

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

УДК 577.122.2:635.655

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗОЛИРОВАННОГО СОЕВОГО БЕЛКА И СОЕВОЙ МУКИ МЕТОДОМ SE-HPLC

*Е.В. Милорадова, доцент, П.А. Иванушкин, аспирант, А.А. Ананьев, студент, С.Е. Траубенберг, профессор, *А.В. Софьин, старший научный сотрудник Московский государственный университет пищевых производств*

кафедра Аналитической химии

**Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН*

e-mail: emiloradova@gmail.com

В работе методом SE-HPLC (эксклюзионной ВЭЖХ) показано различное действие протеолитических ферментных препаратов различного происхождения и их мультиэнзимных композиций на фракционный состав гидролизатов соевой муки и соевого изолированного белка.

The paper presents the results of an investigation by SE-HPLC (size-exclusion HPLC) of the fractional composition of hydrolyzates of soy flour and isolated soy protein obtained under the action of proteolytic enzymes of different origin and of their multienzyme blends.

Ключевые слова: соевая мука, изолированный соевый белок, ферментативный гидролиз, SE-HPLC, фракционный состав, протеолитические ферментные препараты.

Key words: soy flour, isolated soy protein, enzymatic hydrolysis, SE-HPLC, fractional composition, proteolytic enzymes.

Продукты, обогащенные соевым белком, такие как мука, концентраты и изоляты сои, используются в пище из-за их функциональности, питательной ценности и низкой стоимости. Соевые белки могут быть модифицированы путем физических, химических и ферментативных воздействий. Одним из способов изменения функциональных свойств соевых белков является ограниченный ферментативный гидролиз.

Белки в сое представлены, главным образом, запасными белками, которые обладают характерными особенностями запасных белков высших растений, описанными Осборном еще в 1898 г. [1]. В настоящее время основные запасные белки сои (*Glycine max*) классифицируются в соответствии с их седиментационными свойствами [2–4]. Около 70% белков сои в основном представлены запасными белками глицинином и β -конглицинином, имеющими коэффициенты седиментации 11S и 7S, соответственно.

Глицинин (11S-глобулин) является белком с компактной четвертичной структурой, стабилизированной за счет дисульфидных, электростатических и гидрофобных взаимодействий. Имеет молекулярную массу 360 кДа, представляет собой олигомер из 6 субъединиц, каждая из которых состоит из кислой (А-) и основной (В-) компонент. Различные комбинации А- и В-полипептидных цепей лежат в основе полиморфизма глицининовых белков.

В зависимости от рН и ионной силы глицинин диссоциирует с образованием различных субъединиц: 7S, 3S и 2S. При определенных условиях около изоэлектрической точки и при низкой ионной силе глицининовые молекулы агрегируют в димеры 16S и в более крупные высокомолекулярные агрегаты. Влияние различных внешних воздействий на кон-

формационное состояние глицинина изучено очень тщательно, так как этот вопрос связан со способностью соевых белков образовывать гели, обладающие различными свойствами, от чего зависит их применение в пищевой технологии.

β -Конглицинин – основной белок 7S-фракции с молекулярной массой 150 – 180 кДа [2]. Он состоит из трех субъединиц (α 76 кДа, α' 72 кДа, β 53 кДа), которые взаимодействуют, образуя 7 изомеров. β -Конглицинин – это гликопротеид, он содержит углеводы, связанные с N-концевым остатком аспарагиновой кислоты. Углеводная часть β -конглицинина состоит из 38 маннозных и 12 глюкозаминных остатков на одну молекулу белка [3].

Оставшаяся часть белков сои представлена 15S-белками, имеющими молекулярную массу 600 кДа, их в соевых семенах обнаружено около 11%. Альбуминов в бобовых еще меньше, их относительная молекулярная масса находится в пределах 10 – 100 кДа. Альбумины представлены в форме изолектинов, имеющих четвертичную структуру с 2 – 4 субъединицами [4].

Анализ литературных источников показал, что ферментативному гидролизу соевых белков уделялось недостаточное внимание. Описан гидролиз белков сои с помощью различных протеолитических ферментов животного и растительного происхождения (пепсин, трипсин, химо tripsин, папаин), а также бактериальных и грибных протеаз [5–7] при использовании различных субстратов, включая обезжиренную и тостированную соевую муку, изоляты и концентраты сои. Поэтому сравнить описанные в литературе данные достаточно трудно.

Устойчивость к протеолизу пептидных связей основных соевых белков зависит, в основном, от степени денатурации белков:

нативные (высокая устойчивость, интактная структура) > тостированные (средняя устойчивость, разрушенные нековалентные связи) > экструдированные (низкая устойчивость, разрушенные нековалентные и дисульфидные связи). В тостированной муке β -конглицинин эффективно деградирует под действием различных эндопротеаз. Подвергнутый термообработке, он также эффективно разрушается протеазами микроорганизмов [5]. Полипептид В глицинина более устойчив к протеолизу, чем полипептид А, возможно из-за более «упакованной» структуры белковой молекулы.

Для изолятов соевых белков протеолиз также значительно коррелирует со степенью денатурации β -конглицинина и глицинина [6]. Как показали исследования с ферментными препаратами Алькалаза и Флавозим, деградация белков протекает наиболее быстро в течение первых 5 ч инкубирования, и высокую скорость гидролиза можно наблюдать при комбинировании двух ферментов. Бактериальные протеазы в целом более эффективно, чем грибные протеазы, гидролизуют изоляты [7].

Деградация очищенного глицинина и β -конглицинина протеазами субтилизинового типа имеет много общего с деградацией этих белков в муке под действием микроорганизмов рубца [6]. После нагрева в слабощелочной среде гексамерная полипептидная структура консервируется и В-полипептиды остаются, в основном, интактными [8]. В β -конглициине α - и α' -цепи легко деградируют под действием трипсина [9].

Жидкостная хроматография высокого давления (HPLC) в настоящее время рассматривается как один из основных методов качественного и количественного анализа большинства классов химических соединений, включая такие биополимеры как белки, полипептиды, углеводы и нуклеиновые кислоты. Один из видов такой хроматографии – эксклюзионная жидкостная хроматография (ситовая хроматография, size-exclusion, SE-HPLC), которая основана на различной способности молекул разного размера проникать в поры неионогенного геля, служащего неподвижной фазой – это предпочтительный метод определения молекулярных масс и молекулярно-массовых распределений природных полимеров [9].

Ионообменную жидкостную хроматографию высокого давления ранее использовали для исследования пептидов, полученных в результате гидролиза соевых белков [10]. Однако применение метода SE-HPLC известно лишь для дифференцирования сортов сои путем оценки распределения ее белков по молекулярной массе [11].

Целью настоящей работы была сравнительная оценка фракционного состава полученных под действием различных ферментных препаратов и их композиций гидролизатов изолированного соевого белка «Майсол» и обезжиренной соевой муки методом SE-HPLC.

Результаты и обсуждение

Для проведения исследований использовались обезжиренная соевая мука, полученная из отборных экологически чистых и генетически не модифицированных очищенных соевых бобов, выращенных в Казахстане, и изолированный соевый белок (ИСБ) «Майсол», любезно предоставленный компанией «Могунция-Интеррус» (Германия – Россия).

Для гидролиза белков применяли различные ферментные препараты: Бирзим П7 «ERB-SLOH» (Германия), Флавозим и Нейтраза («Novozymes», Дания). Основная гидролитическая активность ферментных препаратов Нейтраза (получен из *Bacillus amyloliquefaciens*) и Бирзим П7 (получен из *Bacillus subtilis*) обусловлена действием протеиназ, а ферментного препарата Флавозим (получен из микроскопического гриба *Aspergillus oryzae*) – действием протеиназы и аминоклотаза.

Методом SE-HPLC нами исследован фракционный состав ИСБ, а также продуктов его гидролиза, полученных обработкой исследуемыми ферментными препаратами в течение 6 ч (рис. 1). Фракционирование образцов осуществляли в 3 повторностях.

Для полученных хроматограмм рассчитывали площади под кривыми распределения фракций, а затем процентное содержание каждой фракции. Расчеты осуществляли с использованием программного обеспечения хроматографа. Среднее отклонение не превышало 5%. В табл. 1 представлены усредненные результаты расчета фракционного состава ИСБ и гидролизатов ИСБ, полученных с помощью различных протеолитических препаратов.

Фракционный состав ИСБ представлен главным образом высокомолекулярными белками с молекулярной массой более 130 кДа (51.9%) и белками с молекулярной массой 25-130 кДа (32.1%), остальная часть белков имеет молекулярную массу 10-25 кДа (рис. 1А).

Анализ полученных хроматограмм гидролизатов ИСБ (рис. 1Б–Г) показывает, что Нейтраза достаточно эффективно расщепляет высокомолекулярные белки ИСБ – так, в ходе гидролиза ИСБ в течение 6 ч под действием Нейтразы высокомолекулярные белки гидролизуются практически полностью. В результате преимущественно образуются белки и пептиды с молекулярной массой около 25-45 кДа (58.2%), а также олигопептиды с молекулярной массой 15-25 кДа (24.8%).

Таблица 1. Фракционный состав ИСБ и гидролизатов ИСБ, полученных обработкой различными протеолитическими препаратами в течение 6 ч.

Время удерживания, мин	Молекулярная масса, кДа	Содержание фракции, %			
		ИСБ	Гидролизаты ИСБ		
			Нейтраза	Бирзим	Флавозим
5.2	Более 130	51.9	0.3	0.4	0.9
7.2-8.5	45-130	15.6	7.5	20.4	20.1
8.5-10.2	25-45	16.5	58.2	30.9	38.1
10.2-13.3	15-25	10.0	24.8	38.5	26.8
14.1	5-15	3.3	5.8	4.7	3.7
15.7	1.5-5	2.4	3.3	4.9	10.2

При гидролизе ИСБ под действием Бирзима в течение 6 ч образуются более крупные, чем под действием Нейтразы, белки с молекулярной массой 45-130 кДа (20.4%), а также белки и пептиды с молекулярной массой 25-45 кДа (30.9%) и 15-25 кДа (38.5%).

Под действием Флавозима в течение 6 ч высокомолекулярные фракции ИСБ частично гидролизуются и образуются практически такое же, как и в случае Бирзима, количество высокомолекулярных белков с молекулярной массой 45-130 кДа (20.1%), соотношение белков с молекулярными массами 25-45 и 15-25 кДа наблюдается несколько другое (38.1 и 26.8%), кроме того, присутствует достаточно большая доля свободных аминокислот (10.2%). Полученное распределение продуктов гидролиза обусловлено наличием как эндо-протеиназы, так и аминопептидазы в составе ферментного препарата.

Таким образом, методом SE-HPLC показан различный результат действия исследуемых ферментов Нейтраза, Бирзим и Флавозим на ИСБ. Установлено, что более глубокий гидролиз высокомолекулярных белков осуществляется с участием ферментного препарата Нейтраза. В отличие от Нейтразы, ферментные препараты Бирзим и Флавозим осуществляют частичный гидролиз высокомолекулярной фракции изолированного соевого белка. Полученные результаты фракционирования продуктов гидролиза ИСБ показали возможность и целесообразность совместного применения ферментных препаратов для получения гидролизатов соевых белков с заданным составом и функциональными свойствами.

Методом SE-HPLC нами также исследован экстракт соевой муки и ее гидролизаты, полученные под действием исследуемых ферментных препаратов и их мультиэнзимных композиций после гидролиза в течение 8 и 17 ч (рис. 2 и 3). Результаты фракционирования представлены в табл. 2.

По сравнению с ИСБ, в водном экстракте исследуемой соевой муки (рис. 2А) содержание

высокомолекулярных белков с молекулярной массой более 130 кДа значительно меньше (14.1% против 51.9% в ИСБ), соотношение белков с молекулярными массами 45-130 и 25-45 кДа также отличается от такового в ИСБ (соответственно 41.2 и 23.5% против 15.6 и 16.5% в ИСБ).

Обезжиренная соевая мука представляет собой сложный субстрат, содержащий не только белки, но и высоко- и низкомолекулярные вещества, так называемые экстрактивные вещества (растворимые углеводы, органические кислоты, низкомолекулярные соединения), при этом основные фракции белков остаются в нерастворимом состоянии. Высокомолекулярные комплексы представлены главным образом белками, находящимися в связанном состоянии со сложными полисахаридами – целлюлозой и гемицеллюлозой, содержащимися в сое в виде ксилоглюкана, а также пектинами в виде арабогалактанов.

При исследовании экстракта соевой муки под действием ферментных препаратов наблюдаются два одновременно происходящих процесса – экстракция белков и их гидролиз. То есть, с одной стороны, белок из связанного состояния переходит в свободное, образуя агрегаты с большой молекулярной массой, а с другой стороны, ферменты гидролизуют высокомолекулярные белки до низкомолекулярных.

Полученные нами результаты свидетельствуют о различных скоростях этих процессов.

В течение первых 8 ч действия Нейтразы на экстракт соевой муки образуются белки с молекулярной массой 45-130 кДа (27.7%), с молекулярной массой 25-45 кДа (18.4%) и больше всего белков с молекулярной массой 15-25 кДа (40.8%). В течение следующих 9 ч доля белков и пептидов с молекулярной массой 25-45 кДа увеличивается до 51.1%, а содержание белков с молекулярной массой 15-25 кДа несколько снижается (36.2%). Полученные данные подтверждают характер действия

Нейтразы как эндопептидазы, расщепляющей внутренние связи в молекулах белка (рис. 2Б).

При действии ферментного препарата Бирзима (рис. 2В) на экстракт соевой муки в течение первых 8 ч гидролиза содержание фракции с молекулярной массой более 130 кДа составило 16.4%, 45-130 кДа – 12.9%, 25-45 кДа – 27.4% и 15-25 кДа – 37.1%. В течение последующих 9 ч гидролиза под действием Бирзима накапливаются белки с молекулярной массой 25-45 кДа (37.5%) и 15-25 кДа (39.9%). Таким образом, Бирзим имеет существенные отличия от Нейтразы в характере протеолитического действия на белки сои, данный фермент медленнее расщепляет высокомолекулярные белки.

При действии Флавозима (рис. 2Г) на экстракт соевой муки в течение первых 8 ч гидролиза наблюдалось иное соотношение фракций: с молекулярной массой более 130 кДа 23.6%, 45-130 кДа 14.8%, 25-45 кДа 27.7% и 10-25 кДа 25.5%. В течение последующих 9 ч характер распределения белков и пептидов сохраняется при увеличении доли белков с молекулярной массой 15-25 кДа (до 34.2%). Таким образом, Флавозим, обладая эндо- и экзопептидазными активностями, осуществляет достаточно глубокий гидролиз белков соевой муки. Сохранение характера кривой распределения белков и пептидов в течение 17 ч свидетельствует о балансе эндо- и экзопептидазных активностей Флавозима.

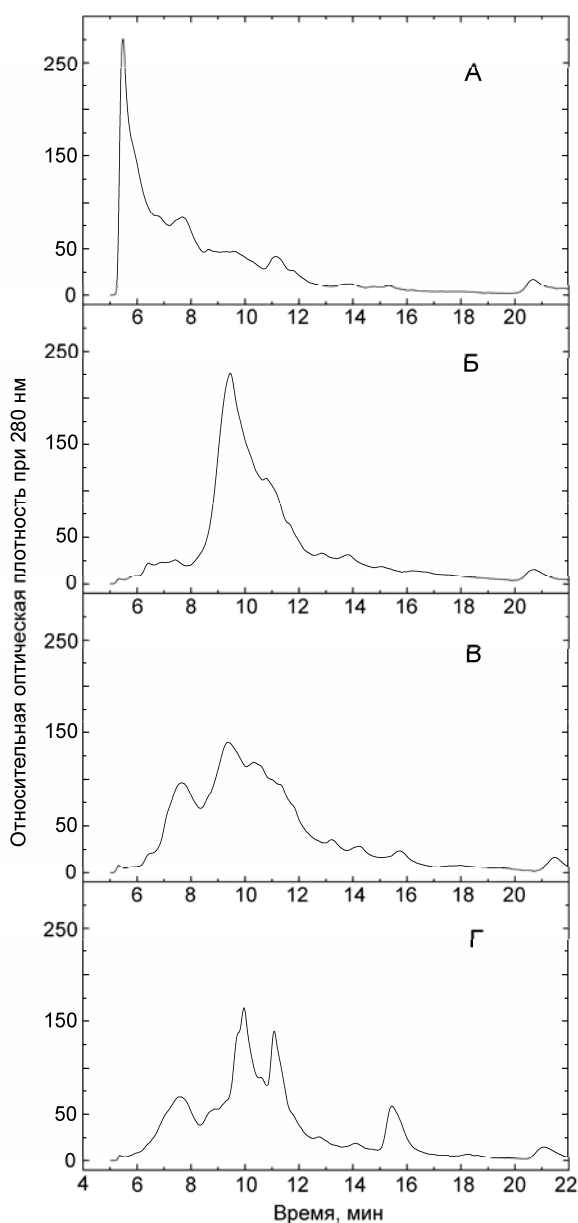


Рис. 1. SE-HPLC-хроматограммы ИСБ до (А) и после обработки в течение 6 ч ферментными препаратами Нейтраза (Б), Бирзим (В) и Флавозим (Г).

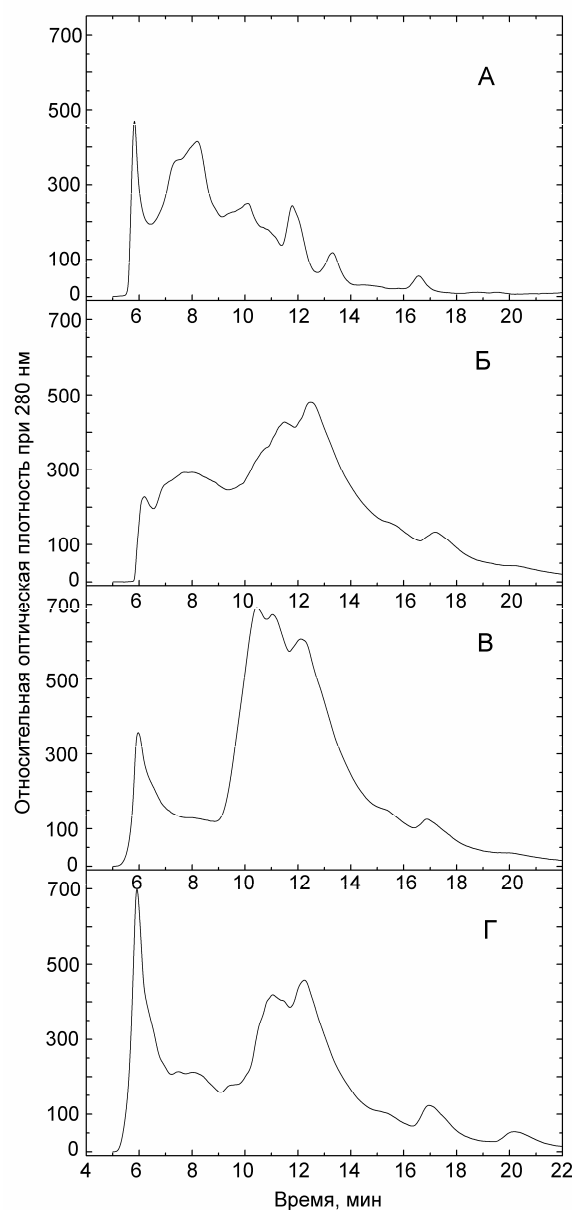


Рис. 2. SE-HPLC-хроматограммы экстракта обезжиренной соевой муки (А) и ее гидролизатов, полученных обработкой в течение 8 ч ферментными препаратами Нейтраза (Б), Бирзим (В) и Флавозим (Г).

Из представленных на рис. 3А данных видно, что благодаря Нейтразе в составе МЭК-1 Нейтраза + Флавозим гидролизат, полученный за 8 ч гидролиза, содержит небольшую долю высокомолекулярных белков соевой муки с молекулярной массой более 130 кДа (12.2%), в его составе преобладают белки и пептиды с молекулярной массой 25-45 кДа (30.4%) и 15-25 кДа (45.8%). В течение последующих 9 ч под действием МЭК-1 Нейтраза + Флавозим в

гидролизате продолжают накапливаться белки и пептиды с молекулярной массой 25-45 кДа (49.7%) и 15-25 кДа (36.8%), а также короткие олигопептиды с молекулярной массой 5-15 кДа. Таким образом, благодаря сочетанию в составе МЭК-1 Нейтраза + Флавозим указанных ферментов образуется гидролизат, в составе которого преобладают продукты глубокого гидролиза соевых белков – белки и олигопептиды.

Таблица 2. Фракционный состав белков экстракта соевой муки и ее гидролизатов, полученных обработкой различными протеолитическими препаратами в течение 8 и 17 ч.

Время удерживания, мин	Молекулярная масса, кДа	Экстракт соевой муки	Содержание фракции, %									
			Гидролизаты соевой муки									
			Нейтраза		Бирзим		Флавозим		МЭК-1 Нейтраза+ Флавозим		МЭК-2 Бирзим + Флавозим	
8 ч	17 ч	8 ч	17 ч	8 ч	17 ч	8 ч	17 ч	8 ч	17 ч	8 ч	17 ч	
5.8	Более 130	14.1	4.9	2.9	16.4	12.7	23.6	21.7	12.2	2.7	8.9	8.5
7.5	45-130	41.2	27.7	2.3	12.9	3.6	14.8	12.2	1.7	0.0	9.7	9.2
10.8	25-45	23.5	18.4	51.1	27.4	37.5	27.7	23.4	30.4	49.7	28.6	29.9
12.2	15-25	11.7	40.8	36.2	37.1	39.9	25.5	34.2	45.8	36.8	42.3	41.6
16.8	5-15	9.4	8.2	7.5	6.1	6.2	5.5	6.1	7.8	10.7	7.7	8.2
20.2	Менее 1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.3	1.9	0.0	2.7	2.5

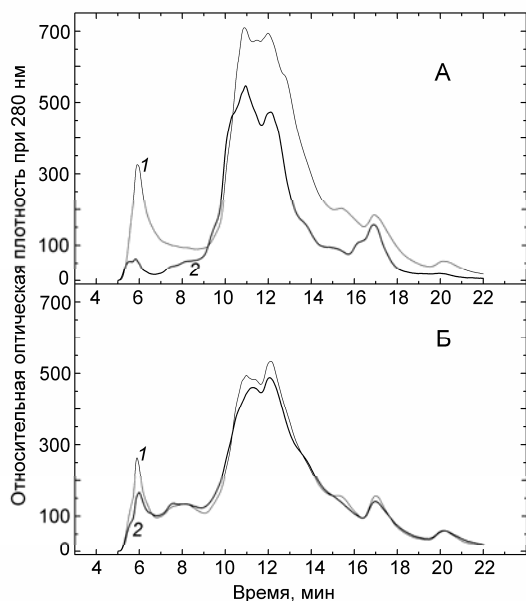


Рис. 3. SE-HPLC-хроматограммы гидролизатов обезжиренной соевой муки, полученных обработкой в течение 8 (1) и 17 (2) ч МЭК-1 Нейтраза + Флавозим (А) и МЭК-2 Бирзим + Флавозим (Б).

Благодаря Бирзиму, входящему в состав МЭК-2 Бирзим + Флавозим (рис. 3Б), за первые 8 ч гидролиза образуются белки с молекулярной массой 45–130 кДа (9.7%), в составе гидроли-

зата преобладают белки и пептиды с молекулярной массой 25-45 кДа (28.6%) и 15-25 кДа (42.3%) В течение последующих 9 ч под действием МЭК-2 Бирзим + Флавозим продолжается гидролиз и в гидролизате сохраняется достигнутое соотношение фракций.

Выводы

Методом SE-HPLC показан различный характер действия исследуемых ферментов Нейтраза, Бирзим и Флавозим и мультиэнзимных композиций на их основе Нейтраза + Флавозим и Бирзим + Флавозим на изолированный соевый белок и белки соевой муки. Более глубокий гидролиз высокомолекулярных белков осуществляется с участием ферментного препарата Нейтраза и МЭК-1 Нейтраза + Флавозим. В отличие от Нейтразы, ферментный препарат Бирзим и МЭК-2 Бирзим + Флавозим осуществляют частичный гидролиз высокомолекулярного изолированного соевого белка и белков соевой муки.

Таким образом, можно констатировать, что разработанные условия и режимы получения белковых гидролизатов ИСБ и соевой муки позволяют получить гидролизаты, существенно различающиеся фракционным составом, что, в свою очередь, обуславливает в дальнейшем их различные технологические функциональные

свойства (растворимость, вспениваемость, эмульгируемость и др.), что дает возможность использовать их в производстве различных продуктов питания.

Экспериментальная часть

Гидролиз ИСБ и обезжиренной соевой муки проводили при температуре 45°C и pH 6.0 – 6.5. Ферментные препараты вносили в количестве 0.6 ед. ПС (протеолитической активности) на 1 г муки, при составлении мультиэнзимных композиций дозировки ферментных препаратов составляли 0.35 ед ПС на 1 г муки. Ферментные препараты вносили одновременно.

Белково-полипептидный состав полученных гидролизатов анализировали методом SE-HPLC. В работе использовали жидкостной хроматограф «Стайер-SYSTEM» фирмы «Аквилон»

(Россия), оборудованный системой внесения образцов Rheodyne 7725i («Rheodyne», США) и сопряженный со спектрофотометрическим детектором UVV104 («Аквилон»). Применяли аналитическую колонку BioSep-SEC-S2000 («Phenomenex», США) размером 7.8×300 мм. Подвижная фаза в изократическом разделении – 0.05 М К-Na-фосфатный буфер, pH 7.0, содержащий 0.3 М NaCl, скорость потока 1 мл/мин. Разделение проводили при температуре 25°C. Поглощение света детектировали при 280 нм. Колонка была предварительно откалибрована с использованием набора белков-маркеров «LMW Calibration Kit» фирмы «Phenomenex» (США): бычьего сывороточного альбумина (БСА – 67 кДа), овальбумина (43 кДа), химотрипсिनогена (25 кДа), рибонуклеазы (13.7 кДа), бацитрацина (1.45 кДа).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Osborne, T. B. Proteids of soybean / T. B. Osborne, G. F. Campbell // J. Am. Chem. Soc. – 1898. – Vol. 20. – P. 419–428.
2. Thanh, V. H. Major proteins of soybean seeds. A straight forward fractionation and their characterization / V. H. Thanh, K. Shibasaki // J. Agric. Food Chem. – 1976. – Vol. 24. – P. 1117–1121.
3. Kinsella, J. E. Functional properties of soy proteins / J. E. Kinsella // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1979. – Vol. 56. – P. 242–258.
4. Владова, Р. Резервни белтъци на соята / Р. Владова // Генетика и селекция. – 1988. – Т. 21, № 4. – С. 367–373.
5. Marsmann, G. J. R. *In vitro* accessibility of untreated, toasted and extruded soybean meals for proteases and carbohydrases / G. J. R. Marsmann, H. Gruppen, A. G. J. Voragen // J. Agric. Food Chem. – 1997. – Vol. 45. – P. 4088–4095.
6. Selective proteolysis of the glycinin and beta-conglycinin fractions in a soy protein isolate by pepsin and papain with controlled pH and temperature / K. Tsumura [et al.] // J. Food Sci. – 2004. – Vol. 69. – P. 363–367.
7. Bernardi-Don, L. S. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases / L. S. Bernardi-Don, A. M. R. Pilosof, G. B. Batholomai // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1991. – Vol. 68. – P. 102–105.
8. Action of trypsin on glycinin: Mixed-type proteolysis and its kinetics; molecular mass of glycinin T / A. D. Shutov [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1991. – Vol. 199. – P. 539–544.
9. Limited proteolysis of beta-conglycinin and glycinin, the 7S and 11S storage globulins from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): structural and evolutionary implications / A. D. Shutov [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1996. – Vol. 241. – P. 221–228.
10. Брун, Е. Жидкостная хроматография полимеров: настоящее и будущее / Е. Брун // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. Хим. Об-ва Д.И. Менделеева). – 2003. – Т. XLVII, № 1. – С. 90–101.
11. Oomah, B. D. Characterization of soybean proteins by HPLC / B. D. Oomah, H. Voldeng, J. A. Fregeau-Reid // Plant Foods for Human Nutrition. – 1994. – Vol. 45. – P. 251–263.