

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 двудоменных 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 (например, 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 функциональных 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 легуминов 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 фенил-сефарозе CL-4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) [15]. 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 часов. Реакцию останавливали добавлением trans-ε-oxysuccinyl-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-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 оС 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_д, принимали температуру максимума соответствующей кривой избыточной теплоемкости. Энтальпию плавления, ΔH_дкал, 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-П определены термодинамические параметры денатурации обеих форм белка. На рис.1 приведены типичные термограммы (кривые изменения удельной теплоемкости при повышении температуры) растворов глицинина и глицинина-П 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-П, определенные из термограмм. Для расчета молярных величин

использованы значения молекулярных масс глицинина и глицинина-П, 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: $\Delta T = \Delta H_{дккал} / A_{mp}$, где A_{mp} - 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 ($\Delta S_{дккал}$), что коррелирует с меньшим размером и массой модифицированной формы молекулы. Рис. 1 - Термограммы глицинина (1) и глицинина-П (2) в 0,05М фосфатном буфере при pH7,6 и содержании NaCl 0,5М. Рассчитанная свободная энергия Гиббса денатурации ($\Delta G_{дккал}$), как универсальный критерий стабильности, также ниже в случае модифицированной формы. Таблица 1 - Термодинамические параметры денатурации глицинина и глицинина-П в 0,05М фосфатном буфере с pH7,6 и концентрацией NaCl 0,5М

Форма белка	T_d , оС	$\Delta H_{дккал}$, 103 кДж/моль	ΔC_p , кДж/(моль·К)	A_{mp} , кДж/(моль·К)	$\Delta T = \Delta H_{дккал} / A_{mp}$	$\Delta S_{дккал}$, кДж/(моль·К)	$\Delta G_{дккал}(25^\circ C)$, кДж/моль
Глицинин	96,9 ± 1,8	151 ± 14	1406 ± 103	9,0 ± 1,2	34,0 ± 3,6	529 ± 42	96,9 ± 1,8
Глицинин-П	91,7 ± 1,8	9,2 ± 0,7	173 ± 15	763 ± 95	12,0 ± 1,5	25,2 ± 3,0	91,7 ± 1,8

Ранее при исследовании ограниченного протеолиза глицинина папаином [13] установлено, что в ходе протеолиза происходит расщепление связки b-баррель/a-спирали и последующее отщепление всей обширной C-концевой последовательности a-цепей, охватывающей гипервариабельный участок и всю область a-спиралей; при этом бесструктурная петля a-цепей остается интактной так же, как и b-цепи. Таким образом, субъединицы глицинина-П, конечного продукта ограниченного протеолиза глицинина папаином, состоят из «оголенного» b-барреля a-цепей, соединенного с интактными b-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 a-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 0,05М, рН7,6 На основе параметров, полученных из термограмм (Тд, ΔНдккал, ΔСуд), с использованием уравнений (1), (2) и (3) рассчитаны температурные зависимости 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].

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

$$\Delta dS(T) = \Delta dH(T_d)/T_d - \Delta dC_{уд}[\ln(T_d/T)] \quad (2)$$

$$\Delta dG(T) = \Delta dH(T_d)(1-T/T_d) - \Delta dC_{уд}\{(T_d-T) - T[\ln(T_d/T)]\} \quad (3)$$

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, концентрации 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. Заключение Установлено, что ограниченный протеолиз существенно влияет на термодинамическую

стабильность глицинина. Он вызывает понижение как термодинамической стабильности глицинина, так и уровня кооперативности конформационного перехода 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.