

А. В. Поляков, А. Н. Даниленко, С. В. Рудаков, А. С. Рудакова,
А. Д. Шутлов, И. Г. Плащина, В. Ф. Шкодиш, А. М. Кочнев, Г. Е. Заиков

ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА ПАПАИНОМ НА ТЕРМОДИНАМИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ ГЛИЦИНИНА

Ключевые слова: глицинин, соевые бобы, ограниченный протеолиз, папаин, термодинамическая стабильность, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия, термодинамические параметры денатурации.

Исследованы изменения термодинамических параметров глицинина, запасного 11S глобулина семян сои Glycine max, в результате ограниченного протеолиза папаином. Методом адиабатной сканирующей микрокалориметрии определены термодинамические параметры денатурации (температура, энтальпия, энтропия и свободная энергия Гиббса) интактного и модифицированного белков в зависимости от концентрации хлорида натрия в растворе. Установлено, что ограниченный протеолиз глицинина папаином приводит к понижению свободной энергии денатурации белка, то есть к понижению его термодинамической стабильности. Наблюдаемые закономерности в изменениях термодинамических параметров денатурации согласуются с ранее установленными изменениями молекулярных параметров.

Keywords: glycinin, soybeans, limited proteolysis, papain, thermodynamic stability, differential scanning microcalorimetry, denaturation thermodynamic parameters.

Alterations of thermodynamic parameters of glycinin, soybean Glycine max storage 11S globulin, generated by papain limited proteolysis have been investigated. By using adiabatic scanning microcalorimetry method, denaturation thermodynamic parameters (temperature, enthalpy and free Gibbs energy) of intact and modified proteins were determined at different sodium chloride concentrations. It was determined that glycinin limited proteolysis with papain results in lower denaturation free energy of the protein, that is results in lower thermodynamic stability. The described alterations of glycinin thermodynamic parameters coincide with those of molecular parameters previously determined.

Введение

Основными белковыми компонентами семян зернобобовых и масличных культур являются запасные белки, преимущественно глобулины, большую часть которых составляют легумины (11S глобулины). Глицинин – 11S фракция глобулинов соевых бобов – входит в состав обширного относительно консервативного семейства двудомных запасных белков [1]. Легумины имеют высокую пищевую ценность, однако, их использование в качестве структурообразующих компонентов пищевых систем ограничивается недостаточно высокой технофункциональностью. Понятие технофункциональные свойства служит для описания поведения белков в сложных системах и характеризует их пригодность для переработки и хранения. Функциональные свойства белков определяются их структурой и конформационной стабильностью. Так, вязкость, гелеобразующие свойства и способность к текстурированию коррелируют с гидродинамическими характеристиками (размер и форма молекул, их гибкость), тогда как растворимость, водосвязывающая способность, пенообразующие и эмульгирующие свойства определяются характером поверхности молекул (распределением полярных и неполярных групп, поверхностной гидрофобностью) [2].

Конформационная стабильность является важнейшей характеристикой белков и зависит от структуры и характера взаимодействия с растворителем и другими компонентами раствора. Мерой конформационной стабильности является изменение свободной энергии Гиббса при полном конформационном превращении. Этот параметр обычно определяют в процессе термической денатурации или денатурации в присутствии денатурирующего агента (на-

пример, гуанидинхлорида). В первом случае для определения изменения свободной энергии денатурации необходима экстраполяция в область физиологических температур; во втором случае необходима экстраполяция к нулевой концентрации денатурирующего агента. Термодинамические параметры денатурации могут быть определены различными методами. Однако наиболее предпочтительным является метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК), так как он прямой и не требует привлечения информации о механизме процесса денатурации. Напротив, метод ДСК позволяет составить представление о механизме процесса конформационного перехода между упорядоченным и неупорядоченным состоянием макромолекулы.

Одним из наиболее мягких и эффективных способов улучшения технофункциональных свойств запасных глобулинов семян служит ограниченный протеолиз [3,4]. Ограниченный протеолиз обусловлен присутствием в молекулах белкового субстрата пептидных связей с повышенной чувствительностью к действию протеолитических ферментов. После исчерпания чувствительных связей ограниченный протеолиз завершается образованием относительно стабильного высокомолекулярного продукта, отличающегося от исходного белка молекулярными параметрами [5,6].

Изучению функциональных свойств белков, модифицированных путем ограниченного протеолиза, посвящено большое количество работ [4, 7, 8]. Они выполнены, преимущественно, с использованием изолятов и концентратов глобулинов, а также муки зернобобовых культур. Полученные результаты несомненно имеют важное практическое значение, однако, не позволяют установить взаимосвязь между изменением структуры и физико-химических и функ-

циональных свойств глобулинов. Данные по влиянию ограниченного протеолиза на структуру и физико-химические свойства индивидуальных фракций глобулинов весьма ограничены. Наиболее систематически изученным является процесс ограниченного гидролиза леуმიнов трипсином [9,10].

Олигомерная структура молекулы глицинина образуется в результате соединения двух структурно эквивалентных тримеров субъединиц. Субъединицы глицинина синтезируются единой полипептидной цепью, посттрансляционно расщепляющейся с образованием α -цепей (N-концевой домен) и β -цепей (C-концевой домен), соединенных дисульфидной связью. N- и C-концевые домены гомологичны и структурно эквивалентны. [11].

В предыдущей работе [12] нами исследованы изменения молекулярных параметров глицинина при его ограниченном протеолизе папаином. Методами лазерного статического и динамического светорассеяния, малоуглового рентгеновского рассеяния и скоростной седиментации показано снижение при ограниченном протеолизе молекулярной массы, гидродинамического размера, радиуса инерции, поверхностного заряда и степени асимметрии молекулы глицинина, а также увеличение уровня гидрофобности ее поверхности. Установленные изменения молекулярных параметров глицинина в основном согласуются с ранее показанными изменениями первичной структуры его субъединиц при ограниченном протеолизе папаином [13].

Цель работы заключалась в сравнительной характеристике термодинамической стабильности интактного и модифицированного ограниченным протеолизом папаином глицинина и установлении ее взаимосвязи с молекулярными характеристиками. В работе использован метод адиабатной дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. При анализе полученных данных использован подход, развитый Приваловым и сотр. [14]. Выбор папаина обусловлен его низкой специфичностью, что позволяет моделировать условия ограниченного протеолиза глобулинов под действием кислых эндогенных протеиназ в процессе прорастания семян.

Материалы и методика исследований

Выделение и ограниченный протеолиз глицинина

Глицинин выделяли из сухих семян сои (*Glycine max* [L.] Merrill, сорт Ликурич, Молдова) с помощью изоэлектрического осаждения и фракционного высаливания сульфатом аммония [11] с последующей очисткой хроматографией на фенилсефарозе CL-4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) [15]. Для получения глицинина-II выделенный препарат глицинина гидролизovali папаином (Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA) при весовом соотношении фермент/субстрат 1:200 в 0,037 М фосфатно-цитратном буфере pH 5,6, доведенном NaCl до ионной силы 0,5 М, содержащем 0,02% NaN_3 , 1 мМ ЭДТА и 10 мМ 2-меркаптоэтанол, при 30° С в течение 2 часов. Реакцию останавливали добавлением *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) (Sigma, Life Science) до конечной концентрации 5%. Препараты глицинина и глицинина-II

хранили в насыщенном растворе сульфата аммония при 5°С.

Приготовление растворов

Исходные растворы белков получали диализом (мембрана из регенерированной целлюлозы ZelluTrans/Roth с пределом отсечения 12-14 кДа) против 0,05 М фосфатного буфера (0,02% NaN_3 , 0,1% 2-меркаптоэтанол) с соответствующими значениями pH и ионной силы, задаваемой добавлением NaCl. Растворы белка перед измерениями центрифугировали 1 час при 18000 об/мин (Beckman, Model J2-21) и фильтровали через целлюлозные мембранные фильтры (Millipore, USA) с диаметром пор 0,22 мкм. Концентрацию белка в растворах определяли микробиуретовым методом, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта [16].

Определение термодинамических параметров денатурации

Калориметрические исследования проводили на микрокалориметре ДАСМ-4 (НПО Биоприбор, Россия) в температурном диапазоне 10-110 °С при скорости нагревания 2 град/мин и избыточном давлении 0,2 МПа. Объем калориметрической ячейки составлял 0,48 мл. Концентрация белка в пробе - 2 мг/мл. В каждом эксперименте шкалу теплоемкости калибровали с помощью эффекта Джоуля-Ленца [14].

Первичную обработку термограмм и преобразование температурных зависимостей парциальной теплоемкости в функции избыточной теплоемкости перехода проводили с помощью программы Wscal. Базовую линию в области перехода получали сплайн-интерполяцией. За температуру плавления белка, T_d , принимали температуру максимума соответствующей кривой избыточной теплоемкости. Энтальпию плавления, $\Delta H_d^{\text{кап}}$, определяли интегрированием соответствующей кривой избыточной теплоемкости [17].

Результаты и их обсуждение

Мерой термодинамической стабильности молекулы белка является изменение свободной энергии Гиббса при полной денатурации. Для характеристики термодинамической стабильности глицинина и глицинина-II определены термодинамические параметры денатурации обеих форм белка. На рис.1 приведены типичные термограммы (кривые изменения удельной теплоемкости при повышении температуры) растворов глицинина и глицинина-II в 0,05М фосфатном буфере+0,5М NaCl и pH7,6.

Ограниченный протеолиз глицинина папаином вызывает смещение термограммы в область более низких температур, уменьшение площади пика теплопоглощения и повышение инкремента теплоемкости (разности теплоемкостей в нативном и денатурированном состоянии), а также уширение пика теплопоглощения. В таблице 1 приведены термодинамические параметры денатурации глицинина и глицинина-II, определенные из термограмм. Для расчета молярных величин использованы значения молекулярных масс глицинина и глицинина-II, определенные нами методом статического светорассеяния [12].

Как видно из приведенных данных (табл.1), ограниченный протеолиз глицинина сопровождается понижением температуры и энтальпии денатурации.

Повышение инкремента теплоемкости ($\Delta C_{уд}$) свидетельствует об увеличении доступной для растворителя гидрофобной поверхности глицинина-П по сравнению с глицинином. Вследствие ограниченного протеолиза наблюдается также повышение параметра, характеризующего уровень кооперативности процесса денатурации: $\Delta T = \Delta H_d^{кал} / \Delta C_{уд}$, где $\Delta C_{уд}$ – максимальная ордината пика теплопоглощения (табл.1). Повышение ΔT в случае глицинина-П означает понижение уровня кооперативности процесса денатурации модифицированного белка по сравнению с интактным. Модифицированная форма белка характеризуется более низким значением энтропии процесса термоденатурации ($\Delta S_d^{кал}$), что коррелирует с меньшим размером и массой модифицированной формы молекулы.

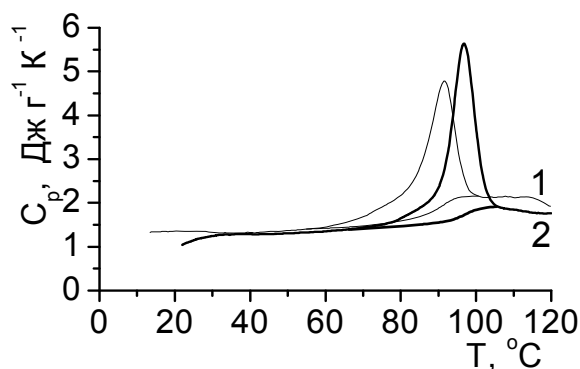


Рис. 1 - Термограммы глицинина (1) и глицинина-П (2) в 0,05M фосфатном буфере при pH7,6 и содержании NaCl 0,5M

Рассчитанная свободная энергия Гиббса денатурации ($\Delta G_d^{кал}$), как универсальный критерий стабильности, также ниже в случае модифицированной формы.

Таблица 1 - Термодинамические параметры денатурации глицинина и глицинина-П в 0,05M фосфатном буфере с pH7,6 и концентрацией NaCl 0,5M

Форма белка	$T_d, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_d^{кал}, 10^3 \text{ кДж/моль}$	$\Delta C_{уд}, \text{кДж/(моль}\cdot\text{K)}$	$\Delta C_{уд}, \text{кДж/(моль}\cdot\text{K)}$	$\Delta T = \Delta H_d^{кал} / \Delta C_{уд}$	$\Delta S_d^{кал}, \text{кДж/(моль}\cdot\text{K)}$	$\Delta G_d^{кал}(25^\circ\text{C}), \text{кДж/моль}$
Глицинин	96,9 ±1,8	12,6 ±0,8	151 ±14	1406 ±103	9,0 ±1,2	34,0 ±3,6	529 ±42
Глицинин-П	91,7 ±1,8	9,2 ±0,7	173 ±15	763 ±95	12,0 ±1,5	25,2 ±3,0	411 ±38

Ранее при исследовании ограниченного протеолиза глицинина папаином [13] установлено, что в ходе протеолиза происходит расщепление связки β -баррель/ α -спирали и последующее отщепление всей обширной C-концевой последовательности α -цепей,

охватывающей гипервариабельный участок и всю область α -спиралей; при этом бесструктурная петля α -цепей остается интактной так же, как и β -цепи. Таким образом, субъединицы глицинина-П, конечного продукта ограниченного протеолиза глицинина папаином, состоят из «оголенного» β -барреля α -цепей, соединенного с интактными β -цепями 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 [13]. Таким образом, очевидно, что понижение энтальпии денатурации при ограниченном протеолизе обусловлено потерей фрагментов упорядоченной структуры молекулы.

Влияние концентрации хлорида натрия на термодинамические параметры (температуру и молярную энтальпию) денатурации глицинина и глицинина-П продемонстрировано на рис. 2. При одинаковых концентрациях соли в растворах температуры денатурации белков в интактной форме выше соответствующих температур для модифицированной формы во всем исследованном диапазоне концентраций NaCl.

Удельные энтальпии обеих форм глицинина возрастали с повышением содержания соли в растворе, однако для модифицированной формы была выявлена более сильная зависимость, выражающаяся в большем инкременте кривой. Различия в значениях параметров денатурации интактной и модифицированной форм белка указывают на различия в характере стабилизирующего влияния хлорида натрия на стабильность изучаемых белков. Известно, что действие соли имеет электростатическую и лиотропную составляющие [18]. Можно полагать, что изменения инкремента температуры и энтальпии в данном случае является отражением изменения этих вкладов в стабильность интактной и модифицированной форм белка, так как величины их поверхностных зарядов и доступной гидрофобной поверхности различны [12].

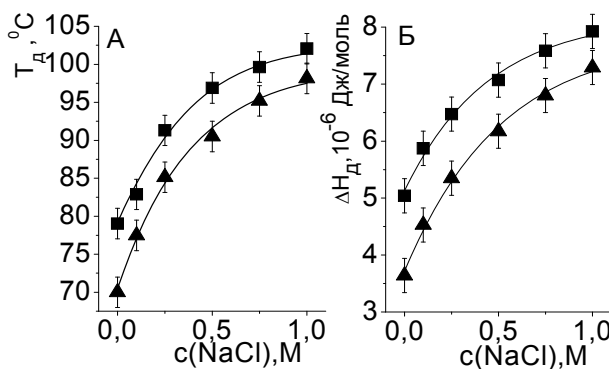


Рис. 2 - Зависимость температуры (А) и молярной энтальпии (Б) денатурации глицинина (квадраты) и глицинина-П (треугольники) от концентрации NaCl в растворе. Фосфатный буфер 0,05M, pH7,6

На основе параметров, полученных из термограмм (T_d , $\Delta H_d^{кал}$, $\Delta C_{уд}$), с использованием уравнений (1), (2) и (3) рассчитаны температурные зависи-

мости стандартных термодинамических функций (энтальпии, энтропии и энергии Гиббса) денатурации глицинина и глицинина-П. Используемые уравнения обычно применяют в химической термодинамике для описания равновесных процессов, характеризующихся изменением теплоёмкости, независящим существенно от температуры [14].

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_d) - \Delta C_{уд}(T_d - T) \quad (1)$$

$$\Delta_d S(T) = \Delta_d H(T_d)/T_d - \Delta_d C_{уд}[\ln(T_d/T)] \quad (2)$$

$$\Delta_d G(T) = \Delta_d H(T_d)(1 - T/T_d) - \Delta_d C_{уд}\{(T_d - T) - T[\ln(T_d/T)]\} \quad (3)$$

На рис.3 приведены графики зависимостей свободной энергии термоденатурации глицинина и глицинина-П от температуры при различных концентрациях NaCl в растворе. Увеличение концентрации соли в растворе приводит в обоих случаях к увеличению свободной энергии денатурации белков, что свидетельствует о повышении термодинамической стабильности обеих форм белка. 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.

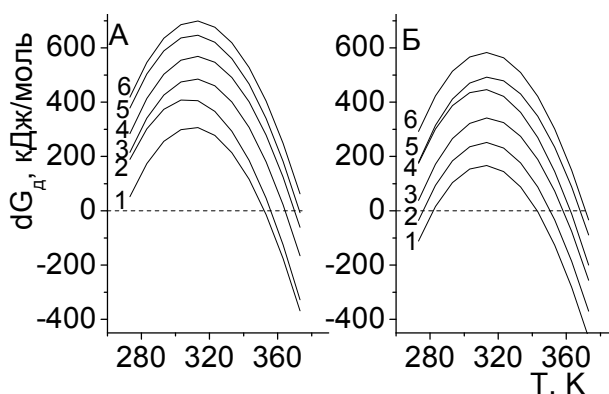


Рис. 3 - Зависимость свободной энергии Гиббса денатурации глицинина (А) и глицинина-П (Б) от температуры при различных концентрациях хлорида натрия в растворе (фосфатный буфер 0,05М, рН 7,6, концентрация NaCl: 1 - 0,0 М, 2 - 0,1М, 3 - 0,25 М, 4 - 0,5 М, 5 - 0,75 М, 6 - 1,0 М)

Как следует из рис. 3, абсолютные значения величин энергии Гиббса денатурации и, следовательно, термодинамическая стабильность модифицированной формы глицинина ниже, чем интактной. Кроме того, температурный интервал стабильности глицинина-П в растворе также значительно уже, чем глицинина.

Закключение

Установлено, что ограниченный протеолиз существенно влияет на термодинамическую стабильность глицинина. Он вызывает понижение как термодинамической стабильности глицинина, так и уровня кооперативности конформационного перехода

да глобула-клубок. Сопоставление наблюдаемых в ходе ограниченного протеолиза папаином изменений параметров молекулярной структуры и термодинамической стабильности молекул глицинина позволяет прийти к заключению, что понижение конформационной стабильности глицинина при ограниченном протеолизе папаином не сопровождается потерей четвертичной и третичной структуры, а обусловлено лишь глубокой перестройкой внутримолекулярных связей вследствие потери слабоструктурированных фрагментов С-концевых α-цепей и части внутримолекулярных водородных связей [13]. Наблюдаемые изменения молекулярных параметров и понижение конформационной стабильности молекулы глицинина при ограниченном протеолизе папаином благоприятны для повышения его функциональных свойств. В частности, понижение плотности заряда и повышение поверхностной гидрофобности глицинина при модификации ограниченным протеолизом папаином должны приводить к увеличению поверхностной активности белка; уменьшение гидродинамического размера – к повышению скорости диффузии, и в сочетании с понижением конформационной стабильности молекулы белка – к повышению скорости формирования адсорбционного слоя.

Предполагаемые эффекты действительно наблюдались, что будет продемонстрировано в следующей статье.

Литература

1. A.D. Shutov, H. Bäumlein *Seed Proteins*. Springer, Netherlands, 1999. С. 543-561.
2. J. Kinsella, D. M. Whitehead and L. G. Phillips *Structure-Function Properties of Food Proteins* Elsevier Science & Technology Books, Amsterdam, 1994. 271 с.
3. V. P. Bulmaga, A. D. Shutov, I. A. Vaintraub *Nahtung-food.*, 33, 1, 25-29 (1989).
4. M. B. Barać, S. P. Stanojević, S. T. Jovanović and M. B. Pešić *APTEFF*, 35, 1-280 (2004).
5. A.D. Shutov, J. Pineda, V. I. Senyuk, V. A. Reva, I. A. Vaintraub *Eur J Biochem.* 199, 3, 539-543 (1991)
6. I.A. Vaintraub *Nahrung.*, 42, 59-60 (1998)
7. S.Y. Kim, P.S.W. Park, K.C. Rhee *J.AgricFood Chem.* 38,651-656 (1990).
8. W.U. Wu, N. S. Hettiarachchy, M. Qi, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 845-850 (1998).
9. Braudo E.E., A.N.Danilenko, P.V.Guslyannikov, G.O.Kozhevnikov, G.P.Artykova, N.A.Lapteva, L.A.Vaintraub, E.Sironi, M.Duranti *Int J Biol Macromol.*, 39, 4-5, 174-178 (2006).
10. K.D. Schwenke, T. Henning; S. Dudek; H. Dautzenberg, A. N. Danilenko, G. O. Kozhevnikov, E. E. Braudo, *INT J BIO M*, 28, 2, 175-182 (2001).
11. M. Adachi, J. Kanamori, T. Masuda, K. Yagasaki, K. Kitamura, B. Mikami, S. Utsumi *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 7395-7400 (2003)
12. А.В. Поляков, А.Н. Даниленко, А.В. Кривандин, С.В. Рудаков, А.С. Рудакова, А.Д. Шутов, И.Г. Плащина, Г.Е. Заиков, О.Н. Кузнецова *Вестник Казанского Технологического Университета*, 9, 184-190 (2013).
13. A.D. Shutov, A. Rudakova, S. Rudakov, I. Kakhovskaya, A. Schallau, N. Maruyama, K. Wilson *J. Plant. Physiol.*, 169, 1227-1233 (2012)
14. P. Privalov, *Methods in Molecular Biology*, 490, 1-39 (2009).

15. A.D. Shutov, V.I. Senyuk, I.A. Kakhovskaya, *J. Pineda Biokhimiya*, 58, 174-182 (1993)
16. R. F. Itzhaki, D. M. Gill *Analytical Biochemistry*, 9, 4, 401-410 (1964)

17. H. J. Hinz, F. P. Schwarz *Pure Appl. Chem.*, 73, 4, 745-759 (2001)
18. T.M. Bikbov, V. Ya. Grinberg, A. N. Danilenko, T. S. Chaika, I. A. Vaintraub, and V. B. Tolstoguzov *Colloid & Polymer Sci*, 261,346-358 (1983).

© **А. В. Поляков** – асп. лаб. физико-химической модификации биополимеров, Институт биохимической физики им. М.Н.Эмануэля РАН, polyakov-a-v@mail.ru; **А. Н. Даниленко** – вед. науч. сотр. той же лаборатории, ana-danilenko@yandex.ru; **С. В. Рудаков** – мл. науч. сотр. лаб. биохимии растений, Государственный университет Молдовы, Rudik66 @ mail.ru; **А. С. Рудакова** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. той же лаборатории, Rud-as@ mail.ru; **А. Д. Шутов** – д-р биол. наук, проф., гл. науч. сотр. той же лаборатории, shutovandrei@yahoo.com; **И. Г. Плащина** – канд. хим. наук, зав. лаб. физико-химической модификации биополимеров, Институт биохимической физики им. М.Н.Эмануэля РАН, igplashchina@sky.chph.ras.ru; **В. Ф. Шкодич** – канд. хим. наук, доц. каф. технологии синтетического каучука КНИТУ, shkodich@mail.ru; **А. М. Кочнев** – д.п.н., проф., зав. каф. технологии синтетического каучука КНИТУ, kochnev55@bk.ru; **Г. Е. Заиков** - д.х.н., профессор каф. технологии пластических масс КНИТУ, gezaikov@yahoo.com.