

Введение Глицинин входит в состав обширного относительно консервативного семейства легуминов, двудомных запасных 11S глобулинов в семенах как покрытосеменных, так и голосеменных [1]. Легумины как основные запасные белки в семенах зернобобовых и масличных культур имеют высокую пищевую ценность. Однако, их использование в качестве структурообразующих компонентов пищевых систем ограничивается недостаточно высокой технофункциональностью. Одним из наиболее мягких и эффективных способов улучшения технофункциональных свойств запасных глобулинов семян может быть ограниченный протеолиз. [2,3]. Ограниченный протеолиз обусловлен присутствием в молекулах белкового субстрата пептидных связей с повышенной чувствительностью к протеолитической атаке. После исчерпания чувствительных связей ограниченный протеолиз завершается образованием относительно стабильного высокомолекулярного продукта, отличающегося от исходного белка молекулярными параметрами. Дальнейший массированный (неограниченный) протеолиз протекает как реакция псевдопервого порядка по кооперативному механизму без качественных изменений субстрата [4,5].

Олигомерная молекула 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. 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) [6] и A3B4 (pdb|1od5) [7]. В отличие от β -цепей, α -цепи содержат три протяженных бесструктурных участка, 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. Эти участки наиболее чувствительны к ограниченному протеолизу, что было установлено при исследовании гидролиза глицинина трипсином [8]. Иные результаты были получены при исследовании гидролиза глицинина папаином [9]. В ходе ограниченного протеолиза папаином происходит не только расщепление связки β -баррель/ α -спирали, но и последующее отщепление всей обширной C-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. 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 [9]. Глицинин приобретает способность к неограниченному (кооперативному) протеолизу папаином только после завершения ограниченного протеолиза. Это может свидетельствовать о закономерных изменениях структуры глицинина в ходе ограниченного протеолиза, связанных всего лишь с ослаблением взаимодействий между субъединицами в полумолекулах. Однако, невзирая на такое ослабление, гексамерная структура глицинина сохраняется и после его превращения в глицинин-П [9]. Возможно, в ходе ограниченного протеолиза происходит более глубокая реорганизация структуры глицинина. В настоящей работе исследованы изменения молекулярных параметров глицинина при его ограниченном протеолизе папаином в сопоставлении с предполагаемой первичной структурой глицинина-П, описанной ранее [9].

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 [7] с последующей очисткой хроматографией на фенил-сефарозе CL-4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) [10]. Для получения глицинина-П выделенный препарат глицинина гидролизовали 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% NaN₃, 1 мМ ЭДТА и 10 мМ 2-меркаптоэтанол, при 30° С в течение 2 час. Реакцию останавливали добавлением trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) (Sigma, Life Science) до конечной концентрации 5%. Препараты глицинина и глицинина-П хранили в насыщенном растворе сульфата аммония при 50С. 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% NaN₃, 0,1% 2-меркаптоэтанола) 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 [11]. Статическое светорассеяние Средневесовую молекулярную массу и второй вириальный коэффициент определяли с помощью метода Рэлеевского рассеяния с использованием оборудования Zeta Sizer Nano (ZEN 3600, Malvern Instrument, UK), оснащенном 4 мВт He-Ne лазером ($\lambda=633$ нм). Измерения избыточной интенсивности рассеяния как функции концентрации белка в растворе проводили при 25° С и постоянном угле рассеяния 173°. Так

как размеры молекул белков существенно меньше длины волны лазера, то результаты измерений представляли в виде графиков Дебая по уравнению $KC/R\theta = 1/M_w + 2B_2 \cdot C$, (1) где M_w - средневесовая молекулярная масса белка, кДа; B_2 - второй вириальный коэффициент в разложении химического потенциала по концентрации белка в бинарном растворе, характеризующий энергию парных взаимодействий белок-растворитель, моль·мл/г²; C - концентрация белка в растворе, г/мл; $R\theta$ - отношение Рэлея, см⁻¹, K - оптическая константа, определяемая из уравнения (2) $K = 2\pi^2 (n_0 \, dn/dc)^2 / \lambda^4 N_A$, (2) где n_0 - коэффициент преломления растворителя; dn/dc - инкремент коэффициента преломления света раствора, мл/г; λ - длина волны источника излучения, нм; N_A - число Авогадро. Отношение Рэлея $R\theta = I_A n_0^2 RT / I_T n_T^2$, (3) где I_A - разность интенсивностей рассеяния раствора и растворителя; I_T - интенсивность рассеяния толуола; n_T - показатель преломления толуола; RT - рэлеевское отношение толуола, равное $1,35 \cdot 10^{-5}$ см⁻¹. Определение ζ -потенциала Для определения ζ -потенциала молекул белка измеряли электрофоретическую подвижность макроионов методом лазерного электрофореза. Скорости движения частиц определяли с помощью лазерного доплеровского измерителя скорости Laser Doppler Velocimetry (LDV), которым оснащен Zeta Sizer Nano (ZEN 3600) (Malvern Instrument, UK). Значения ζ -потенциала рассчитывали на основе закона Генри: $UE = 2\varepsilon\xi f(KA)/3\eta$, (4) где UE - электрофоретическая подвижность, см²/(В·с); ε - диэлектрическая постоянная растворителя; ξ - зета-потенциал, В; η - вязкость растворителя, Па·с; $f(KA)$ - функция Генри, значение которой для водных растворов равно 1,5. Динамическое светорассеяние Коэффициент диффузии (D) и эффективный гидродинамический размер (RH) молекул белка определяли методом динамического рассеяния света при 25°C и фиксированном угле рассеяния 173° с использованием Zeta Sizer Nano (ZEN 3600, Malvern Instrument, UK). Анализ полученных автокорреляционных функций интенсивности рассеяния растворов глицина и глицина-П в диапазоне концентраций белка 0,05-0,16 мг/мл осуществляли автоматически с помощью встроенного программного обеспечения Zetasizer Software 6.20. Protein Analysis по уравнению: $g_2(t)-1 = \beta [fA(\tau)\exp(-t/\tau) \int d\tau]^2$ (5) где $g_2(t)$ - автокорреляционная функция; t - время задержки корреляционной функции, с; β - коэффициент, учитывающий отклонение от идеальной корреляции; τ - время релаксации, с; $A(\tau)$ - распределение времен релаксации. Коэффициент поступательной диффузии определяли из соотношения: $D = \Gamma/q^2$ (6) где $\Gamma = \tau^{-1}$ - частота релаксации, с⁻¹; q - вектор рассеяния, зависящий от коэффициента преломления растворителя (n), угла рассеяния (θ) и длины волны падающего луча (λ): $q = 4\pi n \sin(q/2)/\lambda$ (7) Для обработки корреляционных кривых использовали метод неотрицательных наименьших квадратов (NNLS). Гидродинамический радиус молекул белка рассчитывали с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна: $RH = kT / (6\pi\eta D)$, (8) где k - константа Больцмана, Дж/К; T - абсолютная температура, К, η

- динамическая вязкость растворителя, Па·с, D – коэффициент диффузии, м²/с. Малоугловое рентгеновское рассеяние Измерение интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния растворов белка проводили на дифрактометре, описанном в работе [12], в интервале величин дифракционного вектора S от 0,15 до 3 нм⁻¹, где $S = (4\pi \sin q)/\lambda$, q – половина угла рассеяния, λ – длина волны рентгеновского излучения CuK α (0,154 нм). Обработку данных малоуглового рассеяния и введение коллимационной поправки выполняли как в работе [12]. Радиус инерции R_g белковых макромолекул определяли при помощи программы PRIMUS [13] с аппроксимацией начальных участков кривых малоуглового рассеяния по методу Гинье [14] функцией: $I(S) = I(0)\exp\{-(SR_g)^2/3\}$ (9)

Скоростная седиментация Коэффициенты седиментации определяли на аналитической ультрацентрифуге «Beckman, Model E» с фотоэлектрической сканирующей абсорбционной оптической системой при длине волны света 280 нм, скорости вращения ротора 52000 об/мин и температуре 20^oС в 0,05М фосфатном буфере pH 7,6, содержащем 0,5 М NaCl и 0,1% 2-меркаптоэтанола. При обработке седиментограмм использовали программное обеспечение SEDFIT [15]. Приведение значений коэффициентов седиментации к стандартным условиям (20^oС, вода) осуществляли в соответствии с уравнением: $S_{0,20,вода} = S_{T,буф} (\eta_{T,буф}/\eta_{T,вода}) \cdot (1 - \rho_{20,вода} \cdot v_{уд,20,вода} / (1 - \rho_{T,буф} \cdot v_{уд,T,буф}))$ (10)

Молекулярную массу глицинина и глицинина-П рассчитывали по формуле Сведберга [16]: $MSD = (s_{0,w}/D_{0,w}) \times (RT/(1 - v_{уд} \cdot \rho))$ (11) где S_{0,w} и D_{0,w} – соответственно коэффициенты седиментации и диффузии белка при бесконечном разбавлении (табл.1); R – газовая постоянная; T=293^oС; v_{уд} – парциальный удельный объем (0,730±0,004 и 0,721±0,005 см³·г⁻¹ для глицинина и глицинина-П, соответственно); ρ – плотность растворителя (1,021±0,005 г·см⁻³). Денситометрия Парциальный удельный объем определяли по данным измерения плотности растворов глицинина и глицинина-П на автоматическом денсиметре АД-1 (НПО “Биоприбор”, Пущино). Результаты и их обсуждение Молекулярная масса и второй вириальный коэффициент Графики Дебая для растворов глицинина и глицинина-П линейны (рис. 1, условия - 0,05 М фосфатный буфер pH 7,6; 0,5 М NaCl). Средневесовые молекулярной массы (M_w) глицинина и глицинина-П, рассчитанные как обратные величины значений отрезков, отсекаемых на оси ординат при линейной экстраполяции графиков Дебая, приведенные в табл. 1, составляют 331±21кДа (глицинин) и 264±24кДа (глицинин-П). Таким образом, молекулярная масса глицинина при его превращении в глицинин-П снижается приблизительно на 70 кДа. Близкие результаты были получены ранее [9] на основе расчетов среднечисленных молекулярных масс (M_n) по известным аминокислотным последовательностям субъединиц в гетерогексамере глицинина и по предполагаемой первичной структуре субъединиц гетерогексамера глицинина-П (соответственно 325 кДа и 250 кДа). Рис. 1 - Графики Дебая для растворов глицинина (А) и глицинина-П (Б)

Угловой коэффициент графика Дебая использовали для определения второго вириального коэффициента (B_2) в разложении химического потенциала по концентрации белка в бинарном растворе. Значения B_2 для глицинина и глицинина-П составили соответственно $(3,57 \pm 0,21) \cdot 10^{-4}$ и $(1,31 \pm 0,16) \cdot 10^{-4}$ мл·моль/г² (Табл. 1). Таким образом, при превращении глицинина в глицинин-П взаимодействия молекул белка и растворителя остаются термодинамически предпочтительными, но его сродство к растворителю достоверно снижается. Это может быть следствием экспонирования к растворителю большего числа гидрофобных аминокислотных остатков. Подобное явление наблюдалось при ограниченном протеолизе легумина кормовых бобов трипсином [18].

Зависимость ξ - потенциала молекул глицинина и глицинина-П от pH

Практически во всем интервале значений pH (от 3 до 11) абсолютная величина ξ - потенциала молекул глицинина-П ниже, чем у глицинина, что свидетельствует о понижении суммарного поверхностного заряда глицинина при его превращении в глицинин-П. Значения pH, при которых ξ -потенциалы обоих белков равны нулю (приблизительно соответствуют pI глицинина [19]), практически совпадают и равны $5,0 \pm 0,1$. Этот результат кажется необычным, поскольку по крайней мере начальный этап ограниченного протеолиза глицинина и других 11S глобулинов заключается в экспериментально установленном последовательном отщеплении гипервариабельного участка α -цепей, обогащенного кислыми аминокислотами [8,10]. Сопоставление аминокислотного состава глицинина и глицинина-П показывает существенное снижение содержания заряженных аминокислот (от 25,5% до 19,9%) и увеличение содержания гидрофобных аминокислот (от 42,0% до 45,5%) [9]. Это согласуется с результатами сопоставления ξ -потенциала молекул глицинина и глицинина-П (рис. 2), а также со снижением второго вириального коэффициента при ограниченном протеолизе (рис. 1). Отметим, что величина B_2 для глицинина-П остается положительной, что может быть связано с определенным увеличением относительного содержания в нем незаряженных полярных аминокислот (от 32,5% до 34,6%). Константа диффузии и гидродинамический размер молекул глицинина и глицинина-П. Для определения константы диффузии D_0 и эффективного гидродинамического радиуса R_H молекул глицинина и глицинина-П получали корреляционные функции рассеяния при разных концентрациях белка. Полученные значения коэффициента диффузии и, соответственно, гидродинамического размера не обнаруживали систематической зависимости от концентрации белка. За значение константы диффузии и действительный эффективный размер принимали усредненные значения D_0 и R_H в интервале значений, не зависящих от концентрации белка. Полученные значения параметров приведены в Табл.1. Очевидно, что ограниченный протеолиз сопровождается небольшим повышением коэффициентов диффузии и понижением эффективного гидродинамического размера макромолекул глицинина вследствие снижения

молекулярной массы глицина и, возможно, вследствие увеличения плотности упаковки молекулы белка при формировании глицина-П в связи с отщеплением бесструктурного С-концевого участка α -цепей. Радиус инерции молекул глицина и глицина-П. Отличия кривых малоуглового рентгеновского рассеяния растворов глицина и глицина-П отражают структурные изменения молекулы глицина при его превращении в глицин-П. Кривые малоуглового рентгеновского рассеяния растворов глицина-П и глицина в координатах Гинье (уравнение 9) и их аппроксимация по формуле Гинье показаны на рис. 2 (условия - 0,05 М фосфатный буфер pH 7,6; 0,5 М NaCl, точки - экспериментальные значения, прямые линии - результат аппроксимации). Для глицина-П наблюдается протяженная область S (примерно от 0,18 до 0,60 нм⁻¹), в которой интенсивность рассеяния хорошо аппроксимируется по формуле Гинье (9) (рис. 2Б). Этой области соответствует радиус инерции $R_g = 4,15 \pm 0,02$ нм. (Табл.1). Для глицина аппроксимация Гинье в том же интервале S неприменима (рис. 2А). На начальном участке кривой рассеяния ($S \approx 0,10$ нм⁻²) наблюдается резкий подъем интенсивности, обусловленный присутствием в растворе агрегатов молекул глицина. Рис. 2 - Кривые малоуглового рентгеновского рассеяния растворов глицина (А) и глицина-П (Б) в координатах Гинье и их аппроксимация по формуле (9). Значение $R_g \approx 6,3$ нм, определенное по этому участку кривой рассеяния (рис. 2А) позволяет оценить средний радиус инерции глицина в смеси с его агрегатами. Для линейного участка зависимости $\log I$ (S) в интервале S от 0,40 до 0,57 нм⁻¹, (рис. 2А) $R_g = 4,25 \pm 0,05$ нм. Это значение вполне может соответствовать молекулярно дисперсному состоянию глицина. В этом же интервале S значение R_g для глицина-П равно $4,11 \pm 0,05$ нм, т.е. лишь незначительно меньше значения $R_g = 4,15 \pm 0,02$ нм, полученного для глицина-П в интервале S от 0,18 до 0,62 нм⁻¹ (рис. 2Б). Таким образом, из данных малоуглового рентгеновского рассеяния следует, что R_g глицина-П лишь незначительно меньше, чем R_g глицина (примерно на 0,1 нм, т.е., приблизительно на 2%). Дополнительным подтверждением различий в структуре глицина и глицина-П является различие в форме кривых рентгеновского рассеяния при $S > 0,6$ нм⁻¹ (данные не представлены). Минимум на кривой рассеяния глицина лежит вблизи $S \approx 0,9$ нм⁻¹, а для глицина-П - при $S \approx 1,0$ нм⁻¹. Такие отличия в кривых малоуглового рассеяния, скорее всего, свидетельствуют о более компактной структуре глицина-П по сравнению с глицином. Коэффициенты седиментации и фрикционные отношения глицина и глицина-П В Табл.1 приведены значения коэффициентов седиментации, приведенные к стандартным условиям и экстраполированные к нулевой концентрации. Здесь же представлены значения молекулярных масс $M_{S,D}$ глицина и глицина-П, рассчитанные на основании уравнения Сведберга. Очевидно, что полученные значения $M_{S,D}$ в пределах ошибки эксперимента совпадают со значениями M_W ,

полученными статическим рассеянием. Сочетание уравнений Сведберга (11) и Стокса-Эйнштейна (8) и значения молекулярной массы MW использовано для расчета радиуса Стокса (RS) интактного и модифицированного глицинина с целью сравнения его с гидродинамическим радиусом (RH), полученным из данных динамического светорассеяния. Как следует из Табл.1, величины этих параметров близки. Для оценки степени асимметрии молекул обоих белков использован полуколичественный критерий - фрикционное отношение f/f_{min} . 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 [20]. Величина фрикционного отношения может быть определена на основе данных динамического светорассеяния, как $f/f_{min} = R_H / R_{min}$ (12) где R_H – эффективный гидродинамический радиус, нм, а R_{min} – минимальный радиус, соответствующий гладкой негидратированной сфере, нм. Отношение фрикционных коэффициентов можно также получить на основе данных о молекулярной массе MW и коэффициенте седиментации молекулы белка [20] по уравнению: $f/f_{min}^* = S_{max}/S = 0.00361M^{2/3}/S$, (13) где $f_{min} = 6\pi\eta R_{min}$ – фрикционный коэффициент гладкой негидратированной сферы, имеющей минимальный радиус R_{min} и, соответственно, максимальный коэффициент седиментации S_{max} . Аналогичный смысл имеет и параметр ρ , предложенный [21] для характеристики формы макромолекул: $\rho = R_G/R_H$ (14) Для удобства сравнения в Табл.1 приведены обратные величины ρ . Здесь же приведены величины параметров f/f_{min} и f/f_{min}^* . Все три подхода позволяют получить близкие значения степени асимметрии молекул интактного и модифицированного глицинина. Значения для обеих форм белка находятся в интервале, типичном для глобулярных белков. При этом глицинин характеризуется более высокой асимметрией формы молекулы, чем глицинин-П. Полученные для интактного глицинина значения фрикционных отношений соответствуют литературным данным. Так по данным [22,23] эти величины равны 1,33 и 1,44, соответственно. Таблица 1 - Молекулярные параметры глицинина и глицинина-П. Условия: 0,05М фосфатный буфер, pH 7,6, 0,5М NaCl, 0,1% меркаптоэтанола; температура 25°C

Параметры	Глицинин	Глицинин-П
Молекулярная масса MW, кДа (из статического рассеяния света)	331±21	264±20
Второй вириальный коэффициент B ₂ , (мл•моль/г ²).10 ⁻⁴	3,57±0,21	1,64±0,18
Константа диффузии D ⁰ _{w,20} , (см ² /сек) 10 ⁻⁷	3,49±0,13	4,14±0,12
Эффективный гидродинамический радиус R _H , нм	6,12±0,18	5,16±0,15
Радиус инерции R _g , нм	4,25±0,05	4,15±0,02
Коэффициент седиментации S, 10 ¹³ с	10,8±0,2	10,6±0,2
Константа седиментации S ⁰ _{w,20} , 10 ¹³ с	12,2±0,3	11,9±0,3
Молекулярная масса M _{S,D} , кДа (из уравнения Сведберга)	340±23	275±25
Радиус Стокса R _S , нм	5,97±0,27	5,07±0,24
Радиус гладкой негидратированной сферы R _{min} , нм	4,56±0,10	4,23±0,10
Фрикционное отношение f/f _{min}	1,34±0,04	1,22±0,03
Фрикционное отношение f/f _{min} [*]	1,42±0,05	1,25±0,05
Структурный фактор 1/ρ		

1,44±0,06 1,24±0,05 Выводы Согласно полученным экспериментальным данным, ограниченный протеолиз папаином приводит к снижению молекулярной массы, гидродинамического размера и радиуса инерции, а также степени асимметрии молекулы глицинина. Глицинин-П, относительно стабильный продукт ограниченного протеолиза глицинина папаином [9], отличается от интактного глицинина более низкими плотностью заряда и сродством к растворителю. Обнаруженные изменения молекулярных параметров глицинина позволяют прогнозировать улучшение в ходе ограниченного протеолиза его функциональных свойств (в частности, повышение поверхностной активности, динамики формирования и реологических свойств адсорбционных слоев на межфазной границе с неполярной средой и, как следствие, повышение эмульгирующей и пенообразующей способности).