черными треугольниками изображена ось симметрии третьего порядка, расположенная перпендикулярно изображению. Цветными стрелками изображены оси псевдвторого порядка двух тримеров. Взято из [97].

Характерной чертой структуры протомеров глицинина является, наряду с наличием доменной структуры, наличие мобильных неупорядоченных участков в составе α -цепей, образующих гидрофильные слои на поверхности гексамерной молекулы глицинина: петля между стрендами E и F, участок, связывающий β -баррель с α -спиралями, и гипервариабельный C-концевой участок. Мобильные участки ингибируют образование гексамера из-за стерических

препятствий, располагаясь непосредственно в области связывания тримеров. После расщепления цепи, составляющей субъединицу тримера, между аминокислотными остатками Asn-320 и Gly-321, неупорядочные участки способны перемещаться на боковые поверхности тримера. Этот процесс в значительной мере открывает область для связывания между тримерами с образованием гексамера, при этом неупорядочные участки кислых цепей субъединиц перемещаются к боковой поверхности гексамера [97]. Неупорядоченность, относительная свобода перемещений и расположение на поверхности молекулы делают эти участки в значительной степени подверженными расщеплению протеазами [98, 99].

Молекулярные параметры некоторых легуминов в растворе приведены в таблице 1.4. Для определения молекулярной массы в различных работах использовались такие методы, как статическое светорассеяние (СРС), гель-электрофорез (ГЭ), скоростная седиментация (СС), гель-фильтрация (ГФ), малоугловое рентгеновское рассеяние (МРР).

Таблица 1.4. Структурные параметры легуминов некоторых зернобобовых культур в растворе

Параметр/Культура	Соевые бобы	Кормовые бобы	Горох
Молекулярная масса, кДа	350 (СРС, СС) [100]; 350 (ГЭ) [101]; 317 (СС) [101]; 322 (СС)[101].	350 (МРР) [94]; 320-400 (ГЭ) [102]; 347 (ГФ) [103].	359 (МРР) [104]; 390-395 (ГФ) [105]; 415-420 (СС) [105].
Коэффициент седиментации (вода, 20°C), $\times 10^{13}$, с	12,3 [101]; 12,3 [106]; 12,2 [88]; 12,2 [93].	11,4 [106]	12,1 [107]; 13,1 [106].
Коэффициент диффузии (вода, 20°C), $\text{см}^2/\text{с}$, $\times 10^7$	3,44 [101]; 2,91 [88]; 3,48 [93].	3,38 [108]	3,49 [107]
Гидродинамический радиус, нм	5,85 [82]	6,3 [34]	7,1 [105]
Радиус инерции, нм	4,40 [82]	4,45 [34]; 4,45 [108]	4,40 [109]
Парциальный удельный объем, мл/г	0,730 [101]; 0,715 [88]; 0,719 [93].	0,7283 [34]	0,733 [110]; 0,735 [107].
Фрикционное отношение	1,40 [101]; 1,40 [88]; 1,55 [93].	1,40 [108]	1,4 [104, 109]

Судя по представленным в таблице 1.4 данным, молекулярные параметры легуминов различных культур имеют близкие значения, что подтверждает представление об их гомологичном строении.

Вторичная и третичная структура легуминов в растворе зависит от свойств растворителя, прежде всего величины рН и ионной силы. В работе [111] показано влияние ионной силы раствора на изменение структуры легуминов и, как следствие, поверхностной гидрофобности. С увеличением ионной силы поверхностная гидрофобность повышается, что свидетельствует о перераспределении аминокислотных остатков на поверхности глобулы. Об этом свидетельствует сдвиг λ_{\max} триптофана в спектрах флюоресценции и изменение относительной интенсивности I_{850}/I_{830} в Раман спектрах, которая служит индикатором степени экспонирования тирозиновых остатков на поверхности глобулы [111].

Четвертичная структура легуминов также подвергается изменениям в зависимости от рН и ионной силы раствора. При нейтральных значениях рН и ионной силе выше 0,35 М устойчивой в растворе является гексамерная форма глицинина с коэффициентом седиментации приблизительно 11S. При нейтральном значении рН и ионной силе ниже 0,01 М часть глицинина диссоциирует на тримеры (7S) и протомеры (3S). Диссоциация глицинина до этих же форм была установлена и в кислой среде при рН < 3,8 [112].

1.3. Физико-химические свойства легуминов

Ключевыми физико-химическими свойствами легуминов, определяющими их функциональные свойства, являются конформационная стабильность и поверхностная активность.

1.3.1. Конформационная стабильность

В общем случае под конформационной (термодинамической) стабильностью понимают способность молекулы белка сохранять нативную конформацию при различных воздействиях физической и химической природы. Конформационная стабильность является одной из важнейших физико-химических характеристик молекулы белка, которая зависит от его структуры и термодинамического качества растворителя. Она играет важную роль как при выполнении белками их биологических функций, так и в процессах самоорганизации молекул белка в растворе, таких как конформационные переходы, ассоциация, гелеобразование, взаимодействие с лигандами и др., лежащих в основе их функционирования как структурообразующих компонентов пищевых систем. Гидрофобно-гидрофильный баланс нативной и денатурированной форм макромолекулы белка определяет его физико-химические и

функциональные свойства, например, эмульгирующую и пенообразующую способности, а также способность к термотропному гелеобразованию. В процессе денатурации облегчается доступ к гидрофобным участкам макромолекулы белка и, таким образом, увеличивается число контактов с гидрофобными поверхностями или число центров связывания с гидрофобными лигандами.

Мерой конформационной стабильности белковой молекулы принято считать изменение свободной энергии Гиббса (ΔG_d) при полной денатурации (переходе белка из нативного упорядоченного состояния в менее упорядоченное денатурированное состояние) [113]. При термической денатурации величина ΔG_d обычно определяется путем экстраполяции в область физиологических температур, а в присутствии денатурирующего агента – путем экстраполяции концентрации последнего к нулю. Некоторые методы определения термодинамической стабильности белков приведены в работах [114-117].

Из ряда методов, с помощью которых можно определить термодинамические параметры денатурации, метод высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии (ВЧ-ДСК) обладает рядом преимуществ, в первую очередь высокой чувствительностью и точностью. Также этот метод не требует привлечения дополнительной информации о механизме процесса денатурации. Подход, основанный на использовании ВЧ-ДСК для определения стабильности как малых простых, так и мультидоменных белков, развит в работах [118-120].

Согласно Привалову, белки, в зависимости от кооперативности процесса денатурации, делятся на однодоменные и мультидоменные. Однодоменные белки денатурируют кооперативно, без образования промежуточных форм. Мультидоменные белки денатурируют частями (доменами), каждая при своей определенной температуре, при этом вклад доменов в суммарную избыточную теплоемкость процесса денатурации можно оценить, используя метод деконволюции [114].

В работах [121-123] исследовали термическую денатурацию глицинина и влияние на этот переход ионной силы раствора. Установлено, что стадии денатурации субъединиц предшествует стадия диссоциации гексамера на субъединицы. Повышение ионной силы растворов приводило к повышению термодинамических параметров денатурации глицинина. Аналогичные закономерности наблюдались и для других легуминов [124].

Систематическое исследование термодинамической стабильности легуминов методом ВЧ-ДСК с использованием развитого Приваловым и сотрудниками подхода выполнено в серии работ В. Я. Гринберга и сотр. [125-129]. Полученные результаты обобщены в статье [130]. Сравнительное исследование легуминов сои, кормовых бобов, гороха, подсолнечника и рапса в

одном и том же растворителе показало, что термодинамические параметры их денатурации, такие как температура денатурации, удельная энтальпия и инкремент теплоемкости, довольно близки (в таблице 1.5 приведены данные для глицинина и легумина *V.f.*), что соответствует представлениям об их гомологичном строении и одинаковых биологических функциях [83, 85, 98, 108].

Анализ термограмм показал, что молекулу легумина можно рассматривать как ансамбль 12 эквивалентных подсистем (конституентных цепей) с высоко коррелированными взаимодействиями аминокислотных остатков внутри каждой из них. Определяющий вклад в свободную энергию нативной формы 11S глобулинов вносят взаимодействия аминокислотных остатков внутри цепи. Вклад взаимодействий между цепями и (или) субъединицами, вероятно, достаточно мал. В первом приближении конформационный переход внутри конституентной цепи и (или) субъединицы можно рассматривать как переход между двумя состояниями [130].

Таблица 1.5.

Термодинамические параметры денатурации легуминов соевых и кормовых бобов. Данные взяты из работы [130].

Концентрация NaCl, М	Глицинин		Легумин <i>V.f.</i>	
	Температура денатурации, °С	Энтальпия денатурации, Дж/г	Температура денатурации, °С	Энтальпия денатурации, Дж/г
0	79	20,1±0,20	78	15,5±0,05
0,1	85	23,0±0,10	87	20,3±0,10
0,3	92	24,6±0,05	94	22,5±0,20
0,5	96	25,5±0,10	97	24,2±0,05
1,0	101	26,4±0,20	101	25,8±0,10

В серии работ [125, 126, 128] изучено влияние рН, концентрации нейтральных солей и некоторых алифатических спиртов на термодинамические параметры денатурации легуминов и с помощью модели двух состояний проанализировано их влияние на термодинамическую стабильность 11S глобулинов ряда зернобобовых культур. Установлено, что конформационная стабильность 11S глобулинов возрастает с повышением величины рН и концентрации

нейтральных солей (от 0 до 1 М NaCl). Показано, что повышение конформационной стабильности легуминов при увеличении рН от 3,0 до 4,0 является результатом вклада небольшого числа аномальных карбоксильных групп с $pK \approx 1,5$, ионизированное состояние которых стабилизировано водородными связями между остатками тирозина или гистидина. Эффект солей объясняется приблизительно равноценным вкладом в стабильность как экранирования электростатических взаимодействий поверхностных зарядов молекулы белка, так и лиотропным эффектом.

Согласно [130], средняя величина свободной энергии денатурации легуминов в расчете на протомер равна 77 ± 10 кДж/моль, т.е. сравнима с таковой для малых глобулярных белков, которая составляет 30-71 кДж моль⁻¹ [131].

Согласно данным ЯМР [104], глицинин характеризуется высокой термической стабильностью. Высказано предположение, что в процессе нагревания β -слои глицинина не подвергаются существенным изменениям (вплоть до 95 °С), тогда как участки между β -слоями плавятся с экспонированием гидрофобных остатков. Высокая термическая стабильность легуминов подтверждается калориметрическими методами исследования, согласно которым свободная энергия Гиббса денатурации глицинина существенно выше, чем у всех приведенных в обзорной работе глобулярных белков [125, 132-134].

В целом, анализируя данные по конформационной стабильности легуминов, можно заключить, что молекулы легуминов, имея сложную, стабилизированную вторичными взаимодействиями и дисульфидными связями структуру, характеризуются относительно высокой конформационной стабильностью, вероятно, связанной с запасной функцией этих белков.

1.3.2. Поверхностная активность и свойства адсорбционных слоев

Обладая амфифильной структурой, молекулы белка способны адсорбироваться на межфазных границах газ/жидкость, жидкость/жидкость и жидкость/твердое тело. Адсорбция молекул белка на поверхности раздела фаз воздух/раствор и масло/раствор является необходимым процессом для образования и стабилизации ими пен и эмульсий.

Мерой поверхностной активности белка служит величина максимально достижимого поверхностного давления на межфазной границе $\pi = \sigma^0 - \sigma$, где σ – поверхностное натяжение раствора белка и σ^0 – поверхностное натяжение растворителя.

Поверхностная активность белков и реологические свойства адсорбционных слоев определяются структурой белка [135]. На адсорбционное поведение белков влияет суммарный заряд и характер его распределения по поверхности белковой молекулы [136, 137]; общая

поверхностная гидрофобность и характер распределения на поверхности глобулы гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков [135].

Кроме структурных факторов на адсорбцию молекул влияет конформационная стабильность белковой молекулы, т.е. способность к разворачиванию или денатурации. Чем ниже конформационная стабильность молекулы белка, тем больше экспонируется находящиеся внутри нативной молекулы неполярных участков к поверхности раздела фаз, тем большей поверхностной активностью обладает молекула белка [135, 138, 139].

Динамические кривые формирования адсорбционного слоя молекулами белка на поверхности раздела фаз (кривые зависимости поверхностного натяжения или давления от времени) характеризуются следующими последовательными этапами: 1) диффузия молекул к поверхности раздела фаз; 2) ориентация молекул к неполярной фазе преимущественно неполярными участками и адсорбция, сопровождающаяся частичной денатурацией; 3) углубление процесса денатурации и взаимодействие между адсорбированными молекулами белка [140].

Свойства сформированных адсорбционных слоев (упругость и вязкость) исследуют путем определения сил, препятствующих деформации слоя. Деформацию адсорбционного слоя можно разделить на 2 типа: 1) деформация сдвига – площадь слоя не изменяется, меняется его форма; 2) дилатационная деформация – форма слоя остается неизменной, меняется площадь слоя. Реакция адсорбционного слоя на деформацию в динамическом дилатационном режиме характеризуется величиной поверхностного дилатационного модуля, состоящего из действительной и мнимой частей, которые соответствуют упругой и вязкостной составляющим. Величина и соотношение составляющих дилатационного модуля в значительной степени определяется конформацией молекул в адсорбционном слое и, как правило, коррелируют со стабильностью пен и эмульсий [141, 142].

Имеются немногочисленные сведения о поверхностной активности и свойствах адсорбционных слоев индивидуальных легуминов [135, 143-149].

Динамические кривые поверхностного натяжения растворов глицинина имеют типичную для глобулярных белков монотонную форму [148]. Так для глобулярных белков при формировании монослоя характерно монотонное повышение поверхностного давления и модуля эластичности до максимальной постоянной величины, и в обоих случаях максимальные значения этих параметров выше в случае белков, обладающих менее компактной структурой и большей гибкостью [150].

Легумины, адсорбированные на поверхности раздела воздух-вода, формируют упругие адсорбционные слои, для которых модуль упругости значительно превышает модуль вязкости,

а также характеризуется слабой частотной зависимостью [151]. Такой тип реологического поведения характерен для адсорбционных слоев всех глобулярных белков и называется эластичным (упругим).

В работе [151] установлено, что в случае глицинина наибольшее понижение поверхностного натяжения и наибольшие значения дилатационного модуля раствора удается достичь вдали от изоэлектрической точки белка (\approx рН 4,8) – либо в сторону уменьшения рН (до рН 3,0), либо в сторону увеличения (до рН 7,0).

Как и для других глобулярных белков, для глицинина характерно понижение поверхностного натяжения при увеличении концентрации белка до практически постоянной величины [148, 151]. Однако достигнутое состояние является квазиравновесным, так как конформационные изменения и белок-белок взаимодействия молекул белка внутри слоя развиваются весьма длительное время. С увеличением времени формирования адсорбционного слоя глицинина увеличивается действительная часть дилатационного модуля и понижается величина фазового угла, что связано, по-видимому, с увеличением числа контактов белок-белок в адсорбционном слое при углублении денатурации адсорбированных молекул и перераспределении их сегментов [151].

В сравнении с другими пищевыми белками, такими как казеинат натрия и белки молочной сыворотки, белки сои характеризуются более низкой скоростью диффузии к поверхности раздела фаз вследствие большей молекулярной массы и гидродинамического размера молекул [143, 152]. Кроме того, глицинин характеризуется более низкими величинами поверхностного давления растворов и дилатационного модуля по сравнению с другими глобулярными белками [143].

Ферментативный гидролиз глицинина и соевого белкового изолята увеличивает поверхностное давление их растворов, а также действительную часть дилатационного модуля совместно с понижением фазового угла, что приводит к формированию более упругих поверхностных слоев [153, 154].

В целом, анализ литературных данных по исследованию адсорбционного поведения интактных легуминов свидетельствует об их недостаточно высокой поверхностной активности вследствие особенностей молекулярной структуры (низкой поверхностной гидрофобности, высокой жесткости и компактности структуры). Для повышения эффективности использования легуминов с целью стабилизации дисперсных систем требуется направленное изменение их структуры.

1.4. Функциональные свойства легуминов

Изоляты и концентраты белков зернобобовых культур (преимущественно, соевых бобов) широко используются в качестве ингредиентов пищевых систем для повышения их пищевой ценности, а также регулирования их структуры, стабильности, реологических и осмотических свойств [155, 156].

Белки, используемые в составе пищевых продуктов, должны обладать не только высокой пищевой ценностью, но и высокими функциональными свойствами. Термин «функциональные свойства» означает физико-химические свойства белков, определяющие их поведение и характеристики в пищевых системах в процессах формирования, хранения и потребления. Эти свойства, как правило, являются результатом нескольких параллельно происходящих физических, физико-химических или химических воздействий, которым подвергается белок в пищевой системе. К числу важнейших функциональных свойств белков относятся гидратационные свойства (растворимость и водосвязывающая способность), поверхностные свойства (эмульгирующая, пенообразующая и стабилизирующая способность) и белковые взаимодействия (гелеобразование) [82, 157-159].

Ключевым направлением фундаментальных исследований является исследование взаимосвязи между параметрами структуры легуминов и их физико-химическими и функциональными свойствами. Структура легуминов определяет их гидродинамические характеристики (гидродинамический размер, форма молекул) и свойства поверхности молекул (величина поверхностного заряда, распределение полярных и неполярных групп, поверхностную гидрофобность) [13], и, как следствие – поверхностную активность молекул и свойства формируемых ими адсорбционных слоев, которые, в свою очередь, определяют их функциональные свойства [160]. Функциональные свойства белков зависят также от лабильности их структуры, т.е. способности изменять конформацию в зависимости от условий окружающей среды, и от характера и интенсивности взаимодействий как с высоко-, так и с низкомолекулярными компонентами пищевой системы [161-163].

1.4.1. Природные легумины

Исследованию функциональных свойств белковых концентратов и изолятов зернобобовых культур и природных легуминов посвящено большое количество работ, однако большая их часть носит феноменологический характер. Сравнение результатов исследований, выполненных различными группами, для установления взаимосвязи структуры, физико-химических и функциональных свойств затруднено вследствие использования различных экспериментальных условий и препаратов белка. Например, согласно данным [164], индексы

эмульсионной активности соевого белкового изолята и соевого белкового концентрата (основными компонентами которых являются глицинин и β -конглицинин) составляют $121,35 \pm 1,12$ и $110,20 \pm 1,72$ м²/г, соответственно. Однако по данным работы [165] индексы эмульсионной активности соевых концентрата и изолята составляют 36 и 10 м²/г, что указывает на существенную зависимость этого показателя от условий получения эмульсий и источника белка. Таким образом, при анализе экспериментальных данных необходимо учитывать природу и условия приготовления образцов белка, а также – условия проведения эксперимента.

Ниже рассмотрены результаты исследований, посвященных установлению взаимосвязи структуры с функциональными свойствами природных легуминов, в первую очередь глицинина.

1.4.1.1. Растворимость

Растворимость характеризуется количеством белка, переходящего в водный раствор в стандартных условиях и определяется термодинамическим сродством белка к растворителю. Это свойство в наибольшей степени зависит от присутствия нековалентных взаимодействий между макромолекулами белка, таких как гидрофобные, электростатические и водородные связи. Растворимость белка напрямую влияет на другие функциональные свойства. Водосвязывающая способность характеризуется адсорбцией воды на поверхности белка при участии гидрофильных остатков его аминокислот. Эта способность зависит от баланса гидрофильных и гидрофобных участков на поверхности белка, суммарного заряда и характера распределения заряженных аминокислотных остатков. В зависимости от количества воды вокруг белковой молекулы может формироваться один или несколько слоев молекул воды с одновременным заполнением ими углублений в рельефе поверхности молекулы белка [166].

Зависимость растворимости глицинина от ионной силы и величины рН характеризуется наличием точек экстремума: минимальная растворимость наблюдается при концентрации 0,1 М NaCl и значении рН, соответствующем изоэлектрической точке легуминов рI 4,6-4,8 [69, 82, 85]. Глицинин в растворе способен к образованию дисульфидно-связанных кластеров различных размеров, начиная от растворимых агрегатов с коэффициентами седиментации 14-22S, и заканчивая образованием нерастворимых полимерных частиц. Различные вещества в соответствующих концентрациях, такие как меркаптоэтанол, перекись водорода, сульфид натрия, сульфит натрия и цианид натрия, увеличивают растворимость глицинина путем блокирования образования межмолекулярных дисульфидных связей [167].

В работе [168] изучена связь между структурой глицинина на разных уровнях организации и его растворимостью в условиях, представительных для пищевых систем. При

понижении ионной силы от 0,5 до 0,2 и 0,03 при рН 7,6 основные полипептидные цепи экспонируются на поверхность молекулы глицинина. Такая структурная реорганизация вызывает смещение рН минимума растворимости в сторону более высоких значений. Седиментационный анализ свидетельствует о том, что при рН 7,6 и ионной силе 0,5 М глицинин имеет форму гексамера, в то время как при рН 3,8 и ионной силе 0,03 М глицинин существует в форме тримера. Изменяя рН и ионную силу можно управлять как четвертичной, так и третичной и вторичной структурой глицинина.

1.4.1.2. Эмульгирующая способность

Эмульсии составляют основу большого числа природных и искусственных материалов [156], применяемых в пищевой, фармацевтической и косметической областях промышленности. Пищевые эмульсии чаще всего являются макроэмульсиями с размером частиц от 0,1 до 100 мкм [169-172].

Эмульсии представляют собой термодинамически неустойчивые смеси взаимно нерастворимых жидкостей. Термодинамическая нестабильность эмульсий, проявляющаяся в процессе коалесценции, т.е. слиянии капель дисперсной фазы, может быть понижена за счет использования эмульгаторов и стабилизаторов, в частности, белков.

Способность белков, благодаря амфифильной структуре, адсорбироваться на поверхности раздела полярной и неполярной фаз, понижая межфазное натяжение, лежит в основе их эмульгирующей способности. Эмульгирующая способность белка зависит от структуры молекулы: размера, формы, поверхностной гидрофобности, поверхностного заряда, конформационной подвижности и других структурных и физико-химических характеристик. К числу факторов, определяющих эмульгирующую способность белков, относят скорость адсорбции на границе раздела фаз, количество адсорбированного белка, конформационную подвижность, степень понижения межфазного натяжения [173]. Роль реологических свойств белковых адсорбционных слоев в стабильности эмульсий неоднозначна. В основном полагают, что пленки с высокими реологическими характеристиками обладают высокой стабилизирующей способностью, однако есть экспериментальные данные, свидетельствующие об отсутствии связи между вязкоупругими свойствами белковых пленок и стабильностью эмульсий масло/вода [174].

Эмульгирующие свойства белковых молекул в значительной степени определяются их конформационной подвижностью [175]. Небольшие плотно упакованные белковые молекулы со значительным количеством дисульфидных сшивок обладают низкой гибкостью и, как правило, являются плохими эмульгаторами. На конформационную подвижность белковой

молекулы, кроме дисульфидных связей, влияют нековалентные взаимодействия, такие как водородные связи, Ван-дер-Ваальсовы, электростатические и гидрофобные взаимодействия [176]. Изменение конформации белковой молекулы может приводить к увеличению поверхностной гидрофобности, что влечет за собой улучшение эмульгирующих свойств [164].

В результате разворачивания белковой глобулы ее гидрофобные аминокислотные остатки ориентируются к неполярной фазе. Показано, что переход в неполярную фазу более чем одного аминокислотного остатка вызывает практически необратимую адсорбцию на поверхности раздела фаз [177]. В процессе образования эмульсий с использованием глицинина в неполярной фазе идентифицировано от 6 до 8 аминокислотных остатков белка [21, 178]. Таким образом, можно полагать, что адсорбция глицинина в изученных условиях носит необратимый характер.

Эмульгирующие свойства глобулярных белков зависят от поверхностной гидрофобности белковой молекулы, тогда как средняя молекулярная гидрофобность заметного эффекта на эмульгирующие свойства не оказывает [179, 180]. На этом основании полагают, что, в отличие от пенообразования, по крайней мере некоторые глобулярные белки не претерпевают существенного разворачивания на поверхности масло/вода [173].

Глицинин сои, из-за особенностей структуры (низкая поверхностная гидрофобность, жесткость структуры), обладает низкой способностью к адсорбции на поверхности раздела фаз, и, как следствие, недостаточно высокими эмульгирующими свойствами. В частности, они ниже, чем у β -конглицинина (7S запасной белок соевых бобов) [181].

Легумины зернобобовых культур в целом обладают недостаточно высокими эмульгирующими свойствами, в связи с чем предпринималось множество попыток их улучшения (в первую очередь, в случае легуминов сои и кормовых бобов). Наиболее успешными оказались методы модификации эмульгирующих свойств путем взаимодействия с полисахаридами, химической модификации, ограниченного протеолиза [182-185].

1.4.1.3. Пенообразующая способность

Пенообразование широко используют в пищевой промышленности при производстве многих аэрированных продуктов, таких как мороженое, взбитые сливки, хлеб, кекс, безе, пиво, шампанское, сыры, масла, соусы [186, 187].

Пена представляет собой систему, в которой в жидкости или в твердом теле сформированы ячейки, содержащие воздух или другой газ. Как правило, объем, занимаемый воздухом в пене, достаточно велик, а разделяющие пленки жидкости или твердого тела тонки. Пены термодинамически неустойчивы, их стабильность понижается за счет таких процессов, как дренаж (отделение жидкости), диспропорционирование (переход мелких пузырьков в более

крупные) и коалесценция (соединение пузырьков путем разрыва слоев) [13, 188]. Для характеристики способности белков формировать и стабилизировать пены измеряют различные параметры. Под пенообразующей емкостью, как правило, подразумевают объем пены по отношению к исходному объему раствора. Стабильность пены часто характеризуются временем ее полураспада [189].

Пенообразующая способность белка зависит от размера, формы, поверхностной гидрофобности, поверхностного заряда и других структурных и физико-химических характеристик белковой молекулы [173]. Пенообразующие свойства жестких, стабилизированных дисульфидными связями белков, как правило, улучшаются при восстановлении дисульфидных связей [190, 191]. Установлено, что прочность адсорбционных слоев, формируемых белками на границе воздух/вода, коррелирует со способностью стабилизировать пены [174, 192-194].

Пенообразующие свойства легуминов относительно хорошо изучены [169, 195-197]. Показано, что они ограничены из-за жесткой компактной структуры молекул [192], а также из-за невысокой поверхностной гидрофобности и большого молекулярного размера. В частности, в сравнительном исследовании показано, что белки молочной сыворотки образуют более стабильные пены, чем соевый белковый изолят [198].

Таким образом, легумины обладают необходимым потенциалом для использования в качестве пенообразователей при условии, что их структура может быть модифицирована в направлении более полного раскрытия гидрофобных участков при отсутствии агрегации в растворе [199].

Согласно [177], основными методами исследования эффективности эмульгирования и пенообразования являются исследования межфазного поверхностного натяжения и межфазной реологии на границе раздела неполярная фаза/водный раствор, измерение индекса эмульсионной емкости и индекса эмульсионной стабильности, а также пенообразующей способности и стабильности пен.

1.4.1.4. Гелеобразование

Одним из важнейших функциональных свойств глобулинов является их способность к гелеобразованию. Термотропное гелеобразование белков используется для производства текстуратов, сурими, для инкапсулирования пробиотиков и др. Образование гелей включает частичную денатурацию белка на первом этапе, и последующую агрегацию с образованием объемной структуры связанных друг с другом белковых молекул, погруженных в жидкую фазу. В образовании гелей ключевую роль играют те же самые химические и физические силы, что и

при денатурации и агрегации [200]. Белковые гели могут быть образованы под действием как повышения, так и понижения температуры, высокого давления, солей, рН, ферментов, сшивающих агентов и др. [168, 201]. Термотропные гели, образованные глицинином и легумином гороха, имеют близкие свойства, однако на повторный цикл нагревания-охлаждения отвечают по-разному: легумин гороха способен перестраиваться с упрочнением геля, а глицинин – нет [200]. При образовании гелей из глицинина, в отличие, например, от конглицинина, ключевыми факторами формирования гелей является не только гидрофобные взаимодействия и водородные связи, а также образование дисульфидных связей [202]. Вероятно, дисульфидные связи являются причиной формирования более прочных гелей глицинином по сравнению с конглицинином [203].

Перспективным направлением исследований является изучение закономерностей криотропного гелеобразования белков, т.е. гелей, образующихся под действием низких температур [204, 205]. Разработка их новых форм с заданными свойствами, в том числе депо-форм лекарственных субстанций, ферментных препаратов, носителей для трехмерного культивирования клеток и др. является важной задачей химии высокомолекулярных соединений и биотехнологии.

1.4.2. Мутантные и рекомбинантные легумины

Значительный вклад в изучение связи структура – функциональные свойства внесли систематические исследования, выполненные на образцах мутантных проглицининов, полученных методами рекомбинантной технологии и генной инженерии.

Изучена связь между структурой и функциональными свойствами (термотропным гелеобразованием, эмульгирующей способностью, а также пищевой ценностью) проглицинина (гомотримера A1aB1b), полученного путем генной модификации с использованием аминокислотных последовательностей глицининового типа из различных бобовых и не бобовых культур. Продемонстрирована возможность получения белка с функциональными свойствами, превосходящими свойства нативного глицинина [21]. Установлена роль длины и конфигурации высокозаряженных (положительно и отрицательно) протяженных вариабильных участков в С-концевой области глицинина как важнейшей детерминанты его растворимости и эмульгирующей способности на примере ряда мутантных проглицининов [22, 206].

На примере гомотримера A1aB1b продемонстрирована роль введенных сульфгидрильных групп и дисульфидных связей в стабилизации его структуры и гелеобразующей способности. 5 мутантных форм проявляли значительно более высокую термическую стабильность структуры, большую жесткость термотропных гелей и большую устойчивость к протеолизу α -

химотрипсином, чем природный тип проглицинина. Этот результат показывает, что данные функциональные свойства проглицинина могут быть повышены путем введения в первичную структуру остатков цистеина [207], а также указывает на влияние наличия дисульфидных шивок на конформационную стабильность и устойчивость к атаке ферментами.

На примере 4-х мутантов глицинина, содержащих субъединицы различных типов, была выявлена корреляция эмульгирующей способности с длиной гипервариабельных участков кислых цепей [208]. Однако взаимосвязи длины участков с другими физико-химическими свойствами мутантных белков глицинина не было установлено [208, 209].

В работе [210] показано, что индекс эмульсионной активности кислых цепей глицинина значительно выше этого параметра основных цепей, которые, несмотря на более высокую поверхностную гидрофобность, обладают низкими эмульгирующими свойствами из-за низкой растворимости. Индекс эмульсионной активности глицинина имеет наибольшие значения вдали от изоточки – при рН 3,0 и 9,0 (41,76 и 41,16 м²/г, соответственно), тогда как наиболее стабильные эмульсии образуются при рН 5,0 и 7,0 (периоды полураспада составляют 20,45 мин и 24,13 мин, соответственно). Примечательно, что при рН 3,0 и 9,0 индекс эмульсионной активности глицинина выше аналогичного параметра любых отдельных цепей при тех же значениях рН.

Функциональные свойства природного глицинина отличаются от свойств мутантных и рекомбинантных проглицининов и свойств отдельных субъединиц и не могут быть строго прогнозированы на их основе. Однако установленные общие закономерности, отражающие связь параметров структуры белковой молекулы и функциональных свойств белка, создают предпосылки для молекулярного дизайна легуминов с улучшенным составом и функциональными свойствами [21].

Подводя итог обзору функциональных свойств легуминов, можно отметить, что легумины обладают недостаточно высокими функциональными свойствами. Это обусловлено особенностями их структуры, такими как ограниченная растворимость при относительно низкой ионной силе и в окрестностях изоточки белка, низкая поверхностная гидрофобность, жесткость и компактность структуры за счет стабилизации вторичными взаимодействиями и дисульфидными связями. В этой связи возникает необходимость в поисках путей направленной модификации структуры легуминов для повышения их функциональных свойств.

1.5. Модификация структуры легуминов с целью регулирования функциональных свойств

Различные способы модификации структуры глобулинов (химический, физический, ферментативный, генно-инженерный) служат незаменимыми инструментами получения белков с заданными функциональными свойствами [181, 211-213]. Физико-химическая модификация белков за счет слабых неспецифических взаимодействий с другими компонентами пищевых систем (полисахаридами, поверхностно-активными веществами, липидами и др.) в данной работе не рассматривается.

1.5.1. Химическая модификация

Многообразие химических реакций, в которые могут вступать молекулы белков, открывают широкие возможности для их структурных преобразований. Химическая модификация позволяет изменять структуру белка и, как следствие, его функциональные свойства в широких пределах.

Известно большое число работ, посвященных улучшению функциональных свойств белков растительного происхождения с использованием различных химических процессов: умеренная кислотная обработка с нагреванием и без нагревания, восстановление дисульфидных связей [181, 214, 215]; ацелирование [216-217]; алкилирование [218]; фосфорилирование [219]; ацилирование ангидридами кислот [220]; сукцинирование [221]; гликозилирование [222]; амидирование, дезамидирование [223]; полимеризация путем образования дополнительных дисульфидных связей [224].

В работе [214] установлен положительный эффект таких воздействий, как диссоциация, дезамидирование, сокращение числа дисульфидных связей глицинина на его пенообразующие свойства. Сшивка молекул глицинина тироназой улучшает эмульгирующие свойства [225].

К числу безвредных для пищевого использования химических процессов относят модифицирование белковой молекулы глюкозой (гликозилирование), присоединение которой осуществляется по лизиновым остаткам [226]. Гликозилирование улучшает эмульгирующие свойства [227], гелеобразование, водосвязывающую способность [228], пенообразование и растворимость [229]. Обнаружено повышение растворимости, эмульгирующей и пенообразующей способностей при невысоких и средних степенях гликозилирования глицинина [230].

Несмотря на эффективность, процессы химической модификации весьма ограниченно применимы для производства пищевого и кормового белка ввиду возможности присутствия в продукте химических реагентов. Кроме того, химическая модификация оставляет в продукте

относительно большое количество солей. Некоторые типы химической модификации (например, сукцинирование) приводят к ухудшению гидролиземости белков желудочной и панкреатической протеиназами [231].

1.5.2. Физическая модификация

Физическая модификация белков включает изменение их структуры под действием факторов физической природы, таких как температура [32, 232], давление [233-235], ультразвуковое воздействие [236].

Термическая модификация является традиционным и самым распространенным методом модификации соевых белков, который используется в том числе и для дезактивации ингибиторов ферментов. Этот метод улучшает некоторые функциональные свойства, такие как растворимость и эмульгирующую способность, а также перевариваемость [32]. В частности, существенно улучшаются эмульгирующие свойства соевых белков после обработки горячим паром в течение 30 секунд [232].

Изучена способность изолята сои к гелеобразованию при обычных температурах при использовании в качестве денатурирующего агента высокого давления и включении ионов кальция [234]. Полученные гели могут быть использованы для инкапсулирования термолабильных соединений и пребиотиков. Обработанный при повышенном давлении изолят сои проявляет более высокую способность к стабилизации эмульсии [235].

Исследование воздействия низкочастотного ультразвука при переменной мощности и времени воздействия на дисперсию соевого изолята показало, что происходит изменение характера реологического поведения дисперсии, которая становится более вязкой. Повышаются содержание свободных сульфгидрильных групп, поверхностная гидрофобность и растворимость. Изучены изменения вторичной, третичной и четвертичной структуры белка в зависимости от мощности воздействия [236]. Показано, что суспензии термически обработанного соевого белкового изолята с различными размерами агрегатов (670-1000 кДа) улучшают стабильность пен и эмульсий. При этом растворы с меньшим размером агрегатов в меньшей степени способны к стабилизации эмульсий, чем растворы с более крупными агрегатами.

Физические методы модификации часто используют как предварительный этап для последующей химической модификации белков.

1.5.3. Биотехнологическая модификация

1.5.3.1. Генная инженерия

Рекомбинация субъединиц макромолекулы и генная инженерия являются основными биотехнологическими инструментами для направленной модификации структуры легуминов. Белковая инженерия базируется на технологиях рекомбинации последовательности ДНК, определяющей первичную структуру белка. Определенными удалениями или вставками нуклеотидов в цепочку ДНК удастся достичь спланированного изменения аминокислотной последовательности белка, что отражается на более высоких уровнях структурной организации и приводит к улучшению его функциональных свойств [21, 22, 237-240].

Достигнуты значительные успехи в области улучшения биологической ценности легуминов из различных источников путем включения в их состав незаменимых аминокислот [237]. В частности, получен модифицированный легумин кормовых бобов с увеличенным содержанием метионина [238]. На примере генной модификации глицинина продемонстрирована возможность повышения функциональных свойств легуминов (растворимости, гелеобразующей и эмульгирующей способности) [241].

В настоящее время метод генной инженерии в силу высокой степени прогнозируемости результата является очень востребованным и перспективным методом модификации белков. Однако безопасность использования в пищевых и кормовых целях генетически модифицированного белка продолжает оставаться предметом дискуссий [239, 240].

1.5.3.2. Проращение бобов

Проращение семян зернобобовых культур сопровождается благоприятными с точки зрения физиологии питания изменениями в их биохимическом составе. В ряде работ [242-244] изучали изменения химического состава, биохимических элементов и антиалиментарных факторов соевых бобов *Glycine max* при проращении. Показано, что проращение улучшает перевариваемость белков, пищевую ценность и функциональные свойства (эмульгирующие пенообразующие свойства, водосвязывающая способность) муки зернобобовых культур [245-248].

В процессе проращения внутри семени происходят существенные изменения среды, способствующие деградации запасных белков вплоть до образования свободных аминокислот. Величина рН в вакуолях соевых бобов в процессе проращения понижается от 6,0 до 5,5. При более низких значениях рН гистидиновые остатки глицинина приобретают положительный заряд, что повышает суммарный заряд на поверхности тримеров глицинина, участвующей в образовании гексамера. Повышение электростатического взаимодействия между тримерами

приводит к диссоциации гексамера. Отделенные тримеры имеют свободные подвижные неупорядоченные участки, которые в большей степени подвержены действию протеиназ [97, 249].

Судя по данным электрофореза, наиболее подверженными расщеплению в процессе прорастания соевых и кормовых бобов являются кислые цепи легуминов. Кислые цепи глицинина на третий день изменяются без существенного снижения молекулярной массы – происходит, предположительно, протеолиз карбоксильного хвоста и дезамидирование. После этого происходит гидролиз кислых цепей с существенным понижением молекулярной массы – до 21,9 кДа. Основные цепи гидролизуются значительно позже – в период с восьмого по десятый день прорастания [243, 250].

Прорастание – технологически простой, недорогой и легко реализуемый процесс, позволяющий не только модифицировать свойства белка, но и удалить многие антиалиментарные факторы [242] и повысить биологическую доступность полезных веществ.

1.5.3.3. Индуцированный автолиз

Одним из самых биологически естественных способов модификации растительного сырья (горох, люпин, кормовые бобы) является индуцированный автолиз. В этом процессе используют «протеолитическую затравку» – кислую протеазу, способную вызвать цепь биохимических, в первую очередь катаболических процессов, подобных тем, которые протекают при прорастании семян. Показано, что в результате индуцированного автолиза улучшаются функциональные свойства муки гороха – эмульсионная стабильность и гелеобразующие свойства [251]. Возрастание эмульсионной стабильности в результате модификации отмечено и для муки кормовых бобов и люпина [148]. Индуцированный автолиз положительно влияет на перевариваемость и органолептические свойства муки гороха и кормовых бобов, в случае добавления их к фаршевым изделиям [253]. В качестве побочных продуктов автолиза муки зернобобовых образуются жидкие фракции, содержащие продукты гидролиза. Эти фракции могут найти применение в производстве напитков. Таким образом, применение автолиза позволяет использовать собственный биопотенциал растительного сырья, получать белковые препараты с требуемыми функциональными свойствами, а также биологически активные пептиды [254].

1.5.4. Ферментативная модификация

Одним из наиболее эффективных методов улучшения функциональных свойств белков является ферментативный гидролиз определенных пептидных связей в составе белковой

молекулы. Преимущество ферментативной модификации заключается в её специфичности и, соответственно, в отсутствии нежелательных побочных реакций [32].

Возможны два принципиально различных механизма ферментативного гидролиза белков: ограниченный (заканчивается образованием стабильного высокомолекулярного продукта) и кооперативный (заканчивается образованием низкомолекулярных пептидов).

При ограниченном протеолизе скорость каждой последующей стадии значительно меньше предыдущей. Вследствие этого последовательный протеолиз протекает упорядочено и позволяет обнаружить промежуточные продукты определенного состава [35]. Характерным признаком ограниченного протеолиза является уменьшение молекулярной массы белка при сохранении его молярной концентрации неизменной. Завершению стадии ограниченного протеолиза соответствует образование устойчивого высокомолекулярного продукта. При данном типе протеолиза («zip») выполняется равенство:

$$\frac{P^*}{P(t)} : \frac{M^*}{M(t)} = 1 \quad (1.1)$$

где P^* и M^* – весовая концентрация и молекулярная масса белка до гидролиза, $P(t)$ и $M(t)$ – весовая концентрация и молекулярная масса белка при различных временах гидролиза [35, 255].

Кооперативный протеолиз («поодиочный» – «one-by-one») заключается в глубоком поочередном расщеплении молекул субстрата: расщепление каждой отдельно взятой молекулы происходит с увеличивающейся скоростью по мере развития конформационных изменений белка и завершается образованием низкомолекулярных пептидов. В любой момент реакции молекулярная масса остаточного белка не отличается от исходной [255]. Другими словами, характерным признаком кооперативного типа протеолиза является отсутствие в гидролизате промежуточных продуктов и постоянство молекулярной массы белка. При этом выполняется неравенство:

$$\frac{P^*}{P(t)} > 1 \text{ при } \frac{M^*}{M(t)} = 1 \quad (1.2)$$

При кооперативном типе гидролиза повышается растворимость продукта, однако функциональные свойства гидролизата, как правило, неудовлетворительны. Кроме того, такой продукт обычно горьковат на вкус.

В зависимости от предъявляемых к свойствам белкового компонента пищевого продукта требований возникает задача получения в процессе гидролиза преимущественно либо модифицированного белка (продукта ограниченного протеолиза), либо пептидов (продуктов кооперативного гидролиза). Как правило, для стабилизации пен и эмульсий необходим модифицированный высокомолекулярный белок, а улучшению растворимости белкового

препарата способствует понижению молекулярной массы белка, вплоть до образования пептидов.

1.5.4.1. Ограниченный протеолиз легуминов

Ограниченный протеолиз обусловлен присутствием в молекуле субстрата связей (участков) с повышенной чувствительностью к атаке протеолитическими ферментами и происходит с замедлением по мере убывания числа этих участков. Реорганизация структуры белка вследствие ограниченного протеолиза приводит к изменению его физико-химических и функциональных свойств. Улучшение функциональных свойств модифицированных белков в значительной степени обусловлено уменьшением их молекулярной массы и размера и увеличением поверхностной гидрофобности. Кроме того, в процессе ограниченного протеолиза происходит разрушение дисульфидных связей внутри молекулы белка, что увеличивает ее конформационную подвижность, и, как следствие, улучшает пенообразующую и эмульгирующую способности белка [32, 98, 256].

Таким образом, для получения гидролизата белка с требуемыми свойствами необходимо уметь управлять процессом гидролиза. Поэтому основными направлениями в области изучения ограниченного протеолиза являются изучение его механизма и исследование взаимосвязи изменения структуры молекулы белка в процессе ограниченного протеолиза с изменением его физико-химических и функциональных свойств.

1.5.4.2. Изменение структуры и физико-химических параметров

Изучение изменений структуры белковой молекулы в ходе ограниченного протеолиза имеет первоочередную важность, так как многие функциональные свойства напрямую зависят от формы и размера молекулы, ее поверхностной гидрофобности.

Известно, что в случае гидролиза глицинина протеазам в первую очередь, как правило, отщепляются гидрофильные участки кислых цепей, которые расположены на поверхности молекулы. Основные же цепи полностью обращены внутрь, поэтому в ходе ограниченного протеолиза они не подвергаются (или подвергаются в значительно меньшей степени) атаке ферментами. Укорачивание кислых цепей при практически неизменных основных цепях в ходе ограниченного протеолиза прослеживается с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [257].

Для инициирования протеолиза глицинина его иногда подвергают предварительному нагреванию или обработке щелочью [258]. Ограниченный протеолиз не происходит по любым участкам на поверхности молекулы, его действие сводится, в основном, к нескольким

локальным участкам [259]. Известно, что участки, в наибольшей степени подверженные атаке ферментами в ходе ограниченного протеолиза, характеризуются значительной подвижностью цепи. Это свойство иногда используется для характеристики третичной структуры белковой молекулы с использованием ограниченного протеолиза [260].

В работе [34] выполнено систематическое исследование физико-химических параметров продукта ограниченного протеолиза (трипсинолиза) легумина кормовых бобов. Отмечено существенное снижение молекулярной массы, гидродинамического размера и степени асимметрии молекулы легумина в результате ограниченного трипсинолиза.

Относительная гидрофобность, оцененная методом флюоресценции с применением цис-паринаровой кислоты и 8-анилино-нафтален-1-сульфоновой кислоты [185], оказалась вдвое выше у модифицированного ограниченным трипсинолизом легумина кормовых бобов по сравнению с интактным. Увеличенная в результате модификации адсорбционная способность белка указывает на большее количество экспонированных к поверхности ароматических хромофоров в результате расщепления пептидных связей. Однако различий в поверхностном натяжении интактного и модифицированного белков не наблюдалось.

В работе [251] суммированы результаты сравнительного исследования термодинамических параметров денатурации легуминов кормовых бобов, гороха, сои и подсолнечника и продуктов их ограниченного протеолиза трипсином. Показано, что ограниченный протеолиз трипсином приводит к понижению конформационной стабильности легуминов, при этом легумины сои и подсолнечника претерпевают значительно более глубокие изменения структуры, чем таковые кормовых бобов и гороха. Температура денатурации всех легуминов понижается, но в разной степени. Если в случае легумина кормовых бобов и гороха понижение температуры составляет 3°C, то для глицинина и гелиантина (легумин подсолнечника) эта величина равна 6°C и 9°C, соответственно. В результате ограниченного трипсинолиза отмечен рост энтальпии денатурации легумина кормовых бобов и гороха, в то время как величина этого параметра глицинина и гелиантина понижается на порядок. Наблюдаемые различия в термодинамическом поведении легуминов авторы связывают с отличиями в их первичной структуре.

1.5.4.3. Изменение функциональных свойств

Как было отмечено выше, природный глицинин, благодаря компактной третичной структуре, которая стабилизирована вторичными взаимодействиями и дисульфидными связями, имеет недостаточно высокие функциональные свойства [41, 195]. Изучению изменений функциональных свойств в ходе ограниченного протеолиза изолятов сои и отдельных 7S и 11S

белков посвящено немало работ [261, 262]. В большинстве исследований были использованы промышленно получаемые протеазы, такие как трипсин, пепсин, алкалаза. Показано, что предварительная обработка белков нагреванием до определенных температур или разбавленным раствором щелочи облегчает действие протеаз.

Ограниченный протеолиз с использованием различных ферментов приводит к реорганизации структуры и повышению растворимости, эмульгирующих и пенообразующих свойств, способности к гелеобразованию [257], понижению вязкости растворов глицинина, тогда как чрезмерный гидролиз часто вызывает потерю некоторых функциональных свойств [32].

Изменения структуры легумина кормовых бобов в результате ограниченного протеолиза трипсином приводят к повышению индекса эмульсионной активности и понижению размера частиц образуемой эмульсии (до определенной степени гидролиза – около 30 пептидных связей на молекулу легумина) [185].

Обработка панкреатином увеличивает поверхностную гидрофобность и эмульсионную активность изолята белков сои, при этом установлена прямая зависимость между указанными параметрами и степенью гидролиза [263]. Ограниченный протеолиз соевого изолята протеазами повышает его растворимость при рН 4,5 и 7,0, а также эмульсионную активность и способность подвергаться агрегации при нагревании [261]. Протеолиз изолята соевых бобов папаином улучшает такие функциональные свойства, как растворимость, эмульгирование и гелеобразование [258, 264].

Согласно работам [265, 266], обработка изолята соевых белков папаином оказывает различное влияние на их эмульсионные и пенообразующие свойства в зависимости от способа остановки протеолиза: замораживание как способ остановки гидролиза не приводило к улучшению эмульсионных и пенообразующих свойств, тогда как подкисление рН среды улучшало эмульсионные и пенообразующие свойства гидролизатов.

Сравнительное исследование влияния ограниченного протеолиза рядом эндо- и экзо-протеаз растительного и микробного происхождения на иммунореактивность, сенсорные и технофункциональные свойства глицинина показало, что папаин обладает наибольшей эффективностью, способствуя значительному снижению аллергенности глицинина, улучшению сенсорных характеристик и повышению таких функциональных свойств как растворимость, эмульсионная емкость, пенообразующая активность [33].

Модифицированные ограниченным протеолизом легумины имеют большой потенциал для их использования в пищевой промышленности вследствие более приемлемых функциональных свойств.

1.5.4.4. Кинетика ограниченного протеолиза глицинина папаином

Папаин (КФ 3.4.22.2) — монотиоловая цистеиновая эндопротеаза. По характеру ферментативного действия ее называют «растительным пепсином», но, в отличие от пепсина, папаин активен не только в кислых, но и в нейтральных и щелочных средах (диапазон рН 3-12, оптимум рН 5-8). При рН 5,0-7,5 папаин гидролизует амиды, белки (предпочтительнее разрывает пептидные связи следующих аминокислот: цистеина, гистидина, аспарагина) и эфиры основных аминокислот с незамещенной аминогруппой. Папаин сохраняет активность в широком температурном диапазоне (до 50-60 °С) [267].

Каталитическая активность папаина обусловлена содержанием в нем активных тиоловых групп. При этом механизм действия папаина существенно отличается от действия большинства сериновых протеаз тем, что основным действующим участком является субстратсвязывающий субсайт S₂, а не S₁, что приводит к атаке папаином преимущественно протяженных гидрофобных и незаряженных участков субстрата (например, боковая группа аланина). Кроме основного субсайта S₂ в папаине присутствуют некоторые другие важные субсайты, обуславливающие его активность. Они располагаются по обеим сторонам от каталитического сайта, образуя вытянутый связывающий сайт, обуславливающий связывание с семью различными аминокислотами [268]. В несколько меньшей степени по сравнению с лизином и аргинином связывание активного центра папаина происходит с гистидином, глицином, глутамином и тирозином [269].

Папаин представляет значительный интерес вследствие проявления ферментативной активности в широком диапазоне рН и эффективном влиянии на структуру и свойства глобулинов. Интерес к папаину обусловлен также возможностью моделировать с его помощью процесс гидролиза легуминов *in vivo* под действием кислых эндогенных папаиноподобных протеаз в ходе прорастания бобов и, таким образом, установить их регуляторную роль в последующей массивной деградации легуминов [270].

Вследствие подобия структуры легуминов зернобобовых культур можно предположить, что механизмы их ограниченного протеолиза ферментом с низкой специфичностью, каким является папаин, будут аналогичны. Наиболее изученным является механизм ограниченного протеолиза папаином глицинина.

Сотрудниками лаборатории «Биохимия растений» Молдавского Государственного Университета под руководством профессора Шутова А.Д. выполнено систематическое исследование кинетики процесса гидролиза глицинина *Glycine max* под действием папаина [270].

На рисунке 1.2.А представлена динамическая кривая гидролиза глицинина папаином. Линия 1 соответствует понижению весовой концентрации белка ($P(t)$, в %) в растворе; линия 2 – изменению молекулярной массы ($M(t)$, в %) глицинина в ходе протеолиза. Линия 3 соответствует выражению $([100-M(t)]+P(t))$ и описывает кинетику кооперативного механизма протеолиза. Ее начальный участок в увеличенном виде представлен на рисунке 1.2.В. Анализ полученных зависимостей показывает, что на первом этапе протеолиза глицинина папаином (приблизительно до 60 минут) понижение молекулярной массы белка происходит симбатно с понижением его весовой концентрации в растворе. Такая ситуация характерна для ограниченного протеолиза. На втором этапе протеолиза (после 60 минут, расхождение линий 1 и 2) весовая концентрация понижается с большей скоростью, чем молекулярная масса белка. Это свидетельствует о том, что на данном этапе параллельно ограниченному протеолизу происходит полное расщепление молекул белка до пептидов – кооперативный протеолиз. Константа скорости кооперативного протеолиза зависит от конформационного состояния белкового субстрата. Изменения интактной третичной структуры запасных глобулинов в ходе ограниченного протеолиза может оказывать влияние на константу скорости кооперативного процесса, который либо ускоряется, либо даже инициируется ограниченным протеолизом [255]. Другими словами, способность глицинина к кооперативному протеолизу приобретает в результате его структурных изменений в ходе ограниченного протеолиза.

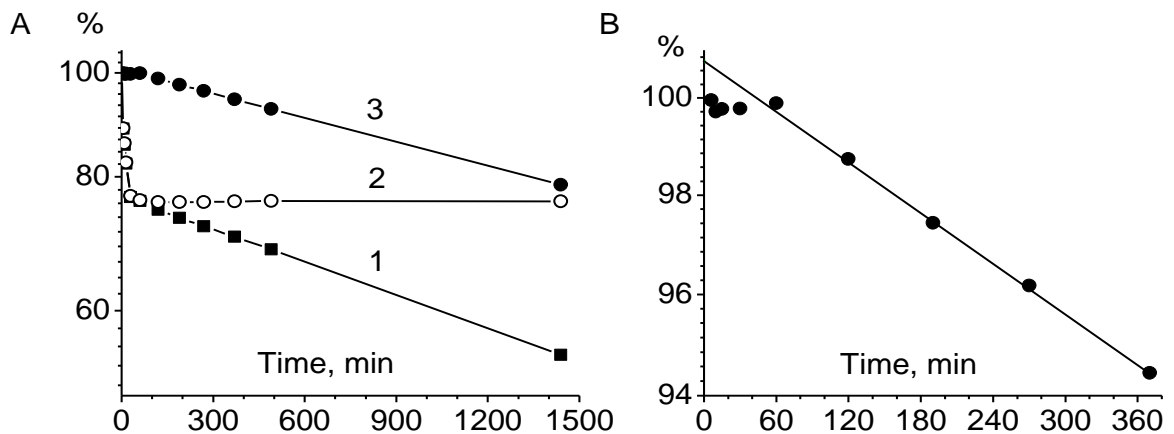


Рисунок 1.2. Ход ограниченного протеолиза глицинина папаином [270]. График А, линия 1 – весовая концентрация оставшегося белка $P(t)$, линия 2 – его молекулярная масса $M(t)$. ($P(t)$ и $M(t)$ выражены в процентах от начальных величин. Линия 3 $([100-M(t)]+P(t))$ % характеризует кинетику протеолиза по кооперативному механизму. На графике В представлен начальный участок линии 3.

Согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле (рисунок 1.3), в результате ограниченного протеолиза глицинина папаином β -цепи остаются интактными, а кислые α -цепи укорачиваются.

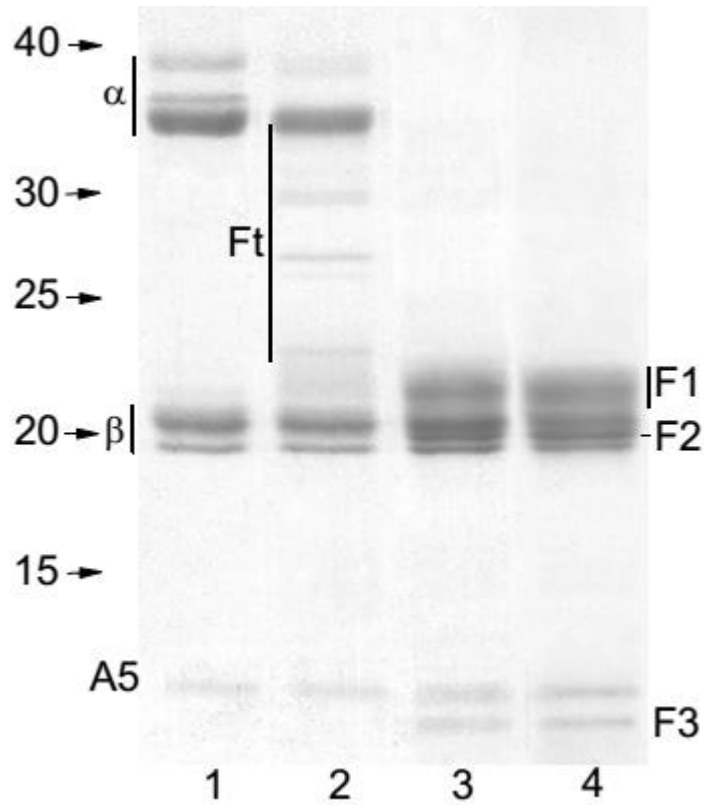


Рисунок 1.3 Электрофореграмма интактного и модифицированного папаином глицинина. Линия 1 – интактный глицинин, линия 2 – промежуточный продукт гидролиза (6 минут), линии 3 и 4 – глицинин-II (120 и 390 минут, соответственно). Числа слева соответствуют молекулярным массам (кДа) маркеров. Ft – промежуточные, F1, F2, F3 – финальные полипептиды протеолиза α -цепи. A5 – α -цепь A5. Взято из [270].

Согласно работе [270], в отличие от изменений структуры глицинина под действием ограниченного протеолиза трипсином (удаление петли между стрендами E и F, участка связывающего β -баррель с α -спиралями, и гипервариабельного С-концевого участка), в случае действия папаина происходит не только расщепление связки β -баррель/ α -спирали, но и последующее отщепление всей обширной С-концевой последовательности α -цепей, охватывающей гипервариабельный участок и всю область α -спиралей, при этом бесструктурная петля EF α -цепей остается интактной так же, как и β -цепи (рисунок 1.4). Чувствительность участка α -полипептидных цепей к протеолизу является общей характеристикой легуминов многих культур зернобобовых [36].

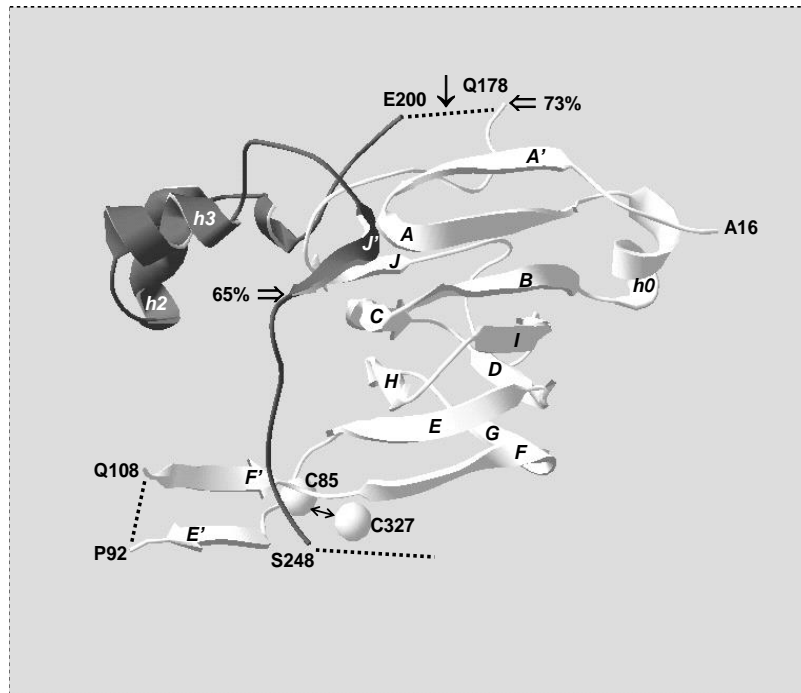


Рисунок 1.4. Ленточная диаграмма α -цепи A3 субъединицы глицинина A3B4. Пунктиром указаны три участка, подверженные действию ограниченного протеолиза: петля между Pro92 и Gln108, соединение β -складок/ α -спирали между Gln178 и Glu200, гипервариабельный участок после Ser248. Темная часть ленточной диаграммы соответствует участку, отделяемому от молекулы в процессе формирования глицинина-II. Взято из [270].

В процессе формирования глицинина-II от трети до половины водородных связей, участвующих во взаимодействии соседствующих субъединиц в полумолекулах интактного глицинина, исчезает в связи с удалением спиральных участков α -цепей [270].

Таким образом, в работе [270] установлены условия ограниченного протеолиза глицинина *Glycine max* и характерные изменения его первичной структуры, проявляющиеся в укорачивании С-концевых фрагментов кислых цепей и неизменной структуре основных цепей. Найденные условия были использованы для получения серии образцов, исследованных в настоящей работе.

1.6. Заключение

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что глобулины зернобобовых культур являются весьма перспективными источниками пищевого белка, благодаря, с одной стороны, значительным объемам производства зернобобовых культур и тенденции к увеличению их доли в общем объеме производства зерновых, с другой – высокой биологической ценности легуминов. Ограничения в использовании легуминов в качестве пищевых ингредиентов для обогащения белком традиционных пищевых продуктов и для создания продуктов функционального и лечебного питания, связаны с их недостаточно высокими функциональными свойствами. Низкие функциональные свойства легуминов обусловлены особенностями их молекулярной структуры: 1) компактность и жесткость молекулы; 2) высокая конформационная стабильность; 3) низкая поверхностная гидрофобность. Ограниченный протеолиз является мягким и эффективным средством модификации структуры легуминов, результатом которого является не только улучшение функциональных свойств (эмульгирующей и пенообразующей способности), но и снижение иммунореактивности и повышение атакуемости легуминов ферментами желудочно-кишечного тракта.

Для эффективного и прогнозируемого изменения функциональных свойств легуминов необходимо исследование закономерностей между изменением их структуры под действием ограниченного протеолиза и соответствующими изменениями физико-химических и функциональных свойств этих белков. Соответственно, **цель работы** заключалась в установлении связи между изменением структуры легуминов в результате ограниченного протеолиза папаином и изменением их физико-химических и функциональных свойств.

Для достижения поставленной цели было необходимо провести сравнительное исследование следующих характеристик интактных и модифицированных легуминов: молекулярных параметров в растворе (молекулярной массы, поверхностного заряда, термодинамического сродства к растворителю, гидродинамических параметров); конформационной стабильности; поверхностной активности на границе воздух/раствор, динамики формирования и реологических свойства адсорбционных слоев; функциональных свойств (атакуемости ферментами желудочно-кишечного тракта *in vitro*, пенообразующей способности).

Легумины являются структурными гомологами на всех уровнях организации. Гомология проявляется в близкой вторичной структуре и единообразном способе объединения субъединиц в гексамерную четвертичную структуру. Можно полагать, что вследствие структурного подобия, закономерности, установленные на примере отдельных представителей класса легуминов, будут иметь общий характер.

В качестве объектов исследования в данной работе использованы легумин соевых бобов *Glycine max* (глицинин) и легумин кормовых бобов *Vicia faba* (легумин *V.f.*), а также продукты их ограниченного протеолиза папаином (глицинин-П и легумин *V.f.*-П, соответственно).

Выбор папаина для модификации легуминов обусловлен его доступностью, относительно невысокой стоимостью, возможностью в широких пределах варьировать условия гидролиза (температура и pH). Известна также способность папаина снижать аллергенность и улучшать сенсорные характеристики глицинина [33]. Из литературы также известно, что среди других протеаз папаин обладает высоким потенциалом для улучшения функциональных свойств белков зернобобовых культур путем ограниченного протеолиза [258, 264].

Кроме того, модификация легуминов папаином, предположительно, позволяет смоделировать условия ограниченного протеолиза легуминов под действием кислых эндогенных протеиназ в процессе прорастания семян и тем самым способствовать изучению регуляторной роли ограниченного протеолиза в массивной деградации запасных белков [270].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

2.1.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили легумины (11S фракции глобулинов) двух зернобобовых культур и продукты их ограниченного протеолиза:

- глицинин – интактный легумин соевых бобов вида *Glycine max* (сорт Ликурич, Молдова);
- глицинин-П – глицинин, модифицированный ограниченным протеолизом папаином;
- легумин *V.f.* – интактный легумин кормовых бобов вида *Vicia faba* (сорт Узуновка, Россия);
- легумин *V.f.*-П – легумин *V.f.*, модифицированный ограниченным протеолизом папаином.

2.1.2. Ферменты

Для проведения ограниченного протеолиза легуминов использовали препарат папаина (Sigma Life Science, США) без дополнительной очистки. Активность папаина – 15 единиц/мг.

Препараты ферментов, использованные для исследования атакуемости интактных и модифицированных легуминов (без дополнительной очистки):

Пепсин из бычьего желудка, активность 2500 единиц/мг (Fluka).

Трипсин из бычьей поджелудочной железы, активность 40 единиц/мг (Merck).

Альфа-химотрипсин из бычьей поджелудочной железы, активность 87 единиц/мг (Serva).

2.1.3. Реактивы и вода

Все использованные в работе реактивы были аналитической степени чистоты.

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Millipore Direct-Q3) с удельным сопротивлением 18,2 МОм·см при температуре 25°C.

2.2. Препаративные методы

2.2.1. Выделение интактных легуминов

Интактный глицинин выделяли из обезжиренной муки соевых бобов согласно [97, 270]. Метод основан на изоэлектрическом осаждении и фракционировании путем высаливания сульфатом аммония с последующей очисткой хроматографией на Фенил-Сефарозе CL-4В (Pharmacia Biotech, Швеция) [36].

Интактный легумин *V.f.* выделяли согласно [271]. Метод фракционирования основан на различной растворимости 7S и 11S фракций в растворе NaCl при pH 4,8 и температурах 5 и 20°C. Дополнительную очистку выделенного 11S компонента производили хроматографически на Фенил-Сефарозе CL-6B (Pharmacia Biotech, Швеция).

2.2.2. Получение модифицированных легуминов

Для получения препаратов легуминов, модифицированных методом ограниченного протеолиза папаином (глицинина-П и легумина *V.f.*-П) использовали методику, приведенную в [270]. Ограниченный протеолиз проводили в растворе 0,037 М фосфатного буфера с pH 5,6 и ионной силой 0,5 моль/л, полученной путем добавления NaCl. В растворе также присутствовали 0,02 % NaN₃, 1 ммоль ЭДТА и 10 ммоль меркаптоэтанола (МЭ). Концентрация легуминов в реакционной смеси составляла 5 мг/мл; фермент-субстратное отношение папаин/легумин (E/S) 1:200 (по массе). Модификацию проводили при температуре 30°C в течение 24 часов. Гидролиз останавливали добавлением реагента Е64 (транс-эпоксисукцинил-L-лейцил-амидо-(4-гуанидино) бутан (Sigma, Life Science)) до конечной концентрации 10 мкмоль/л. Полученный белок очищали методом гель-фильтрации с использованием Сефакрила S-300.

Полноту прохождения гидролиза контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле в среде ДСН согласно [272].

Белки хранили в насыщенном растворе сульфата аммония при 5°C.

2.2.3. Приготовление растворов белков

Исходные растворы белков (~ 10 мг/мл) в 0,05 М фосфатном буфере с pH 7,6 готовили при постоянном перемешивании в течение 2 часов, не допуская вспенивания, и подвергали их диализу против того же буфера (мембрана из регенерированной целлюлозы ZelluTrans/Roth с пределом отсечения 12-14 кДа) в течение 1 суток при 5°C. Растворы легуминов перед измерениями подвергали центрифугированию (центрифуга Beckman Model J2-21, США) при 15000 g в течение 30 минут при 20°C. Рабочие растворы интактных и модифицированных белков готовили путем разбавления исходных растворов равновесным диализатом и фильтрованием через целлюлозные мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millex, Millipore). Ионную силу варьировали путем добавления хлорида натрия. Растворитель содержал также 0,02 % NaN₃ и 0,1 % МЭ для ингибирования роста микроорганизмов и предотвращения агрегации белка за счет тиол-дисульфидного обмена, соответственно.

2.2.4. Определение концентрации белка в растворе

Для определения концентрации белка в растворах использовали микробиуретовый метод [273].

Для построения калибровочной кривой использовали раствор бычьего сывороточного альбумина с исходной концентрацией 20 мг/мл. Измерение оптической плотности осуществляли при длине волны 562 нм на спектрофотометре Unicо 2800 (США). Для расчета концентрации использовали полученный коэффициент экстинкции A_{562} (1 %, 10 мм) = 2,88. Относительная погрешность измерения концентрации составляла не более 3 %. Использовали не менее трех параллельных измерений.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Статическое светорассеяние

Измерения статического светорассеяния, динамического светорассеяния и электрофореза по Допплеру выполняли на приборе Zeta Sizer Nano (ZEN 3600, Malvern Instrument, Великобритания) с 4 мВт He-Ne лазером (длина волны 633 нм). Анализ полученных автокорреляционных функций интенсивности рассеяния растворов белков осуществляли автоматически с помощью встроенного программного обеспечения Zetasizer Software 6.20. Protein Analysis с применением метода анализа CONTIN.

Основным уравнением в методе статического светорассеяния является уравнение Рэлея [274]:

$$\frac{Kc}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{M} + 2Bc \right) \times P(\theta) \quad (2.1),$$

где R_{θ} – отношение интенсивности рассеянного света к интенсивности исходного пучка света (отношение Рэлея); M – молекулярная масса образца; B – второй вириальный коэффициент; c – концентрация образца; $P(\theta)$ – фактор, учитывающий угловую зависимость интенсивности рассеяния образца; K – оптическая постоянная, которая вычисляется по формуле:

$$K = \frac{2\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \times \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (2.2),$$

где N_A – число Авогадро; λ_0 – длина волны лазера; n_0 – показатель преломления растворителя; dn/dc – инкремент показателя преломления образца.

Интенсивность светорассеяния пропорциональна средней молекулярной массе и концентрации частиц. Стандартный подход к измерению молекулярной массы заключается в измерении интенсивности рассеяния, используя стандартные чистые жидкости с известным

отношением Рэлея. Zetasizer Nano измеряет интенсивность светорассеяния растворов образцов различных концентраций под углом 173°C , затем она сравнивается с интенсивностью рассеяния стандарта. Общий стандарт, используемый в методе статического светорассеяния, – толуол; отношение Рэлея для толуола известно в широком диапазоне длин волн и температур. При условии, что размер рассеивающих частиц в растворе намного меньше длины волны исходного света, $P(\theta)$ равно 1, угловая зависимость интенсивности светорассеяния исчезает и уравнение Рэлея можно представить в следующем виде [275]:

$$\frac{Kc}{R_0} = \frac{1}{M} + 2Bc \quad (2.3).$$

Графическое представление формулы (2.3) является графиком Дебая и применяется для определения абсолютной молекулярной массы и второго вириального коэффициента белка. Величину и знак второго вириального коэффициента использовали для оценки термодинамического сродства белка к растворителю.

2.3.2. Динамическое светорассеяние

Метод динамического светорассеяния использовали для измерения коэффициентов трансляционной диффузии и расчета эффективных гидродинамических размеров молекул интактных и модифицированных белков.

Связь между размером частицы и трансляционным коэффициентом диффузии, обусловленным броуновским движением, определяли по уравнению Стокса-Эйнштейна:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (2.4),$$

где: η – динамическая вязкость среды; R_h – гидродинамический радиус частицы, T – температура, k – константа Больцмана, D – коэффициент трансляционной диффузии [275].

При рассеивании света с длиной волны λ_0 частицами с радиусом $R_h \ll \lambda_0$ (более чем в 10 раз), интенсивность рассеянного света (I) прямо пропорциональна шестой степени радиуса частицы и обратно пропорциональна четвертой степени длины волны лазера:

$$I \sim R_h^6 / \lambda_0^4 \quad (2.5).$$

В используемой модели Zetasizer Nano 3600 детектор установлен под углом 173° (обратное светорассеяние) [274].

2.3.3. Электрофорез по Допплеру

Существование заряда на поверхности частицы оказывает влияние на распределение ионов в окружающем межфазном слое, что приводит к повышению концентрации противоионов у поверхности, и, таким образом, созданию вокруг каждой частицы двойного электрического слоя.

Двойной электрический слой, окружающий заряженную частицу в растворе, состоит из внутреннего слоя, называемого слоем Штерна, где ионы сильно связаны друг с другом, и внешнего, диффузионного слоя, в котором они слабо связаны. Потенциал на границе между слоем Штерна и диффузионным слоем известен как ζ -потенциал, который напрямую связан с поверхностным зарядом частицы [276, 278, 279, 280, 281].

Данные о ζ -потенциалах молекул исследуемых белков были получены методом лазерного электрофореза по Допплеру путем определения их электрофоретической подвижности по уравнению Генри [276, 278, 279]:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(K_A)}{3\eta} \quad (2.6),$$

где ζ – ζ -потенциал молекулы; U_E – электрофоретическая подвижность молекулы; ε – диэлектрическая постоянная среды; η – вязкость среды; $f(K_A)$ – функция Генри, которая в водных растворах с умеренной концентрацией электролитов равна 1,5 [282].

Измерение электрофоретической подвижности белков осуществляли с помощью лазерного Допплеровского измерителя скорости Laser Doppler Velocimetry.

2.3.4. Малоугловое рентгеновское рассеяние

Исследование растворов белков методом малоуглового рентгеновского рассеяния [283] проводили при комнатной температуре ($\sim 22^\circ\text{C}$) на автоматизированном малоугловом рентгеновском дифрактометре, описанном в работе [284], в лаборатории малоуглового рентгеновского рассеяния ИБХФ РАН. Концентрация белка в растворе составляла около 30 мг/мл.

Растворы белков во время рентгеновских измерений находились в тонкостенном стеклянном капилляре диаметром 1 мм. Из интенсивности рассеяния белковых растворов вычитали интенсивность рассеяния капилляра с буфером и получали «чистую» интенсивность рассеяния белковыми макромолекулами $I(s)$, где модуль дифракционного вектора равен $s = (4\pi\sin\theta)/\lambda$, θ – половина угла рассеяния, λ – длина волны рентгеновского излучения CuK_α (0,1542 нм). Сглаживание кривых малоуглового рассеяния и введение коллимационной поправки на высоту рентгеновского пучка и окна детектора выполняли при помощи

программы, разработанной в лаборатории малоуглового рассеяния Института кристаллографии РАН. Метод введения коллимационной поправки описан в работе [285]. Радиус инерции макромолекул R_g и интенсивность рассеяния при нулевом угле $I(0)$ определяли при помощи программы PRIMUS [286] аппроксимацией начальных участков кривых малоуглового рассеяния по формуле Гинье [283]:

$$I(s) = I(0) \exp(-(sR_g)^2 / 3) \quad (2.7).$$

В случае полидисперсной системы белковых макромолекул аппроксимация интенсивности рассеяния по формуле (2.7) дает средний радиус инерции R_g белковых частиц в растворе, который связан с весовой концентрацией c_n , молекулярной массой M_n и радиусом инерции $(R_g)_n$ частиц n -го вида соотношением

$$(\bar{R}_g)^2 = \sum_n c_n M_n (R_g)_n^2 / \sum_n c_n M_n \quad (2.8).$$

Для разделения вкладов интактного белка и его агрегатов кривую малоуглового рассеяния аппроксимировали по формуле:

$$I(s) = I_1(0) \exp(-(sR_{g1})^2 / 3) + I_2(0) \exp(-(sR_{g2})^2 / 3) \quad (2.9),$$

в результате чего получали радиус инерции белка R_{g1} и средний радиус инерции его агрегатов R_{g2} .

2.3.5. Высокочувствительная сканирующая калориметрия

Метод высокочувствительной динамической сканирующей калориметрии (ВЧ-ДСК) использовали для изучения конформационной стабильности исследуемых белков путем измерения термодинамических параметров термической денатурации [114].

Калориметрические измерения выполняли на дифференциальном адиабатном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4М (СКБ БП, РАН, Пущино) в диапазоне температур 10-110°C при скорости сканирования 2°C/мин и избыточном давлении 0,2 МПа. В каждом эксперименте шкалу теплоемкости калибровали с помощью эффекта Джоуля-Ленца [114].

Первичную обработку термограмм и преобразование температурной зависимости парциальной теплоемкости в функции избыточной теплоемкости денатурации белка проводили с помощью программы WScal 2.0 (Институт биологического приборостроения РАН, Пущино). Базовую линию в области перехода получали сплайн-интерполяцией. За температуру плавления белка (T_d) принимали температуру максимума кривой избыточной теплоемкости. Энтальпию плавления ($\Delta_d H$) определяли интегрированием кривой избыточной теплоемкости [287].

Деконволюцию калориметрических пиков плавления проводили с использованием программы CpCalc Version 2.1 (Applied Thermodynamics).

2.3.6. Динамическая капельная тензиометрия и двумерная дилатометрия

Исследование поверхностного натяжения, динамики формирования и реологических свойств адсорбционных слоев интактных и модифицированных белков на границе воздух/раствор проводили на капельном тензиометре Tracker (TRACKER, IT Concept, Longessaine, Франция) в термостатируемой кювете при температуре $25 \pm 0,1$ °С.

В экспериментальной установке пузырек воздуха выдувается из шприца в термостатируемую стеклянную кювету с исследуемым раствором. Изображение формы пузырька детектируется при помощи камеры, совмещенной с устройством оцифровывания и обработки видеоизображений. После проверки вертикальности установки иглы оценивали соответствие формы пузырька фундаментальному уравнению Лапласа [288, 289]:

$$\frac{1}{x} \cdot \frac{d}{dx} (x \sin \theta) = \frac{2}{r} - c_k z \quad (2.10)$$

где x и z – декартовы координаты, r – радиус кривизны капли в наивысшей точке, θ – угол касания контура капли, c_k – постоянная капилляра (равна $(g\Delta\rho)/\sigma$, где $\Delta\rho$ – разница плотностей двух фаз, g – ускорение силы тяжести).

В процессе эксперимента происходит автоматическая компенсация изменений площади поверхности (или объема) пузырька, возникающих при формировании адсорбционного слоя и с помощью программного обеспечения WinDrop_2009 рассчитывается межфазное натяжение как функция времени.

Тензиометр TRACKER позволяет измерять как динамическое межфазное натяжение, так и вязкоупругие характеристики поверхностного слоя в режиме синусоидального нагружения. [289]. Изменения поверхности капли влекут за собой изменения поверхностного натяжения, которое вычисляется с помощью уравнения Янга-Лапласа из измеренных значений колебаний поверхности капли, и представляется как функция частоты деформирования.

Двухмерный комплексный модуль эластичности E адсорбционных слоев определяли из измеряемых значений поверхностного натяжения при приложении нагрузки на межфазную поверхность, изменяющейся по синусоидальному закону:

$$A = A_0 \sin(\omega t) \quad (2.11),$$

где A – площадь поверхности пузырька, A_0 – амплитуда площади поверхности, ω – частота нагружений, t – время.

Периодическое изменение площади поверхности приводит к синусоидальному изменению поверхностного натяжения адсорбционного слоя:

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (2.12),$$

где φ – фазовый угол между натяжением и напряжением, σ_0 – амплитуда поверхностного натяжения, σ – поверхностное натяжение [290].

В линейной области комплексный модуль вязкоупругости E может быть выражен следующим образом.

$$E = \frac{d\sigma}{dA/A} = -\frac{d\pi}{d \ln A} \quad (2.13),$$

где π – поверхностное давление.

Дилатационный модуль состоит из действительной (E') и мнимой (E'') частей, которые соответствуют упругой и вязкостной составляющей:

$$E = (\sigma_0 / A_0)(\cos \varphi + i \sin \varphi) = E' + iE'' \quad (2.14).$$

Отношение σ_0/A_0 соответствует максимальному значению дилатационного модуля и является суммарной мерой сопротивления материала дилатационным деформациям (упругим и вязкостным). В случае абсолютно упругого материала напряжение и натяжение находятся в одной фазе ($\varphi = 0^\circ$), действительная часть максимальна. В случае абсолютно вязкого материала ($\varphi = 90^\circ$) максимальна мнимая часть [291].

Измерения реологических свойств производили после формирования устойчивого адсорбционного слоя в течение 72 000 секунд. Колебания площади поверхности пузырька производили с амплитудой 5-10 % от исходной. Осуществляли серию нагружений из 3-5 последовательных активных и 10 пассивных циклов при постоянной амплитуде и частоте. Диапазон использованных частот нагружения составлял 0,001-0,02 Гц ($6,28 \cdot 10^{-3}$ - $1,256 \cdot 10^{-1}$ рад/с).

2.3.7. Определение атакуемости белков ферментами желудочно-кишечного тракта

Для проведения исследования атакуемости легуминов ферментами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) был взят за основу рекомендованный в работе [292] обобщенный подход к выбору условий для оценки атакуемости пищевых продуктов, содержащих белки, жиры и углеводы, для обеспечения сравнения результатов, полученных в разных лабораториях.

Используемая методика имитирует последовательное действие на белки ферментов желудочно-кишечного тракта человека: 1) на первом этапе действие пепсина в кислой среде (аналогично среде желудка), 2) на втором этапе совместное действие трипсина и химотрипсина

в нейтральной среде (аналогично среде тонкого кишечника). Исследование проводили в термостатируемых стеклянных стаканах при 37°C.

За ходом гидролиза белков следили двумя способами: 1) по накоплению количества свободного аминного азота методом ТНБС (тринитробензолсульфокислота, [293]); 2) по уменьшению числа пептидных связей в реакционной смеси микробиуретовым методом [273]. Для построения калибровочных кривых использовали бычий сывороточный альбумин. Метод ТНБС часто используется для оценки степени атакуемости белков ферментами ЖКТ [293, 294].

Водный раствор белка с концентрацией 0,3 % (объем – 20-25 мл) доводили до pH 2,0 с помощью 0,1 М HCl. После отбора 1 мл пробы (нулевой) к оставшемуся раствору добавляли раствор пепсина (1 мг/мл) до величины фермент/субстратного отношения $E/S = 1/200$. Смесь инкубировали в стеклянной емкости с рубашкой при 37°C. Через 40, 80 и 120 минут от момента добавления пепсина из реакционной смеси отбирали пробы по 1 мл. Сразу после отбора пробы в момент времени 120 минут инкубации pH среды доводили до 7,6 при помощи 0,1 М NaOH и добавляли трипсин и химотрипсин (концентрация каждого фермента – 1 мг/мл) до фермент/субстратного соотношения $E/S = 1/200$ по каждому из ферментов. В дальнейшем через каждые 40 минут продолжали отбирать реакционную смесь по 1 мл.

Отобранный объем реакционной смеси в каждый момент времени делили на две части для исследования микробиуретовым методом и методом ТНБС.

2.3.8. Определение пенообразующей способности

Для характеристики пенообразующих свойств интактных и модифицированных легуминов использованы пенообразующая емкость и стабильность пен.

Для формирования пены использовали растворы белков с концентрацией 0,3 – 10 мг/мл в фосфатном буфере с pH 7,6, содержащем 0,5 М NaCl и 0,02 % NaN₃. Растворы белка объемом 3 мл помещали в калиброванные по объему стеклянные пробирки (внутренний диаметр – 12 мм, высота – 115 мм). Для образования пены закрытые пробирки встряхивали с одинаковой интенсивностью и амплитудой в течение 10 секунд при температуре 25°C.

Пенообразующую емкость определяли как отношение объема образуемой пены к объему исходного раствора в стандартных условиях (мл/мл). За характеристику стабильности пены принимали время ее полураспада (время двукратного уменьшения высоты столба пены) при комнатной температуре.

2.3.9. Электрофорез в полиакриламидном геле

Гель-электрофорез в полиакриламидном геле в среде додецил сульфата натрия проводили по методу [272].

Предварительное разделение белков на цепи и их денатурацию осуществляли кипячением в растворе додецилсульфата натрия и меркаптоэтанола. Зоны белков в геле окрашивали Кумаси бриллиантовым голубым R-250. В качестве маркеров молекулярных масс использовали белковый набор Fermentas Life Sciences (Литва).

2.3.10. Скоростная седиментация

Коэффициенты седиментации определяли на аналитической ультрацентрифуге «Beckman, Model E» (Германия) с фотоэлектрической сканирующей абсорбционной оптической системой при длине волны света 280 нм, скорости вращения ротора 52000 об/мин и температуре 20°C в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,6, содержащем 0,5 М NaCl и 0,1 % МЭ. Концентрация белка в исследовании составляла 2 мг/мл. При обработке седиментограмм использовали программное обеспечение SEDFIT [295].

2.3.11. Потенциометрия

Измерение pH растворов и доведение значений pH до требуемой величины осуществляли с помощью цифрового pH-метра OrionSA-520 (США) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке путем добавления 0,1 М NaOH при титровании в щелочную область, либо 0,1 М HCl при титровании в кислую область.

2.3.12. Денситометрия

Парциальный удельный объем определяли при 25°C по данным измерения плотности растворов интактных и модифицированных белков на автоматическом денсиметре АД-1 (НПО “Биоприбор”, Пушкино, Россия) с точностью $\pm 2 \times 10^{-5}$ г/мл. Плотность растворов белка измеряли в интервале концентрации $(1-10) \times 10^{-3}$ г/мл. Удельный парциальный объем был рассчитан с помощью экстраполяции плотности к нулевой концентрации белка [238].

4.3.13. Рефрактометрия

Показатели преломления растворов белков n_D измеряли на рефрактометре RM40 (Mettler Toledo, Швейцария) на длине волны 589,3 нм. Стандартная температура составляла $20 \pm 0,1$ °C.

Из графика зависимости показателя преломления от концентрации белка по величине тангенса угла наклона определяли инкремент показателя преломления dn/dc .

2.3.14. Спектрофотометрия

Для спектрофотометрических измерений использовали однолучевой прибор Unicо 2800 (США). Спектральная полоса пропускания – 4 нм, разрешение – 0,1 нм. Погрешность определения коэффициента пропускания – от $\pm 0,5\%$ до $\pm 1,0\%$.

2.3.15. Флуоресцентная спектроскопия

Спектры флуоресценции получали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 (Япония), снабженным 150 Вт ксеноновой лампой, спектральный диапазон измерения – от 220 нм до 750 нм.

Используемые длины волн возбуждения – 295 нм (триптофановые остатки) и 280 нм (триптофановые и тирозиновые остатки). Спектры эмиссии регистрировали в диапазоне от 300 до 500 нм со скоростью сканирования Medium, шаг – 1 нм, ширина щели – 5 нм.

Для исследований использовали растворы белков с концентрацией 0,05 мг/мл.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние ограниченного протеолиза на молекулярные параметры легуминов в растворе

В разделе приведены результаты сравнительного исследования молекулярных параметров легуминов, интактных и модифицированных ограниченным протеолизом с использованием папаина. Образцы интактного и модифицированного глицинина были частично предоставлены лабораторией Биохимии растений (Государственный Университет Молдовы). Образцы легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-II, а также частично – глицинина и глицинина-II, получены в ходе данной работы. Контроль результатов протеолиза осуществляли методом электрофореза в полиакриламидном геле растворов интактных и модифицированных белков, предварительно денатурированных нагреванием в растворе додецилсульфата натрия и меркаптоэтанола согласно [272].

На рисунке 3.1 представлена типичная электрофореграмма интактных и модифицированных белков. Дорожка А содержит белковые маркеры с известными молекулярными массами. На дорожку Б был нанесен раствор интактного глицинина, который диссоциирован на цепи: кислые (α) с молекулярной массой 36-38 кДа и основные (β) с молекулярными массами 20-22 кДа. Дорожка В соответствует раствору цепей модифицированного глицинина. Очевидно, что в ходе ограниченного протеолиза глицинина папаином происходит укорачивание кислых цепей, в то время как основные цепи при заданных условиях остаются неизменными. В работе [270] показано, что в процессе ограниченного протеолиза папаином отщеплению подвергаются неупорядочные, располагающиеся на поверхности участки кислых цепей глицинина. Учитывая то обстоятельство, что С-концевые участки α -цепей имеют гидрофильный характер и располагаются на поверхности белковой глобулы, можно полагать, что удаление этих фрагментов в процессе ограниченного протеолиза приведет изменению как молекулярных параметров, так и доступной для растворителя гидрофобной поверхности молекул легуминов.

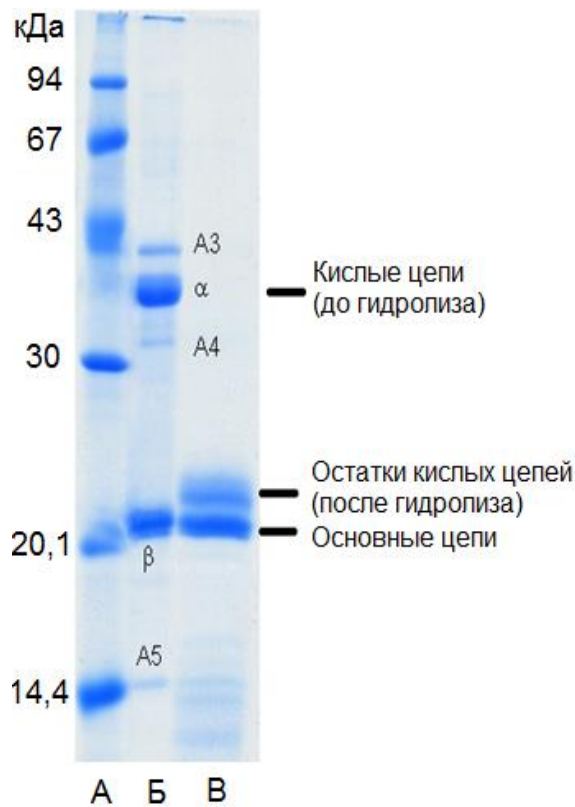


Рисунок 3.1. Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Кислые и основные цепи глицинина до (Б) и после (В) ограниченного протеолиза папаином. Дорожка А – маркеры молекулярных масс. Растворитель: 25 мМ трис, 0,1 % додецил сульфат натрия, 192 мМ глицин.

3.1.1. Молекулярная масса и второй вириальный коэффициент

Для определения молекулярных масс интактных и модифицированных ограниченным протеолизом легуминов, а также их вторых вириальных коэффициентов как меры термодинамического сродства к растворителю использован метод статического светорассеяния. Величины инкрементов показателя преломления (dn/dc) имели близкие значения и составляли $0,192 \pm 0,002$ мл/г, то есть находились в интервале, характерном для большинства белков [296].

На рисунке 3.2 приведены графики Дебая для растворов глицинина и глицинина-П в 0,05 М фосфатном буфере с содержанием 0,5 М NaCl и pH 7,6. Графики имеют линейный характер. Средневесовые молекулярные массы (M_w) глицинина и глицинина-П, рассчитанные как обратные величины значений отрезков, отсекаемых на оси ординат при линейной экстраполяции графиков Дебая, составляют 331 ± 16 кДа (глицинин) и 264 ± 15 кДа (глицинин-П) [297].

Для интактной формы глицинина полученное значение молекулярной массы соответствует литературным данным [298]. Значение молекулярной массы глицинина-П ниже молекулярной массы глицинина приблизительно на 70 кДа. Близкие результаты были получены

ранее [270] на основе расчетов среднечисленных молекулярных масс (M_n) по известным аминокислотным последовательностям субъединиц в гетерогексамере глицинина и по предполагаемой первичной структуре субъединиц гетерогексамера глицинина-II (соответственно, 325 кДа и 250 кДа).

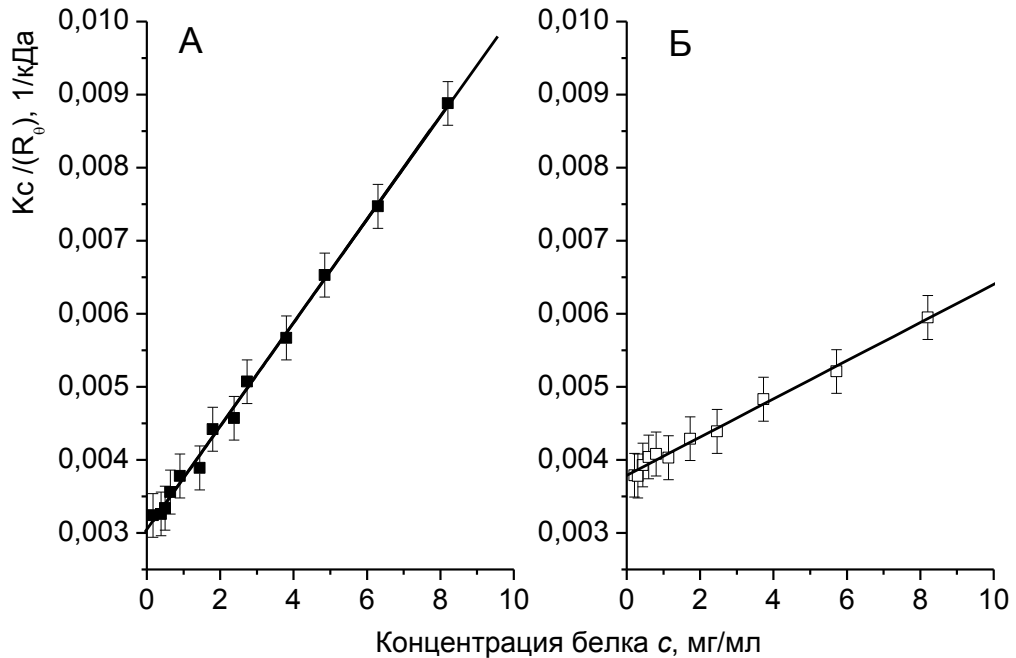


Рисунок 3.2. Графики Дебая для растворов глицинина (А) и глицинина-II (Б) в фосфатном буфере с pH 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

Угловой коэффициент графика Дебая использовали для определения второго вириального коэффициента B в разложении химического потенциала по концентрации белка в двухкомпонентном растворе в соответствии с уравнением [299]:

$$\mu_1 - F_1^0 = -RTV_1^0 c_2 (1/M_2 + Bc_2 + Cc_2^2 + \dots) \quad (3.1),$$

где μ_1 – химический потенциал растворителя,

F_1^0 – мольная свободная энергия чистого растворителя,

R – универсальная газовая постоянная,

T – абсолютная температура,

V_1^0 – парциальный мольный объем растворителя,

c_2 – концентрация растворенного вещества,

M_2 – молекулярная масса растворенного вещества,

B, C – второй и третий вириальные коэффициенты,

Уравнение (3.1), согласно [299], является общим для растворов неэлектролитов, причем коэффициенты B , C и т.д. являются функциями температуры и давления и зависят от природы растворителя и растворенного вещества. Химический потенциал раствора полиэлектролитов не описывается уравнением (3.1). Причиной этого служат, как минимум, два дополнительных фактора: эффект Доннана и эффект флуктуации зарядов полиэлектролита. Однако, если в растворе присутствует третий компонент, обеспечивающий высокую концентрацию ионов, то это уравнение применимо и к растворам полиэлектролитов, так как значительный положительный вклад доннановского члена ($1000 \times Z^2 v_1 / 4 m_3 M_2^2$, где Z – заряд, m_3 – концентрация белка) в величину B становится пренебрежимо малым. Кроме того, как было показано [300], отрицательный вклад флуктуаций зарядов в величину химического потенциала быстро уменьшается с увеличением концентрации малых ионов и при достижении величины ионной силы $\approx 0,1$ М вклад эффекта исключенного объема становится преобладающим:

$$B = \frac{16\pi N_A R_h^3}{3M_2^2} = \frac{4v_2}{M_2} \quad (3.2),$$

где v_2 – удельный объем белка, R_h – радиус молекул белка.

Таким образом, при достаточно высокой ионной силе величина B раствора полиэлектролита будет определяться только членом исключенного объема. Соответственно, в нашей работе для определения второго вириального коэффициента растворов интактных и модифицированных белков использовали 0,05 М фосфатный буфер с pH 7,6, содержащий 0,5 М NaCl.

Знак B характеризует природу парных взаимодействий макромолекул в растворе, а его величина – их силу. Соблюдение неравенства $B > 0$ означает, что термодинамически предпочтительными являются взаимодействия молекул белка и растворителя; $B < 0$ свидетельствует о предпочтительности взаимодействий молекул белка между собой, то есть о самоассоциации молекул белка [301].

К настоящему времени для ряда глобулярных белков теоретически обосновано и экспериментально подтверждено существование прямой корреляции между знаком и величиной B и растворимостью белка в водном растворе [302, 303]. Анализ значений второго вириального коэффициента растворов белка широко используют для изучения фазового поведения белков в водных растворах [304-307], а также для предсказания оптимальных условий кристаллизации белков.

В данной работе изменение параметра B рассматривали как меру изменения термодинамического сродства легуминов к растворителю в результате ограниченного

протеолиза. Величины B для растворов глицина и глицина-П в данном растворителе имеют положительные значения и составляют, соответственно, $(3,57 \pm 0,21) \times 10^{-4}$ и $(1,31 \pm 0,16) \times 10^{-4}$ мл·моль/г². Таким образом, при превращении глицина в глицин-П взаимодействия молекул белка и растворителя остаются термодинамически предпочтительными, но термодинамическое сродство белка к растворителю достоверно снижается.

Аналогичные закономерности в изменении молекулярной массы и параметра B прослеживались и при ограниченном протеолизе папаином легумина *V.f.* (рисунок 3.3). Молекулярная масса понизилась от 327 ± 16 кДа до 258 ± 14 кДа, второй вириальный коэффициент уменьшился практически вдвое – от $(3,20 \pm 0,16) \times 10^{-4}$ мл·моль/г² до $(1,59 \pm 0,17) \times 10^{-4}$ мл·моль/г².

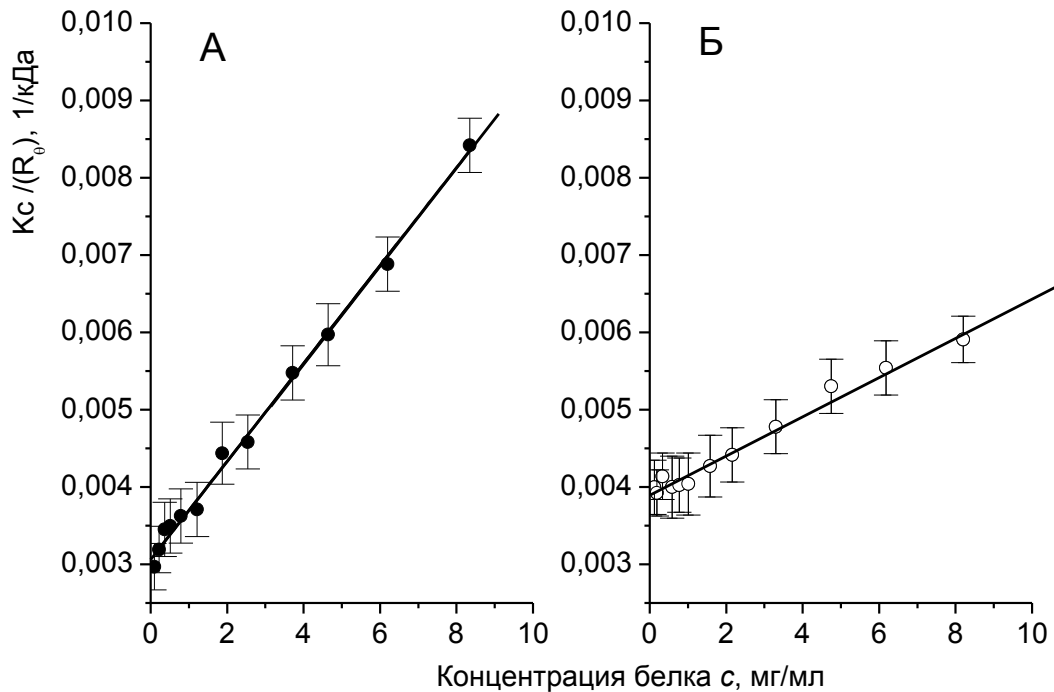


Рисунок 3.3. Графики Дебая для растворов легумина *V.f.* (А) и легумина *V.f.*-П (Б) в фосфатном буфере с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

Таким образом, в результате ограниченного протеолиза папаином происходит понижение молекулярной массы глицина и легумина *V.f.*. Растворы как интактных, так и модифицированных белков характеризуются положительными значениями вторых вириальных коэффициентов, то есть взаимодействия молекул белка и растворителя остаются термодинамически предпочтительными, однако термодинамическое сродство молекул модифицированных форм белков к растворителю снижается. Вероятно, это является

результатом удаления части гидрофильных остатков с поверхности в процессе модификации и дополнительного экспонирования к растворителю некоторых гидрофобных аминокислотных остатков. Подобное явление наблюдалось при ограниченном протеолизе легумина кормовых бобов трипсином [185].

3.1.2. Спектральные свойства

Для изучения структурных изменений молекул глицинина и легумина *V.f.* в результате ограниченного протеолиза с помощью папаина также использовали методы УФ-спектроскопии и флуоресцентной эмиссионной спектроскопии.

В таблице 3.1 представлены величины удельных и молярных коэффициентов поглощения интактных и модифицированных ограниченным протеолизом легуминов в растворе фосфатного буфера (рН 7,6, 0,05 М NaCl) при длине волны 280 нм, при которой основной вклад в поглощение вносят остатки тирозина и триптофана [308].

Таблица 3.1. Удельные и молярные экстинкции растворов интактных и модифицированных легуминов в растворе фосфатного буфера с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl при 280 нм.

Белок	Глицинин	Глицинин-П	Легумин <i>V.f.</i>	Легумин <i>V.f.</i> -П
Удельная экстинкция ($\epsilon_{280}^{1\%}$)	8,03	8,35	7,67	8,04
Молярная экстинкция (ϵ_{280}^{1mM})	266	220	251	207

Понижение молярного коэффициента экстинкции модифицированных белков в сравнении с интактными свидетельствует о потере части ароматических остатков (17,3 и 16,5 % в случае глицинина и легумина *V.f.*, соответственно). В то же время, повышение (на 4-5 %) удельных коэффициентов поглощения отражает увеличение доли ароматических остатков в составе модифицированных глицинина и легумина *V.f.* [308].

На рисунке 3.4 представлены эмиссионные спектры собственной флуоресценции легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-П при концентрации 0,05 мг/мл в буферном растворе (0,05 М фосфатный буфер с рН 7,6 и 0,05 М NaCl) при длине волны возбуждения 295 нм (возбуждение триптофана). На рисунке 3.4 Б ордината нормирована по молекулярной массе белка (раздел 3.1.1: 327 и 258 кДа для легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-П, соответственно).

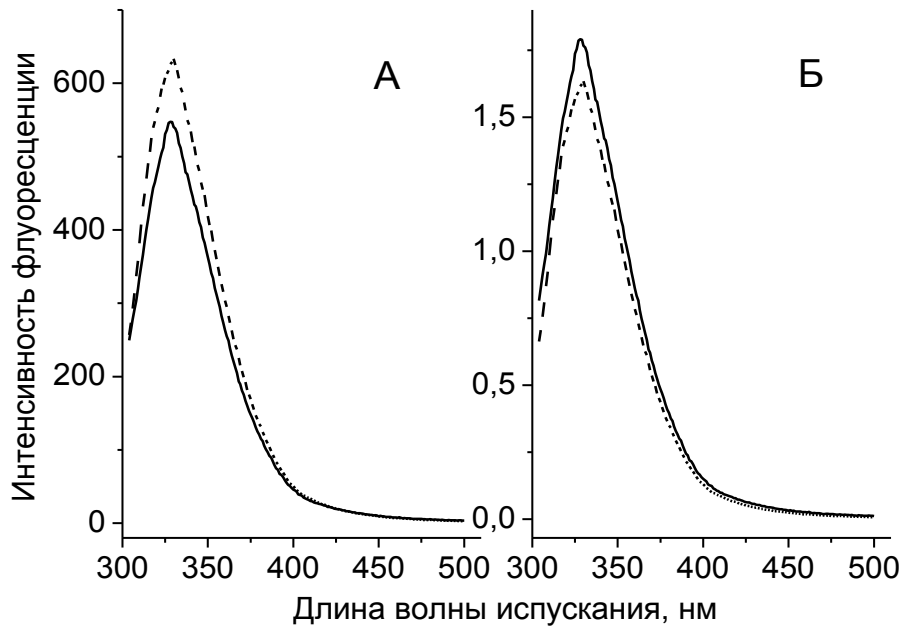


Рисунок 3.4. Исходные (экспериментальные) (А) и нормированные по молекулярной массе (Б) спектры флуоресценции легумина *V.f.* (сплошная линия) и легумина *V.f.*-II (штриховая линия) после возбуждения при длине волны 295 нм. Концентрация белка – 0,05 мг/мл, растворитель – фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,05 М NaCl.

Более высокая интенсивность флуоресценции эмиссионного спектра легумина *V.f.*-II по сравнению с интактным легумином *V.f.* (рисунок 3.4 А) отражает более высокое удельное содержание триптофана в модифицированном белке. Спектр эмиссии при длине волны возбуждения 295 нм модифицированного легумина имеет максимум при длине волны 330 нм, что на 2 нм выше, чем у интактного белка. Сдвиг максимума эмиссии в красную сторону происходит, вероятно, вследствие экспонирования к полярной среде (растворителю) части триптофановых остатков в результате модификации. Максимальная молярная интенсивность флуоресценции понижается (рисунок 3.4 Б) в результате ограниченного протеолиза приблизительно на 9 %, что также отражает повышение экспонирования триптофановых остатков к полярной среде, или может быть следствием их частичного удаления в результате протеолиза [309].

Аналогичные закономерности в изменении спектров флуоресценции наблюдались для легумина *V.f.* при ограниченном протеолизе трипсином [34].

В частности, в работе [185] прослежена зависимость величины эффекта экспонирования ароматических хромофоров от степени трипсинолиза легумина *V.f.* и установлен максимальный эффект при разрыве около 60 пептидных связей на молекулу белка (фермент/субстратное отношение E/S=1/40). В нашем случае в условиях, выбранных для получения

модифицированного легумина, число расщепленных пептидных связей составляло около 100 на молекулу белка ($E/S=1/200$).

Таким образом, при ограниченном протеолизе легумина *V.f.* наблюдается изменение структуры белка, сопровождающееся повышением экспонирования ароматических хромофоров, и, следовательно, повышением поверхностной гидрофобности. Этот эффект коррелирует с уменьшением второго вириального коэффициента растворов легуминов, т.е. понижением термодинамического сродства легуминов к растворителю в результате ограниченного протеолиза под действием папаина.

3.1.3. ζ -потенциал

С помощью электрофореза по Допплеру были определены значения ζ -потенциала молекул интактных и модифицированных белков при различных значениях pH раствора.

Результаты измерений ζ -потенциала молекул глицинина и легумина *V.f.* в интактной и модифицированной форме представлены на рисунке 3.5. Очевидно, что практически во всем интервале значений pH абсолютная величина ζ -потенциала интактных молекул выше, чем модифицированных, что свидетельствует о понижении суммарного поверхностного заряда в результате ограниченного протеолиза папаином. Нулевые значения ζ -потенциала как интактных, так и модифицированных молекул совпадают и приходятся на область значений pH интактных глицинина и легумина-*V.f.* (глицинин pI 4,9 [69, 89], легумин *V.f.* pI 4,7-4,9 [85, 90]).

Сопоставление аминокислотного состава глицинина и глицинина-II [270] свидетельствует о понижении относительного содержания заряженных аминокислот (от 25,5 % до 19,9 %) и увеличении относительного содержания гидрофобных аминокислот (от 42,0 % до 45,5 %). Наблюдается также определенное увеличение содержания в составе глицинина-II незаряженных полярных аминокислот (от 32,5 % до 34,6 %). Эти данные качественно согласуются с выявленным понижением ζ -потенциала (следовательно, поверхностного заряда) молекул глицинина в результате ограниченного протеолиза (рисунок 3.5), а также с данными об уменьшении второго вириального коэффициента (рисунок 3.2).

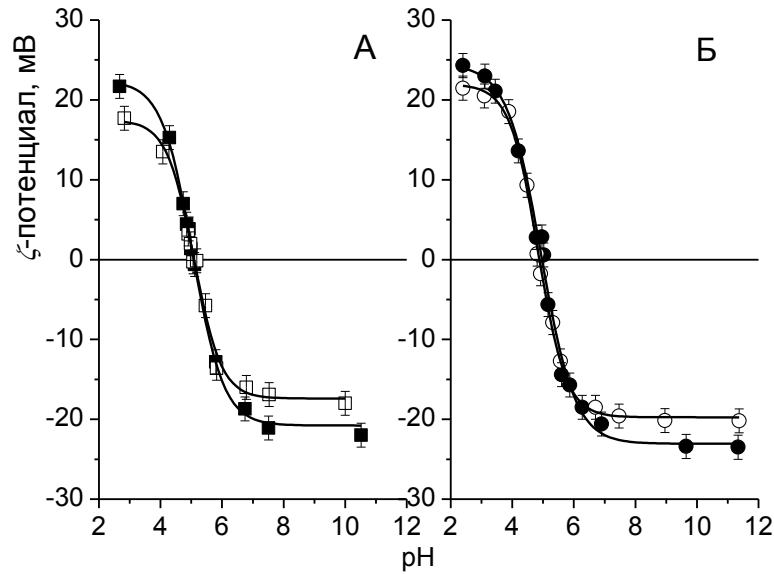


Рисунок 3.5. pH-зависимость ζ -потенциала молекул интактных (■/●) и модифицированных (□/○) глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б) в 0,05 М фосфатном буфере. Концентрация белка – 1 мг/мл.

3.1.4. Константа диффузии и эффективный гидродинамический размер

Для характеристики гидродинамических параметров интактных и модифицированных молекул легуминов использовали метод динамического светорассеяния.

На рисунке 3.6 приведены примеры кривых распределения по размеру молекул интактных и модифицированных форм глицинина и легумина *V.f.*. Эффективные гидродинамические радиусы при различных концентрациях молекул в растворе приведены на рисунке 3.7. Как в случае интактных, так и модифицированных белков гидродинамический радиус не зависит от их концентрации.

За значение константы диффузии и действительного эффективного гидродинамического размера принимали усредненные значения D_0 и R_h в интервале значений, не зависящих от концентрации белка (рисунок 3.7). Очевидно, что ограниченный протеолиз сопровождается повышением коэффициентов диффузии и понижением эффективного гидродинамического размера макромолекул глицинина и легумина-*V.f.* вследствие понижения молекулярной массы и, возможно, вследствие увеличения плотности упаковки молекулы белка в связи с отщеплением бесструктурного С-концевого участка α -цепей.

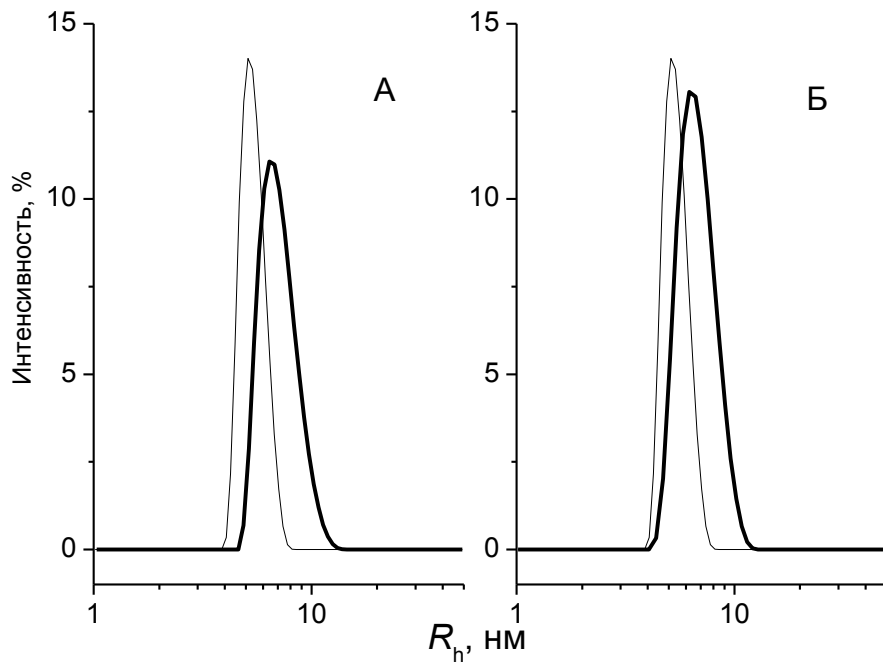


Рисунок 3.6. Распределение молекул по величине радиуса Стокса для интактных и модифицированных белков глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б). Жирные линии – интактные белки, тонкие линии – модифицированные белки. Концентрации белков – 1,0 мг/мл, растворитель – фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl, 0,1% МЭ и 0,02 % NaN₃.

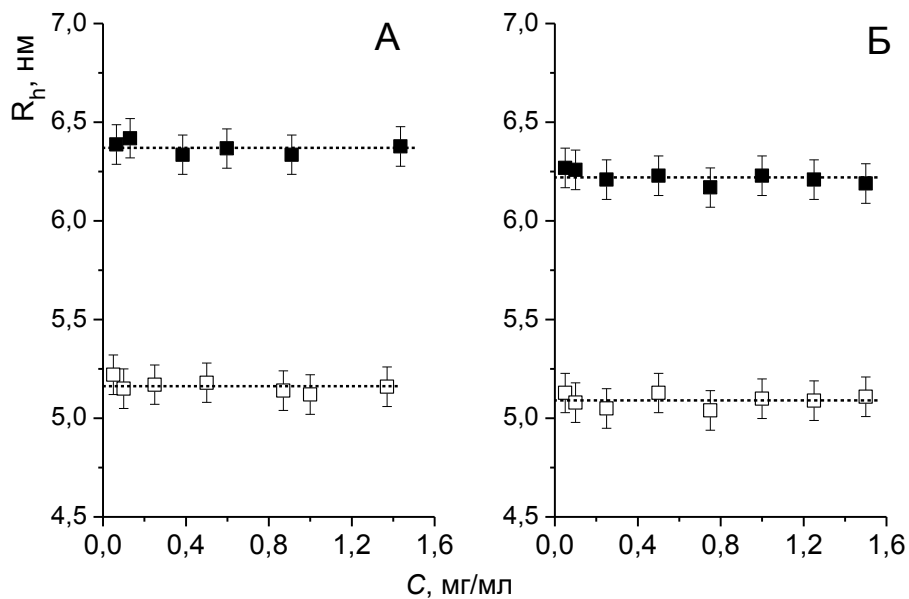


Рисунок 3.7. Зависимости эффективного гидродинамического радиуса молекул интактных (■/●) и модифицированных (□/○) глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б) от их концентрации в растворе. Растворитель – фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl, 0,1 % МЭ и 0,02 % NaN₃. Эффективные гидродинамические радиусы: глицинин – $6,37 \pm 0,10$ нм, глицинин-П – $5,16 \pm 0,10$ нм, легумин – $6,22 \pm 0,10$ нм, легумин-П – $5,09 \pm 0,11$ нм.

3.1.5. Радиус инерции

Экспериментальные кривые малоуглового рентгеновского рассеяния растворов глицинина и глицинина-П в 0,05 М фосфатном буфере с рН 7,6 и содержащем 0,5 М NaCl, 0,1 % МЭ и 0,02 % NaN₃ приведены на рисунке 3.8 А. На рисунке 3.8 Б показаны те же кривые после введения коллимационной поправки.

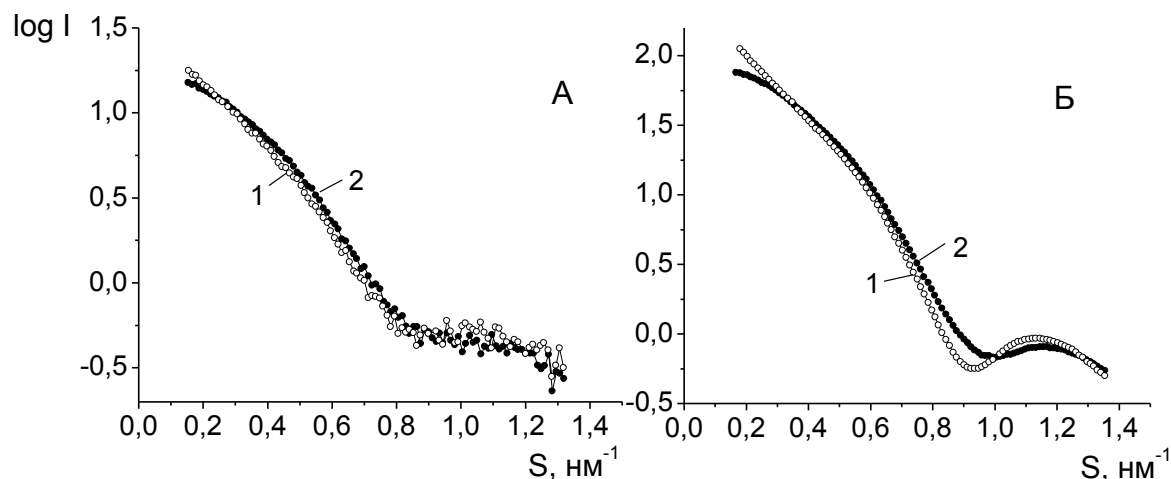


Рисунок 3.8. Кривые малоуглового рентгеновского рассеяния глицинином (1) и глицинином-П (2): А – экспериментальные кривые, Б – кривые после сглаживания и введения коллимационной поправки. Растворитель: фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl и 0,02 % NaN₃; концентрации белков 30 мг/мл; температура 22°C.

На рисунке 3.9 представлены данные малоуглового рентгеновского рассеяния растворов глицинина и глицинина-П в координатах Гинье: $(\ln(I(S)))$ от S^2 , где $I(S)$ – интенсивность рассеяния, S – волновой вектор.

В координатах Гинье индикатриса рассеяния имеет вид прямой, если выполняется приближение:

$$I(S) = I(0) \exp(-(SR_g)^2 / 3) \quad (2.7)$$

Как видно из рисунка 3.9 (Б), для глицинина-П наблюдается протяженная область значений волнового вектора S (0,18-0,60 nm⁻¹), в которой индикатриса рассеяния хорошо аппроксимируется уравнением Гинье (уравнение 2.7). Этой области соответствует радиус инерции $R_g = 4,15 \pm 0,02$ нм.

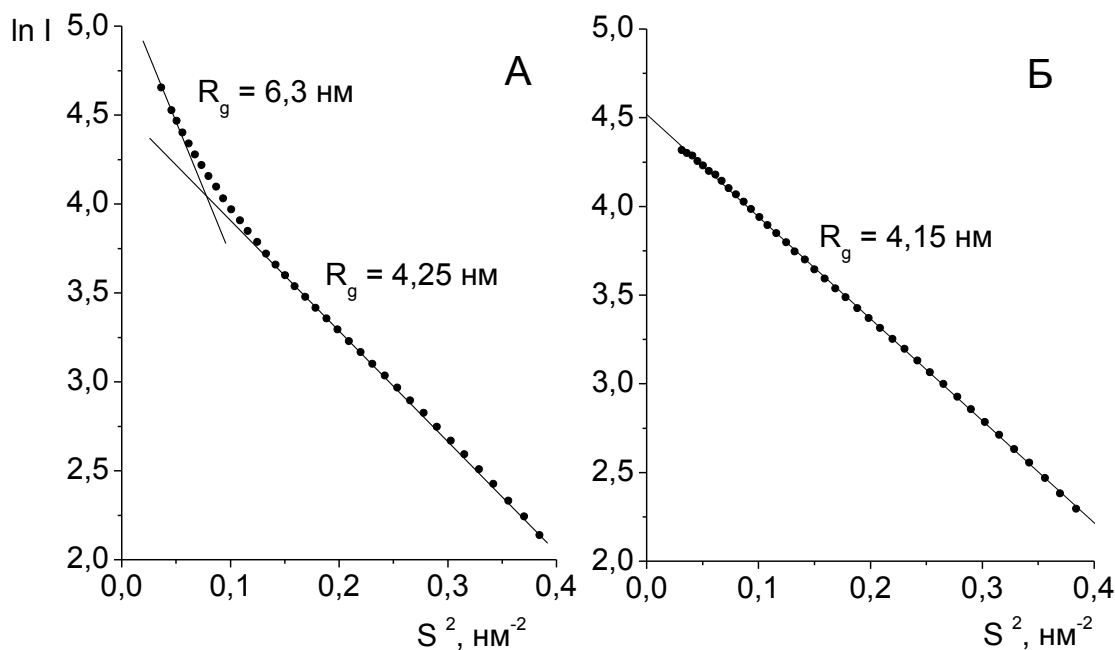


Рисунок 3.9. Индикатрисы малоуглового рентгеновского рассеяния растворов глицинина (А) и глицинина-II (Б) в координатах Гинье. Растворитель: фосфатный буфер с рН 7,6, содержанием 0,5 М NaCl, 0,1 % меркаптоэтанола и 0,02 % NaN₃, концентрация белка – 30 мг/мл.

Если выполнить аппроксимацию кривой рассеяния глицинина по уравнению Гинье, исключив начальную область рассеяния, в которую дают вклад агрегаты, то в интервале s от 0,40 до 0,57 нм⁻¹ величина радиуса инерции молекулы глицинина составляет $R_g = 4,25 \pm 0,05$ нм (рисунок 3.9 А). Определенная в этом же интервале s величина R_g для глицинина-II составляет $4,11 \pm 0,05$ нм.

Таким образом, проведенные расчеты значений радиуса инерции показывают, что R_g глицинина-II лишь незначительно меньше, чем R_g глицинина (примерно на 0,10 – 0,14 нм).

3.1.6. Парциальный удельный объем

Значения парциального удельного объема интактных и модифицированных белков составляют $0,730 \pm 0,002$ см³/г, $0,721 \pm 0,002$ см³/г, $0,727 \pm 0,002$ см³/г, $0,720 \pm 0,002$ см³/г для глицинина, глицинина-II, легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-II, соответственно, и находятся в интервале величин, характерных для белков (0,70-0,76 см³/г) [310].

3.1.7. Коэффициенты седиментации и фрикционные отношения

Методом скоростной седиментации получены седиментограммы интактных и модифицированных форм легуминов.

Коэффициенты седиментации исследуемых интактных и модифицированных белков имеют близкие значения (приведены в таблице 3.2). Здесь же представлены коэффициенты седиментации, приведенные к стандартным условиям ($s^{\circ}_{20^{\circ}, \text{вода}}$) в соответствии с уравнением [310]:

$$s^{\circ}_{20^{\circ}, \text{вода}} = s_{T, \text{буф}} \times \frac{\eta_{T, \text{буф}} \times (1 - \rho_{T, \text{буф}} \times v_{2(T, \text{буф})})}{\eta_{20^{\circ}, \text{вода}} \times (1 - \rho_{20^{\circ}, \text{вода}} \times v_{2(20^{\circ}, \text{вода})})} \quad (3.3),$$

в котором v_2 – парциальный удельный объем, s – коэффициент седиментации белка, η – вязкость и ρ – плотность для буферного раствора при температуре исследования (T) и при 20°C для воды.

В таблице 3.2 также представлены значения молекулярных масс $M_{S,D}$ белков, рассчитанные на основании модифицированного уравнения Сведберга, устанавливающего взаимосвязь между молекулярной массой, размером и формой молекулы в растворе [310, 311]:

$$s = \frac{M_{S,D}(1 - v_2\rho)}{N_A 6\pi\eta R_s} \quad (3.4),$$

где R_s – радиус Стокса (гидродинамический радиус),

N_A – число Авогадро.

Рассчитанные значения $M_{S,D}$ в пределах ошибки эксперимента совпадают со значениями M_w , полученными статическим рассеянием.

Для оценки степени асимметрии молекул белков использован полуколичественный критерий – фрикционное отношение f/f_{\min} [310]. Величина фрикционного отношения может быть определена на основе данных динамического светорассеяния:

$$f / f_{\min} = R_h / R_{\min} \quad (3.5),$$

где R_h – эффективный гидродинамический радиус, а R_{\min} – минимальный радиус, соответствующий гладкой негидратированной сфере, рассчитываемый на основе молекулярной массы по формуле [310]:

$$R_{\min} = (3V / 4\pi)^{1/3} = 0,066M^{1/3} \quad (3.6),$$

где молекулярная масса (M) выражена в Дальтонах, радиус – в нанометрах.

Большинство глобулярных белков характеризуются величинами фрикционных отношений, находящихся в пределах 1,2-1,4; белки с более вытянутой формой – 1,5-1,9; фибриллярные белки – 2-3 [310].

Значения f/f_{\min} для обеих форм белков находятся в интервале, типичном для глобулярных белков (таблица 3.2). При этом интактные белки характеризуются более высокой асимметрией формы молекулы, чем модифицированные: величина фрикционного отношения интактных

белков ($f/f_{\min} = 1,40$ для глицинина и $1,37$ для легумина *V.f.*) характеризует их форму как эллипсоид вращения, тогда как в случае модифицированных легуминов ($f/f_{\min} = 1,22$ для глицинина-П и $1,21$ для легумина *V.f.*-П) форма молекулы почти сферическая. Полученные для интактного глицинина значения фрикционных отношений соответствуют литературным данным: $1,44$ и $1,33$ [82, 101, соответственно].

Для характеристики структуры макромолекул Бурхардом предложен параметр ρ_B , представляющий собой отношение радиуса инерции к гидродинамическому [312]:

$$\rho_B = \frac{R_g}{R_h} \quad (3.7).$$

В случае гомогенной непроницаемой сферы значение параметра ρ_B составляет $0,788$. Для статистического клубка в зависимости от качества растворителя величина ρ_B составляет от $1,50$ до $2,05$. Для жесткого стержня параметр $\rho_B > 2$.

Оценка формы молекулы с помощью параметра ρ_B привела к следующим результатам: для интактного глицинина ρ_B составляет $0,667$, а для модифицированного глицинина $\rho_B = 0,804$. Таким образом, при переходе от интактного глицинина к модифицированному наблюдается увеличение параметра ρ_B , что соответствует переходу от более проницаемой структуры (за счет наличия слабоструктурированных фрагментов цепей α -цепей на поверхности глобулы глицинина) к модели гомогенной непроницаемой сферы.

В таблице 3.2 приведены полученные величины молекулярных параметров интактных и модифицированных легуминов в растворе.

Таблица 3.2. Молекулярные параметры интактных и модифицированных легуминов в растворе.

Параметры	Глицинин	Глицинин-П	Легумин <i>V.f.</i>	Легумин <i>V.f.</i> -П
Молекулярная масса M_w , кДа (по данным статического светорассеяния)	331±16	264±15	327±16	258±14
Второй вириальный коэффициент B , $\times 10^4$ мл·моль/г ²	3,57±0,21	1,31±0,16	3,20±0,16	1,59±0,17
Константа диффузии D_{20}^0 , вода, $\times 10^7$ см ² /сек	3,36±0,13	4,19±0,12	3,41±0,12	4,17±0,13
Эффективный гидродинамический радиус R_h , нм	6,37±0,11	5,16±0,10	6,22±0,10	5,09±0,11
Радиус инерции R_g , нм	4,25±0,05	4,15±0,02	-	-
Парциальный удельный объем, v_2 , см ³ /г	0,730±0,002	0,721±0,002	0,727±0,002	0,720±0,002
Коэффициент седиментации s , с, $\times 10^{13}$	10,8±0,2	10,6±0,2	10,9±0,2	10,7±0,2

Приведенный коэффициент седиментации $s_{20}^{\circ}, \text{с}, \times 10^{13}$	12,2±0,3	11,9±0,3	12,3±0,3	12,0±0,3
Молекулярная масса $M_{S,D}$, кДа (из уравнения Сведберга)	338±23	269±25	343±25	272±25
Радиус гладкой негидратированной сферы R_{\min} , нм	4,57±0,10	4,23±0,10	4,55±0,09	4,20±0,09
Фрикционное отношение f/f_{\min}	1,40±0,06	1,22±0,05	1,37±0,06	1,21±0,05
Структурный фактор ρ_B	0,667±0,016	0,804±0,017	-	-

Таким образом, в результате ограниченного протеолиза папаином снижаются молекулярная масса глицинина и легумина $V.f.$, их эффективный гидродинамический размер и, в меньшей степени, – радиус инерции (измерен для глицинина и глицинина-П). Величины фрикционных отношений свидетельствуют о понижении степени асимметрии молекул модифицированных белков в сравнении с интактными. Повышение значения параметра ρ_B для глицинина означает понижение проницаемости молекул белка и приближение к модели гомогенной непроницаемой сферы. Установлено также, что молекулы глицинина-П и легумина $V.f.$ -П характеризуются более низкой плотностью заряда (более низким значением ζ -потенциала) и более низким сродством к растворителю (более низким значением второго вириального коэффициента B).

Аналогичные закономерности в изменении структуры наблюдали при исследовании легумина $V.f.$, модифицированного путем ограниченного протеолиза трипсином (легумин-Т), что указывает на общность механизма ограниченного протеолиза легуминов [34, 108]. Получены следующие результаты: коэффициент седиментации $(12,06 \pm 0,27) \times 10^{-13}$ с; коэффициент диффузии $(4,30 \pm 0,07) \times 10^{-7}$ см²/с; гидродинамический радиус $5,0 \pm 0,09$ нм; парциальный удельный объем 0,7186 мл/г; молекулярная масса 241 кДа (молекулярная масса интактной молекулы белка 350 кДа); фрикционное отношение $1,22 \pm 0,02$ (для интактной молекулы 1,40). В целом, сопоставление результатов анализа молекулярных параметров модифицированного ограниченным тринсинолизом легумина $V.f.$ и нашими данными по ограниченному протеолизу папаином показывает близость всех молекулярных параметров. Это может быть следствием сходства механизмов ограниченного протеолиза под действием трипсина и папаина.

3.2. Влияние ограниченного протеолиза на конформационную стабильность легуминов

Для характеристики конформационной стабильности интактных и модифицированных легуминов методом ВЧ-ДСК определены термодинамические параметры их термической денатурации в 0,05 М фосфатном буфере при pH 7,6 как функции концентрации хлорида натрия и рассчитаны значения свободной энергии денатурации Гиббса как функции температуры при каждой концентрации соли.

Исходные термограммы были преобразованы в температурные зависимости парциальной удельной теплоемкости c_p и затем – в функции избыточной теплоемкости денатурации белка. Базовую линию в области перехода получали методом сплайн-интерполяции [287]. За температуру перехода T_d принимали температуру, соответствующую максимальному значению кривой избыточной теплоемкости c_p^* , а за калориметрическую энтальпию перехода $\Delta_d h^{cal}$ – площадь под кривой. Инкремент теплоемкости перехода $\Delta_d c_p$ (разность между значениями теплоемкости в нативном и денатурированном состоянии белка) определяли путем экстраполяции линейных участков функции парциальной теплоемкости до и после перехода к температуре перехода. Ширину перехода определяли по формуле $\Delta T = \Delta_d h^{cal} / c_p$. Основные термодинамические параметры процесса денатурации определяли согласно [313].

3.2.1. Термодинамические параметры денатурации

На рисунках 3.10 и 3.11 приведены типичные термограммы денатурации глицинина и глицинина-П, а также легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-П.

Каждая из термограмм характеризуется единственным относительно симметричным пиком теплопоглощения, соответствующим переходу молекулы белка из упорядоченного состояния (глобулярного) в менее упорядоченное состояние (клубкообразное). Очевидно, что в результате ограниченного протеолиза папаином происходит изменение структуры обоих легуминов, проявляющееся в смещении термограмм в область более низких температур, уменьшении площади пика теплопоглощения, небольшом изменении инкремента теплоемкости, а также в уширении пика теплопоглощения. Аналогичные изменения термограмм наблюдались во всем изученном диапазоне концентраций NaCl (0-1,0 М) [314].

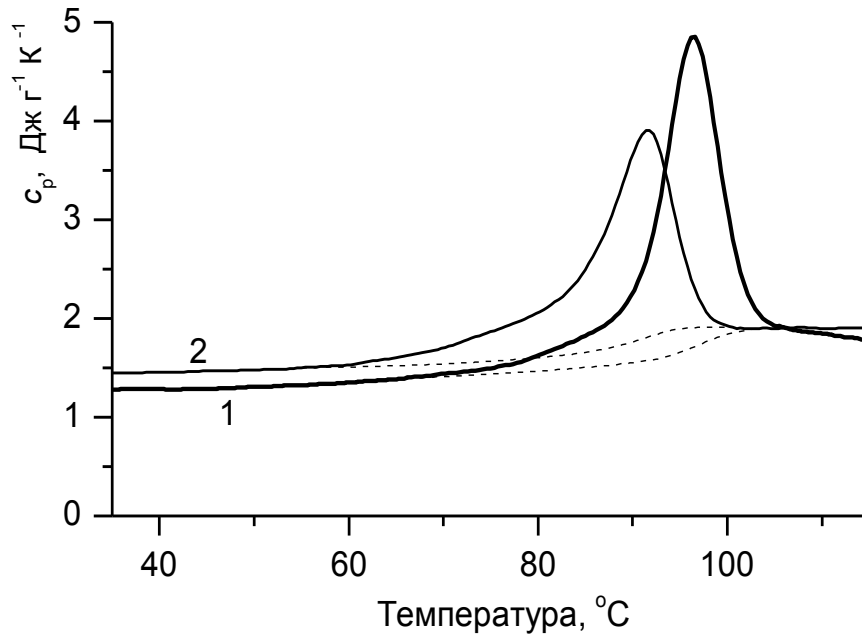


Рисунок 3.10. Термограммы глицинина (1) и глицинина-П (2) в фосфатном буфере с рН 7,6 и NaCl 0,5 М. Концентрация белка – 2 мг/мл.

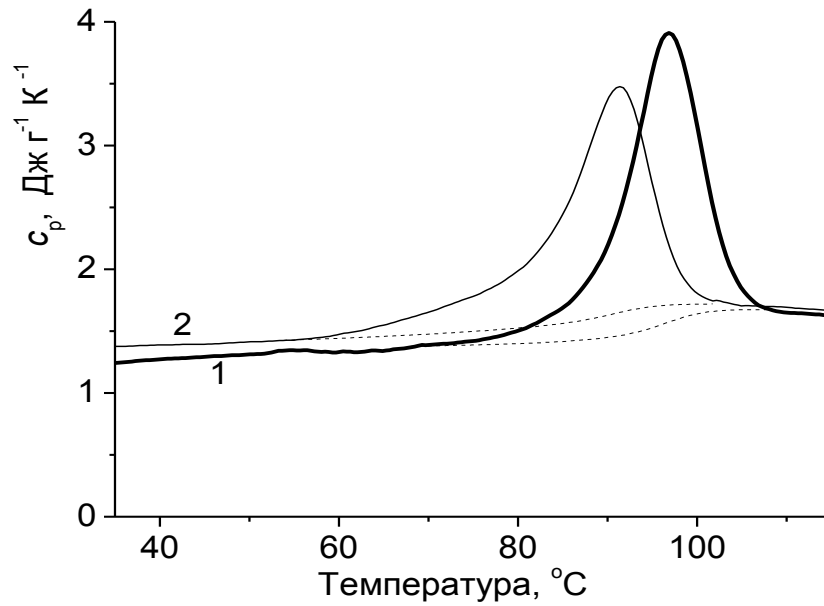


Рисунок 3.11. Термограммы легумина *V.f.* (1) и легумина *V.f.*-П (2) в фосфатном буфере с рН 7,6 и концентрации NaCl 0,5 М. Концентрация белка – 2 мг/мл.

В таблице 3.3 приведены удельные термодинамические параметры денатурации интактных и модифицированных легуминов при различных концентрациях NaCl.

Таблица 3.3. Удельные термодинамические параметры денатурации интактных и модифицированных легуминов в 0,05 М фосфатном буфере с рН 7,6.

Белок	C_{NaCl} , М	T_d , °С	$\Delta_d h^{\text{cal}}$, Дж/г	c_p^{298} , Дж/г/К	$\Delta_d c_p$, Дж/г/К	ΔT , К
Глицинин	0	78,8	20,4	1,35	0,32	7,4
	0,10	83,0	22,4	1,24	0,35	7,8
	0,25	92,4	25,0	1,42	0,28	8,1
	0,50	96,7	26,3	1,32	0,44	7,5
	0,75	99,8	26,8	1,38	0,38	7,9
	1,0	101,2	27,1	1,24	0,47	7,1
Среднее				1,33±0,06	0,37±0,06	7,6±0,3
Глицинин-П	0	69,5	17,0	1,40	0,22	9,9
	0,10	77,3	18,9	1,55	0,44	9,9
	0,25	85,2	21,7	1,53	0,35	8,6
	0,50	91,6	23,7	1,47	0,42	8,9
	0,75	95,5	25,0	1,43	0,26	8,4
	1,0	98,4	25,6	1,45	0,37	8,4
Среднее				1,47±0,05	0,34±0,07	9,0±0,6
Легумин <i>V.f.</i>	0	76,3	18,5	1,23	0,34	7,2
	0,10	82,1	19,8	1,23	0,45	7,0
	0,25	91,0	21,8	1,36	0,37	7,4
	0,50	96,6	24,1	1,34	0,34	7,1
	0,75	99,7	25,4	1,25	0,46	7,4
	1,0	101,7	26,1	1,36	0,25	7,8
Среднее				1,30±0,05	0,37±0,06	7,3±0,2
Легумин <i>V.f.</i> -П	0	68,0	16,1	1,47	0,38	9,2
	0,10	77,5	18,3	1,40	0,41	8,9
	0,25	85,1	21,0	1,49	0,26	8,2
	0,50	91,1	23,2	1,42	0,34	8,6
	0,75	95,2	23,8	1,33	0,30	8,3
	1,0	98,1	24,5	1,42	0,47	8,0
Среднее				1,42±0,05	0,36±0,06	8,5±0,4

Как видно из приведенных данных, температуры и энтальпии денатурации легуминов в модифицированной форме ниже соответствующих величин интактной формы при одинаковых концентрациях соли в растворе.

Вследствие ограниченного протеолиза для обоих легуминов наблюдается уширение пика теплопоглощения (таблица 3.3, увеличение параметра ΔT). Это уширение, безусловно, означает снижение уровня кооперативности структуры белка. Таким образом, в результате ограниченного протеолиза структура исследованных белков становится менее кооперативной.

В исследованном диапазоне концентраций NaCl изменение инкремента теплоемкости Δc_p с увеличением концентраций соли не носило систематического характера. Это связано, вероятно, с недостаточной точностью определения этого параметра из термограмм. Усредненные значения при всех концентрациях соли составляли для глицинина и глицинина-П $0,37 \pm 0,06$ Дж/г/К и $0,34 \pm 0,07$ Дж/г/К; для легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-П – $0,37 \pm 0,06$ Дж/г/К и $0,36 \pm 0,06$ Дж/г/К, соответственно, и находились в пределах, характерных для большинства белков [315].

Удельная теплоемкость c_p интактной белковой молекулы в водном растворе зависит от суммарной теплоемкости гидратации доступных растворителю аминокислот, при этом неполярные и ароматические аминокислоты характеризуются положительными значениями теплоемкости гидратации, тогда как полярные аминокислоты имеют отрицательный знак величин теплоемкостей гидратации. Согласно Гомез и Привалову, парциальная удельная теплоемкость нативного белка является универсальной характеристикой глобулярных белков, значения которой при 25°C находятся в интервале от 1,35 до 1,52 Дж/г/К (Привалов, в пересчете на усредненное значение молекулярной массы аминокислотного остатка 115 Да, [114]) или 1,38 – 1,63 Дж/г/К (Гомез и др., [316]).

Полученные в нашем эксперименте значения удельной парциальной теплоемкости интактных и модифицированных легуминов в пределах ошибки измерения согласуются с указанными интервалами (таблица 3.3). Можно заключить, что модификация не приводит к радикальным изменениям третичной структуры белка. Кроме того, следует отметить, что модифицированные легумины характеризуются более высокими значениями удельной парциальной теплоемкости в неденатурированном состоянии (при $T = 298$ К, $c_p(298)$) по сравнению с интактными белками. Этот факт может свидетельствовать в пользу того, что молекулы модифицированных белков имеют более высокую площадь доступных растворителю гидрофобных и ароматических аминокислот (и/или меньшую площадь доступной растворителю поверхности гидрофильных аминокислот), то есть поверхностная гидрофобность модифицированной молекулы выше интактной. Ранее парциальные теплоемкости легуминов

различных сортов гороха в растворе, полученные методом ВЧ-ДСК, были использованы в качестве критерия интегральной гидрофобности [317].

Ранее было установлено [270], что в ходе ограниченного протеолиза глицинина папаином происходит расщепление связки β -баррель/ α -спирали и последующее отщепление всей обширной С-концевой последовательности α -цепей, охватывающей гипервариабельный участок и всю область α -спиралей; бесструктурная петля EF α -цепей остается интактной так же, как и β -цепи (рисунок 1.4). Таким образом, субъединица глицинина-П включает «оголенный» β -баррель α -цепи, соединенный с интактной β -цепью дисульфидной связью. В процессе формирования глицинина-П от трети до половины водородных связей, участвующих во взаимодействии соседствующих субъединиц в тримерах (полумолекулах) нативного глицинина, исчезает в связи с удалением спиральных участков α -цепей [270]. Таким образом, вероятно, что понижение энтальпии денатурации при ограниченном протеолизе в значительной степени обусловлено потерей фрагментов упорядоченной структуры молекулы, а также разрушением значительной доли водородных связей, стабилизирующих четвертичную структуру [270]. Изменения структуры молекулы сопровождаются уменьшением плотности внутримолекулярных контактов, что может приводить к ослаблению третичной и четвертичной структуры.

Исследование влияние концентрации NaCl на термодинамические параметры денатурации показало, что температуры и удельные энтальпии денатурации обеих форм глицинина и легумина *V.f.* возрастали с повышением содержания соли в растворе (таблица 3.3). Известно, что действие соли на конформационную стабильность белков имеет электростатическую и лиотропную составляющие [318]. Характер зависимости температуры денатурации от концентрации NaCl (рисунок 3.13) типичен для белков. На восходящем участке кривой (при концентрациях соли ниже $\sim 0,3$ М) характер зависимости термодинамических функций определяется действием сил электростатической природы. С увеличением концентрации соли происходит экранирование заряда макромолекул и снижение эффекта отталкивания одноименных зарядов, дестабилизирующих глобулу. Наличие линейного участка функций свидетельствует о вкладе лиотропного эффекта [319].

Уравнение Хиппель-Вонга [320] описывает зависимость температуры денатурации белков от концентрации соли в растворе:

$$T_d = T_d^0 + K_S C_S \quad (3.8),$$

где K_S – лиотропная константа; T_d^0 – температура денатурации белка в отсутствие соли, C_S – концентрация соли.

В работе [127] на примере ряда легуминов и других глобулярных белков продемонстрировано, что зависимость термодинамических параметров денатурации от концентрации соли в растворе коррелирует с гидрофобностью молекул. Величина лиотропной константы для 7S и 11S глобулинов сои, согласно экспериментальным данным [127], составляет 23,6 и 22,9 К·л/моль.

В нашем случае при линейаризации участков зависимости температуры денатурации от концентрации NaCl в диапазоне 0,25-1,0 М получены величины лиотропных констант для интактных и модифицированных легуминов (рисунок 3.12). Молекулы модифицированных белков характеризуются значениями лиотропных констант ($17,4 \pm 2,3$ К·л/моль для глицинина-П и $17,3 \pm 2,0$ К·л/моль для легумина V.f.-П) выше по сравнению со значениями констант для интактных белков ($11,8 \pm 1,8$ К·л/моль для глицинина и $14,0 \pm 2,3$ К·л/моль для легумина V.f.).

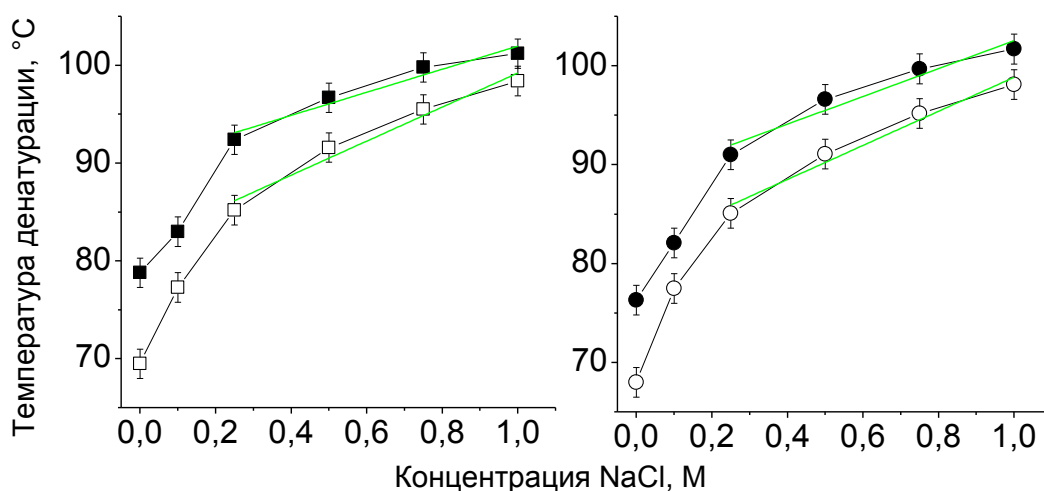


Рисунок 3.12. Зависимость температуры денатурации интактных (■/●) и модифицированных (□/○) форм глицинина (А) и легумина V.f. (Б) от концентрации NaCl в 0,05 М фосфатном буфере с pH 7,6. Углы наклона линейаризованных зависимостей dT/dC_{NaCl} в диапазоне от 0,25 до 1,0 М NaCl, °С/М: глицинин – $11,8 \pm 1,8$ (коэффициент корреляции $R_{X,Y} = 0,965$), глицинин-П – $17,4 \pm 2,3$ ($R_{X,Y} = 0,975$), легумин – $14,0 \pm 2,3$ ($R_{X,Y} = 0,961$), легумин-П – $17,3 \pm 2,0$ ($R_{X,Y} = 0,981$). Линии линейной регрессии представлены зеленым цветом.

Сравнивая значения лиотропных констант интактных и модифицированных молекул легуминов можно предположить, что разрушение структуры молекул в результате отщепления фрагментов α -цепей при ограниченном протеолизе приводит к усилению их чувствительности к лиотропному действию соли. Однако количественная оценка этого параметра требует

дополнительных исследований, в частности, расширения диапазона концентраций соли в сторону более высоких значений.

Удельные энтальпии денатурации всех исследованных белков являются линейными функциями температуры денатурации (рисунок 3.13). Их наклоны Δc_p близки величинам инкрементов теплоемкости $\Delta_d c_p$, экспериментально установленным из термограмм соответствующих легуминов (таблица 3.3). Это совпадение является признаком термодинамического соответствия полученных calorиметрических данных.

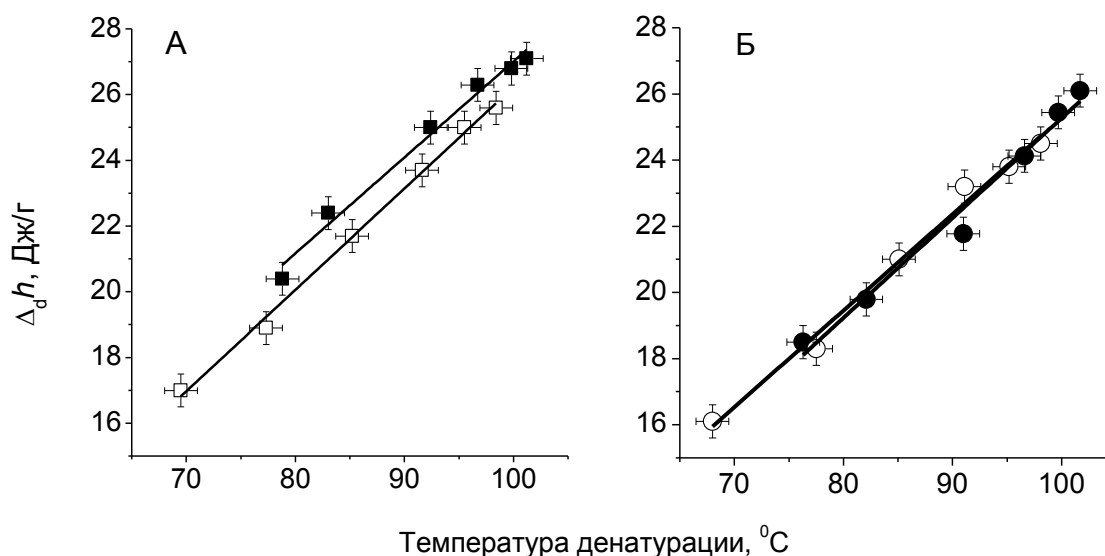


Рисунок 3.13. Графики Кирхгофа для интактных (■/●) и модифицированных (□/○) форм глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б). Углы наклона $\Delta c_p = d\Delta_d h/dT$ (Дж/г/°С): глицинин – $0,29 \pm 0,02$ (коэффициент корреляции $R_{X,Y} = 0,991$), глицинин-П – $0,31 \pm 0,02$ ($R_{X,Y} = 0,998$), легумин *V.f.* – $0,30 \pm 0,02$ ($R_{X,Y} = 0,987$), легумин *V.f.*-П – $0,29 \pm 0,02$ ($R_{X,Y} = 0,994$). На графиках представлены линии линейной регрессии.

Различие между прямым и косвенным определением инкремента теплоемкости не очень существенны. Модификация легуминов не изменяет гидратационный вклад в энтальпию. Отсюда следует вывод, что изменение энтальпии является следствием нарушения компактности третичной структуры белка.

3.2.2. Расчет свободной энергии денатурации Гиббса

В связи с необратимостью тепловой денатурации интактных и модифицированных глобулинов неизбежно возникает вопрос о применимости законов равновесной термодинамики к анализу результатов, полученных методом ВЧ-ДСК (расчет эффективной энтальпии, энтропии и свободной энергии денатурации).

Предварительное изучение кинетических параметров денатурации ряда олигомерных белков (в частности, легуминов и вицилинов) позволило установить:

1) процессу конформационного перехода субъединиц предшествует процесс диссоциации молекул легуминов на субъединицы [121, 321, 322];

2) в используемом диапазоне концентраций белка (1-10 мг/мл) и скоростей сканирования (0,25-2,0 К/мин) температура и энтальпия денатурации изменяются слабо [323].

Это означает, что агрегация не вносит заметного вклада в величину измеряемых параметров, и экспериментальная термограмма мало отличается от кривой обратимого перехода. В этих условиях применение к определению термодинамических параметров подхода с позиций равновесной термодинамики не приводит к значимым ошибкам [313]. Данный подход был использован в работах [130, 251, 323] для анализа термодинамических свойств глобулинов, в том числе легуминов соевых и кормовых бобов, гороха и подсолнечника, а также продуктов их трипсинолиза.

В таблице 3.4 приведены значения молярной калориметрической энтальпии денатурации ($\Delta_d H^{\text{cal}}$) и эффективной энтальпии (Вант-Гоффа) ($\Delta_d H^{\text{v.H}}$) интактных и модифицированных легуминов, а также величины отношений $\Delta_d H^{\text{cal}}/\Delta_d H^{\text{v.H}}$, служащих эмпирическим критерием применимости модели двух состояний к описанию процесса денатурации белков [130, 324].

Для расчета молярных величин термодинамических параметров денатурации использованы значения молекулярных масс интактных и модифицированных белков, определенные ранее методом статического светорассеяния.

Расчет эффективной энтальпии денатурации ($\Delta_d H^{\text{v.H}}$) выполнен согласно уравнению (3.9) [324]:

$$\Delta_d H^{\text{v.H}} = 4RT_d^2 C_p^* / \Delta_d H^{\text{cal}} \quad (3.9)$$

Как следует из данных таблицы 3.4, термодинамические параметры $\Delta_d H^{\text{cal}}$ и $\Delta_d H^{\text{v.H}}$ являются возрастающими функциями концентрации NaCl. Повышение энтальпии, с одной стороны, обусловлено экранированием одноименных зарядов макромолекул. С другой стороны, причиной повышения энтропии и энтальпии денатурации является эффект дегидратации белка при концентрации NaCl в растворе выше 0,1 М. Процесс дегидратации характеризуется положительными значениями изменений энтальпии вследствие разрушения связей молекул воды с молекулой белка.

Модифицированные формы легуминов характеризуются более низкими значениями как температуры, так и энтальпии термической денатурации (таблицы 3.3 и 3.4) при одинаковой

концентрации NaCl. Это, по-видимому, свидетельствует о понижении конформационной стабильности в результате модификации.

Таблица 3.4. Молярные термодинамические параметры денатурации легуминов в 0,05 М фосфатном буфере с pH 7,6 при различных концентрациях NaCl.

Белок	C_{NaCl} , М	$\Delta_d H^{\text{cal}}$, кДж/моль	$\Delta_d H^{\text{v.H.}}$, кДж/моль	$\Delta_d H^{\text{cal}} / \Delta_d H^{\text{v.H.}}$	$\Delta_d G^{\text{max}}$, кДж/моль
Глицинин	0	6752	424	15,9	625
	0,10	7414	471	15,7	742
	0,25	8275	507	16,3	896
	0,50	8705	536	16,2	976
	0,75	8870	570	15,6	1008
	1,0	8970	623	14,4	1026
Среднее				15,7±0,6	
Глицинин-П	0	4488	310	14,5	344
	0,10	4990	333	15,0	413
	0,25	5729	343	16,7	529
	0,50	6257	392	16,0	616
	0,75	6600	416	15,9	676
	1,0	6758	449	15,1	702
Среднее				15,5±0,7	
Легумин <i>V.f.</i>	0	6050	356	17,0	502
	0,10	6470	393	16,5	562
	0,25	7120	411	17,3	658
	0,50	7890	441	17,9	791
	0,75	8320	480	17,3	871
	1,0	8535	512	16,7	910
Среднее				17,1±0,4	

Легумин V.f.-II	0	4154	279	14,9	319
	0,10	4721	279	16,9	400
	0,25	5418	321	16,9	512
	0,50	5986	348	17,2	606
	0,75	6140	357	17,2	634
	1,0	6321	376	16,8	665
Среднее				16,7±0,7	

Величина отношений калориметрической энтальпии денатурации к эффективной (вантгоффовской), используемых как эмпирический критерий применимости модели двух состояний к описанию процесса термической денатурации близки к числу структурных доменов, а именно, к 12 в составе молекулы легуминов [130]. В нашем случае при расчете на 1 конституентную цепь величина параметра близка 1, (а именно, 1,3-1,4), что свидетельствует о правомерности в первом приближении применения модели двух состояний к анализу процесса термоденатурации как интактных, так и модифицированных легуминов [130].

На основе параметров, полученных из термограмм (T_d , $\Delta_d h^{cal}$), с использованием уравнений (3.10 – 3.11) рассчитаны температурные зависимости стандартных термодинамических функций (энтальпии и свободной энергии Гиббса) денатурации исследуемых белков. Этот подход основан на комбинировании уравнений Кирхгоффа и Гиббса-Гельмгольца. Используемые уравнения обычно применяют в химической термодинамике для описания равновесных процессов, характеризующихся изменением теплоёмкости, независящим существенно от температуры [114].

$$\Delta_d H(T) = \Delta_d H(T_d) - \Delta_d C_p (T_d - T) \quad (3.10)$$

$$\Delta_d G(T) = \Delta_d H(T_d) (1 - T/T_d) - \Delta_d C_p [(T_d - T) - T \ln(T_d/T)] \quad (3.11)$$

Зависимости энтальпии денатурации от температуры денатурации (зависимость Кирхгоффа) для каждого из белков имеют линейный вид (рисунок 3.14), что позволяет допустить независимость скачка теплоемкости процесса денатурации от температуры в рассматриваемом диапазоне температур.

Абсолютные значения определяемых параметров весьма значительно зависят от точности определения инкремента теплоемкости $\Delta_d c_p$. Точность определения $\Delta_d c_p$ из термограмм не достаточна для их расчета. В нашем случае критерием истинности значения $\Delta_d c_p$ служило его приблизительное совпадение с Δc_p , рассчитанного из графика Кирхгоффа. Кроме того, ошибка в определении Δc_p по Кирхгоффу была ниже (рисунок 3.14), чем в случае $\Delta_d c_p$, рассчитанного

из термограмм. Это послужило основанием для выбора значений Δc_p вместо Δ_{dc_p} при расчете температурных зависимостей термодинамических параметров денатурации легуминов в соответствии с уравнениями 3.10 – 3.11.

На рисунках 3.14 и 3.15 приведены графики зависимостей свободной энергии денатурации Гиббса для глицинина/глицинина-П и легумина *V.f.*/легумина *V.f.*-П, соответственно, от температуры при различных концентрациях NaCl в растворе. Увеличение концентрации соли в растворе приводит к увеличению свободной энергии денатурации белков, что свидетельствует о повышении термодинамической стабильности обеих форм белков под действием соли. Повышение свободной энергии денатурации с ростом концентрации соли обусловлено уменьшением ионной атмосферы макромолекул белка и, как следствие, понижением эффекта отталкивания одноименных зарядов аминокрупп, дестабилизирующего глобулу. Кроме того, повышение концентрации соли может оказывать дополнительный стабилизирующий эффект на конформацию молекулы белка, усиливая внутримолекулярные гидрофобные взаимодействия [325].

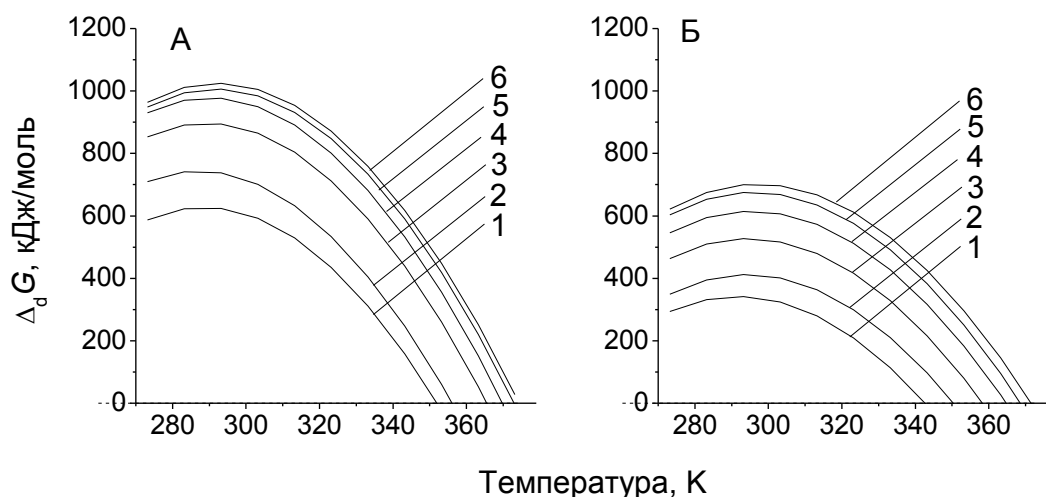


Рисунок 3.14. Зависимости свободной энергии Гиббса денатурации глицинина (А) и глицинина-П (Б) от температуры при различных концентрациях NaCl в растворе (фосфатный буфер 0,05 М с рН 7,6, концентрации NaCl: 1 – 0,0 М, 2 – 0,1 М, 3 – 0,25 М, 4 – 0,5 М, 5 – 0,75 М, 6 – 1,0 М).

Как следует из рисунков 3.14 и 3.15, абсолютные значения величин свободной энергии денатурации Гиббса и, следовательно, термодинамическая стабильность модифицированных форм легуминов ниже, чем интактных. Кроме того, температурный интервал стабильности глицинина-П и легумина *V.f.*-П в растворе уже, чем глицинина и легумина *V.f.*.

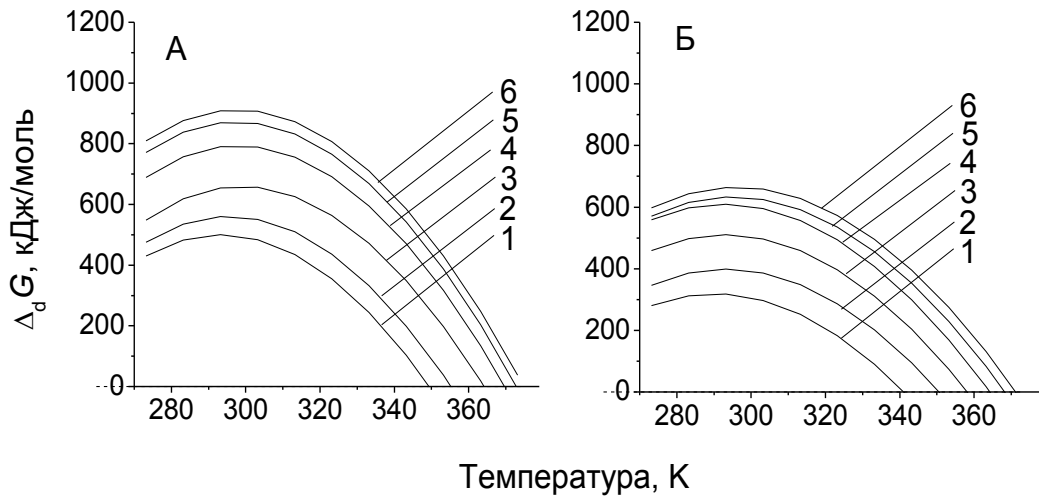


Рисунок 3.15. Зависимости свободной энергии Гиббса денатурации легумина *V.f.* (А) и легумина *V.f.*-II (Б) от температуры при различных концентрациях NaCl в растворе (фосфатный буфер 0,05 М с рН 7,6, концентрации NaCl: 1 – 0,0 М, 2 – 0,1 М, 3 – 0,25 М, 4 – 0,5 М, 5 – 0,75 М, 6 – 1,0 М).

Максимальные значения свободной энергии денатурации наблюдаются в области температур 30-40°C как для интактных, так и модифицированных белков. В таблице 3.4 приведены максимальные значения свободной энергии денатурации при различных концентрациях NaCl в растворе.

3.2.3 Анализ термограмм

Асимметрия пиков теплопоглощения на термограммах (рисунки 3.10 и 3.11), а также значения отношений $\Delta_d H^{cal}/\Delta_d H^{v.H} > 1$ (таблица 3.4) свидетельствуют о сложном характере процесса термической денатурации легуминов: наличии более чем одного типа кооперативных единиц при конформационном превращении. Таким образом, возникает вопрос о выборе адекватной модели для описания этого процесса.

Сложный характер термограмм может быть обусловлен либо несколькими последовательными переходами внутри макромолекулы как целого, либо независимыми переходами различных доменов в составе макромолекулы белка. Последняя версия наиболее вероятна для олигомерных белков [326].

С другой стороны, как упоминалось выше (раздел 1.2), каждая из 6 субъединиц легуминов содержит по два структурных домена [94]. Один из них образован α -цепью, имеющей молекулярную массу 30-40 кДа, относительно гидрофильной и имеющей кислый характер (рI

4,7-5,4). Другой домен образован β -цепью с молекулярной массой 20 кДа, гидрофобной и основной (рI 8,0-8,5) [327]. Общность картины ограниченного протеолиза легуминов проявляется в расщеплении преимущественно пептидных связей слабоструктурированных гидрофильных С-концевых участков α -цепей, тогда как β -цепи заметных изменений не претерпевают [28]. Следует принять во внимание и тот факт, что процессу кооперативного конформационного превращения предшествует процесс диссоциации молекулы 11S глобулинов на субъединицы [321-322].

Учитывая сказанное, для деконволюции пиков термограмм была выбрана модель **n** независимых переходов «все или ничего». Предварительная деконволюция пиков избыточной теплоемкости на основе выбранной модели показала наличие 3-х пиков теплопоглощения (рисунок 3.16), при которой наблюдалось наименьшее свреднеквадратичное отклонение точек, образующих теоретическую кривую, от экспериментальной (на рисунке не показана). Аналогичный результат был получен ранее Кожевниковым и Браудо [251] при анализе термограмм интактных и модифицированных ограниченным трипсинолизом легуминов гороха и кормовых бобов *Vicia faba*. По аналогии можно полагать, что низкотемпературный переход обусловлен диссоциацией макромолекул легуминов на субъединицы, а два последующих высокотемпературных перехода вызваны отдельной денатурацией доменов, образованных α - и β -цепями.

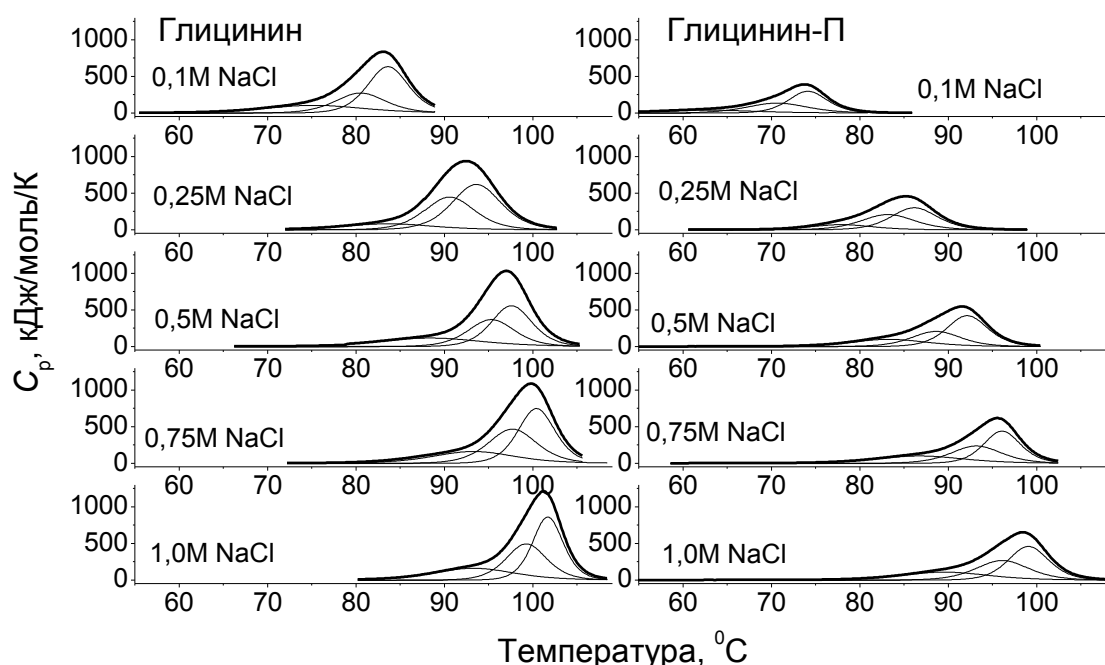


Рисунок 3.16. Результаты деконволюции пиков избыточной теплоемкости термоденатурации глицинина и глицинина-П при различных концентрациях NaCl в 0,05 М фосфатном буфере с рН 7,6. Температуру, энтальпию и инкремент теплоемкости переходов использовали как

подгоночные параметры в процессе деконволюции. Тонкими линиями представлены пики переходов, полученные в результате деконволюции. Расчетные кривые избыточной теплоемкости, полученные в результате деконволюции, на рисунках совпадают с экспериментальными кривыми (жирные линии).

В таблице 3.5 приведены параметры пиков, полученных в результате деконволюции кривых избыточной теплоемкости при различных концентрациях NaCl. Предварительный анализ показывает, что ограниченный протеолиз как глицинина, так и легумина *V.f.* сопровождается понижением температуры и энтальпии низкотемпературного перехода, полученного в результате деконволюции, что отражает понижение стабильности четвертичной структуры легуминов. Аналогичная картина характерна и для двух более высокотемпературных переходов, свидетельствуя о дестабилизирующем действии ограниченного протеолиза на структуру α - и β -доменов.

Таблица 3.5 Температуры и энтальпии денатурации субпиков глицина и глицинина-II после деконволюции при различных концентрациях NaCl в растворе

	Глицинин			Глицинин-II		
	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 1	Пик 2	Пик 3
C_{NaCl} , М	Температура денатурации, °С					
0,1	75,2	80,4	83,5	69,7	78,4	82,1
0,25	83,6	90,5	93,6	77,9	83	86,1
0,50	88,2	95,2	97,5	83,2	88,6	92
0,75	93,1	97,6	100,3	86,6	93	96
1,0	93,2	99,2	101,7	89,4	95,8	99
C_{NaCl} , М	Энтальпия денатурации, кДж/моль					
0,1	1507	2069	3824	646	1529	2145
0,25	862	3255	4132	858	2164	2618
0,50	1645	2833	4203	1310	1878	2983
0,75	1612	3291	3928	1417	2240	2852
1,0	1726	3232	3992	1552	2246	2972

Анализ параметров деконволюции позволяет оценить вклад концентрации соли в стабилизацию четвертичной структуры интактных и модифицированных легуминов, а также их структурных доменов. Однако строгий количественный анализ (расчет свободной энергии денатурации Гиббса) требует дополнительных исследований. Предварительно можно отметить, что картина деконволюции является общей для интактных и модифицированных легуминов: 1) α - и β - домены энергетически не эквивалентны; 2) ограниченный протеолиз протекает без разрушения третичной и четвертичной структуры легуминов, однако вызывает понижение термодинамической стабильности как четвертичной, так и третичной структуры.

Таким образом, установлено, что ограниченный протеолиз существенно влияет на термодинамическую стабильность легуминов. Он вызывает понижение как свободной энергии денатурации глицинина и легумина *V.f.*, так и уровня кооперативности конформационного перехода. Сопоставление наблюдаемых в ходе ограниченного протеолиза папаином изменений параметров молекулярной структуры и термодинамической стабильности молекул легуминов позволяет прийти к заключению, что понижение конформационной стабильности при ограниченном протеолизе папаином не сопровождается потерей четвертичной и третичной структуры, а обусловлено лишь глубокой перестройкой внутримолекулярных связей вследствие потери слабоструктурированных C-концевых фрагментов α -цепей и части внутримолекулярных водородных связей.

3.3. Влияние ограниченного протеолиза на адсорбционное поведение легуминов на границе воздух/раствор

Способность молекул белка образовывать адсорбционные слои на межфазных границах (жидкость/жидкость, газ/жидкость и жидкость/твердое тело) играет важную роль в биологических процессах, таких как сворачивание крови, адгезия клеток, активация метаболических процессов и др., а также – в технологических процессах, в частности, для создания пищевых эмульсий и пен.

Третичная структура белков имеет дифильный характер. Несмотря на то, что бóльшая часть гидрофильных аминокислотных остатков третичной структуры белка экспонирована к растворителю, не все гидрофобные остатки скрыты в интерьере молекулы. Значительная их часть находится на поверхности глобулы в виде участков (областей) [328]. Для большинства глобулярных белков гидрофобные участки составляют около 40% от общей площади доступной поверхности [328]. Движущей силой процесса перемещения молекул белка из объемной фазы к поверхности раздела фаз является гидрофобный эффект, заключающийся в вытеснении гидрофобных областей поверхности белка из водного окружения.

В данном разделе представлены результаты измерения динамических поверхностных свойств: временной зависимости поверхностного давления, изотерм адсорбции и дилатометрических свойств квазиравновесных адсорбционных слоев на границе воздух/раствор интактных глицинина и легумина *V.f.* и их модифицированных папаином форм.

3.3.1. Динамика формирования адсорбционных слоев

Процесс адсорбции белков на жидкой межфазной поверхности многостадийен. Согласно литературным данным [329-332], с кинетической точки зрения он протекает в три стадии. На первом этапе (индукционный период) скорость адсорбции определяется скоростью диффузии молекул белка из объема к поверхности раздела фаз. Изменение поверхностного давления на этом этапе не превышает 1 мН/м [332]. Определяющую роль на этом этапе играют молекулярные параметры белка: гидродинамический радиус, поверхностный заряд, поверхностная гидрофобность [329, 331]. Второй этап адсорбции начинается с момента достижения минимального покрытия поверхности раздела. Поверхностное давление резко возрастает вследствие адсорбции и частичного разворачивания молекул белка при взаимодействии с поверхностью. Полагают, что на этом этапе ключевую роль играет конформационная стабильность белка и, соответственно, возрастающая при разворачивании цепи поверхностная гидрофобность, размер молекулы, а также – поверхностный заряд [332]. Наконец, когда достигается насыщение межфазного слоя, скорость адсорбции падает вследствие возникновения энергетического барьера, создаваемого сформированным монослоем. Адсорбция продолжается путем образования мультислойного покрытия. На этом этапе поверхностное давление практически не меняется. Однако углубление процессов реорганизации и денатурации молекул белка и белок-белок взаимодействий в адсорбционном слое вплоть до образования гелей протекает более 20 часов в зависимости от структуры белка и свойств растворителя [329, 331]. По этой причине максимальное значение поверхностного давления, соответствующее стационарному участку динамической кривой, считается квазиравновесным.

Динамические кривые поверхностного давления адсорбционных слоев, формируемых на границе воздух/водный раствор глицинина и глицинина-П, а также легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-П при различных концентрациях белка за время наблюдения 20 тыс сек представлены на рисунках 3.17 А и 3.18 А.

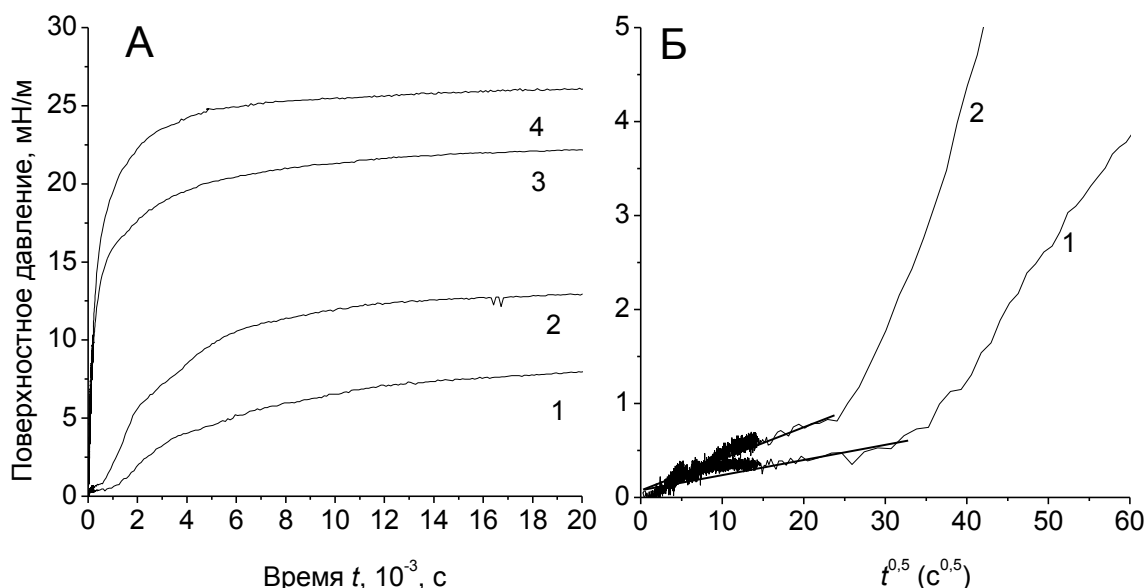


Рисунок 3.17. Динамические кривые поверхностного давления адсорбционных слоев (А) и зависимости поверхностного давления адсорбционных слоев от $t^{0,5}$ (Б) для молекул глицина (1, 3) и глицина-II (2, 4) на границе воздух/буферный раствор при температуре 25°C. Концентрация белка: 0,01 (1), 0,01 (2), 1,0 (3) и 1,0 (4) мг/мл. Растворитель: фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

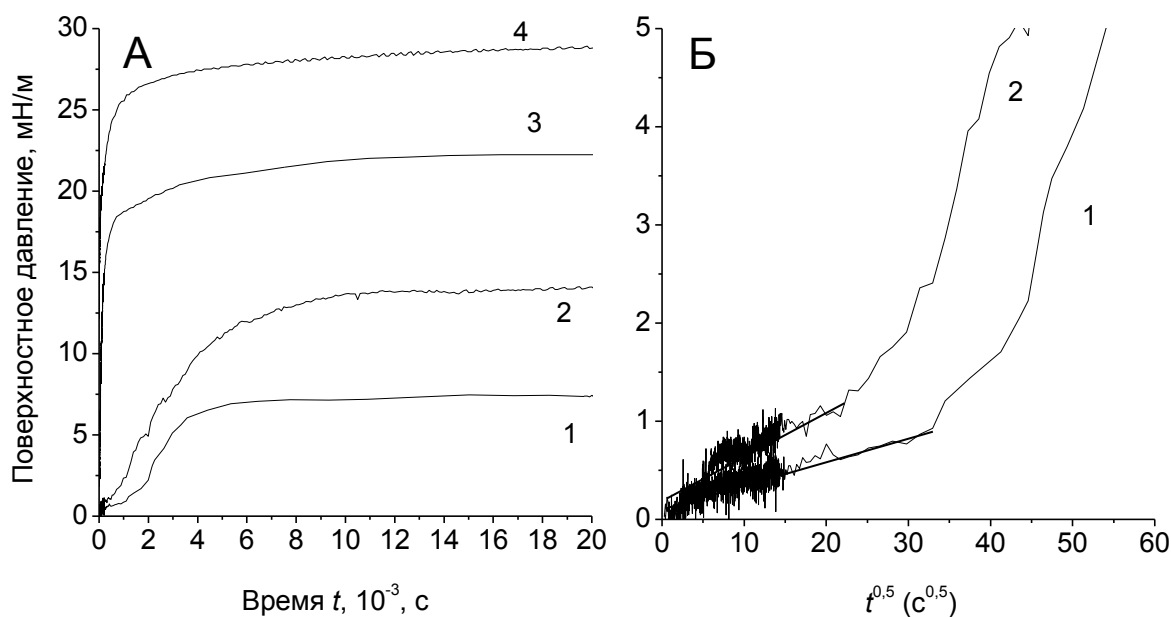


Рисунок 3.18. Динамические кривые поверхностного давления адсорбционных слоев (А) и зависимости поверхностного давления адсорбционных слоев от $t^{0,5}$ (Б) для молекул легумина V.f. (1, 3) и легумина V.f.-II (2, 4) на границе воздух/буферный раствор при температуре 25°C. Концентрация белка: 0,01 (1), 0,01 (2), 1,0 (3) и 1,0 (4) мг/мл. Растворитель: фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

При концентрациях белка 0,01 мг/мл и менее динамические кривые имеют типичную сигмоидальную форму, на которой можно выделить следующие основные участки: 1) участок относительно медленного повышения поверхностного давления (период малых времен, где скорость адсорбции контролируется скоростью диффузии молекул белка из объема к межфазной поверхности, или индукционный период); 2) участок значительного повышения поверхностного давления (период, где скорость адсорбции лимитируется величиной энергетического барьера, связанного с внедрением молекул в формирующийся слой, изменением нативной конформации белка и усилением межмолекулярных взаимодействий внутри слоя, или постиндукционный период); 3) стационарный участок, на котором поверхностное давление достигает наибольшего значения и в дальнейшем практически не изменяется. Медленное повышение поверхностного давления по истечении длительного времени указывает на то, что уже адсорбированные макромолекулы контролируют адсорбцию новых молекул посредством перераспределения сегментов в адсорбционном слое [333, 334].

На первом этапе адсорбции, при относительно низком поверхностном давлении, скорость диффузии определяет скорость адсорбции в соответствии с модифицированной формой уравнения Тордэй [335]:

$$\pi = 2C_0kT(Dt / 3,14)^{1/2} \quad (3.12)$$

где C_0 – объемная концентрация белка, k – константа Больцмана, T – абсолютная температура, D – коэффициент диффузии, t – время.

Если зависимость π от $t^{0,5}$ имеет линейный характер, то скорость адсорбции контролируется скоростью диффузии из объема к межфазному слою [336-338]. Примеры такого рода зависимостей показаны на рисунок 3.18 Б и рис 3.19 Б.

В таблице 3.6 приведены значения динамических параметров адсорбции для интактных и модифицированных легуминов на границах раздела фаз при 25 °С и различных концентрациях белка.

Величина индукционного периода сокращается с повышением концентрации белка. В нашем случае при объемной концентрации белка 1 мг/мл она уже не может быть установлена в рамках данного метода. Кривые $\pi = f(t)$ демонстрируют лишь вторую и финальную стадии адсорбции (рисунки 3.17 А и 3.18 А, кривые 3 и 4). При сопоставлении значений индукционного периода для одинаковых концентраций интактных и модифицированных легуминов можно видеть, что эти величины в случае модифицированных белков ниже, чем у интактных.

Таблица 3.6. Динамические параметры адсорбции легуминов на границе раздела фаз при 25°C. Растворитель: фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

Белок	Концентрация белка, мг/мл	Индукционный период		Постиндукционный период
		Продолжительность, сек	$k_{\text{диф}} = \Delta\pi / \Delta t^{0,5}, 10^6$ $\text{Н} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{сек}^{-0,5}$	$\Delta\pi / \Delta t, 10^6$ $\text{Н} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$
Глицинин	1,0	-	-	55,4
	0,1	25	-	13,9
	0,01	1011	20	1,62
	0,001	1558	15	0,84
Глицинин-П	1,0	-	-	75,2
	0,1	10	-	42,5
	0,01	586	37	4,72
	0,001	846	22	2,03
Легумин <i>V.f.</i>	1,0	-	-	63,5
	0,1	28	-	15,6
	0,01	1102	23	1,95
	0,001	1632	14	0,62
Легумин <i>V.f.</i> -П	1,0	-	-	83,8
	0,1	12	-	40,4
	0,01	484	41	4,31
	0,001	901	25	1,82

В таблице 3.6 представлены величины наклонов линейных графиков, соответствующих индукционному периоду, для разных концентраций белка. Наблюдается повышение скорости адсорбции с увеличением концентрации белка. Аналогичные зависимости наблюдались в работах [339-340]. Этот эффект отражает тот факт, что движущей силой процесса диффузии является градиент концентрации белка.

Более значительное повышение поверхностного давления на индукционном участке динамической кривой наблюдается для модифицированных легуминов по сравнению с интактными (рисунки 3.17 Б и 3.18 Б), что является отражением изменения структуры легуминов в процессе ограниченного протеолиза.

Наблюдаемый эффект, также как сокращение продолжительности индукционного периода, коррелирует с изменением молекулярных параметров белков вследствие ограниченного протеолиза: отщепление слабоструктурированных фрагментов α -цепей приводит к понижению молекулярной массы, понижению эффективного гидродинамического размера и формированию более компактной структуры молекул легуминов и, как следствие, более высокой скорости диффузии (таблица 3.2).

Скорость адсорбции в постиндукционный период зависит от величины энергетического барьера, обусловленного рядом факторов, связанных с влиянием заряда адсорбированных молекул, денатурацией белка, пенетрацией молекул в структуру адсорбционного слоя и реорганизацией структуры слоя. Учитывая сложность и условность разделения вкладов различных процессов в кинетику адсорбции, для характеристики постиндукционного этапа адсорбции мы использовали начальный наклон кривых в постиндукционный период. Значения полученных величин наклонов приведены в таблице 3.6. Большой наклон начальных участков наблюдался в случае модифицированных легуминов.

Для оценки скорости проникновения молекул в адсорбционный слой в постиндукционный период часто используют эмпирический подход, основанный на определении наклона линейных участков зависимостей $\ln((\pi_{10800}-\pi_t)/(\pi_{10800}-\pi_0))$ от времени t [341-342]. Предполагается, что скорость пенетрации подчиняется кинетическому уравнению первого порядка, что позволяет линеаризовать начальные участки и находить константу скорости перетрации k_p . Использование данного подхода в нашем случае (рисунок 3.19) показало, что величина этого параметра у модифицированных молекул выше, чем у интактных. В частности, при концентрации 0,01 мг/мл константы скорости пенетрации глицинина и глицинина-П составляют $(1,51 \times 10^{-4} \pm 0,10) \times 10^{-4}$ и $(1,93 \times 10^{-4} \pm 0,12) \times 10^{-4}$ сек⁻¹, соответственно.

Таким образом, в постиндукционный период наблюдается повышение скорости изменения поверхностного давления, обусловленного адсорбцией, с увеличением концентрации белка как для интактных легуминов, так и для модифицированных. В то же время, скорость адсорбции в случае модифицированных белков выше по сравнению с интактными при одинаковой концентрации белка.

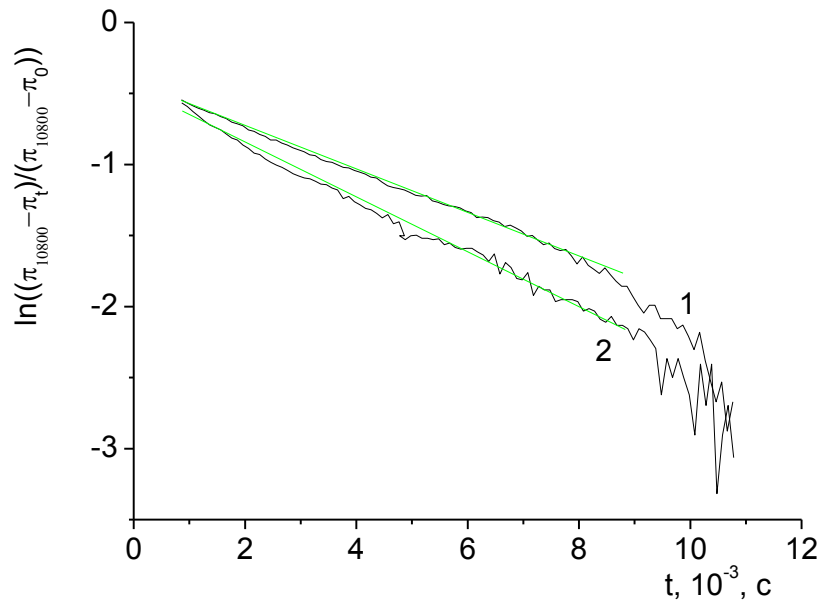


Рисунок 3.19. Зависимость $\ln((\pi_{10800}-\pi_t)/(\pi_{10800}-\pi_0))$ в постиндукционный период от времени формирования адсорбционного слоя t для молекул глицинина (1) и глицинина-П (2) на границе буферный раствор/воздух при температуре 25°C. Концентрации белков в растворе – 0,01 мг/мл, растворитель: фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl. π_0 – поверхностное давление в начальный момент времени, π_{10800} – поверхностное давление через 10800 сек, π_t – поверхностное давление в момент времени t .

Повышение скорости формирования адсорбционного слоя в случае модифицированных легуминов в постиндукционный период обусловлено, вероятно, понижением активационного барьера адсорбции вследствие:

- 1) уменьшения конформационной стабильности (раздел 3.2);
- 2) уменьшения поверхностного заряда (раздел 3.1);
- 3) уменьшения молекулярной массы и размера молекулы белка (раздел 3.1).

Нами установлено, что в результате ограниченного протеолиза наблюдается понижение свободной энергии денатурации глицинина и легумина $V.f.$ на 365 и 185 кДж/моль, соответственно (при 0,5 М NaCl в растворе, таблица 3.4, рисунок 3.16, рисунок 3.17). Кроме того, из литературных данных известно, что при ограниченном протеолизе глицинина с использованием папаина разрушается приблизительно половина водородных связей, соединяющих соседние субъединицы в составе тримера и часть дисульфидных связей, стабилизирующих его нативную конформацию [270].

Измерение ζ -потенциала свидетельствует о понижении поверхностного заряда легуминов вследствие ограниченного протеолиза папаином (рисунок 3.5, таблица 3.2). Этот результат

коррелирует с известной из литературы обратной зависимостью между величиной ζ -потенциала белковой молекулы, с одной стороны, и скоростью адсорбции на поверхность раздела фаз и поверхностной активностью – с другой [137].

Возможно, роль в снижении активационного барьера адсорбции играет также и устранении некоторых стерических затруднений при адсорбции вследствие отщепления слабоструктурированного фрагмента α -цепей.

3.3.2. Изотермы адсорбции

На рисунках 3.20 и 3.21 представлены изотермы поверхностного давления растворов глицинина и глицинина-П, а также легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-П на границе воздух/буферный раствор. По оси ординат отложены значения квазиравновесных величин поверхностного давления (время формирования адсорбционного слоя 72 000 сек), по оси абсцисс – логарифм концентрации белка в растворе.

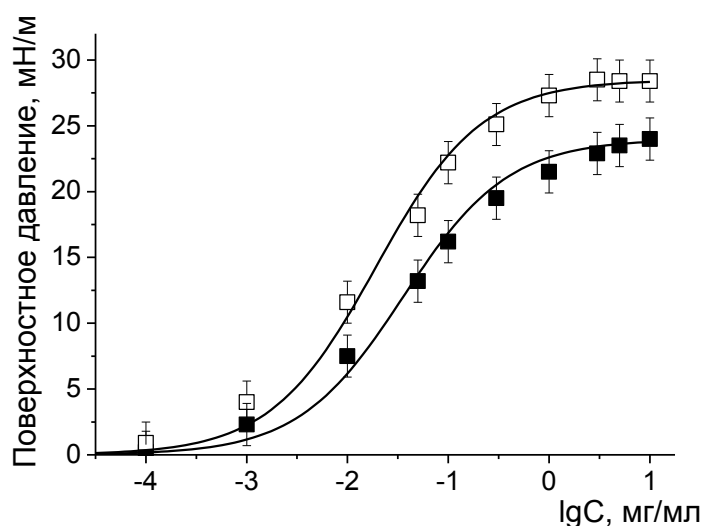


Рисунок 3.20. Изотермы адсорбции глицинина (■) и глицинина-П (□) на границе воздух/буферный раствор при 25°C. Время формирования адсорбционного слоя – 72 000 сек. Растворитель: 0,05 М фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

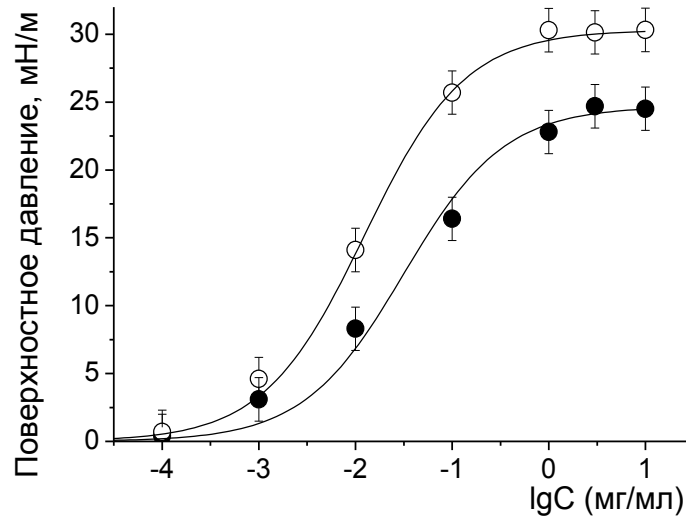


Рисунок 3.21. Изотермы адсорбции легумина *V.f.* (●) и легумина *V.f.-II* (○) на границе воздух/буферный раствор при 25°C. Время формирования адсорбционного слоя – 72 тыс сек. Растворитель: 0,05 М фосфатный буфер с pH 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

При концентрации легуминов в растворе 10^{-4} мг/мл и ниже повышения поверхностного давления практически не наблюдается. С увеличением концентрации белка поверхностное давление возрастает вплоть до постоянного значения. Согласно существующим представлениям, достижение максимального уровня поверхностного давления соответствует формированию насыщенного адсорбционного монослоя. Дальнейшее повышение концентрации белков в растворе может приводить к образованию мультислойного покрытия межфазной границы, которое не обязательно сопровождается изменением поверхностного давления на межфазной границе.

В литературе описаны эффекты изменения хода зависимости $\pi = f(\tau)$ при повышении $\pi > 12-22$ мН/м, а также при увеличении времени старения слоев [154], связанные с изменением структуры слоя, а именно зависимость меняла характер с монотонного на двуступенчатый. В нашем случае даже при значительных временах формирования слоя (более 70 часов) динамические кривые имели одноступенчатый характер. Указанные различия в адсорбционном поведении, вероятно, связаны с использованием в нашем случае более высокой ионной силы растворов (0,5 М NaCl), соответствующих более высокой конформационной стабильности молекул легуминов.

Как следует из рисунков 3.20 и 3.21, модифицированные глицинин и легумин *V.f.* во всем интервале концентраций в растворе характеризуются более высокими значениями

поверхностного давления по сравнению с интактными. Максимальное значение поверхностного давления (поверхностная активность) в данном растворителе (0,05 М фосфатный буфер с pH 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl) составляет в случае глицинина – 23,9 мН/м, глицинина-П – 28,4 мН/м, легумина V.f. – 24,5 мН/м и легумина V.f.-П – 30,3 мН/м.

Концентрация белка, при которой функция достигает $\pi = f(\tau)$ постоянного значения, т.е. происходит насыщение поверхностного слоя, ниже для модифицированных белков в сравнении с интактными. В случае глицинина эта величина находится в интервале от 5 до 10 мг/мл, глицинина-П – от 1 до 3 мг/мл; легумина V.f. – от 1 до 3 мг/мл, легумина V.f.-П – от 0,1 до 1 мг/мл.

Установленные различия изотерм адсорбции интактных и модифицированных белков свидетельствуют о том, что модификация молекул легуминов папаином приводит к повышению поверхностной активности белков и понижению критической концентрации белка, соответствующей формированию насыщенного адсорбционного слоя. Возможные причины наблюдаемых эффектов заключаются в изменении параметров молекулярной структуры и конформационной стабильности легуминов в результате протеолиза. Можно предположить также, что модифицированные молекулы способны формировать более плотные молекулярные слои за счет большей молекулярной подвижности в сочетании с меньшим размером.

Роль молекулярной массы и размера молекулы белка в равновесной адсорбции установлена в работе [343]. Адсорбционное поведение 8 глобулярных белков (включая глицинин и вицилин) на границе воздух/водный раствор проанализировано с позиций оценки распределения белка между объемной фазой растворителя и приграничной фазой, имеющей определенную толщину и свойства растворителя, отличные от свойств объемной фазы. Экспериментальные изотермы адсорбции и изотермы, рассчитанные на основе модифицированной модели, совпадали при использовании в качестве подгоночного параметра отношения величины площади доступной поверхности глобулы к ее объему (A_s/V), несмотря на различия в структуре и физико-химических свойствах белков. Относительное сродство глобулярных белков к поверхности раздела понижалось с повышением молекулярной массы. Теоретический анализ и экспериментальные данные свидетельствуют, что повышение молекулярной массы белка в 2 раза вызывает неблагоприятное изменение (повышение) свободной энергии адсорбции на 272 кал/мол [344].

Согласно уравнению

$$\Delta G = \Delta G_2 - \Delta G_1 = RT \ln \left(\frac{M_2}{M_1} \right)^{2/3} \quad (3.13),$$

в котором M и ΔG – молекулярная масса и свободная энергия денатурации исходного (1) и измененного (2) белков, определенное нами понижение молекулярных масс глицинина и легумина *V.f.* (таблица 3.2) в результате протеолиза сопровождается понижением свободной энергии адсорбции на 374 Дж/моль и 391 Дж/моль, соответственно.

На рисунке 3.22 представлены зависимости квазиравновесного поверхностного давления растворов интактных и модифицированных белков на границе воздух/раствор белка (1 мг/мл) от концентрации NaCl. Поверхностное давление растворов модифицированных белков выше такового интактных легуминов во всем исследованном диапазоне концентраций NaCl. Растворы как интактных, так и модифицированных белков демонстрируют общую тенденцию к повышению поверхностного давления с увеличением ионной силы раствора. Кроме того, наблюдается больший инкремент зависимостей поверхностного давления от концентрации соли ($d\pi/dC_{\text{NaCl}}$) модифицированных форм легуминов по сравнению с интактными.

Причина наблюдаемых эффектов заключается в двойственном действии соли. С одной стороны, NaCl повышает скорость адсорбции белков, понижая энергетический барьер путем экранирования поверхностного заряда и подавления отталкивания диффундирующих к поверхности молекул белка, как с уже адсорбированными молекулами, так и между молекулами внутри адсорбционного слоя. С другой стороны, при концентрации NaCl $\geq 0,2$ М усиливаются гидрофобные взаимодействия поверхности белковой молекулы с неполярной фазой и между молекулами белка внутри адсорбционного слоя [127]. Повышение поверхностной гидрофобности молекул легуминов в результате ограниченного протеолиза, по-видимому, является причиной более высокого инкремента поверхностного давления с увеличением концентрации соли в случае модифицированных легуминов. Этот результат качественно коррелирует с нашими данными по более высокому значению константы лиотропного действия соли на конформационную стабильность модифицированных легуминов по сравнению с интактными.

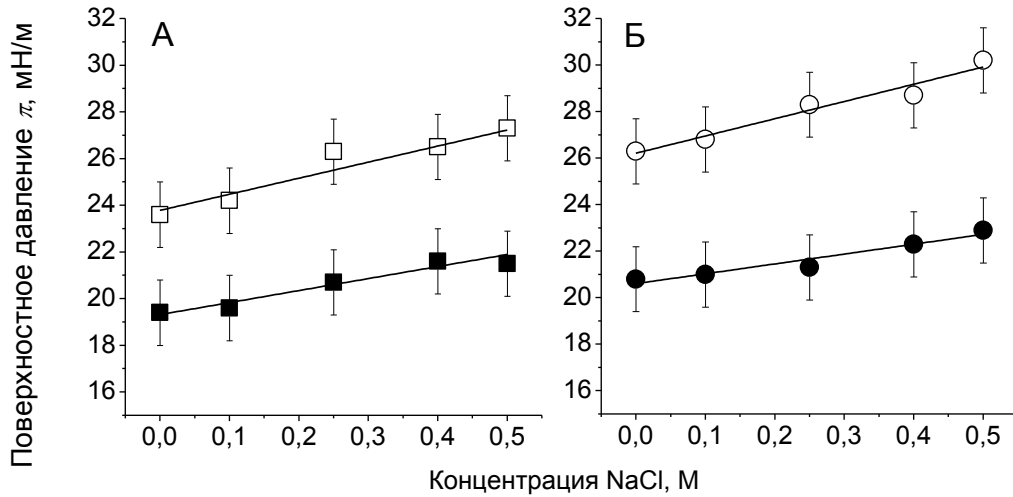


Рисунок 3.22. Зависимость поверхностного давления от концентрации NaCl для растворов интактных (■/●) и модифицированных (□/○) белков глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б). Концентрации белков 1 мг/мл, температура 25°C, растворитель – фосфатный буфер с рН 7,6. Углы наклона линий ($d\pi/dC_{\text{NaCl}}$): глицинин – $5,15 \pm 0,25$ ($R_{X,Y} = 0,974$), глицинин-П – $6,88 \pm 0,27$ ($R_{X,Y} = 0,975$), легумин *V.f.* – $4,24 \pm 0,23$ ($R_{X,Y} = 0,959$), легумин *V.f.*-П – $7,41 \pm 0,30$ мН/м/М ($R_{X,Y} = 0,979$).

3.3.3. Реологические свойства адсорбционных слоев

В процессе образования пищевых дисперсных систем (эмульсий и пен) непрерывно формируется новая межфазная поверхность в диапазоне времен, типичных для дилатационной реологии. Типы деформации, которым подвергается межфазный слой в процессе эмульгирования и пенообразования, это расширение и, в меньшей степени – сжатие [345-348].

Межфазная реология является весьма чувствительным методом характеристики структурообразующих свойств молекул на межфазной границе [349, 350]. Это позволяет проследить связь между реологическими свойствами адсорбционных слоев и их пенообразующей и эмульгирующей способностью.

Данный раздел посвящен сравнительному исследованию реологических свойств адсорбционных слоев интактных и модифицированных легуминов, исследованных в линейной области в соответствии с подходом, предложенным в работах [351-353].

Частотная зависимость комплексного модуля вязкоупругости может быть выражена следующим образом:

$$E = (\sigma_0 / A_0)(\cos \varphi + i \sin \varphi) = E' + iE'' \quad (2.14)$$

где E' и E'' – реальная (модуль накопления) и мнимая (модуль потерь) части, которые зависят от приложенной частоты и определяют консервативный и диссипативный характер реологического поведения адсорбционных слоев, соответственно.

Информация о реологических свойствах адсорбционных слоев получена путем измерения комплексного модуля вязкоупругости в синусоидальном режиме. На рисунке 3.23 представлен пример синусоидальных изменений площади поверхности пузырька и поверхностного натяжения, используемые для расчета реологических характеристик.

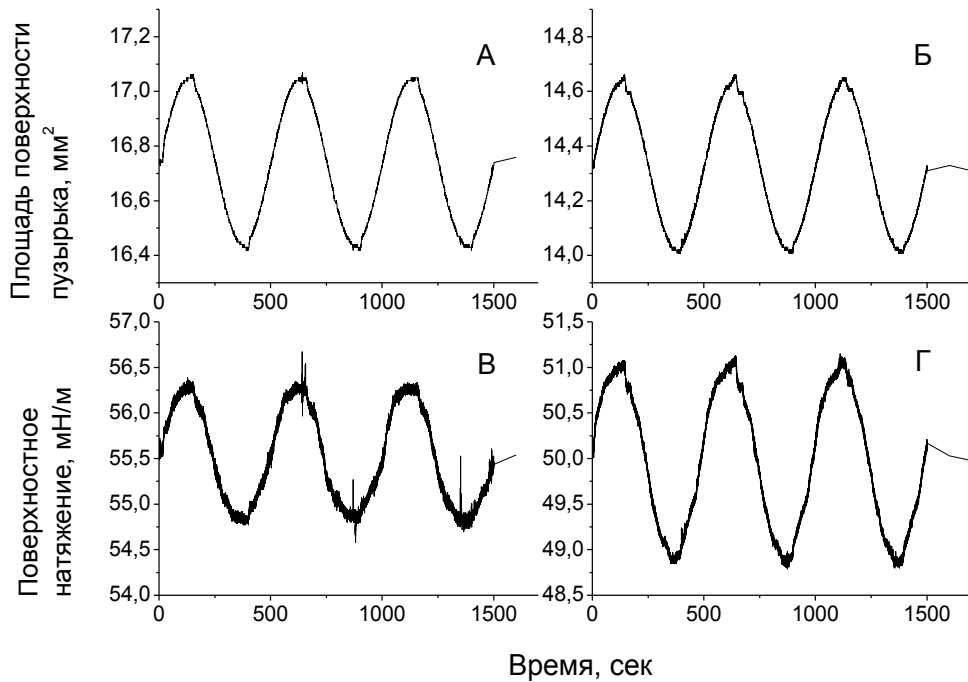


Рисунок 3.23. Изменения площади поверхности пузырька воздуха в растворе глицинина (А) и глицинина-II (Б) и изменения поверхностного натяжения растворов белков (В и Г, соответственно) в процессе дилатационного нагружения в синусоидальном режиме. Растворитель: фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl. Концентрации белков 0,1 мг/мл. Частота нагружения 0,02 Гц, амплитуда нагружения 5 %.

На рисунках 3.24 и 3.25 приведены частотные зависимости действительной E' и мнимой E'' составляющих комплексного модуля вязкоупругости адсорбционных слоев глицинина, глицинина-II, легумина $V.f$ и легумина $V.f$ -II, сформированных в течение 72 тыс сек. на границе раздела воздух/буферный раствор при различных концентрациях белков.

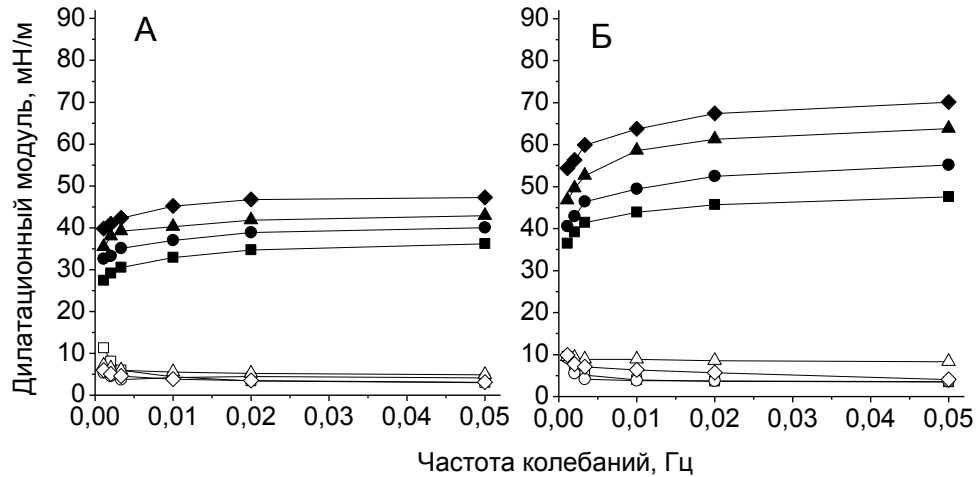


Рисунок 3.24. Действительная (темные символы) и мнимая (светлые символы) составляющие дилатационного модуля адсорбционных слоев глицинина (А) и глицинина-II (Б) при различных концентрациях белков: 0,001 мг/мл (■/□), 0,01 мг/мл (●/○), 0,1 мг/мл (▲/△), 1 мг/мл (◆/◇). Температура 25°C, растворитель – фосфатный буфер с pH 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

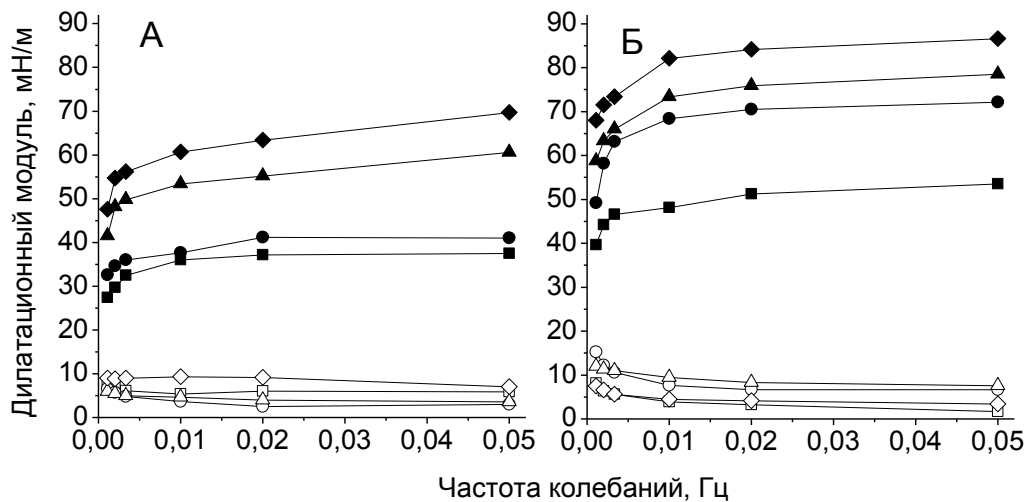


Рисунок 3.25. Действительная (темные символы) и мнимая (светлые символы) составляющие дилатационного модуля адсорбционных слоев легумина *V.f.* (А) и легумина *V.f.*-II (Б) при различных концентрациях: 0,001 мг/мл (■/□), 0,01 мг/мл (●/○), 0,1 мг/мл (▲/△), 1 мг/мл (◆/◇). Температура 25°C, растворитель – фосфатный буфер с pH 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

Общими характеристиками реологического поведения адсорбционных слоев как интактных, так и модифицированных легуминов является близость значений комплексного модуля вязкоупругости (данные не приведены) и его упругой составляющей (модуля

накопления E'). Величина модуля накопления намного превышает величину модуля потерь комплексного модуля вязкоупругости ($E' \gg E''$). Общность реологического поведения всех исследованных белков проявляется также в увеличении комплексного модуля вязкоупругости и его упругой составляющей с ростом концентрации белка и частоты приложенного напряжения. В то же время модуль потерь E'' претерпевает существенно меньшие изменения как при повышении концентрации белка, так и при увеличении частоты деформации.

На рисунке 3.26 представлены зависимости фазового угла для интактных и модифицированных белков в зависимости от концентрации белка и частоты нагружения. Величина фазового угла понижается как с ростом концентрации белка, так и с увеличением частоты колебаний, что указывает на упругое поведение адсорбционных слоев. Аналогичные зависимости дилатационного модуля и фазового угла от частоты колебаний были ранее установлены для глицинина [148].

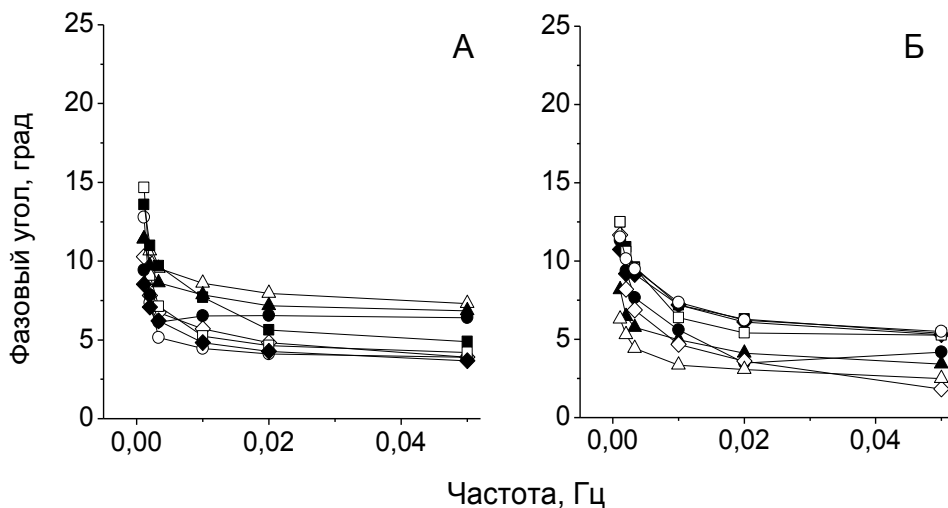


Рисунок 3.26. Зависимости величин фазовых углов от частоты нагружения. А – глицинин/глицинин-П (темные/светлые символы), Б – легумин *V.f.* /легумин *V.f.*-П (темные/светлые символы) при различных концентрациях: 0,001 мг/мл (■/□), 0,01 мг/мл (●/○), 0,1 мг/мл (▲/△), 1 мг/мл (◆/◇). Температура 25°C, растворитель – фосфатный буфер с pH 7,6.

Известно, что наиболее характерным типом реологического поведения адсорбционных слоев глобулярных белков является упругое поведение [354]. Причина этого заключается в особенностях структуры глобулярных белков. Как интактные, так и модифицированные легумины в нашем случае демонстрируют именно такой тип поведения.

Наблюдаемое для всех исследованных белков увеличение E' с ростом частоты колебаний обусловлено тем, что при больших скоростях деформирования (сжатия/растяжения) пузырька скорость релаксационных процессов значительно уступает скорости деформирования.

Как следует из сопоставления данных, представленных на рисунках 3.25-3.27, в одинаковых условиях (при одинаковой концентрации белка и частоте деформирования) модуль накопления модифицированных белков превосходит по величине таковой интактных белков. При этом характер реологического поведения адсорбционных слоев в результате модификации не претерпевает заметных изменений.

Повышение модуля упругости адсорбционных слоев модифицированных белков, по-видимому, обусловлено их способностью формировать более плотные адсорбционные слои вследствие меньшего размера молекул, более низкой плотности поверхностного заряда и более низкой конформационной стабильности, а также большего сродства к неполярной поверхности.

Ранее [153] при сравнительном исследовании поверхностной активности и дилатационных характеристик адсорбционных слоев молекул глицина и продуктов его ограниченного протеолиза алькалазой показано, что адсорбционные слои модифицированных молекул обладали более выраженными вязкоупругими свойствами, что выражалось в понижении упругой составляющей дилатационного модуля и повышении фазового угла. Таким образом, согласно [153], в результате ферментативной модификации увеличивалась вязкостная составляющая комплексного дилатационного модуля. В нашем случае в результате ограниченного протеолиза папаином наблюдалось повышение комплексного модуля и его упругой составляющей на фоне слабой частотной зависимости как фазового угла, так и вязкостной составляющей комплексного модуля.

На рисунке 3.27 представлены зависимости модуля накопления и модуля потерь интактных и модифицированных белков от концентрации NaCl в растворе. Очевидно, что с повышением концентрации соли наблюдается уменьшение упругой составляющей комплексного модуля как для интактных, так и для модифицированных легуминов. Мнимая часть дилатационного модуля не проявила существенной зависимости от ионной силы и различий между исследуемыми белками, оставаясь значительно ниже действительной части. Сравнивая интактные и модифицированные легумины, можно констатировать, что величина модуля сохранения модифицированных легуминов превышает таковую для интактных легуминов во всем исследованном диапазоне NaCl.

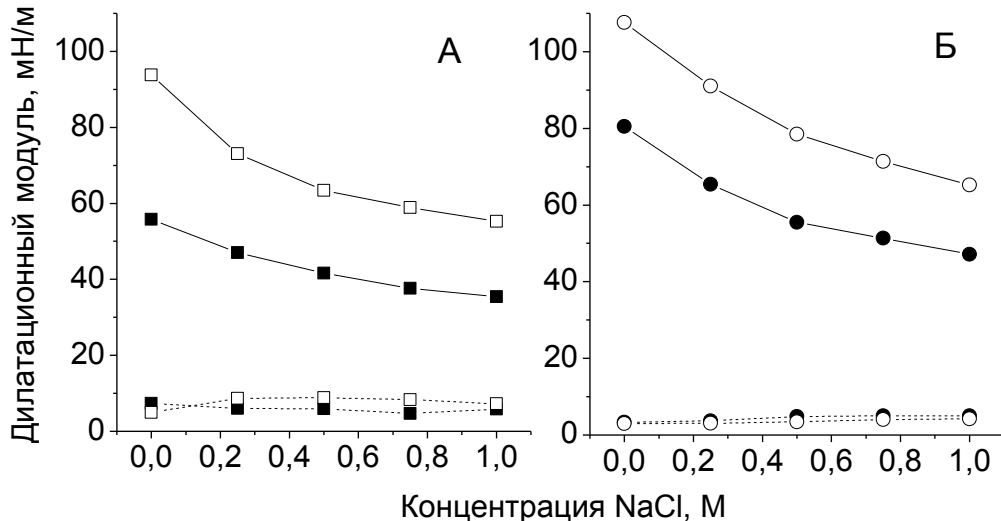


Рисунок 3.27. Зависимость модуля накопления (сплошная линия) и модуля потерь (пунктирная линия) частей дилатационного модуля intactных (■/●) и модифицированных (□/○) белков лизинин (А) и легумин-*V.f.* (Б) от концентрации NaCl в растворе. Температура – 25°C, концентрации белков в растворе – 0,1 мг/мл, частота дилатационных колебаний – 0,02 Гц, растворитель – фосфатный буфер с рН 7,6.

Известно, что присутствие солей повышает скорость адсорбции белка за счет понижения энергетического барьера адсорбции [355]. Соль экранирует электростатическое отталкивание между молекулами белка в адсорбционном слое, что приводит к усилению межмолекулярных взаимодействий и должно способствовать формированию более упругих адсорбционных слоев. В то же время противоположный эффект (понижения модуля упругости с увеличением концентрации соли) может оказывать повышение конформационной стабильности молекулы белка, приводящее к уменьшению числа контактов молекулы белка в адсорбционном слое, реализуемых в результате денатурации.

Как нами ранее показано, повышение концентрации NaCl приводит к увеличению конформационной стабильности легуминов (раздел 3.2.1). В таком случае наблюдаемое понижение величины комплексного дилатационного модуля (а также модуля накопления) в условиях эксперимента обусловлено, вероятно, преобладающим вкладом в наблюдаемый эффект не экранирования заряда, а повышения конформационной стабильности молекул легуминов с ростом концентрации соли.

Таким образом, в исследованном диапазоне условий (концентраций белка, частот нагружения, концентраций NaCl) наблюдаются более высокие значения дилатационных характеристик адсорбционных слоев модифицированных белков в сравнении с intactными.

Причина наблюдаемых эффектов заключена в изменении как молекулярных параметров легуминов в результате ограниченного протеолиза, так и их конформационной стабильности.

Понижение молекулярной массы, гидродинамического радиуса и поверхностного заряда белка приводит к снижению энергетического барьера адсорбции и, как следствие – к повышению скорости адсорбции. Понижение свободной энергии адсорбции в сочетании с большей конформационной подвижностью модифицированных белков благоприятствуют, возможно, более совершенной упаковке адсорбционного слоя, обеспечивающей большее число контактов между макромолекулами. Большая поверхностная гидрофобность модифицированных молекул также благоприятна для стабилизации адсорбционного слоя как за счет гидрофобных взаимодействий между макромолекулами и неполярной фазой, так и между макромолекулами внутри слоя.

Таким образом, установлено, что ограниченный протеолиз глицинина и легумина папаином приводит существенному повышению их поверхностной активности, увеличению скорости формирования и вязкоупругих формируемых ими адсорбционных слоев на границе с воздухом.

3.4 Влияние ограниченного протеолиза на функциональные свойства легуминов

3.4.1. Атакуемость ферментами желудочно-кишечного тракта

Запасные белки зернобобовых культур обладают высокой биологической ценностью, т.е. имеют сбалансированный по содержанию незаменимых аминокислот состав (раздел 1.2). Однако, в силу некоторых особенностей молекулярной структуры (компактности и жесткости, обусловленной наличием, в частности, большого числа дисульфидных связей), они довольно устойчивы к действию ферментов желудочно-кишечного тракта. Кроме того, выделение, модификация и переработка белков часто сопровождается понижением их пищевой ценности вследствие уменьшения доступности действию ферментов и, как следствие, перевариваемости в результате таких процессов, как агрегация, рацемизация, образование комплексов с сахарами и др. Соответственно, целью данного этапа исследований являлась сравнительная характеристика атакуемости ферментами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) интактных и модифицированных легуминов.

При выборе условий проведения эксперимента по атакуемости белков ферментами ЖКТ *in vitro* руководствовались принципами, сформулированными в работе [291], обобщающей результаты многих исследований. В частности, использовали двустадийную схему гидролиза, имитирующую процесс переваривания в среде желудка и тонкого кишечника при

последовательном действии пепсина на первой стадии, химотрипсина и трипсина – на второй при физиологических условиях (рН, температура, продолжительности стадий).

Характеристикой атакуемости служили два параметра: 1) скорость гидролиза, определяемая по увеличению во времени количества свободных аминокрупп [293] и по уменьшению количества пептидных связей [273]; 2) степень гидролиза, рассчитанная как процент расщепленных пептидных связей за стандартное время.

На рисунке 3.28 представлена зависимость от времени количества свободного аминного азота, образующегося в процессе гидролиза глицинина/глицинина-П и легумина *V.f.*/легумина *V.f.*-П. Необходимо отметить, что в составе молекул белка свободный аминный азот присутствует в остатках лизина, чем и обусловлено отличное от нуля значение количества аминного азота до начала переваривания (момент времени = 0). На первом этапе гидролиза под действием пепсина в течение 120 минут наблюдается более интенсивное высвобождение аминного азота в процессе гидролиза модифицированных белков по сравнению с интактными. На втором этапе обработки (после 120 мин, трипсин и химотрипсин) скорости атакуемости ферментами белков в пределах ошибки измерения совпадают (рисунок 3.29, таблица 3.7).

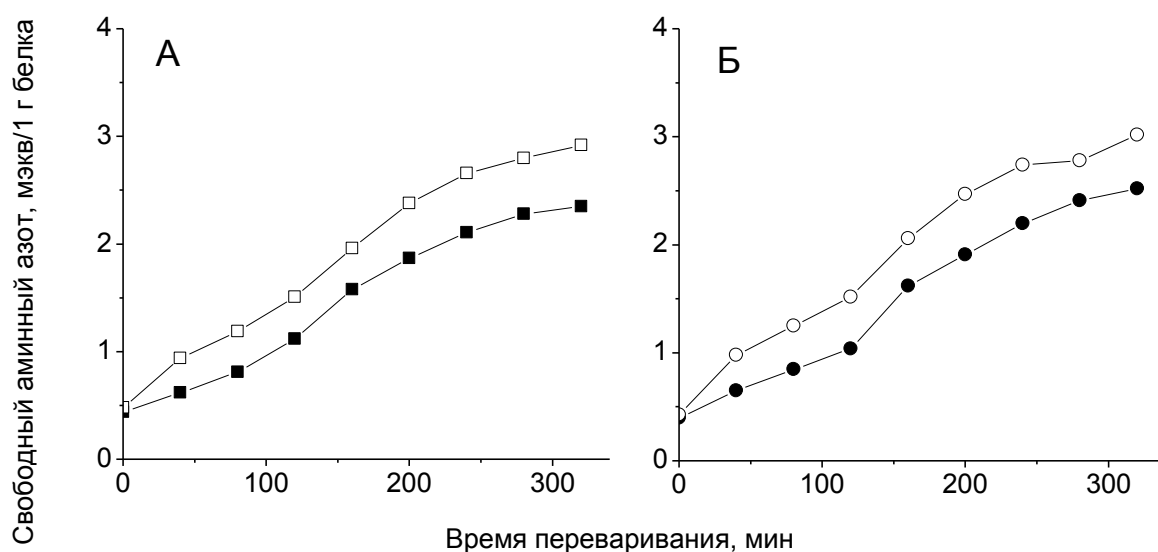


Рисунок 3.28. Кинетические кривые атакуемости интактных (■/●) и модифицированных (□/○) форм глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б) (метод ТНБС: накопление свободного аминного азота [293]). Схема гидролиза: последовательное действие пепсина (до 120 мин, рН 2) и трипсина+химотрипсина (с 120 до 320 мин, рН 7,6); температура 37°C; Е/С = 1/200 для каждого фермента.

На рисунке 3.29 представлены кинетические кривые изменения количества пептидных связей интактных и модифицированных белков в ходе гидролиза по данным микробиуретового метода. Аналогично данным, полученным методом ТНБС, модифицированные белки

проявляют более высокую степень гидролиза как на стадии действия пепсина, так и суммарно по двум стадиям по сравнению с интактными белками.

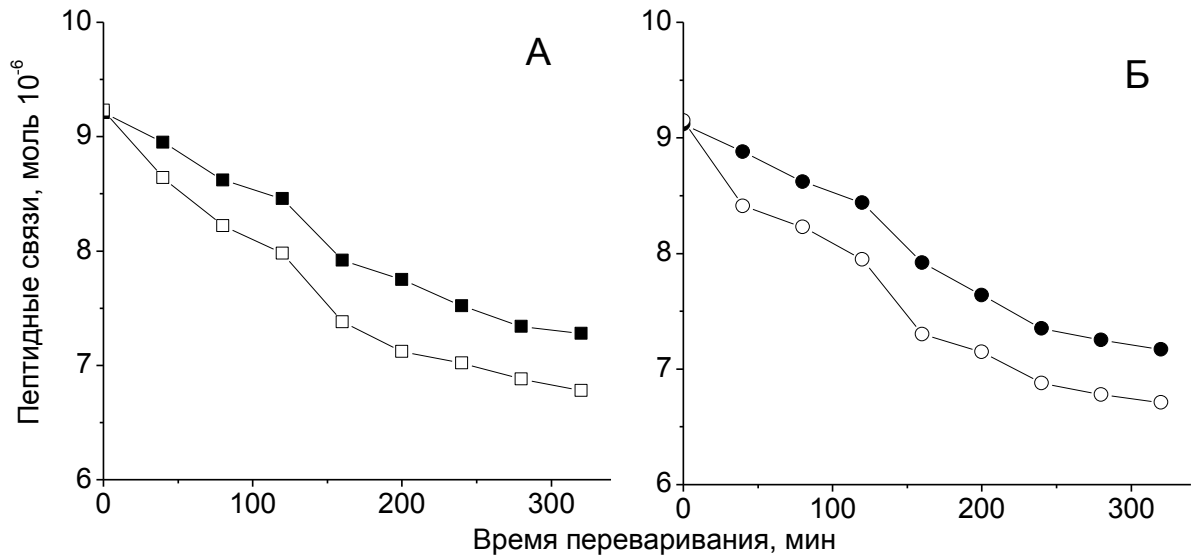


Рисунок 3.29. Кинетические кривые атакуемости интактных (■/●) и модифицированных (□/○) форм глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б) (микробиуретовый метод: уменьшение числа пептидных связей [273]). Схема гидролиза: последовательное действие пепсина (до 120 мин, рН 2) и трипсина+химотрипсина (с 120 до 320 мин, рН 7,6); температура 37°C; E/S = 1/200 для каждого фермента.

Как видно из таблицы 3.7, на первом и втором этапе наблюдается сопоставимая скорость гидролиза интактных белков. Вместе с тем известно, что скорость атакуемости глицинина пепсином при рН 2,0 значительно выше, чем трипсином при рН 8,0 [356]. В существенной степени это объясняется диссоциацией и частичной денатурацией глицинина при рН 2,0, что увеличивает доступность специфических участков молекулы белка протеолитической атаке. Кроме того, действие трипсина ограничивается аминокислотными остатками лизина и аргинина. Однако, при одновременном воздействии двух ферментов (трипсин и химотрипсин) с несколько отличающейся специфичностью, а также в условиях предварительного воздействия пепсина и денатурации легуминов в кислой среде (рН 2,0) происходит нивелирование различий в скорости гидролиза (таблица 3.7).

Таблица 3.7. Скорость и степень гидролиза легуминов ферментами желудочно-кишечного тракта. Стадия 1: действие пепсина, 120 минут; стадия 2: действие трипсина+химотрипсина, с 120 по 320 минуты.

Параметр	Скорость гидролиза, нмоль пептидных связей/мин				Степень гидролиза, %			
	Стадия 1		Стадия 2		Стадия 1		Суммарно по двум стадиям	
Метод	ТНБС	МКБ	ТНБС	МКБ	ТНБС	МКБ	ТНБС	МКБ
Глицинин	5,7	6,3	6,2	5,9	7,8	8,1	21,8	21,0
Глицинин-П	8,6	10,4	7,1	6,0	11,8	13,5	28,0	26,5
Легумин <i>V.f.</i>	5,3	5,7	7,4	6,4	7,3	7,5	24,1	21,4
Легумин <i>V.f.</i> -П	9,1	10,0	7,5	6,2	12,4	13,1	29,5	26,7

Суммарная (по двум этапам) степень гидролиза составляет 21-24 % для интактных белков и 26-30 % для модифицированных (таблица 3.6), что сопоставимо с известными из литературы данными, согласно которым степень гидролиза интактных соевых белков при действии на них индивидуальных ферментов варьирует в интервале от 1 до 25 % [357]. Среди использованных в указанной работе ферментов – пепсин, трипсин, химотрипсин, алькалаза, колораза, флаворзим и другие. Гидролиз проводился, как правило, при физиологических условиях, в некоторых случаях после мягкой предварительной физической модификации.

Таким образом, согласно полученным данным, в условиях, приближенных к физиологическим, молекулы модифицированных легуминов (глицинин-П и легумин *V.f.*-П) подвергаются атаке протеолитическими ферментами желудочно-кишечного тракта человека (пепсин на первом этапе, трипсин и химотрипсин на втором этапе), как правило, с более высокой скоростью, чем молекулы соответствующих интактных легуминов. Различия проявляются в большей степени на этапе действия пепсина. Более высокая атакуемость ферментами ЖКТ модифицированных молекул, вероятно, объясняется отличиями в их структуре: после удаления в результате ограниченного протеолиза С-концевого участка кислых цепей субъединиц легуминов, вероятно, становятся более доступными протеолитическим ферментам некоторые скрытые ранее пептидные связи. Кроме того, более интенсивному гидролизу модифицированных легуминов ферментами ЖКТ способствует их более низкая конформационная стабильность (раздел 3.2).

3.4.2 Пенообразующие свойства

Аналогично образованию поверхности раздела воздух/водный раствор, процесс образования пен включает стадии диффузии белка к поверхности раздела, частичное разворачивание молекул на поверхности, и образование связей (включая гелеобразование) между адсорбированными молекулами [169]. Таким образом, можно ожидать, что положительный эффект модификации легуминов папаином на свойства адсорбционных слоев на поверхности раздела воздух/водный раствор проявится в процессе пенообразования.

Для сравнения пенообразующих свойств исследуемых белков использовали параметр пенообразующей емкости, представляющий собой отношение объема сформированной пены к объему исходного раствора.

На рисунке 3.30 представлены полученные графики зависимости пенообразующей емкости от концентрации белка. Во всем исследуемом диапазоне концентраций модифицированные белки характеризуются бóльшим объемом сформированной пены по сравнению с интактными белками. Различие особенно существенно при концентрациях белков ≥ 1 мг/мл, где пенообразующая емкость модифицированных белков примерно втрое превышает емкость интактных легуминов.

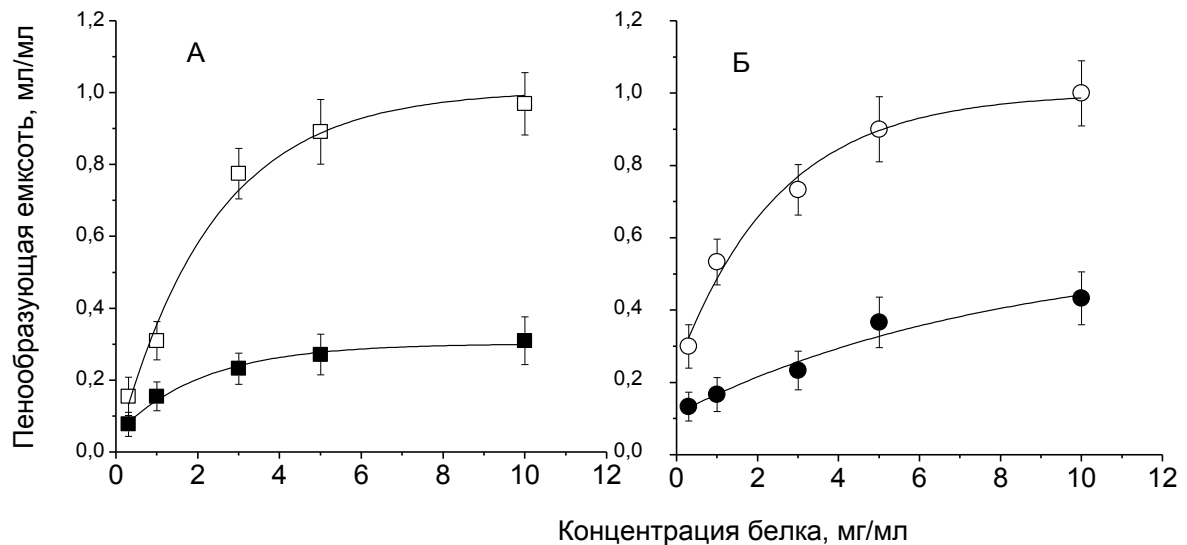


Рисунок 3.30. Зависимость пенообразующей емкости от концентрации интактных (■/●) и модифицированных (□/○) глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б)

Полученные пены различались не только по объему, но и по плотности или среднему размеру пузырьков. На рисунке 3.31 представлено увеличенное изображение пен, полученных из растворов глицинина и глицинина-П. В случае глицинина-П пена более плотная, с большим наблюдаемым размером пузырьков. При тех же условиях глицинин образует менее плотные

пены, при этом средний наблюдаемый размер пузырьков возрастает. Аналогичные различия в морфологии пен наблюдались для легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-П.

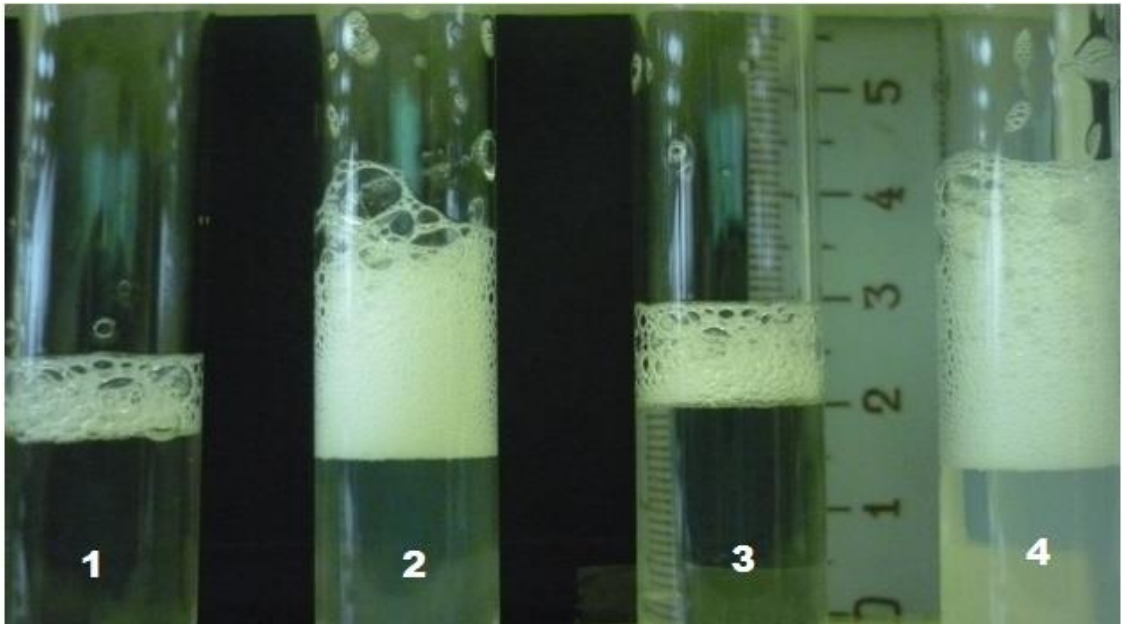


Рисунок 3.31. Пены растворов глицинина (1, 3) и глицинина-П (2, 4). Концентрация белка 3 мг/мл (1, 2), 10 мг/мл (3, 4).

На рисунке 3.32 представлены зависимости высоты столба пены растворов глицинина и глицинина-П (концентрация 10 мг/мл) от времени старения пены. Время полураспада (двукратное сокращение высоты) пены, образованной интактным глицинином составляет 30 часов, глицинина-П – 72 часа. Времена полураспада пены легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-П составили 40 часов и 96 часов, соответственно.

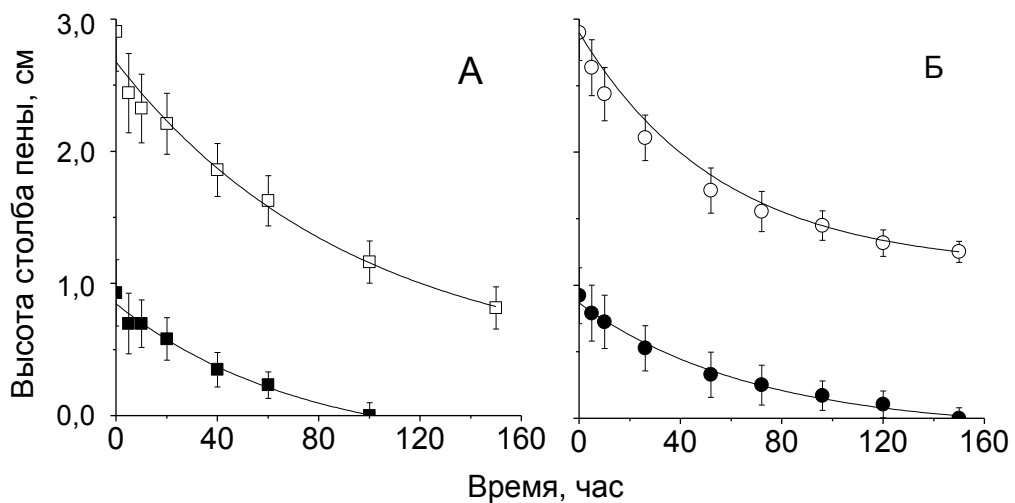


Рисунок 3.32. Стабильность пен растворов интактных (■/●) и модифицированных (□/○) глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б)

На рисунке 3.33 представлены образцы пен, изображенные на рисунке 3.31, после 40 часов хранения при температуре 25°C. Можно отметить, что процесс старения пен сопровождается эффектом диспропорционирования, т.е. наблюдается диффузия воздуха из малых пузырьков пены в большие.

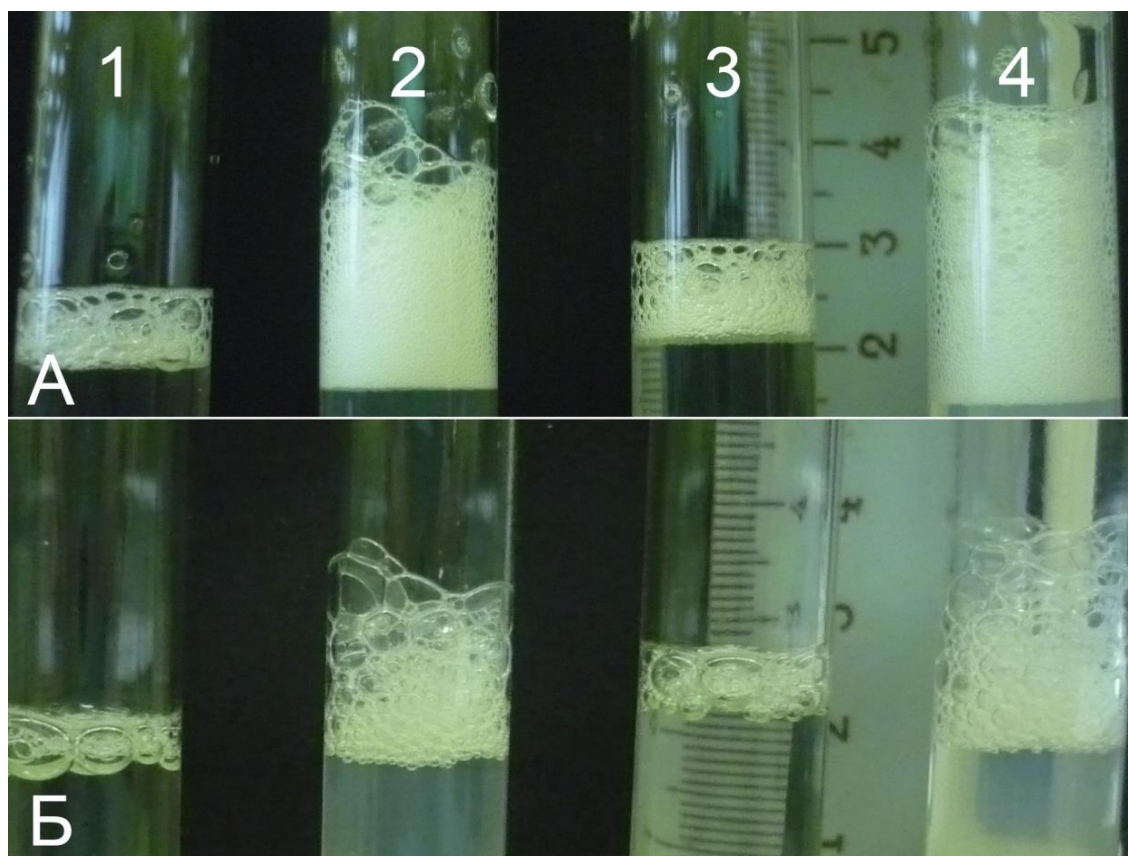


Рисунок 3.33. Пены растворов глицинина (1 – концентрация 3 мг/мл, 3 – концентрация 10 мг/мл) и глицинина-II (2- концентрация 3 мг/мл, 4 – концентрация 10 мг/мл). Фото снято через 40 часов после образования пен.

Таким образом, модификация легуминов ограниченным протеолизом папаином приводит к существенному повышению их пенообразующей емкости при более высокой дисперсности и плотности пен, а также к двукратному повышению стабильности образуемых ими пен по сравнению с интактными легуминами.

Улучшение пенообразующих свойств модифицированных белков обусловлено изменением их молекулярных параметров. Понижение молекулярной массы и гидродинамического размера приводит к повышению скорости диффузии молекул к поверхности раздела. Известно, что увеличение пенообразующей способности глицинина в

результате ограниченного протеолиза коррелирует с повышением скорости диффузии молекул к поверхности раздела фаз [153]. Уменьшение конформационной стабильности модифицированных молекул в сочетании с понижением термодинамического сродства к растворителю приводит к повышению поверхностной активности глицинина-П и легумина *V.f.*-П в сравнении с интактными белками. В свою очередь, ограниченный протеолиз легуминов сопровождается повышением дилатационных свойств адсорбционных слоев на границе с воздухом. Все приведенные факторы способствуют повышению пенообразующей способности и стабильности пен модифицированных легуминов в сравнении с интактными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Запасные белки семян зернобобовых культур, в частности их 11S фракция – легумины, являются ценным источником пищевого белка, однако не находят широкого применения в этом качестве ввиду недостаточно высоких функциональных свойств, обусловленных особенностями молекулярной структуры, таким как компактность, высокая конформационная стабильность, низкая поверхностная гидрофобность. Эффективным и достаточно мягким способом модификации структуры легуминов является ограниченный протеолиз, основанный на избирательном действии протеаз на слабоструктурированные и расположенные на поверхности глобулы С-концевые фрагменты α -цепей.

В данной работе предпринято систематическое исследование влияния ограниченного протеолиза папаином на структурные, термодинамические и гидродинамические характеристики двух практически значимых легуминов – легумина соевых бобов *Glycine max* и легумина кормовых бобов *Vicia faba*. В работе получали и использовали свежевыделенные препараты интактных и модифицированных ограниченным протеолизом легуминов и широкий набор физико-химических методов исследования.

Практическое использование метода ограниченного протеолиза для целенаправленной модификации структуры легуминов возможно лишь при установлении связи между изменением структуры белков в результате ограниченного протеолиза и изменением их физико-химических и функциональных свойств. В настоящей работе исследованы такие ключевые для регулирования функциональных свойств белков физико-химические свойства, как конформационная стабильность и адсорбционное поведение на границе воздух/раствор (поверхностная активность, динамика формирования и дилатометрические свойства адсорбционных слоев). Установлена причинно-следственная связь между изменением молекулярных характеристик легуминов, указанных физико-химических и некоторых функциональных свойств (атакуемость ферментами ЖКТ и пенообразующая способность).

Установлено, что в результате ограниченного протеолиза папаином происходит понижение молекулярной массы глицинина и легумина *V.f.*, их гидродинамического размера, радиуса инерции, степени асимметрии и проницаемости молекул легуминов для растворителя.

Удаление части гидрофильных остатков с поверхности в процессе модификации приводит к понижению поверхностного заряда и дополнительному экспонированию к растворителю некоторых гидрофобных (ароматических) аминокислотных остатков. В результате как интактные, так и модифицированные белки в растворе характеризуются положительными значениями вторых вириальных коэффициентов, то есть взаимодействия молекул белка и

растворителя остаются термодинамически предпочтительными, однако термодинамическое сродство молекул модифицированных форм белков к растворителю снижается.

Ограниченный протеолиз сопровождается понижением термодинамических параметров денатурации обоих легуминов при увеличении значения параметра кооперативности перехода. Это свидетельствует об уменьшении конформационной стабильности легуминов и понижении уровня кооперативности процесса их термической денатурации. Предварительные результаты деконволюции кривых избыточной теплоемкости как интактных, так и модифицированных легуминов показали, что процесс денатурации имеет сложный характер и включает низкотемпературный переход, соответствующий стадии диссоциации четвертичной структуры, и 2 последующих перехода, соответствующих денатурации α - и β -доменов. Параметры термической денатурации модифицированных белков имеют более низкие значения. Следовательно, ограниченный протеолиз легуминов папаином протекает с сохранением четвертичной и третичной структуры легуминов, однако при этом происходит дестабилизация (ослабление) как четвертичной, так и третичной структуры легуминов.

Ограниченный протеолиз вызывает существенные изменения в адсорбционном поведении легуминов, а именно, повышает скорость формирования адсорбционных слоев на границе воздух/раствор, повышает поверхностную активность, понижает критическую концентрацию формирования адсорбционного слоя, а также увеличивает упругость адсорбционных слоев. Динамические кривые адсорбции имеют типичный сигмоидальный характер. Повышение скорости адсорбции модифицированных легуминов в сравнении с интактными проявляется в сокращении индукционного периода и обусловлено повышением скорости диффузии при снижении молекулярной массы, гидродинамического размера, степени асимметрии и увеличении компактности молекул. В постиндукционный период фактором, определяющим более высокую скорость адсорбции молекул модифицированного белка, является более низкий активационный барьер адсорбции. Он, в свою очередь, обусловлен более низкой конформационной стабильностью, более низким поверхностным зарядом и меньшим размером молекул.

Изотермы адсорбции демонстрируют более высокие предельные значения поверхностного давления квазиравновесных адсорбционных слоев модифицированных легуминов в сравнении с интактными. Это является следствием повышения термодинамического сродства модифицированных легуминов к неполярной фазе, а также друг к другу внутри адсорбционного слоя. Проявлением этого является понижение величины второго вириального коэффициента модифицированных белков в сравнении с интактными, а также характерные изменения эмиссионных спектров флюоресценции (понижении интенсивности и красный сдвиг

максимума). Понижение молекулярной массы и размера молекул белка также благоприятно сказывается на поверхностной активности, так как сопровождается понижением свободной энергии адсорбции. Более низкие критические концентрации формирования насыщенного адсорбционного слоя модифицированных легуминов, вероятно, обусловлены способностью последних реализовать большее число контактов за счет большей молекулярной подвижности в сочетании с меньшим размером.

Ограниченный протеолиз папаином в использованных условиях не вызывает изменения «упругого» реологического типа поведения адсорбционных слоев легуминов, для которого характерно значительное преобладание упругой составляющей комплексного модуля над вязкостной и ее слабая частотная зависимость. Однако наблюдается повышение комплексного модуля вязкоупругости адсорбционных слоев модифицированных легуминов по сравнению с интактными при одинаковых условиях (концентрациях, составе растворителя и др.). Наблюдаемый эффект в первую очередь связан с понижением конформационной стабильности легуминов в процессе модификации. Качественно аналогичный эффект наблюдается при уменьшении стабильности легуминов за счет понижения концентрации соли в растворе.

Как следствие понижения конформационной стабильности легуминов, повышения их поверхностной активности и упругости адсорбционных слоев, ограниченный протеолиз легуминов папаином сопровождается значительным повышением их пенообразующей способности. Так пенообразующая емкость возрастает в ~ 3 раза, а стабильность пен в ~ 2 раза.

Установлено повышение атакуемости легуминов ферментами ЖКТ в результате ограниченного протеолиза папаином, которое является следствием, по-видимому, повышения доступности дополнительного числа пептидных связей протеолитической атаке. Наблюдаемый эффект способствует повышению биологической ценности легуминов.

В настоящей работе акцент сделан на общих закономерностях в изменении структуры и свойств исследованных легуминов. Показано, что ограниченный протеолиз папаином при низкой степени гидролиза вызывает изменения молекулярных параметров легуминов, приводящее к существенным изменениям их физико-химических свойств, и, как следствие, – функциональных свойств. Однако несомненный интерес представляет и изучение особенностей поведения различных глобулинов, а также – действие ферментов различного происхождения, в том числе иммобилизованных.

В настоящее время работа продолжена в направлении исследования адсорбционного поведения интактных и модифицированных ограниченным протеолизом папаином легуминов на границе масло/раствор в сопоставлении с их эмульгирующими и стабилизирующими свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Отщепление слабоструктурированных С-концевых фрагментов α -цепей приводит к понижению молекулярной массы, гидродинамического размера, радиуса инерции, степени асимметрии и проницаемости молекул легуминов для растворителя.

2. Удаление в результате протеолиза части гидрофильных слабоупорядоченных фрагментов приводит к понижению термодинамического сродства (второго вириального коэффициента) молекул легуминов к воде, понижению поверхностного заряда и увеличению доступной для растворителя гидрофобной поверхности за счет экспонирования дополнительного числа остатков ароматических аминокислот.

3. Ограниченный протеолиз приводит к понижению конформационной стабильности (свободной энергии денатурации Гиббса) молекул легуминов и уровня кооперативности процесса их термической денатурации; процесс денатурации как интактных, так и модифицированных легуминов имеет многостадийный характер, включающий стадию диссоциации молекулы на субъединицы и последовательное плавление двух энергетически неэквивалентных доменов; процесс ограниченного протеолиза не вызывает потерю четвертичной и третичной структуры легуминов, а проявляется лишь в понижении их стабильности.

4. Повышение скорости диффузии модифицированных молекул в результате уменьшения молекулярной массы и гидродинамического размера, а также понижение энергетического барьера адсорбции за счет снижения конформационной стабильности и уменьшение поверхностного заряда вызывают повышение скорости формирования адсорбционных слоев легуминов на границе воздух/раствор.

5. Повышение поверхностной активности легуминов (понижение свободной энергии адсорбции) и понижение критической концентрации формирования насыщенного адсорбционного слоя являются результатом понижения их термодинамического сродства к растворителю, понижения конформационной стабильности, а также уменьшения молекулярной массы и гидродинамического размера молекул легуминов.

6. Превалирующий вклад в повышение комплексного дилатационного модуля вязкоупругости адсорбционных слоев модифицированных легуминов вносит фактор дестабилизации конформации молекул белка, при этом типичный для глобулярных белков упругий характер реологического поведения адсорбционных слоев сохраняется.

7. Ограниченный протеолиз приводит к повышению атакуемости глицинина и легумина *V.f.* ферментами желудочно-кишечного тракта *in vitro*.

8. Повышение пенообразующей способности и стабильности пен, образуемых модифицированными ограниченным протеолизом легуминами, является следствием изменения их адсорбционного поведения на границе воздух/раствор (повышения скорости

формирования адсорбционных слоев, увеличением поверхностной активности и увеличением дилатационного модуля упругости адсорбционных слоев).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;

Глицинин-П – модифицированный глицинин;

ГФ – гель-фильтрация;

ГЭ – гель-электрофорез;

ВЧ-ДСК – высокочувствительная дифференциальная сканирующая микрокалориметрия;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДСН – додецилсульфат натрия;

ДСН-ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле с ионным детергентом (додецил сульфатом натрия);

ДСР – динамическое светорассеяние;

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;

КФ – код фермента;

Легумин *V.f.* – легумин кормовых бобов *Vicia faba*;

Легумин *V.f.*-П – модифицированный легумин *Vicia faba*;

МРР – малоугловое рентгеновское рассеяние;

МЭ – меркаптоэтанол;

СС – скоростная седиментация;

СРС – статическое светорассеяние;

ТНБС – тринитробензолсульфо кислота;

ФАО – продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (FAO, Food and Agriculture Organization);

ЯМР – ядерный магнитный резонанс;

Е/S– фермент/субстратное отношение г/г (Enzyme/Substrate);

IgE – иммуноглобулин E;

IgG – иммуноглобулин G;

PDCAAS – аминокислотный коэффициент усвояемости белков (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score);

A – площадь поверхности пузырька;

A_0 – амплитуда площади поверхности пузырька;

B – второй вириальный коэффициент;

C – третий вириальный коэффициент;

c_p – избыточная парциальная удельная теплоемкость;

- $\Delta_d c_p$ – инкремент теплоемкости денатурации;
- c_p^* – максимальное значение кривой избыточной парциальной теплоемкости;
- c – концентрация белка;
- c_2 – концентрация растворенного вещества;
- D_λ – оптическая плотность;
- D – коэффициент трансляционной диффузии;
- $D_{20^\circ, \text{вода}}^0$ – константа трансляционной диффузии;
- D_{500} – оптическая плотность при 500 нм;
- dn/dc – инкремент показателя преломления белка;
- E – комплексный дилатационный модуль вязкоупругости;
- E' – реальная часть дилатационного модуля (модуль накопления);
- E'' – мнимая часть дилатационного модуля (модуль потерь);
- F_1^0 – мольная свободная энергия чистого растворителя;
- f/f_{\min} – фрикционное отношение;
- $f(K_A)$ – функция Генри;
- ΔG_d – свободная энергия денатурации Гиббса;
- g – ускорение силы тяжести;
- ΔH_d^{cal} – калориметрическая молярная энтальпия денатурации;
- $\Delta H_d^{\text{v.H.}}$ – эффективная (вант-гоффовская) энтальпия денатурации;
- Δh_d^{cal} – калориметрическая удельная энтальпия денатурации;
- I – интенсивность рассеянного света;
- K – оптическая постоянная;
- k – константа Больцмана;
- k_p – коэффициент скорости пенетрации;
- k_{diff} – коэффициент скорости диффузии;
- l – оптическая длина пути;
- M_w – средневесовая молекулярная масса белка;
- $M_{S,D}$ – седиментационно-диффузионная средняя молекулярная масса белка;
- M_n – среднечисленная молекулярная масса белка;
- M^* – молекулярная масса белка до гидролиза;
- $M(t)$ – молекулярная масса белка при времени гидролиза t ;
- M_2 – молекулярная масса растворенного вещества;
- m_3 – моляльная концентрация белка;
- N_A – число Авогадро;

n_D – показатель преломления белка при длине волны 589,3 нм;

n_0 – показатель преломления растворителя;

$P(\theta)$ – фактор, учитывающий угловую зависимость интенсивности рассеяния;

P^* – весовая концентрация белка до гидролиза;

$P(t)$ – весовая концентрация белка при различных временах гидролиза;

ΔP – давление Лапласа;

R – универсальная газовая постоянная;

R_1 и R_2 – основные радиусы кривизны капли;

R_{\min} – радиус гладкой негидратированной сферы ;

R_h – эффективный гидродинамический радиус;

R_g – радиус инерции;

R_s – радиус Стокса;

$R_{X,Y}$ – коэффициент корреляции Пирсона;

R_θ – отношение Рэлея;

r – радиус кривизны капли в наивысшей точке;

S – модуль дифракционного вектора;

ΔS_d – энтропия денатурации;

s – коэффициент седиментации;

$s^{20^\circ, \text{ вода}}$ – приведенный коэффициент седиментации;

T – абсолютная температура;

T_d – температура денатурации;

ΔT – параметр кооперативности термической денатурации;

t – время;

U_E – электрофоретическая подвижность молекулы;

v_1^0 – парциальный удельный объем растворителя;

v_2 – парциальный удельный объем белка;

x, y, z – декартовы координаты;

Z – заряд белка;

ε – диэлектрическая постоянная среды;

ε_{280} – коэффициент экстинкции белка (мольный ε_{280}^{1mM} и удельный $\varepsilon_{280}^{1\%}$) при длине волны 280 нм;

ζ – ζ -потенциал;

η – динамическая вязкость среды;

θ – половина угла рентгеновского рассеяния;

λ – длина волны рентгеновского излучения;

λ_0 – длина волны лазера в динамическом и статическом светорассеянии;

μ_1 – химический потенциал растворителя;

π – поверхностное давление;

π_t – поверхностное давление в момент времени t ;

ρ_B – структурный фактор по Бурхарду;

ρ – плотность раствора;

σ^0 – поверхностное натяжение растворителя;

σ – поверхностное натяжение раствора;

σ_a – амплитуда поверхностного натяжения;

φ – фазовый угол;

ω – угловая частота дилатационного нагружения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ehrlich P.R., Ehrlich A.H. Population, Resources, and the Faith-Based Economy: the Situation in 2016 // *Biophys Econ Resour Qual* – 2016. – V. 1: 3.
2. International Food Policy Research Institute. 2016. Global Nutrition Report 2016: From Promise to Impact: Ending Malnutrition by 2030: Summary. Washington, D.C.: International Food Policy Research Institute (IFPRI).
3. UN Report. World population projected to reach 9.7 billion by 2050 // 29 July 2015, New York.
4. Мулина Н.А., Евстигнеева Н.И. Юрков Е.А. Проблема недостаточного статуса питания и подходы к ее решению // *Хранение и переработка сельхозсырья*. – 2006. – № 6. – С. 71-72.
5. Покровский А. А. Роль биохимии в развитии науки о питании. / Покровский А. А. – М.: Наука, 1974. – 127 с.
6. Смолянский Б.Л. Терминологическая трактовка и классификация алиментарных заболеваний // *Вопросы питания*. – 1989. – №5. – с. 25-28.
7. Архангельский В.И. Питание и здоровье человека / В кн: Гигиена с основами экологии человека (ред. П.И. Мельниченко) – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 752 с.
8. Распоряжение Правительства РФ «Основы государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года», утвержденные распоряжением Правительства Российской Федерации от 25 октября 2010 г. № 1873-р
9. Нечаев А. П. Пищевая химия ч. 2 / Нечаев А. П., Попов М. П., Траубенберг С. Е. – М.: ИК МГУПП, 1998. – 288 с.
10. Павлоцкая Л. Ф. Физиология питания. / Павлоцкая Л. Ф., Дуденко Н. В., Эйдельман М. М. – М.: Высшая школа, 1989. – 368 с.
11. Толстогузов В. Б. Искусственные продукты питания. Новый путь получения пищи и его перспективы. Научные основы производства / Толстогузов В. Б. – М.: Наука, 1978. – 232 с.
12. Злочевский А.Л., Заверюха А.Х., Масленникова О.А. Продовольственная безопасность: различные аспекты // *Пищевая промышленность*. – 2002. – № 2. – С. 10-12.
13. Damodaran S. Amino acids, peptides and proteins / In: *Food Chemistry* (Ed. Fennema, R.O.) – CRC Press, New York, 1996. – P. 321-416.
14. Aiking H. Future protein supply // *Trends in Food Science & Technology* – 2011. – V. 22. – P. 112-120.
15. Толстогузов В.Б. Экономика новых форм производства пищевых продуктов / Толстогузов В.Б. – М.: Экономика. 1986 – 176 с.

16. Altschul A. M. *New Protein Foods: Seed Storage Proteins* / Altschul A. M., Wilche H. L. – Academic Press, 1985. – 496 p.
17. Hudson B. J. F. *New and Developing Sources of Food Proteins* / Hudson B. J. F. – Springer Science & Business Media, 1994. – 369 p.
18. Дуйяр Р. Биохимические и физико-химические свойства белков листьев / В кн: *Растительный белок* (ред. Т.П. Микулович) – М.: Агропромиздат, 1991. – С. 233-266.
19. Яковлев Н.И. *Источники пищевого белка* / Яковлев Н.И. – М.: Колос, 1979. – 302 с.
20. Шванская И. А. *Использование отходов перерабатывающих отраслей в животноводстве: науч. аналит. обзор.* / Шванская И. А., Коноваленко Л. Ю. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2011. – 96 с.
21. Kim C.S., Kamiya S., Sato T., Utsumi S., Kito M. Improvement of nutritional value and functional properties of soybean glycinin by protein engineering // *Protein Eng.* – 1990. – V. 3(8). – P. 725-731.
22. Tandang M. R., Atsuta N., Maruyama N., Adachi M., Utsumi S. J. Evaluation of the solubility and emulsifying property of soybean proglycinin and rapeseed procruciferin in relation to structure modified by protein engineering // *Agric Food Chem* – 2005. – V. 53 (22). – P. 8736-8744.
23. Федеральный закон от 05.07.1996 N 86 ФЗ (ред. от 19.07.2011) “О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности”
24. Робертсон Э. *Пищевые продукты, питание и здоровье в Российской Федерации* // *Вопросы питания.* – 2000. – Т.69. № 3. – С. 38-42.
25. Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources: a review // *J. Agric. Food Chem.* – 1996. – V. 44. – P. 6-29.
26. Black M. *Seed Technology and its Biological Basis* // Ed. Black M., Bewley J. D. – Sheffield Academic Press, UK and CRC Press, Florida, 2000. – 419 p.
27. Holzhauser T., Wackermann O., Ballmer-Weber B. K., Bindslev-Jensen C., Scibilia J., Perono-Garoffo L. Soybean (*Glycine max*) allergy in Europe: Gly m 5 (beta-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy // *J. Allergy Clin Immunol* – 2009. – V. 123. – P. 452–458.
28. Shutov A. D., Vaintraub I. A. Degradation of storage proteins in germinating seeds // *Phytochemistry* – 1987. – V. 26 (6). – P. 1557-1566.
29. Kamata Y., Shibasaki K. Degradation Sequence of Glycinin by Tryptic Hydrolysis // *Agric Biol Chem* – 1978. – V. 42 (11) – P. 2103-2109.
30. Kamata Y., Shibasaki K. Formation of Digestion Intermediate of Glycinin // *Agric Biol Chem* – 1978. – V. 42 (12) – P. 2323-2329.

31. До Н. Л., Шутов А.Д., Вайнтрауб И.А. Действие трипсина на легумин вики: смена типов протеолиза // Биохимия – 1985. – № 50. – P. 628-633.
32. Barać M. B., Stanojević S. P., Jovanović S. T., Pešić M. B. Soy protein modification – a review // APTEFF. – 2004. – V. 35. – P. 1-280.
33. Meinschmidt P., Sussmann D., Schweiggert-Weisz U., Eisner P. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties // Food Sci. Nutr. – 2015. – V. 4 (1) – P. 11-23.
34. Schwenke K. D., Staatz A., Mothes R., Seifert A., Dautzenberg H. Physico-chemical characterization of legumin-T from faba bean (*Vicia faba* L) // Int. J. Pept. Protein Res. – 1996. – V. 47 (4). – P. 254-259.
35. Shutov A. D., Pineda J., Senyuk V. I., Reva V. A., Vaintraub I. A. Action of trypsin on glycinin. Mixed-type proteolysis and its kinetics; molecular mass of glycinin-T. // Eur. J. Biochem. – 1991. – V. 199. – P. 539-543.
36. Shutov A. D., Senyuk V. I., Kakhovskaya I. A., Pineda J. High molecular mass products of hydrolysis of soybean glycinin by trypsin. // Biokhimiya. – 1993. – V. 58. – P. 174-182.
37. Gueguen J., Barbot J. Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisum sativum* L.) protein composition // J Food Agric – 1988. – V. 42. – P. 209-224.
38. Pate J.S. Pea. // In: Crop Physiology (ed: Evans L.T.) – Cambridge University Press, Cambridge. – 1975. – P. 191-224.
39. Osborne T.B. The vegetable protein // Longmans, Green & Co, London, 1924. – 154 p.
40. Shuster-Gajzago I. Nutritional aspects of legumes // In: Cultivated plants, primarily as food sources (Ed. Fuleky G.) – Eolss Publishers Company Limited, 2009. – V.1.
41. Utsumi S., Matsumura Y., Mori T. Structure-function relationships of soy proteins // In: Food Proteins and Their Applications (Eds. Damodaran S., Paraf A.) – Marcel Dekker, New York, 1997. – P. 257–291.
42. Müntz K., Horstmann C., Schlesier B. *Vicia* globulins // In: Seed Proteins. (Eds. P.R. Shewry, Casey R.) – Boston, Kluwer Academic Publishers, 1999. – P. 259-284.
43. Nielsen N. C., Bassuner R., Beaman T. The Biochemistry and Cell Biology of Embryo Storage Proteins // In: Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development (Eds: Larkins B. A., Vasil I. K.) – Springer Science & Business Media, 1997. – V. 5. – P. 151-220.
44. Забалуева Ю.Ю., Колесникова Н.В., Голова Е.А. Инновационные технологии сосисок из мяса рыбы // Пищевая промышленность. – 2009. – № 5. – С. 10-11.

45. Павловская Н.Е. Белковый комплекс зернобобовых культур и пути повышения его качества / Павловская Н.Е., Шумилин П.И., Задорин А.Д., Правдюк З.А., Шалимова О.А. – ОрелГАУ, 2003. – 216 с.
46. Арора С. К. Химия и биохимия бобовых растений / Ред. Арора С.К. – М.: Агропромиздат, 1986. – 336 с.
47. Павловская Н.Е. Биохимия фасоли / Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Мирошникова М.П. – ОрелГАУ, 2008 – 128 с.
48. Иванов Н.И. Биохимия культурных растений, том 2. / Иванов Н.И. – Сельхозгиз, 1938
49. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. Методические рекомендации МР 2.3.1.2432 -08
50. Codex Alimentarius Commission Document Alinorm 89/30, Working Group's Report of the Fifth Session of CCVP on Protein Quality Measurement. – FAO: Rome, WHO: Geneva, 1989
51. Hoogenkamp H. W. Soy protein and formulated meat products. / Hoogenkamp H. W. – Cambridge, MA, 2005 – 285 p.
52. Liener I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. // Crit Rev Food Sci Nutr. – 1994. – V. 34 (1). – P. 31-67.
53. Kroll J., Rawel H. M., Rohn S., Czajka D. Interactions of glycinin with plant phenols – influence on chemical properties and proteolytic degradation of the proteins // Nahrung. – 2001. – V. 45(6). – P. 388-389.
54. Galli S. J., Tsai M., Piliponsky A. M. The development of allergic inflammation // Nature – 2008. – V. 454. – P. 445–454.
55. Amnuaycheewa P., de Mejia E. G. Purification, characterisation, and quantification of the soy allergen profilin (Gly m 3) in soy products // Food Chem. – 2010. – V. 119. – P. 1671-1680.
56. Shriver S. K., Yang W. W. Thermal and nonthermal methods for food allergen control // Food Eng. Rev. – 2011. – V. 3. – P. 26–43.
57. Sathe S. K., Teuber S. S., Roux K. H. Effects of food processing on the stability of food allergens // Biotechnol. Adv. – 2005. – V. 23. – P. 423 – 429.
58. Yang W., Gonzalez E., Zheng H., Lee Y. Soybean Allergens: Presence, Detection and Methods for Mitigation // In: Soybean and Health (ed. H. El-Shemy) – Rijeka, Croatia: InTech, 2011. – p. 433-464.
59. Sathe S. K., Kshirsagar H. H., Roux K. H. Advances in Seed Protein Research: A Perspective on Seed Allergens // J. Food Sci – 2005. – V. 70. – P. 93-120.

60. L'Hocine L., Boye J. I., Jouve S. Ionic strength and pH-induced changes in the immunoreactivity of purified soybean glycinin and its relation to protein molecular structure // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – V. 55(14). – P. 5819-5826.
61. Demonte A., Carlos I. Z., Lourenço E. J., Dutra de Oliveira J. E. Effect of pH and temperature on the immunogenicity of glycinin (*Glycine max* L.) // *Plant Foods Hum. Nutr.* – 1997. – V.50 (1). – P. 63-69.
62. Verhoeckx K. C. M., Vissers Y. M., Baumert J. L., Faludi R., Feys M., Flanagan S. Food processing and allergenicity // *Food Chem. Toxicol.* – 2015. – V. 80. – P. 223–240.
63. Plumb G. W., Mills E. N. C., Tatton M. J., Dursel C. C. M., Lambert N., Morgan M. R. A. Effect of thermal and proteolytic processing on Glycinin, the 11s Globulin of soy (*Glycine-Max*) - a study utilizing monoclonal and polyclonal antibodies // *J. Agric. Food Chem.* – 1994. – V.42 (3) – P. 834-840.
64. Lee H.-W., Keum E.-H., Lee S.-J., Sung D.-E., Chung D.-H., Lee S.-I., Oh S. Allergenicity of Proteolytic Hydrolysates of the Soybean 11S Globulin // *J. Food Sci.* – 2007. – V. 72 (3) – P. 168–172.
65. Zhao Y., Qin G. X., Sun Z. W., Zhang B., Wang T. Stability and immunoreactivity of glycinin and β -conglycinin to hydrolysis in vitro // *Food Agric. Immunol.* – 2010. – V. 21 (3) – P. 253 – 263.
66. Bodwell C. E. Application of animal data to human protein nutrition: A Review // *Cereal Chem.* – 1977. – V. 54. – P. 958-984.
67. Keil B. Specificity of proteolysis / Keil B. – Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-NewYork, 1992. – 335 p.
68. Olsen J. V., Ong S. E., Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues // *Mol. Cell Proteomics.* – 2004. – V. 3 (6). – P. 608-614.
69. Fukushima D. Internal structure of 7S and 11S globulin molecules in soybean proteins // *Cereal. Chem.* – 1968. – V. 45. – P. 203-224.
70. Fukushima D. Recent progress of soybean protein food chemistry, Tecnology and nutrition // *Food Rev. Int.* – 1991. – V. 7. – P. 323-351.
71. Zhao Y., Qin G. , Sun Z., Zhang X., Bao N., Wang T., Zhang B., Zhang B., Zhu D., Sun L. Disappearance of immunoreactive glycinin and beta-conglycinin in the digestive tract of piglets // *Arch. Anim. Nutr.* – 2008. – V. 62 (4). – P. 322-330.
72. Astwood J. D., Leach J. N., Fuchs R. L. Stability of food allergens to digestion in vitro // *Nat. Biotechnol.* – 1996. – V. 14 (10). – P. 1269-1273.

73. Gall M. L., Guéguen J., Séve B., Quillien L. Effects of grinding and thermal treatments on hydrolysis susceptibility of pea proteins (*Pisum sativum* L.) // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – V. 53(8). – P. 3057-3064.
74. Kamata Y., Okubo K., Shibasaki K. Decrease of the Soybean Glycinin Digestibility in Excess Denaturation; Effect of Refolding // *Agric. Biol. Chem.* – 1979. – V. 43 (6). – 1219-1223.
75. Новиков Н.Н. Физиология и биохимия формирования качества урожая с/х культур // В кн.: Физиология и биохимия с/х растений. – М., КолосС. – 2005. – с. 578-632.
76. Минсельхоз России: в стране собрано более 12 млн. тонн масличных культур // официальный интернет-портал Министерства Сельского Хозяйства Российской Федерации (9.10.2015, <http://www.mcx.ru/news/news/show/45099.355.htm>)
77. Динамика, география и структура выращивания зернобобовых культур в Российской Федерации (с уточнениями по нуту и чечевице) // официальный интернет-портал Министерства Сельского Хозяйства Российской Федерации (10.09.2015, <http://www.mcx.ru/news/news/show/43118.78.htm>)
78. Multari S., Stewart D., Russell W. R. Potential of Fava Bean as Future Protein Supply to Partially Replace Meat Intake in the Human Diet // *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety* – 2015. – V.14. – P.511-522.
79. Linderstrom-Lang K. U., Schellman J. A. Protein Structure and enzyme activity // In: *Enzymes*, 2nd ed. (ed: Boyer P. D., Hardy H., Myrback K) – Academic press, New York, 1959. – P. 443-510.
80. Kessel A. Introduction to Proteins: Structure, Function, and Motion / Kessel A., Ben-Tal N. – CRC-Press, 2010. – 654 p.
81. Chiang Y. S., Gelfand T. I., Kister A. E., Gelfand I. M. New classification of supersecondary structures of sandwich-like proteins uncovers strict patterns of strand assemblage// *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* – 2007. – V. 68 (4). – P. 915–921.
82. Peng I. C., Quass D. W, Dayton W. R., Allen C. E. The Physicochemical and Functional Properties of Soybean 11S Globulin – A Review // *Cereal.Chem.* – 1984. – V. 61. – P. 480-490.
83. El-Shemya H., Abdel-Rahim E., Shaban O., Ragab A., Carnovale E., Fujita K. Comparison of nutritional and antinutritional factors in soybean and fababean seeds with or without cortex // *Soil Sci. Plant Nutr.* – 2000. – V. 46 (2). – P. 515-574.
84. Вайнтрауб И. А. Четвертичная структура запасных белков семян бобовых // В кн.: Растительные белки и их биосинтез. (Ред: Кретович В.Л.) – М. Наука, 1975. – С. 142-152.
85. Derbyshire E., Wright D., Boulter D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds // *Phytochemistry* – 1976. – V. 15. – P. 3-24.

86. Boulter D., Croy R. R. D. The structure and biosynthesis of legumine seed storage proteins: A biological solution to the storage of nitrogen in seeds // *Adv. Botan. Res.* – 1997. – V. 27. – P. 1-92.
87. Takagi S., Okamoto N., Akashi M., Yasumatsu K. Hydrophobic Bonding and SS Bonding in Heat Denaturation of 11S of Soybean Protein Heat Denaturation of Soybean Protein // *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* – 1979. - V. 26 (3) – P. 139-144.
88. Koshiyama I. Purification and physico-chemical properties of 11S globulin in soybean seeds // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1972. – V. 4 (3). – P. 167-176.
89. Koshiyama I. Storage proteins of soybean // *In Seed Proteins Biochemistry, Genetics, Nutritive Value* (Eds: Gottschalk W., Miller H. P.) - Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publisher: The Hague, 1983. – P. 427 – 450.
90. Scholz G., Richter J., Manteuffel R. Studies on seed globulins from legumes. 1. Separation and purification of legumin and vicilin from *Vicia faba* L. by zone precipitation. // *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* – 1974. – V. 166(2). – P. 163-172.
91. Schwenke K. D., Raab B., Plietz P., Damaschun G. The structure of the 12S globulin from rapeseed (*Brassica napus* L.) // *Nahrung* – 1982. – V. 27. – P. 165-175.
92. Caer D., Baniel M., Subirade M., Gueguen J. Preparation and physico-chemical properties of glycosylated derivation of pea legumin // *J. Agric. Food Chem.* — 1990. – V. 38. – P. 1700-1706.
93. Catsimpoolas N., Berg T., Meyer E.W. Hydrogen ion titration of ionizable side-chains in native and denatured glycinin // *Int. J. Protein Res.* – 1971. – V. 3 (2) – P. 63-71.
94. Plietz P., Damaschun G. The structure of the 11s seed globulins from various plant species comparative investigations by physical methods. // *Studia Biophysica* – 1986. – V. 116 (3). – P. 153-173.
95. Adachi M., Takenaka Y., Gidamis A.B., Mikami B., Utsumi S. Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer // *J. Mol. Biol.* – 2001. – V. 305. – P. 291-305.
96. Maruyama N., Fukuda T., Saka S., Inui N., Kotoh J., Miyagawa M., Hayashi M., Sawada M., Moriyama T., Utsumi S. Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins // *Phytochemistry* – 2003. – V. 64 (3). – P. 701-708.
97. Adachi M., Kanamori J., Masuda T., Yagasaki K., Kitamura K., Mikami B. Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2003. – V. 100. – P. 7395-7400.
98. Shutov A. D., Kakhovskaya I. A., Bastrygina A. S., Bulmaga V. P., Horstmann C., Müntz K. Limited proteolysis of beta-conglycinin and glycinin, the 7S and 11S storage globulins from soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Structural and evolutionary implications // *Eur. J. Biochem.* –1996. – V. 241(1). – P. 221-228.

99. Shutov A. D., Blattner F. R., Bäumlein H., Müntz K. Storage and mobilization as antagonistic functional constraints of seed storage globulin evolution // *J. Exp. Bot.* – 2003. – V. 54. – P. 1645-1654.
100. Wolf W. J., Briggs D. R. Purification and characterization of the 11S component of soybean proteins. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – V. 85. – P. 186-199.
101. Badley R. A., Atkinson D., Hauser H., Oldani D., Green J. P., Stubbs J. M. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1975. – V. 412. – P. 214-228.
102. Utsumi S., Mori T. Heterogeneity of broad bean legumin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – V. 621(2). – P. 179-189.
103. Croy R. R. D., Derbyshire E., Krishna T. G., Boulter D. Legumin Of *Pisum sativum* and *Vicia faba* // *New Phytol.* – 1979. – V. 83. – P. 29-35.
104. Miles M. J., Morris V. J., Carroll V., Wright D. J., Newby V. Small-angle X-ray scattering studies of 7S and 11S globulins from pea (*Pisum sativum*) // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1985. – V. 7 (2). – P. 125–126.
105. Casey R. Immunoaffinity Chromatography as a means of purifying legumin from *pisum* (pea) seeds // *Biochem. J.* – 1979. – V. 177(2). – P. 509-520.
106. Möbius D. Proteins in liquid interfaces / Möbius D., Miller R. – Elsevier. Amsterdam, 1998. – 497 p.
107. Danielsson C. E. Seed globulins of the Gramineae and Leguminosae // *Biochem. J.* – 1949. – V. 44 (4). – P. 387-400.
108. Plietz P., Zirwer D., Schlesier B., Gast K., Damaschun G. Shape, symmetry, hydration and secondary structure of the legumin from *Viciafaba* in solution // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1984. – V. 784 – P.140-146.
109. Tulloch P. A., Blagrove R. J. Electron microscopy of seed-storage globulins // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1985. – V. 241 (2). – P. 521-532.
110. Johnson P., Richards E. G. The study of legumin by depolarization of fluorescence and other physicochemical methods // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1962. – V. 97. – P. 260-276.
111. Jiang L., Wang Z., Li Y., Meng X., Sui X., Qi B., Zhou L. Relationship Between Surface Hydrophobicity and Structure of Soy Protein Isolate Subjected to Different Ionic Strength // *Int. J. Food Prop.* – 2015. – V. 18 (5). – P. 1059-1074.
112. Lakemond C. M. M. Heat denaturation of soy glycinin: structural characteristics in relation to aggregation and gel formation: PhD thesis / Catriona M. M. Lakemond – Wageningen Universiteit, 2001. – 129 p.

113. Becktel W. J., Shellman J. A. Protein stability curves // *Biopolymers*. – 1987. – V. 26. – P. 1859–1877.
114. Privalov P. L. Microcalorimetry of proteins and their complexes // In.: *Protein Structure, Stability, and Interactions* (Ed. John W. Shriver) – The Humana Press Inc., Totowa, New Jersey., 2008. – P. 1-39.
115. Senin A. A., Dzhavadov L. N., Potekhin S. A. High-pressure differential scanning calorimeter // *Rev Sci Inst*. – 2016. – V. 87. 034901. – P. 1-5.
116. Pace C. N. Measuring and increasing protein stability // *Trends Biotechnol*. – 1990. – V.8 (4). – P. 93-98.
117. Mills E. N., Marigheto N. A., Wellner N., Fairhurst S. A., Jenkins J. A., Mann R., Belton P. S. Thermally induced structural changes in glycinin, the 11S globulin of soya bean (*Glycine max*) – an in situ spectroscopic study // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2003. – V.1648 (1-2). – P. 105-114.
118. Potekhin S.A. The potential of scanning microcalorimetry for studying thermotropic conformational transitions in biomacromolecules // *Polym. Sci. Ser. C*. – 2012. – V. 54. – P. 1077-1085.
119. Privalov P. L., Potekhin S. A. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins // *Methods Enzymol*. – 1986. – V. 131. – P. 4-51.
120. Privalov P. L., Gill S. J. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. // *Adv. Protein Chem*. – 1988. – V. 39. – P. 191–234.
121. Hashizume K., Watanabe T. Influence of Heating Temperature on Conformational Changes of Soybean Proteins // *Food Nutr*. – 1979. – V. 43 (4). – P. 683-690.
122. Iwabuchi S., Shibasaki K. Immunochemical studies of the effect of ionic strength on thermal denaturation of 11S globulin // *Agric. Biol. Chem*. – 1981. – V. 45 (1). – P. 285-293.
123. Kazumoto H., Nakamura N., Watanabe T. Influence of ionic strength on conformation changes of soybean proteins caused by heating and relationship of its conformation changes to gel formation // *Agric. Biol* – 1975. – V. 39 (7). – P 1339-1347.
124. Weight D. J. The seed globulins // In: *Developments in food proteins* (ed: B.J.F. Hudson) – Elsevier, London, 1987. – V. 5. – P. 81-157.
125. Danilenko A. N., Grozav E. K., Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B. Studies on the stability of 11S globulin from soybeans by differential scanning microcalorimetry // *J. Biol. Macromol*. – 1985. – V. 7 – P. 109-119.
126. Danilenko A. N., Grozav E. K., Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B. Studies on the stability of 11S globulin from *Vicia faba* seeds by differential scanning microcalorimetry // *J. Pept. Protein Res*. – 1985. – V. 26. – P. 5-9.

127. Danilenko A. N., Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Burova T. V., Tolstoguzov V. B. The effect of neutral salts on the conformational stability of 11S globulins from some seeds using differential scanning microcalorimetry // *Molek Biol.* – 1986. – V. 20. – P. 128-137.
128. Danilenko A. N., Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Leontjev A. L., Burova T. V., Surikov V. V., Borisov Y. A, Tolstoguzov V. B. Effect of pH on the thermal stability of 11S globulins from *Glycine max* seeds as indicated by differential scanning microcalorimetry // *Biophysics* – 1987. – V. 32. – P. 434 – 439.
129. Schwenke K. D., Grinberg V. Ya., Danilenko A. N., Burova T. V., Tolstoguzov V. B. On the acceptability of the two-state model of protein unfolding to the 11S globulins from plant seeds // *Nahrung* – 1987. – V.31 (2). – P. 183-184.
130. Grinberg V. Ya., Danilenko A. N., Burova T. V., Tolstoguzov V. B. Conformational stability of 11S globulins from seeds // *J. Sci. Food Agric.* – 1989. – V. 49 (2). – P. 235–248.
131. Privalov P. L. Stability of proteins: small globular proteins // *Adv. Protein Chem.* – 1979. – V. 33. – P. 167-241.
132. Makhatadze G.I., Privalov P. L. Energetics of protein structure // *Adv. Protein Chem* – 1995. – V. 47. – P. 307–42.
133. Pfeil W. *Protein Stability and Folding – A Collection of Thermodynamic Data* / Springer, New York, 1998 – 656 p.
134. *Thermodynamic data for biochemistry and biotechnology* // (Ed. H.-J. Hinz) Springer-Verlag, 1986 – 456 p.
135. Magdassi S. *Surface activity of proteins: chemical and physicochemical modifications* // S. Magdassi (Ed.) – CRC Press, 1996. – 336 p.
136. Pezennec S., Gauthier F., Alonso C., Graner F., Croguennec T., Brule' G., Renault A. The protein net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air–water interface // *Food Hydrocolloids* – 2000. – V. 14. – P. 463-472.
137. Wierenga P. A., Meinders M. B., Egmond M. R., Voragen A. G., de Jongh H. H. Quantitative description of the relation between protein net charge and protein adsorption to air-water interfaces // *J. Phys. Chem.* – 2005. – V. 109(35). – P. 16946-16952.
138. Nakai S. Structure-function relationships of food proteins: with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity // *J. Agric. Food Chem.* – 1983. – V. 31(4). – P. 676–683.
139. Kato A., Osako Y., Matsudomi N., Kobayashi K. Changes in the Emulsifying and Foaming Properties of Proteins during Heat Denaturation // *Agric. Biol. Chem.* – 1983. – V. 47 (1). – P. 33 -37.
140. Narsimhan G., Uraizee F. Kinetics of adsorption of globular proteins at an air-water interface // *Biotechnol. Prog.* – 1992. – V. 8 (3). – P. 187-196.

141. Noskov B. A., Akentiev A. V., Alexandrov D. A., Loglio G., Miller R. Dynamic surface properties of solutions of polyethylene oxide and polyethylene glycols // *J. Phys. Chem.* – 2000. – V. 104. – P. 7923-7931.
142. Koelsch P., Motschmann H. Relating foam lamella stability and surface dilational rheology // *Langmuir* – 2005. – V. 21. – P. 6265-6269.
143. Medrano A., Abirached C., Araujo A.C., Panizzolo L. A., Moyna P., Añón M. C. Correlation of average hydrophobicity, water/air interface surface rheological properties and foaming properties of proteins // *Food Sci. Tech. Int.* – 2012. – V. 18 (2). – P. 187-193.
144. Patino R. J. M., Ortiz M. S. E., Sánchez C. C., Niño R. M. R., Añón M. C. Dynamic properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface // *J. Colloid Interface Sci.* – 2003. – V. 268(1). – P. 50-57.
145. Patino J. M. R., Nino Ma. R. R., Sanchez C. C., Ortiz S. E. M., Anon Ma. Cr. Dilatational properties of soy globulin adsorbed films at the air–water interface from acidic solutions // *J Food Eng* – 2005. – V. 68. – P. 429–437.
146. Sanchez C.C., Ortiz S. E. M., Nino Ma. R. R., Anon Ma. Cr., Patino J. M. R. Effect of pH on Structural, Topographical, and Dynamic Characteristics of Soy Globulin Films at the Air-Water Interface // *Langmuir* – 2003. – V. 19. – P. 7478-7487.
147. Ruiz-Henestrosa V. P., Sanchez C. C., Escobar Ma. M. Y., Jimenez J. J. P., Rodriguez F. M., Patino J. M. R. Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* – 2007. – V. 309. – P. 202–215.
148. Nino M. R. R., Sanchez C. C., Ruiz-Henestrosa V. P., Patino J. M. R. Milk and soy protein films at the air–water interface // *Food Hydrocolloids* – 2005. – V. 19. – P. 417–428.
149. Ortiz S. E. M., Sanchez C. C., Nino M. R. R., Anon M. Cr., Patino J. M. R. Structural characterization and surface activity of spread and adsorbed soy globulin films at equilibrium // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* – 2003. – V. 32. – P. 57-67.
150. Lucassen-Reynders E. H., Fainerman V. B., Miller R. Surface Dilational Modulus or Gibbs' Elasticity of Protein Adsorption Layers // *Phys J. Chem.* – 2004. – V. 108. – P. 9173-9176.
151. Zhou C., Yang X., Wen Q. Rheological studies of soy glycinin adsorbed at air-water interface // *Journal of Shaanxi University of Science and Technology* – 2006. – V. 24. (3). – P. 22-27.
152. Tornberg E. Functional characterization of protein stabilized emulsions: Emulsifying behaviour of proteins in a valve homogenizer // *J. Sci. Food Agric.* – 1978. – V. 29 (10). – P. 867–879.
153. Ruíz-Henestrosa V. P., Sánchez C. C., Pedroche J. J., Millán F., Patino J. M. R. Improving the functional properties of soy glycinin by enzymatic treatment. Adsorption and foaming characteristics // *Food Hydrocolloids* – 2009. – V. 23 (2). – P. 377-386.

154. Martinez K. D., Sanchez C. C., Rodriguez Patino J.M., Pilosof A.M.R. Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates // *Food Hydrocolloids*. – 2009. – V. 23. – P. 2149–2157.
155. Wang G., Troendle M., Reitmeier C. A., Wang T. Using modified soy protein to enhance foaming of egg white protein. // *J. Sci. Food Agric.* – 2012. – V. 92 (10). – P. 2091-2097.
156. Achouri A., Zamani Y., Boye J. I. Stability and Physical Properties of Emulsions Prepared with and without Soy Proteins // *J. Food Res.* – 2012. – V. 1 (1). – P. 254-267.
157. Kinsella J. E. Functional Properties of Proteins in Foods: A Survey // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 1976. – V. 8. – P. 219-220.
158. Phillips L. G. Structure-function properties of food proteins / Phillips L. G., Whitehead D. M., Kinsella J. E. – San Diego: Academic Press, 1994. – 271 p.
159. Smith D. M. Measurement of Functional Properties: Overview of Protein Functionality Testing // In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (Ed. R.W. Harking) – New York: John Wiley & Sons Inc., 2003. – UNIT B5.1.
160. Hill S. E. Functional Properties of Food Macromolecules / Hill S. E., Ledward D. A., Mitchell J. R. – Springer Science & Business Media, 1998. – 348 p.
161. Il'in M. M., Semenova M. G., Belyakova L. E., Antipova A. S., Polikarpov Y. N. Thermodynamic and functional properties of legumin (11S globulin from *Vicia faba*) in the presence of small-molecule surfactants: effect of temperature and pH. // *J. Colloid. Interface Sci.* – 2004. – V. 278 (1). – P. 71-80.
162. Semenova M. G., Anokhina M. S., Antipova A. S., Belyakova L. E., Polikarpov Yu. N. Effect of calcium ions on both the co-assembly of α s-casein with soy phosphatidylcholine and the novel functionality of their complex particles // *Food Hydrocolloids*. – 2014. – V. 34. – P. 22–33.
163. Semenova M. G. Thermodynamic analysis of the impact of molecular interactions on the functionality of food biopolymers in solution and in colloidal systems // *Food Hydrocolloids*. – 2007. – V. 21 (1). – P. 23-45.
164. Jambrak A. R., Lelas V., Mason T. J., Krešić G., Badanjak M. Physical properties of ultrasound treated soy proteins // *J. Food Eng.* – 2009. – V. 93 (4). – P. 386–393.
165. Zhao X., Hou Y. Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index of hydrolysates // *Afr. J. Biotechnol.* – 2009. – V. 8 (14). – P. 3314-3319.
166. Oss C. J., Good R. J., Chaudhury M. K. Solubility of proteins // *J. Protein Chem.* – 1986. – V. 5 (6). – P. 385-405.

167. Briggs D. R., Wolf W. J. Studies on the cold-insoluble fraction of the water-extractable soybean proteins. I. Polymerization of the 11S component through reactions of sulfhydryl groups to form disulfide bonds // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1957. – V. 72 (1). – P. 127-144.
168. Lakemond C. M., de Jongh H.H., Hessing M., Gruppen H., Voragen A.G. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – V. 48(6). – P. 1985-1990.
169. Zayas J. F. *Functionality of Proteins in Food* / Zayas J. F. – Springer Science & Business Media, 1996. – 373 p.
170. Fang Z, Bhandari B. 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends // Food Sci Technol*, - 2010. – V. 21. – P. 510–523.
171. Bakry A. M., Abbas S., Ali B., Majeed H., Abouelwafa M. Y., Mousa A., Liang L. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. - 2016 - V. 15. – P. 143 – 182.
172. Komaiko J. S., McClements D. J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods // *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.* – 2016. – V. 15. – P. 331-352.
173. Hettiarachchy N. S. *Protein Functionality in Food Systems* / Hettiarachchy N. S., Ziegler G. R. –CRC Press, 1994. – 536 p.
174. Phillips L.G. Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams // *Food Tech.* – 1981. - V. 35. – P. 50-51.
175. Kato A., Yutani K. Correlation of surface properties with conformational stabilities of wild-type and six mutant tryptophan synthase alpha-subunits substituted at the same position // *Protein Eng.* – 1988. – V. 2. – P. 153-156.
176. Poon S., Clarke A., Currie G., Schultz C. A protein engineering approach for determining the influence of α -helices on the emulsifying properties of proteins // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2001. – V. 65. – P. 1713-1723.
177. Cabra V., Arreguín R., Farres A. Emulsifying properties of proteins // *Bol. Soc. Qu. m M.* – 2000. – V. 2. – P. 80-89.
178. Utsumi S. Plant food protein engineering // *Adv. Food Nutr. Res.* – 1992. – V. 36. – P. 89-208.
179. Kato A., Nakai S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – V. 24. – P. 13-20.
180. Voutsinas L. P., Cheung E., Nakai S. Relationship of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins // *J. Food Sci.* – 1983. – V.48. – P. 26–32.

181. Chen W., LI X., Rahman M. D. R. T., Al-Hajj N. Q. M., Dey K. C., Raqib S. M. Review: Emulsification properties of soy bean protein // *Nusantara Bioscience* – 2014. – V. 6 (2). – P. 196-202.
182. Krause J.-P., Wüstneck R., Schwenke K. D. Interfacial behaviour of succinylated faba bean legumin at low ionic strength // *Food / Nahrung*. – 1999. – V. 43 (1) – P. 9-13.
183. Burova T. V., Grinberg N. V., Grinberg V. Ya., Leontiev A. L., Tolstoguzov V. B. Effects of polysaccharides upon the functional properties of 11S globulin of broad beans // *Carbohydrate Polymers* – 1992. – V. 18 (2). – P. 101-108.
184. Krause J.-P., Mothes R., Schwenke K. D. Some Physicochemical and Interfacial Properties of Native and Acetylated Legumin from Faba Beans (*Vicia faba* L.) // *J. Agric. Food Chem.* – 1996. – V. 44 (2). – P. 429–437.
185. Henning T., Mothes R., Dudek S., Krause J. P., Schwenke K. D. Structural and functional changes of faba bean legumin during super-limited tryptic hydrolysis // *Nahrung*. – 1997. – V. 41(2). – P. 81-86.
186. Campbell G. M., Mougeot E. Creation and characterization of aerated food products // *Trends Food Sci. Tech.* – 1999. – V. 10. – P. 283–296.
187. Damodaran S. *Food Proteins and Their Applications* / Eds. Damodaran S., Paraf A. – New York: Marcel Dekker, 1997. – 694 p.
188. Meinders M. B. J., Sman R. G. M. Modeling foam stability // In: *Computational Methods for Complex Liquid-Fluid Interfaces* (Ed: M. T. Rahni, M. Karbaschi, R. Miller) – CRC Press – 2015. – P. 503 – 526.
189. Hall G. M. *Methods of Testing Protein Functionality* / Ed: Hall G. M. – London: Blackie Academic & Professional, 1996. – 271 p.
190. Li-Chan E., Nakai S. Biochemical basis for the properties of egg white // *Crit. Rev. Poult. Biol.* – 1989. – V. 2. – P. 21-57.
191. Kella N. K. D., Yang S. T., Kinsella J. E. Effect of disulfide bond cleavage on structural and interfacial properties of whey proteins // *J. Agric. Food Chem.* – 1989. – V. 37 (5). – P. 1203–1210.
192. Kim S. H.; Kinsella J. E. Surface activity of food proteins: relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of bovine serum albumin.// *J. Food Sci.* – 1985. – V. 50. – P. 1526-1530.
193. Mitchell J. R. Foaming and emulsifying properties of proteins // *Dev. Food Prot.* – 1986. – V. 4. – P. 291 - 338.
194. Maeda K.; Yokoi S.; Kamada K.; Kamimura M. Foam stability and physicochemical properties of beer. // *J. Am. Soc. Brew. Chem.* – 1991. – V. 49(1). – P. 14-18.

195. J. E. Kinsella Functional properties of soy proteins // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1979. – V. 56 (3) – P.242 – 258.
196. Cully, Julia (1987) Aspects of structure and functionality in legumin and vicilin from vicia faba seeds – PhD Thesis Duuhram University
197. Bos M.A., Dunnewind B., Vliet T. van Foams and surface rheological properties of β -casein, gliadin and glycinin // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2003. - V. 31. – P. 95-105
198. Abirached C., Medrano C. A., Araujo A. C., Moyna P., Añón M. C., Panizzolo L. A. Comparison of Interfacial and Foaming Properties of Soy and Whey Protein Isolates // *J. Food Sci. Eng.* – 2012. – V. 2. – P. 376-381.
199. Philips G. O. Handbook of Food Proteins / Ed.: Philips G. O., Williams W. A. – Woodhead Publishing, 2011. – 457 p.
200. O'Kane F.E., Happe R.P., Vereijken J.M., Gruppen H., van Boekel M.A. Heat-induced gelation of pea legumin: comparison with soybean glycinin // *J Agric Food Chem.* – 2004. – V. 52(16). – P. 5071-5078.
201. Baier S. K., McClements D. J. Influence of cosolvent systems on the gelation mechanism of globular protein: Thermodynamic, kinetic, and structural aspects of globular protein gelation // *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety.* – 2005. – V. 4. – P. 43-54.
202. Tang C.-H., Wu H., Chen Z., Yang X.-Q. Formation and properties of glycinin-rich and β -conglycinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase // *Food Res Int.* – 2006. – V. 39 (1). – P. 87–97.
203. Renkema J.M.S., Knabben J.H.M., van Vliet T. Gel formation by β -conglycinin and glycinin and their mixtures // *Food Hydrocolloids.* – 2001. – V. 15. – P. 407–414.
204. Rodionov I.A., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Y., Lozinsky V.I. Study of cryostructuring of polymer systems. 42. Physicochemical properties and microstructure of wide-porous covalently cross-linked albumin cryogels / *Colloid Journal of the Russian Academy of Sciences: Kolloidnyi Zhurnal.* – 2016. – V. 46, № 4. – P. 492-504.
205. Rodionov I.A., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Y, Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymer systems. Proteinaceous wide-pore cryogels generated by the action of denaturant/reductant mixtures on bovine serum albumin in moderately frozen aqueous media / *Soft Matter* – 2015. – V. 11(24). – P. 4921-4931.
206. Prak K., Nakatani K., Maruyama N., Utsumi S. C-terminus engineering of soybean proglycinin: improvement of emulsifying properties // *Protein. Eng. Des. Sel.* – 2007. – V. 20(9). – P. 433-442.

207. Adachi M., Chunying H., Utsumi S. Effects of designed sulfhydryl groups and disulfide bonds into soybean proglycinin on its structural stability and heat-induced gelation. // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – V. 52 (18). – P. 5717-5723.
208. Maruyama N., Prak K., Motoyama S., Choi S. K., Yagasaki K., Ishimoto M., Utsumi S. Structure-physicochemical function relationships of soybean glycinin at subunit levels assessed by using mutant lines // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – V.52 (26). – P. 8197-8201.
209. Prak K., Nakatani K., Katsube-Tanaka T., Adachi M., Maruyama N., Utsumi S. Structure-function relationships of soybean proglycinins at subunit levels // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – V. 53 (9). – P. 3650-3657.
210. Yuan D.-B., Yang X.-Q., Tang C.-H., Zheng Z.-X., Wei-Min, Ahmad I., Yin S.-W. Physicochemical and functional properties of acidic and basic polypeptides of soy glycinin // *Food Res. Int.* – 2009. – V.42. – P. 700-706.
211. Feeney R. E. Tailoring proteins for Food and Medical Uses: State of the Art and Interrelationships // In: *Protein Tailoring for food and medical uses* (Ed. Feeney R.E., Whitaker J.R.). – New York: Marcel Decker, 1986. – P. 1- 40.
212. de Jongh H. H. J., Broersen K. Application Potential of Food Protein Modification // In: *Advances in Chemical Engineering* (Eds. Nawaz Z., Naveed S.) – Intech, 2012. – P. 135-182.
213. Nishinari K., Fang Y., Guo S., Phillips G.O. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification // *Food Hydrocolloids* – 2014. - V. 39. – P. 301-318.
214. Wagner J. R., Gueguen J. Surface Functional Properties of Native, Acid-Treated, and Reduced Soy Glycinin. 1. Foaming Properties // *J. Agric. Food Chem.* – 1999. – V. 47. – P. 2173-2180.
215. Wagner J. R., Gueguen J. Surface Functional Properties of Native, Acid-Treated, and Reduced Soy Glycinin. 2. Emulsifying Properties // *J. Agric. Food Chem.* – 1999. – V. 47. – P. 2181-2187.
216. Krause J.P., Schwenke K.D. Relationships between adsorption and emulsifying of acetylated protein isolates from fabe beans (*Vicia faba* L.) // *Food / Nahrung.* – 1996. – V. 40 (1). – P. 12–17.
217. Kim K. S., Rhee J S. Effect of acetylation on emulsifying properties of glycinin // *J. Agric. Food Chem.* – 1990. – V. 38 (3). – P. 669–674.
218. Feeney R. E. *Food Proteins: Improvement through Chemical and Enzymatic Modification* / Eds: Feeney R. E., Whitaker J. R., - Washington: American Chemical Society, 1977. – V. 160.
219. Casella M. L. A., Whitaker J. R. Enzymatically and chemically modified zein for improvement of functional // *J. Food Biochem.* – 1990. – V. 14. – P. 453–475.
220. Швенке, К. Д. Структурная модификация как инструмент функционализации белков семян масличных и зернобобовых. / Швенке, К. Д. – М.: Пищепромиздат, 2000. – 180 с.

221. Kim S. H., Kinsella J. E. Surface active properties of protein: effects of progressive succinylation on film properties and foam stability of glycinin // *J. Food Sci.* – 1987. – V. 52. – P. 1341-1345.
222. Kato A., Minaki K., Kobayashi K. Improvement of emulsifying properties of egg white proteins by attachment of polysaccharide through Maillard reaction in a dry state // *J. Agric. Food Chem.* – 1993. – V. 41. – P. 540-543.
223. Yong H., Yamaguchi S., Gu Y-S., Mori T., Matsumura Y. Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of α -zein // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – V. 52. – P. 7094-7100.
224. Monahan F. J., McClements D. J, German J. B Disulfide-mediated Polymerization Reactions and Physical Properties of Heated WPI-stabilized Emulsions // *J. Food Sci.* – 1996. –V. 61 (3) – P. 504-509.
225. Isaschar-Ovdat S., Rosenberg M., Lesmes U., Fishman A. Characterization of oil-in-water emulsions stabilized by tyrosinase-crosslinked soy glycinin // *Food Hydrocolloids* – 2015. – V. 43. – P. 493-500
226. Liu J., Ru Q., Ding Y. Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review // *Food Research International* – 2012. – V. 49. – P. 170–183.
227. Saeki H., Inoue K. Improved solubility of carp myofibrillar proteins in low ionic strength medium by glycosylation // *J. Agric. Food Chem.* – 1997. – V. 45. – P. 3419-3422.
228. Mat Easa A., Hill S. E., Mitchell J. R., Taylor A. J. Bovin serum albumin gelation as a result of the Maillard reaction // *Food Hydrocolloids.* – 1996. – V. 10. – P. 199-202.
229. Courthaudon J. L., Colas B., Lorient D. Covalent binding of glycosyl residues to bovine casein: Effects on solubility and viscosity // *J. Agric. Food. Chem.* – 1989. – V. 37. – P. 32-36.
230. Achouri A., Boye J. I., Yaylayan V. A., Yeboah F. K. Functional Properties of Glycated Soy 11S Glycinin // *J. Food Sci.* – 2005. – V. 70 (4). – P. 269-274.
231. Shukla T.P. Chemical modification of food proteins. // In: *Food Protein deterioration. Mechanisms and Functionality* (Ed. Cherry J.P.). – Washington: ACS, 1982. – 444 p.
232. Wang C., Johnson L. A. Functional properties of hydrothermally cooked soy protein products // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2001. – V. 78. – P. 189-195.
233. Puppo C., Chapleau N., Speroni F., De Lamballerie-Anton M., Michel F., Añón C., Anton M. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – V. 52 (6). – P. 1564-1571.

234. Speroni F., Añón M.C. Cold-set gelation of high pressure-treated soybean proteins // *Food Hydrocolloids* – 2013. – V. 33 (1). – P. 85-91.
235. Roesch R. R, Corredig M. Texture and Microstructure of Emulsions Prepared with Soy Protein Concentrate by High-Pressure Homogenization // *Food Sci. Tech.* – 2003. – V. 36 (1). – P. 113-124.
236. Hu H., Wu J., Li-Chan E. C. Y., Zhu L., Zhang F., Xu X., Fan G., Wang L., Huang X., Pan S. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. // *Food Hydrocolloids* – 2013. – V. 30 – P. 647-655.
237. Datta A. Genetic engineering for improving quality and productivity of crops // *Agric. Food Sec.* – 2013. – V. 2. – P.15.
238. Saalbach G., Jung R., Saalbach I., Müntz K: Construction of storage protein genes with increased number of methionine codons and their use in transformation experiments. // *Biochem Physiol. Pflanzen.* – 1988. – V. 183. – P. 211-218.
239. OECD Consensus Document on Molecular Characterization of Plants Derived from Modern Biotechnology // *Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 51 and Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 22, 2010.* – 30 p.
240. Herman R. A., Price W. D. Unintended compositional changes in genetically modified (GM) crops: 20 years of research. // *J. Agric. Food Chem.* – 2013. – V. 61(48). – P. 11695–11701.
241. Tandang-Silvas M. R., Tecson-Mendoza E. M., Mikami B., Utsumi S., Maruyama N. Molecular design of seed storage proteins for enhanced food physicochemical properties // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* – 2011. – V. 2. – P. 59-73.
242. Bau H. M., Villaume C., Nicolas J. P., Mejan L. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soybean seeds. // *J. Sci. Food Agric.* – 1997. – V. 73. – P. 1-9.
243. Wilson K. A., Rightmire B. R., Chen J. C., tan-Wilson A. L. Differential proteolysis of glycinin and beta-conglycinin polypeptides during soybean germination and seedling growth. // *Plant Physiol.* – 1986. – V. 82. – P. 71-76.
244. Savelkoul F. H. M. G., Boer H., Tamminga S., Schepers A. J., Elburg L. In vitro enzymatic hydrolysis of protein and protein pattern change of soya and faba beans during germination // *Plant Foods Hum. Nutr.* – 1992. – V. 42 (3). – P. 275-284.
245. Murekatete N., Hua Y., Kong X., Zhang C. Effects of Fermentation on Nutritional and Functional Properties of Soybean, Maize, and Germinated Sorghum Composite Flour // *Int J Food Eng.* – 2012. – V. 8 (1). – P. 1–15.
246. Lee H.-S., Eom K.-Y., Choi H.-S., Kim D.-H., Yoo S.-H., Kim W.-J. Functional Properties of Germinated Whole Soy Flour // *Han'gug sigpum gwahag hoeji* – 2006. – V. 38(4). – P. 483 – 487.

247. Hsu D. L., Leung H. K., Morad M. M., Finney P. L., Leung C. T. Effect of Germination on Electrophoretic, Functional, and Bread-Baking Properties of Yellow Pea, Lentil, and Faba Bean Protein Isolates. // *Cereal Chem.* – 1982. – V. 59. – P. 344 – 350.
248. Rahma E.H. Functional and electrophoretic characteristics of faba bean (*Vicia faba*) flour proteins as affected by germination. // *Nahrung.* – 1988. – V.32 (6). – P. 577-583.
249. Okamoto T., Yuki A., Mitsuhashi N., Minamikawa T. Asparaginyl endopeptidase (VmPE-1) and autocatalytic processing synergistically activate the vacuolar cysteine proteinase (SH-EP) // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – V. 264. – P. 223-232.
250. Kim H. T., Choi U. K., Ryu H. S., Lee S. J., Kwon O. S. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1814(9). – P. 1178-1187.
251. Braudo E. E., Danilenko A. N., Guslyannikov P. V., Kozhevnikov G. O., Artykova G. P., Lapteva N. A., Vaintraub I. A., Sironi E., Duranti M. Comparative effects of limited tryptic hydrolysis on physicochemical and structural features of seed 11S globulins // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2006. – V. 39. – P. 174-178.
252. Махотина И. А. Формирование потребительских свойств белковых препаратов люпина: дис. ... канд. техн. наук : 05.18.15 / Махотина Ирина Алексеевна. – М., 2009 – 169 с.
253. Браудо Е. Е., Даниленко А. Н., Дианова В. Т., Кроха Н. Г. Альтернативные подходы к получению растительных белковых продуктов // В кн. Растительный белок: новые перспективы (ред. Е.Е.Браудо) – М.: Пищепромиздат, 2000. – 179 с.
254. Гусянников П. В. Разработка технологии мясных продуктов с использованием модифицированной муки гороха : дис. ... канд. техн. наук : 05.18.15 / Гусянников Павел Владимирович. – М., 2004 – 173 с.
255. Vaintraub I.A. Kinetics of the co-operative proteolysis // *Food / Nahrung* – 1998. – V. 42 (2). – P. 59–60.
256. German J. B., O'Neill T. E., Kinsella J. E. Film forming and foaming behavior of food proteins. // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* – 1985. – V. 62. – P. 1358-1366.
257. Kumar R., Choudhary V., Mishra S., Varma I. K. Enzymatically Modified Soy Protein // *J. Therm. Anal. Cal.* – 2004. – V. 75 (3). – P. 727-738
258. Wu W. U., Hettiarachchy N. S., Qi M. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1998. – V. 75 (7) – P. 845-850.

259. Fontana A., Polverino L. P., De Filippis V., Scaramella E., Zambonin M. Limited proteolysis in the study of protein conformation. // In.: *Proteolytic Enzymes: Tools and Targets*. (Ed: Sterchi E. E., Stocker W.). – Heidelberg: Springer, 1999. – 325 p.
260. Hubbard S. J., Beynon R. J., Thornton J. M. Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures // *Protein Eng.* – 1998. – V. 11(5). – P. 349-359.
261. Kim S. Y., Park P. S. W., Rhee K. C. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. // *J. Agric. Food Chem.* – 1990. – V. 38(3). – P. 651-656.
262. Tsumura K., Saito T., Kufimiya W., Inouye K. Selective proteolysis of the glycinin and β -conglycinin fractions in a soy protein isolate by pepsin and papain with controlled pH and temperature. // *J. Food Sci.* – 2004. – V. 69. – P. 363-367.
263. Qi M., Hettiarachchy N. S., Kalapathy U. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. // *J. Food Sci.* – 1997. – V. 62(6). – P. 1110-1115.
264. Were L., Hettiarachchy N. S., Kalapathy U. Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. // *J. Food Sci.* – 1997. – V. 62. – P. 821-824.
265. Panizzolo L. A., Añón M. C. Emulsifying Properties of Hydrolysates Isolated from Soybean Protein // *Int. J. Nutr. Food Sci.* – 2015. – V. 4(2). – P. 223-233.
266. Panizzolo L. A., Añón M. C. Foaming properties of soy protein isolate hydrolysates // *J. Food Nutr. Sci.* – 2015. – V. 3 (1). – P. 1-9.
267. Mitchel R. E. J., Claiken I. M., Smith E. L. J. The complete amino acid sequence of papain. // *J. Biol. Chem.* – 1970. – V. 245. – P. 3485-3492.
268. Rawlings N. D. *Handbook of Proteolytic Enzymes* / Ed.: Rawlings N.D., Salvesen G.S. – London: Academic Press, 2013. – 3932 P.
269. Lauwers A. *Pharmaceutical Enzymes, drugs and pharmaceutical sciences*. Volume 84 / Lauwers A., Scharpé S. - New York-Basel-Hong Kong: Marcel Dekker Inc., 1997. – 408 p.
270. Shutov A., Rudakova A., Rudakov S., Kakhovskaya I., Schallau A., Maruyama N., Wilson K. Limited proteolysis regulates massive degradation of glycinin, storage 11S globulin from soybean seeds: an in vitro model. // *J. Plant. Physiol.* – 2012. – V. 169(13). – P. 1227-1233.
271. Popello I.A., Suchkov V.V., Grinberg V.Y., Tolstoguzov V.B. Liquid/liquid phase equilibrium in globulin/salt/water systems: legumin // *J. Sci. Food Agric.* – 1990. – V. 51 (3). – P. 345 – 353.
272. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // *Nature* – 1970. – V. 227. – P. 680-685.
273. Itzhaki R. F., Gill D. M. A micro-biuret method for estimating proteins // *Analytical Biochemistry*. – 1964. – V. 9 (4). – P. 401-410.

274. van de Hulst H.C. Light scattering by small particles / van de Hulst H.C. – New York: John Wiley & Sons, 1957. – 470 p.
275. Jumel K., Browne P., Kennedy J.F. The use of low angle laser light scattering with gel permeation chromatography for the molecular weight determination of biomolecules // In Laser Light Scattering in Biochemistry (Eds: Harding, Sattelle D.B., Bloomfield V.A.) – London: Royal Society of Chemistry, 1992. – P. 23-34.
276. Einstein A. Investigations on the Theory of the Brownian Movement / Einstein A. – New York: Dover Publications Inc., 1956. – 119 p.
277. Ware B. R. Electrophoretic light scattering // Adv. Colloid Interface Sci. – 1974. – V. 4. – P. 1-44.
278. Flygare W. H., Ware B. R., Hartford S. L. / In: Molecular Electrooptics (ed. C. T. O’Konski) – New York: Marcel Dekker, 1976. – P. 321-366.
279. Tucker I.M., Corbett J.C.W., Fatkin J., Jack R.O., Kaszuba M., MacCreath B., McNeil-Watson F. Laser Doppler Electrophoresis applied to colloids and surfaces // COCIS – 2015. – V. 20 (4). – P. 215-226.
280. Hunter R. J. Zeta Potential In Colloid Science: Principles And Applications / Hunter R. J. - UK: Academic Press, 1988. – 398 P.
281. Xu K, Yao P. Stable Oil-in-Water Emulsions Prepared from Soy Protein-Dextran Conjugates // Langmuir. – 2009 – V. 25(17). – P. 9714-9720.
282. Von Smoluchowski M. Contribution à la théorie de l'endosmose électrique et de quelques phénomènes corrélatifs // J. Phys. Theor. Appl. – 1904. – V. 3 (1). – P. 912-912.
283. Svergun D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria // J. Appl. Cryst. – 1992. – V. 25. – P. 495-503.
284. Свергун Д. И. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние / Свергун Д. И., Фейгин Л. А. – М.: Наука, 1986. – 279 с.
285. Кривандин А. В., Муранов К. О., Островский. М. А. Исследование комплексообразования в растворах α - и β L-кристаллинов при 600С. // Молекулярная биология. – 2004. – Т.38, №3. – С. 532-546.
286. Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M. H. J., Svergun D.I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. // J. Appl. Cryst. –2003. – V. 36. – P.1277-1282.
287. Wadso I., Goldberg R. N. Standards in isothermal microcalorimetry (IUPAC Technical Report) // Pure Appl. Chem. – 2001. – V. 73. N. 10. – P. 1625-1639.

288. Berry J. D., Neeson M. J., Dagastine R. R., Chan D. Y.C., Tabor R. F. Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry // *J Col Int Sci* – 2015. – V. 454. – P. 226-237.
289. Benjamins J., Cagna A., Lucassen-Reynders E.H. Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* – 1996. – V. 114. – P. 245-254.
290. Desbrieres J., Babak V. G. Interfacial properties of amphiphilic systems on the basis of natural polymers–chitin derivatives // *Russian Journal of General Chemistry* – 2008. – V. 78 (11). – P. 2230-2238.
291. Lucassen J., Van Den Tempel M. Longitudinal waves on visco-elastic surfaces // *J. Col. Interf. Sci.* – 1972. – V. 41 (3) – P. 491-498.
292. Minekus M., Alming M., Alvito P., Ballance S., Bohn T., Bourlieu C., Carrière F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Egger L., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A., Marze S., McClements D. J., Menard O., Recio I., Santos C. N., Singh R. P., Vegarud G. E., Wickham M. S. J., Weitschies W., Brodkorb A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus // *Food Funct.* – 2014. – V. 5. – P. 1113-1124.
293. Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid // *J. Agric. Food Chem.* – 1979. – V. 27 (6). – P. 1256-1262.
294. Bamdad F., Dokhani Sh., Keramat J., Zareie R. The Impact of Germination and In Vitro Digestion on the Formation of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Lentil Proteins Compared to Whey Proteins // *World Academy of Science, Engineering and Technology* – 2009. – V. 49. – P. 36 – 46.
295. Brown P. H., Schuck P. Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. // *Biophysical Journal.* – 2006. – V. 90. – P. 4651-4661.
296. Zhao H., Brown P. H., Schuck P. On the distribution of protein refractive index increments // *Biophys J.* – 2011. – V. 100 (9). – P. 2309-2317.
297. Поляков А.В., Даниленко А.Н., Кривандин А.В., Рудаков С.В., Рудакова А.С., Шутов А.Д., Плащина И.Г., Заиков Г.Е., Кузнецова О.Н. Изменение молекулярных параметров глицинина под действием ограниченного протеолиза папаином // *Вестник Казанского Технологического Университета* – 2013. – №9. – с. 184-189.
298. Brooks J. R., Morr C. V. Current aspect of soy protein fractionation and nomenclature. // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1985. – V. 62. – P. 1347-1354.
299. McMillan W. G., Mayer J. E. The Statistical Thermodynamics of Multicomponent Systems // *J. Chem. Phys.* – 1945. – V. 13. – P. 276-305.

300. Kirkwood J. G., Shumaker J. B. Forces between Protein Molecules in Solution Arising from Fluctuations in Proton Charge and Configuration // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1952. – V. 38. – P. 863-871.
301. Quigley A., Williams D. R. The second virial coefficient as a predictor of protein aggregation propensity: A self-interaction chromatography study // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2015. – V. 96. – P. 282-290.
302. Haas C., Drenth J., Wilson W. W. Relation between the Solubility of Proteins in Aqueous Solutions and the Second Virial Coefficient of the Solution // *J. Phys. Chem.* – 1999. – V. 103. – P. 2808-2811.
303. Wilson W. W., DeLucas L. J. Applications of the second virial coefficient: protein crystallization and solubility // *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* – 2014. – V. 70. – P. 543-554.
304. George A., Wilson W. W. Predicting protein crystallization from a dilute solution property // *Acta Crystallogr., Sect. D.* - 1994. – V. 50. – P. 361-365.
305. Neal B. L., Asthagiri D., Velev O. D., Lenho A. M., Kaler E.W. Why is the osmotic second virial coefficient related to protein crystallization? // *J. Cryst. Growth.* – 1999. – V.196. – P. 377-387.
306. Bonnete F., Finet S., Tardieu A. J. Second virial coefficient: Variations with lysozyme crystallization conditions // *J. Cryst. Growth* – 1999. – V. 196. – P. 403-414.
307. Narayanan J., Liu X. Y. Protein interactions in undersaturated and supersaturated solutions: a study using light and x-ray scattering // *Biophys. J.* – 2003. – V. 84. – P. 523 - 532.
308. Schmid F.-X. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. // *Encyclopedia of Life Sciences* - London: Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2001.
309. Lakowicz J. R. Protein Fluorescence // In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Ed: Lakowicz J. R.) – Springer US, 2006. – P. 529-575.
310. Erickson H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy // *Biol. Proced. Online.* – 2009. – V. 11. – P. 32–51.
311. Svedberg T., Pedersen K.O. *The Ultracentrifuge* // Oxford University Press, London, 1940 – 275 p.
312. Burchard W. Light scattering techniques // In: *Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers* (Ed: Ross-Murphy S. B.). – Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1994. – P. 151-213.
313. Privalov P. L., Khechinashvili N. N. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study // *J. Mol. Biol.* – 1974. – V. 86 (3). – P. 665-684.

314. Поляков А.В., Даниленко А.Н., Рудаков С.В., Рудакова А.С., Шутов А.Д., Плащина И.Г., Шкодич В.Ф., Кочнев А.М., Заиков Г.Е. Влияние ограниченного протеолиза папаином на термодинамическую стабильность глицинина // Вестник Казанского Технологического Университета. – 2014. – Т17, №1. – с. 203-208.
315. Streicher W. W., Makhatadze G. I. Protein Heat Capacity // In: Heat Capacities: Liquids, Solutions and Vapours (Eds: Wilhelm E., Letcher T. M.), 2010. – RSC Publishing – P. 355-366.
316. Gómez J, Hilser VJ, Xie D, Freire E. The heat capacity of proteins // Proteins. – 1995. – V. 22(4). – P.404-412.
317. Даниленко А.Н. Сравнительный анализ интегральной гидрофобности легуминов гороха различной сортовой принадлежности / Даниленко А.Н., Поляков А.В., Павловская Н.Е., Плащина И.Г. // Вестник Орел ГАУ – 2013. – №1, т.40. – с. 77-83.
318. Bikbov T. M, Grinberg V. Ya, Danilenko A. N., Chaika T. S., Vaintraub I. A., Tolstoguzov V. B. Studies on gelation of soybean globulin solutions // Colloid and Polymer Sci. - 1983. – V. 261. – P. 346-358.
319. von Hippel P. H., Schleich T. The effect of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution // (1969) In: Structure and Stability of Biological Macromolecules (Eds: Timasheff S. N., York Fasman G. D.). – New York: Marcel-Dekker, Inc., 1969. – P. 416-574.
320. von Hippel P.H., Wong K.Y. Neutral salts. The generality of their effects on the stability of macromolecular conformations // Science. – 1964. – V. 145. – P. 577–580.
321. Hashizume K., Nakamura N., Watanabe T. Influence of ionic strength on conformational changes of soybean proteins caused by heating, and relationship of its conformational changes to gel formation // Agric. Biol. Chem. – 1975. – V. 39. – P. 1339-1347.
322. Suryaprakash P., Prakash V. Unfolding of multimeric proteins in presence of denaturants. A case study of helianthinin from *Helianthus annuus* L. // Nahrung. – 2000. – V. 44(3). – P. 178-183.
323. Burova T. V., Grinberg N. V., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B., Schlesier B., Müntz K. Study of the conformational stability of 7S globulin from french beans (phaseolin) using high-sensitivity differential scanning microcalorimetry // Int. J. Biol. Macromol. – 1992. – V.14 (1). – P. 2-8.
324. Sturtevant J. M. Biochemical applications of differential scanning calorimetry // Annu Rev. Phys. Chem. – 1987. – V. 38. – P. 463-488.
325. Kimura A., Fukuda T., Zhang M., Motoyama S., Maruyama N., Utsumi S. Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fava bean, cowpea, and French bean

- with those of soybean – French bean 7S globulin exhibits excellent properties // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – V. 56 (21) – P. 10273-10279.
326. Schulz G. E Principles of Protein Structure / Schulz G. E, Schirmer R. H. - New York: Springer Verlag, 1979. – 251 p.
327. Catsimpoolas N. Isolation of glycinin subunits by isoelectric focusing in urea-mercaptoethanol // *FEBS Lett.* – 1969. – V. 4 (4). – P. 259-261.
328. Miller S., Janin J., Lesk A. M., Chothia C. Interior and surface of monomeric proteins // *J. Mol. Biol.* – 1987. – V. 196 (3). – P. 641-656.
329. Beverung, C. J., Radke C. J., Blanch H. W. Protein adsorption at the oil/water interface: Characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements // *Biophysical Chemistry* – 1999. – V. 81. – P. 59-80.
330. Tripp B. C., Magda J. J., Andrade J. D. Adsorption of globular proteins at the air/water interface as measured via dynamic surface tension: concentration dependence, mass-transfer considerations, and adsorption kinetics // *J. Col. Inter. Sci.* – 1995. – V. 173 (1). – P. 16-27.
331. Sengupta T., Razumovsky L., Damodaran S. Energetics of protein-interface interactions and its effect on protein adsorption // *Langmuir* – 1999. – V. 15 (20). – P. 6991-7001.
332. Miller R., Fainerman V. B., Makievski A. V., Krägel J., Grigoriev D O., Kazakov V. N., Sinyachenko O. V. Dynamics of protein and mixed protein/surfactant adsorption layers at the water/fluid interface // *Adv Colloid Interface Sci.* – 2000. – V. 86. – P. 39-82.
333. Поляков А.В., Даниленко А.Н., Шутов А.Д., Пластина И.Г., Шкодич В.Ф., Кочнев А.М., Заиков Г.Е. Изменение поверхностной активности и реологических свойств адсорбционных слоев глицинина на границе воздух/раствор в результате ограниченного протеолиза папаином // *Вестник Казанского Технологического Университета.* – 2014. – Т17, №1. – с. 210-215.
334. Polyakov A.V., Danilenko A.N., Zhuravleva I.L., Plashchina I.G., Rudakov S.V., Rudakova A.S., Shutov A.D. Improving of the functionality of glycinin by limited papain hydrolysis // Chapter 6 In: *Functional Materials Properties, Performance and Evaluation* (Ed. Klodzinska E.) /Apple Academic Press / 2015 – p. 133-142.
335. Ward A. F. H., Tordai L. Time dependence of boundary tensions of solutions. // *J. Chem. Phys.* – 1946. – V. 14. – P. 453-461.
336. MacRitchie F. Proteins at interfaces // *Adv. Protein Chem.* – 1978. – V. 32. – P. 283-326.
337. de Feijter J. A., Benjamins J. Adsorption kinetics of proteins at the air-water interface // In: *Food Emulsions and Foams* (Ed: Dickinson E.). – London: Royal Society of Chemistry, 1987. – P. 72-85.

338. Xu S., Damodaran S. Kinetics of adsorption of protein at the air-water interface from a binary mixture // *Langmuir*. – 1994. – V. 10. – P. 472-480.
339. Benjamins J., de Feijter F. A., Evans M. T. A., Graham D. E.; Phillips M. C. Dynamic and static properties of proteins adsorbed at the air/water interface // *Faraday Discuss. Chem. Soc.* – 1975. – V. 59. – P. 218-229.
340. Graham D. E., Phillips M. C. Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation // *J. Colloid Interface Sci.* – 1979. – V. 70. – P. 403-414.
341. Tang C.-H., Shen L. Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: Role of conformational flexibility // *Food Hydrocolloids*. – 2015. – V. 43. – P. 388-399.
342. Perez A. A., Carrara C. R., Sanchez C. C., Santiago L. G., Patino J. M. R. Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. // *Food Hydrocolloids*. – 2009. – V. 23. – P. 1253-1262.
343. Damodaran S., Razumovsky L. Role of surface area-to-volume ratio in protein adsorption at the air–water interface // *Surface Science* – 2008. – V. 602. – P. 307-315.
344. Santiago L. G., Maldonado-Valderrama J., Martín-Molina A., Haro-Pérez C., García-Martínez J., Martín-Rodríguez A., Cabrerizo-Vílchez M. A., Gálvez-Ruiz M. J. Adsorption of soy protein isolate at air–water and oil–water interfaces // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* – 2008. – V. 323. – P. 155-162.
345. Dickinson E. *Food Emulsions and Foams: Interfaces, Interactions and Stability* // Dickinson E., Patino R. J. M. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. – 390 p.
346. Wasan, D. T. *Foam and Emulsion Stability: Interfacial rheology and Thin Liquid Film Phenomena*. // In: *Emulsions, Foams, and Thin Films* (Eds: Mittal K. L., Kumar P.). - New York: Marcel Dekker, 2000. – P. 1–30.
347. Benjamins J., Lucassen-Reynders E. H. Surface dilatational rheology of proteins adsorbed at air/water and oil/water interfaces // In: *Proteins at Liquid Interfaces* (Eds: Mobius D., Miller R.). – Amsterdam: Elsevier, 1998. – P. 341-384.
348. Murray B. S. Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2002. – V. 7. – P. 426-431.
349. Patino R. J. M., Carrera C., Nino R. Ma. R., Cejudo M. Structural-dilatational characteristics relationship of monoglyceride monolayers at the air-water interface. // *Langmuir* – 2001. – V. 17. – P. 4003-4013.
350. Patino R. J. M., Carrera C., Nino R., Cejudo M. Structural and dynamic properties of milk proteins spread at the air-water interface. // *J. Colloid Interface Sci.* – 2001. – V. 242. – P. 141-151.

351. Babak V. G., Stébé M. J. Highly concentrated emulsions: physicochemical principles of formulation // *J. Dispersion Sci. Technol.* - 2002. – V. 23. – P. 1-22.
352. Miller R., Ferri J. K., Javadi A., Krägel J., Mucic N., Wüstneck R. Rheology of interfacial layers // *Colloid Polym Sci.* – 2010. – V. 288. – P. 937–950.
353. Piazza L., Durr-Auster N., Gigli J., Windhab E.J., Fischer P. Interfacial rheology of soy proteins – High methoxyl pectin films // *Food Hydrocolloids* – 2009. – V. 23. – P.2125-2131.
354. Noskov B.A. Protein conformational transitions at the liquid-gas interface as studied by dilational surface rheology // *Adv Colloid Interface Sci.* – 2014. – V. 206. – P. 222-238.
355. Dugyala V. R., Muthukuru J. S., Mani E., Basavaraj M. G. Role of electrostatic interactions in the adsorption kinetics of nanoparticles at fluid–fluid interfaces // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2016. – V.18. – P. 5499-5508.
356. Lynch C. J., Rha C. K., Catsimpoolas N. Note on the rapid proteolysis of glycinin by pepsin and trypsin // *Cereal. Chem.* – 1977. – V. 54. – P. 1282-1285.
357. Sun X. D. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation – Review. // *Int. J. Food Sci. Technol.* – 2011. – V. 46. – P. 2447-2459.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность

руководителю работы – к.х.н. Плащиной Ирине Германовне – за внимательное отношение и поддержку на всех этапах выполнения работы;

сотрудникам лаборатории Биохимии растений Государственного Университета Молдовы, в особенности проф., д.б.н. Шутову Андрею Дмитриевичу, за предоставленные образцы и методику проведения ограниченного протеолиза;

сотруднику ИНЭОС РАН Гринбергу В. Я. за плодотворное обсуждение результатов работы;

сотрудникам ИБХФ РАН, в том числе к.ф.-м.н. Кривандину Алексею Владимировичу за исследования белков методом рентгеновского рассеяния; н.с. Даниленко Анатолию Николаевичу за помощь в экспериментальной части работы, д.х.н. Семёновой Марии Германовне и д.х.н. Шишкиной Людмиле Николаевне за внимание и ценные замечания на стадии подготовки диссертации, а также сотрудникам лаборатории физико-химической модификации биополимеров за отзывчивость и поддержку.

Автор благодарит своих супругу и родителей за терпение и поддержку, без которых было бы невозможно выполнение настоящей работы, а также всех тех людей, которые не оставались равнодушными к деятельности автора все эти годы.