

Введение Лигумены представляют собой обширный класс запасных белков зернобобовых культур, имеющий значительный потенциал для расширения сырьевой базы пищевого белка, а также для технического использования в качестве экологичных адгезивов - альтернативы адгезивам на основе фенолформальдегидных смол [1]. Олигомерная молекула глицинина (лигумин соевых бобов) характеризуется гексамерной четвертичной структурой с коэффициентом седиментации 11S. Она образуется в результате соединения двух тримеров субъединиц [2]. Благодаря компактной и жесткой третичной структуре, которая стабилизирована дисульфидными связями, лигумины характеризуются недостаточно высокими функциональными свойствами [3,4]. Одним из наиболее эффективных и экологичных методов улучшения функциональных свойств белков является их ограниченный протеолиз с помощью ферментов, обладающих способностью селективно воздействовать на различные участки белковой глобулы. Ограниченный протеолиз происходит с замедлением по мере убывания числа чувствительных участков и завершается образованием стабильного высокомолекулярного продукта, отличающегося от исходного белка структурой и, как следствие, физико-химическими и функциональными свойствами. Установлено, что улучшение функциональных свойств модифицированных белков в значительной степени связано с уменьшением их молекулярной массы и размеров 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 [5,6] и эмульгирующую [7] способности белка. Ранее было показано, что в результате ограниченного протеолиза изолятов и концентратов белков сои алькалазой, химотрипсином, трипсином, бромелайном и некоторыми другими ферментами улучшается растворимость, эмульгирующие и пенообразующие свойства, гелеобразующая способность [8,9], тогда как более глубокий гидролиз часто вызывает потерю некоторых функциональных свойств [10]. Ограниченный протеолиз белков сои может приводить также к понижению их аллергенности [11] и увеличению атакваемости ферментами желудочно-кишечного тракта [10]. Выбор папаина в качестве модифицирующего фермента для ограниченного протеолиза глицинина обусловлен рядом обстоятельств. Во-первых, действие папаина на лигумины зернобобовых культур максимально моделирует процесс их гидролиза под действием кислых эндогенных папаиноподобных протеаз в ходе прорастания бобов зернобобовых культур [12]. Во-вторых, в литературе есть сведения об успешной модификации белковых изолятов и концентратов папаином [13, 14], приведшей к повышению их функциональных свойств. Кроме того, папаин является доступным и относительно недорогим растительным ферментом. Цель работы состояла в сравнительном исследовании адсорбционного поведения интактного глицинина соевых бобов и глицинина,

модифицированного путем ограниченного протеолиза с использованием папаина. Сопоставлены величина адсорбции, динамика формирования и дилатометрические свойства адсорбционных слоев. Материалы и методика исследований Глицинин выделяли из сухих семян сои (*Glycine max* [L.] Merrill, сорт Ликурич, Молдова) с помощью изоэлектрического осаждения и фракционного высаливания сульфатом аммония [15] с последующей очисткой хроматографией на фенил-сефарозе CL-4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) [16]. 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 реактива E-64 (Sigma, Life Science) до конечной концентрации 5%. Препараты глицинина и глицинина-П хранили в насыщенном растворе сульфата аммония при 50С. Растворы белка готовили путем исчерпывающего диализа исходного раствора белка против фосфатного буфера с содержанием натриевых фосфатных солей суммарной концентрацией 0,05М, pH 7,6 и содержанием 0,5М NaCl и 0,02% NaN₃ и разбавления растворов тем же буфером до требуемой концентрации. Перед измерением растворы фильтровали через целлюлозные мембранные фильтры (Millipore) с размером пор 0,22 мкм. Концентрацию белка в растворе определяли микробиуретовым методом с использованием овальбумина и бычьего сывороточного альбумина в качестве стандартов. Погрешность измерения концентраций не превышала 3%. Измерения динамического поверхностного натяжения и комплексного дилатометрического модуля упругости проводили на капельном тензиометре Tracker (TRACKER, IT Concept, Longessaine, France) в термостатируемой кювете при температуре 25±10С. Принцип работы тензиометра заключается в определении поверхностного натяжения изучаемого раствора из анализа аксисимметричной формы пузырька воздуха, формируемого в растворе [17]. Перед измерением проверяли вертикальность установки шприца и соответствие формы выдуваемого пузырька воздуха уравнению Лапласа. Объем выдуваемого пузырька составлял 7,0±0,1 мм³. Прибор позволяет проводить эксперимент в течение длительного времени при постоянном значении объема/площади пузырька. Формирование квазиравновесного адсорбционного слоя проводили в течение 70 000 сек. Сформировавшиеся адсорбционные слои подвергали деформированию растяжение-сжатие в синусоидальном режиме. Амплитуда колебаний площади поверхности пузырька не превышала 5%, что соответствует области линейной вязкоупругости адсорбционных слоев. Дилатационные свойства регистрировали как функцию времени. Осуществляли серии из 3-5 последовательных колебаний при постоянной амплитуде и частоте. Частотную зависимость модуля упругости исследовали в диапазоне 1,1 – 20 мГц. Расчет поверхностного натяжения

производили на основе информации о форме капли с применением уравнения Лапласа: , (1) где Δp – избыточное давление пленки, σ – поверхностное натяжение, R_1 и R_2 – радиусы главных кривизн поверхности капли [18]. Поверхностное давление раствора белка определяли по понижению поверхностного натяжения раствора по сравнению с чистым растворителем: , (2) где p – поверхностное давление, σ – поверхностное натяжение раствора белка, σ^0 – поверхностное натяжение растворителя. Изучение реологических свойств адсорбционных слоев глицина и глицина-П производили путем приложения малого продольного возмущения к поверхности пузырька воздуха по синусоидальному закону: , (3) где A – площадь поверхности пузырька, A_0 – амплитуда колебаний площади поверхности, ω – частота нагружения, θ – время. Периодическое изменение площади поверхности приводит к синусоидальному изменению поверхностного натяжения адсорбционного слоя: , (4) где ϕ – фазовый угол между натяжением и напряжением. σ_0 – амплитуда поверхностного натяжения. В области линейной вязкоупругости комплексный модуль эластичности может быть выражен следующим образом: , (5) где E – комплексный поверхностный дилатационный модуль. Дилатационный модуль состоит из действительной и мнимой частей, которые соответствуют эластичной и вязкостной составляющей: (6) Действительная часть дилатационного модуля (или модуль сохранения) является дилатационной эластичностью: (7) Мнимая часть дилатационного модуля (или модуль потерь) является поверхностной дилатационной вязкостью: . (8) Отношение σ_0/A_0 является суммарной мерой сопротивления материала дилатационным деформациям (эластичным и вязкостным). В случае абсолютно эластичного материала напряжение и натяжение находятся в одной фазе ($\phi=0$), мнимая часть равна единице. В случае абсолютно вязкого материала ($\phi = 90^\circ$) действительная часть равна единице [19] материала ($\phi = 90^\circ$) действительная часть равна единице [19]. Результаты и их обсуждение Изменение структуры молекул глицина в ходе ограниченного протеолиза папином Ранее нами продемонстрированы изменения молекулярных параметров глицина в результате ограниченного протеолиза папином [20]. 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 глицина, а также увеличение уровня гидрофобности ее поверхности. Установленные изменения молекулярных параметров глицина в основном согласуются с ранее показанными изменениями первичной структуры его субъединиц при ограниченном протеолизе папином. По данным SDS-PAGE [21], в ходе ограниченного протеолиза гидролизу подвергаются слабоупорядоченные С-концевые участки кислых цепей, расположенные на поверхности белковой глобулы. В ходе

недавних исследований [20] нами показано, что модифицированный глицинин обладает меньшей термодинамической стабильностью по сравнению с интактным. Будучи менее конформационно стабильными, молекулы глицинина-П могут проявлять способность к более энергетически выгодной упаковке в составе адсорбционного слоя, что может положительно сказаться на свойствах формируемых адсорбционных слоев. Поверхностная активность и динамика формирования адсорбционных слоев на границе воздух/вода. Динамические кривые поверхностного давления адсорбционных слоев, формируемых на границе воздух/водный раствор глицинина и глицинина-П разной концентрации представлены на рис.1. Форма кривых (рис.2) типична для глобулярных белков. Зависимости для обоих белков при концентрации 0,001 мг/мл характеризуются S-образной формой, на которых можно выделить 3 основных участка – индукционный период или лаг-фаза (начальный участок относительно медленного возрастания поверхностного давления), участок значительного повышения поверхностного давления (постиндукционный период) и стационарную фазу, на которой поверхностное давление достигает максимального значения и в дальнейшем практически не меняется. Известно, что наличие индукционного периода свидетельствует о том, что процесс адсорбции контролируется стадией диффузии макромолекул белка из объема к межфазной поверхности. При концентрации белков в растворе 0,001 мг/мл индукционный период в случае глицинина составляет примерно 1000 сек, а глицинина-П - 600 сек. Уменьшение величины индукционного периода в случае модифицированной формы белка объясняется более высокой скоростью ее диффузии вследствие более низкой молекулярной массы и меньшего гидродинамического размера [20].

Рис. 1 - Динамические кривые поверхностного давления адсорбционных слоев молекул глицинина (0,001 мг/мл – А, 1,0 мг/мл – В) и глицинина-П (0,001 мг/мл – Б, 1,0 мг/мл – Г) на границе буферный раствор/воздух при температуре 25°C

Рис. 2 - Динамические кривые поверхностного давления адсорбционных слоев молекул глицинина (0,001 мг/мл – А, 1,0 мг/мл – В) и глицинина-П (0,001 мг/мл – Б, 1,0 мг/мл – Г) на границе буферный раствор/воздух при температура 25°C (начальные участки кривых) С увеличением объемной концентрации белка величина индукционного периода обычно сокращается [22], что и наблюдалось в наших исследованиях. При объемной концентрации белков 1 мг/мл и выше кривые $\pi(\tau)$ демонстрируют лишь пост-индукционную и финальную стадии адсорбции (рис. 1). При данной концентрации стадия “индукции” отсутствует, то есть межфазная поверхность практически сразу заполняется молекулами, и поверхностное давление при высоких концентрациях белка уже лимитируется не скоростью диффузии молекул, а величиной энергетического барьера, обусловленного конформационными перестройками, пространственными затруднениями и взаимным влиянием одноименных зарядов при адсорбции молекул белка по

мере заполнения ими адсорбционного слоя. Постиндукционный период, участок наиболее интенсивного повышения поверхностного давления, характеризуется большей крутизной в случае глицинина-П. Это обусловлено его большей конформационной лабильностью и более низким поверхностным зарядом [20]. На этом участке происходит разворачивание адсорбированных белковых молекул и их ориентация неполярными участками к неполярной фазе. При одинаковых концентрациях интактного и модифицированного белков в растворах последний в большей степени повышает поверхностное давление. Предположительно, это связано с большей поверхностной гидрофобностью глицинина-П и более низким энергетическим барьером при его адсорбции. Как известно из литературы, ферментативно модифицированный соевый изолят также проявлял более высокие значения поверхностного давления по сравнению с немодифицированным [23]. С повышением концентрации белков наблюдается увеличение поверхностного давления, что связано с повышением концентрации белка в адсорбционном слое [24].

Рис. 3 - Изотермы адсорбции глицинина (темные квадраты) и глицинина-П (светлые квадраты) на границе воздух-раствор при 25°C. Время формирования адсорбционного слоя 70 000 сек. На рис. 3 представлены изотермы адсорбции глицинина и глицинина-П на границе с воздухом при 25°C. Максимальное значение поверхностного давления адсорбционных слоев глицинина-П составляет $28,4 \pm 1,2$ мН/м и достигается при минимальной концентрации $\approx 1,5$ мг/мл. Максимальное значение поверхностного давления интактного глицинина несколько ниже ($25,2 \pm 1,1$ мН/м) и достигается при более высокой концентрации белка в растворе ($\approx 4,0$ мг/мл). Таким образом, молекулы модифицированного белка способны образовывать насыщенные адсорбционные слои при более низких концентрациях, чем интактного.

Реологические свойства адсорбционных слоев

Межфазная эластичность является мерой способности измененной межфазной поверхности восстанавливать равновесное состояние после снятия напряжения. Эта способность зависит от частоты прилагаемых дилатационных деформаций и свойств молекул. На рис.4 представлены частотные зависимости действительной и мнимой частей дилатационных модулей глицинина и глицинина-П.

Действительная часть дилатационного модуля значительно превосходит мнимую при всех частотах для обоих белков. Кроме того, как для интактного, так и для модифицированного белка наблюдается заметное увеличение действительной части дилатационного модуля с увеличением частоты колебаний. Этот эффект объясняется тем, что при больших скоростях деформации молекулы белка не успевают полностью перемещаться из адсорбционного слоя в приадсорбционный и обратно. Мнимая часть дилатационного модуля слабо зависит от частоты прилагаемых деформаций и концентрации белков в растворе, принимая близкие значения у глицинина и глицинина-П. Тангенс угла потерь с увеличением частоты понижается (данные

не приведены). Совокупность наблюдаемых эффектов характерна для всех белков с глобулярной структурой и указывает на упругое (твердообразное) поведение адсорбционных слоев интактного и модифицированного глицинина. Рис. 4 - Действительная (темные символы) и мнимая (светлые символы) составляющие дилатационного модуля адсорбционных слоев глицинина (А) и глицинина-П (Б) при различных концентрациях – 0,001 мг/мл (квадраты), 0,01 мг/мл (кружки), 0,1 мг/мл (треугольники), 1 мг/мл (ромбы) Аналогичные зависимости дилатационного модуля и фазового угла от частоты колебаний были ранее установлены для интактного глицинина [22]. Напротив, в работе [25] при сравнительном исследовании поверхностной активности и дилатационных характеристик адсорбционных слоев молекул глицинина и продуктов его ограниченного протеолиза алькалазой было показано, что адсорбционные слои модифицированных молекул обладают более вязкоэластичными свойствами в сравнении с глицинином, что выражалось в понижении упругой составляющей дилатационного модуля и повышении фазового угла. Таким образом, в результате ферментативной модификации увеличивалась вязкостная составляющая комплексного дилатационного модуля. Мы же наблюдали обратную картину. Ограниченный протеолиз папаином приводил к повышению упругости адсорбционных слоев. Как следует из рис. 4, по абсолютной величине действительной составляющей дилатационного модуля и большей ее зависимости от концентрации и частоты нагружения глицинин-П демонстрирует более выраженный упругий (твердообразный) характер реологического поведения, чем интактный глицинин. По-видимому, это обусловлено его способностью формировать более плотные адсорбционные слои вследствие большего сродства к неполярной поверхности, меньшего размера молекул, более низкой плотности поверхностного заряда и более высокой конформационной лабильности. Зависимость свойств адсорбционных слоев от концентрации соли (NaCl) в растворе Известно, что присутствие неорганических солей в растворе ускоряет адсорбцию белка за счет понижения электростатического отталкивания между адсорбируемыми макромолекулами [26,27]. Присутствие неорганических солей экранирует электростатическое отталкивание между молекулами белка в адсорбционном слое, что приводит к усилению стэкинг-взаимодействий и формированию более прочных адсорбционных слоев. Можно ожидать увеличения поверхностного давления растворов белков с увеличением концентрации NaCl в растворе. Именно такая закономерность установлена как для интактной, так и модифицированной формы глицинина в интервале концентраций NaCl 0-0,5 М (табл. 1). Таблица 1 - Параметры растворов глицинина и глицинина-П при различной концентрации NaCl в растворе (концентрации белков – 0,1 мг/мл)

Белок	Параметр	Концентрация NaCl, М	Глицинин	Глицинин-П
Максимальное поверхностное давление, мН/м	0	20,0±1,2	24,6±1,2	0,2
	0,2	21,5±1,2	25,9±1,1	0,5
	0,5	22,1±1,3	27,8±1,3	

Дилатационный модуль, (50 сек) $0,61,3 \pm 0,7$ $98,5 \pm 0,7$ $0,2$ $53,2 \pm 0,6$ $78,8 \pm 0,7$ $0,5$ $42,0 \pm 0,5$ $61,5 \pm 0,6$ В то же время, с увеличением концентрации хлорида натрия действительные части дилатационных модулей адсорбционных слоев глицинина и глицинина-П, понижаются. В работе [28] также было показано понижение дилатационного модуля 11S и 7S глобулинов сои при добавлении NaCl в нейтральной области pH. Аналогичное поведение наблюдалось в случае BSA [29]. Понижение значений дилатационного модуля при более высоких концентрациях NaCl объясняются тем, что соль облегчает денатурацию белков на межфазной поверхности и переориентацию сегментов молекулы в адсорбционном слое. Денатурированный белок на поверхности обладает меньшей жесткостью, что выражается в меньшем значении дилатационного модуля [29]. Как было показано в работе [24], в области изоточки глицинина (при pH 5,0) наблюдаются наименьшие значения дилатационного модуля, которые растут при удалении от нее, то есть при росте заряда на поверхности белка. Аналогично, в нашей работе продемонстрировано, что более высокая ионная сила, компенсирующая (понижающая) поверхностный заряд молекул белка, способствует понижению величины дилатационного модуля. Модификация молекул глицинина соевых бобов путем ограниченного протеолиза с использованием папаина обеспечивает увеличение его поверхностной активности, повышение скорости формирования его адсорбционных слоев на границе воздух/раствор и повышение их упругости особенно при низких ионных силах раствора. Наблюдаемые изменения адсорбционного поведения модифицированного глицинина являются прямым следствием изменения молекулярных параметров структуры глицинина в процессе ограниченного протеолиза папаином.