

*На правах рукописи*

**Поляков Александр Викторович**

**ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА ПАПАИНОМ НА СТРУКТУРУ,  
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕГУМИНОВ**

02.00.04 – Физическая химия

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки  
Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

**Научный руководитель:**

**Плещина Ирина Германовна,**  
кандидат химических наук

**Официальные оппоненты:**

**Лозинский Владимир Иосифович,**  
доктор химических наук, профессор,  
заведующий лабораторией криохимии  
(био)полимеров Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки «Институт  
элементоорганических соединений им. А.Н.  
Несмеянова Российской академии наук»

**Потехин Сергей Александрович,**  
доктор физико-математических наук,  
руководитель группы термодинамики белка  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Институт белка Российской  
академии наук

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Российский химико-  
технологический университет имени Д. И.  
Менделеева»

Защита состоится «15» марта 2017 г. в 12 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 38 и на веб-сайте: <http://new.chph.ras.ru/diss-sovet/razmeshchennye-dissertatsii/152-dissertatsiya-polyakova-aleksandra-viktorovicha>.

Автореферат разослан « » января 2017 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 002.039.01,  
кандидат химических наук

Мазалецкая Л.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Проблема обеспечения мирового населения полноценным пищевым белком не только сохраняет актуальность в третьем тысячелетии, но и в значительной степени обостряется. Человечество столкнулось с ограниченностью природных ресурсов на фоне быстрого роста населения в экономически слабо развитых странах и увеличения числа техногенных катастроф [Ehrlich 2016]. Дефицит в пище многих эссенциальных нутриентов (в частности, белка) и повышение темпа современной жизни приводят к истощению адаптационных возможностей организма человека и возникновению широкого спектра алиментарнозависимых заболеваний [Архангельский 2012]. Целями государственной политики в области здорового питания являются сохранение и укрепление здоровья населения, профилактика заболеваний, обусловленных неполноценным и несбалансированным питанием. Основными задачами являются: расширение отечественного производства основных видов продовольственного сырья, отвечающего современным требованиям качества и безопасности; развитие производства пищевых продуктов, обогащенных незаменимыми компонентами, продуктов функционального назначения, диетических (лечебных и профилактических) пищевых продуктов [Распоряжение Правительства РФ № 1873-р от 25 октября 2010 г].

В этой связи одним из приоритетных направлений современной пищевой индустрии является развитие технологий новых эссенциальных ингредиентов с высокими функциональными свойствами для обогащения традиционных пищевых продуктов, а также создания продуктов лечебного и функционального питания на их основе.

Растительное сырье, благодаря короткому циклу воспроизводства, доступности, по экономическим и экологическим показателям является одним из перспективных источников пищевого белка. В настоящее время большая часть этих ресурсов используется лишь косвенно – путем скармливания животным. Ежегодно в Западной Европе и США на кормовые нужды расходуется до 60 % потребляемого в стране зерна, в основном белок бобовых и зерновых культур. При этом в среднем для производства 1 кг животного белка расходуется около 8 кг белка растительного [Damodaran 1996].

В 1960-е годы была сформулирована и впоследствии реализована стратегия сокращения пищевой цепи за счет прямой переработки растительного белка в пищевые продукты промышленными методами [Толстогузов 1986]. К настоящему времени в мире создано крупнотоннажное производство муки, концентратов, изолятов, гидролизатов и текстуратов пищевых белков, а также пищевых продуктов преимущественно на основе переработки соевых бобов. Продемонстрирована возможность диверсификации сырьевой базы производства пищевого белка за счет использования семян других зернобобовых и масличных культур, а также белков зеленой биомассы и листьев растений, белков

микроорганизмов. Возрастающее значение для производства пищевого белка приобретает использование вторичных сырьевых ресурсов (солодовая дробина, пшеничные отруби, подсолнечный шрот и др.).

Необходимо отметить, что в питании населения России весьма значительна доля растительных белков, подавляющее большинство которых имеет несбалансированный аминокислотный состав (зерновые культуры, картофель, овощи). При этом удельный вес в питании бобовых культур, содержащих белки с более высокой биологической ценностью, является незначительным. Вместе с тем именно семена зернобобовых и масличных культур являются наиболее перспективными источниками пищевого белка вследствие его высокого содержания и сбалансированности по содержанию незаменимых аминокислот.

Использование растительного белка для пищевых целей сопряжено с некоторыми проблемами. В частности, легумины, являющиеся основной фракцией запасных белков зернобобовых и масличных культур, имеют высокую биологическую ценность, но недостаточно высокие функциональные свойства (эмульгирующая и пенообразующая способность), обусловленные компактной жесткой структурой молекул и их низкой поверхностной гидрофобностью. Сложные растительные белки, в частности, запасные белки зернобобовых культур, не полностью перевариваются ферментами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Кроме того, существует проблема аллергенности некоторых фракций белков зернобобовых культур, в том числе легуминов [Black 2000].

#### **Степень разработанности темы исследования**

Одним из наиболее эффективных и мягких способов регулирования функциональных свойств растительных глобулинов является ферментативная модификация, в частности, ограниченный протеолиз. К настоящему времени установлено, что общей закономерностью ограниченного протеолиза легуминов является отщепление на начальном этапе С-концевых участков  $\alpha$ -цепей, в результате которого образуется высокомолекулярный устойчивый промежуточный продукт [Shutov 1987]. Показано, что продукты ограниченного протеолиза обладают, как правило, более высокими функциональными свойствами. Ограниченный протеолиз также способствует снижению иммуногенных свойств легуминов и повышению их атакуемости ферментами желудочно-кишечного тракта [Вагац 2004].

Наиболее изученным является процесс ограниченного протеолиза легуминов трипсином [Shutov 1993]. Несмотря на множество работ, посвященных ограниченному протеолизу легуминов, большая их часть выполнена на суммарных препаратах глобулинов, что не позволяет установить связь между структурой, физико-химическими и функциональными свойствами и, таким образом, целенаправленно регулировать последние.

#### **Цель и задачи**

Цель работы заключалась в установлении связи между изменением структуры легуминов соевых бобов (глицинин) и кормовых бобов (легумин *V.f.*) в результате

ограниченного протеолиза папаином и изменением их физико-химических и функциональных свойств.

Для достижения поставленной цели было необходимо провести сравнительное исследование следующих характеристик интактных и модифицированных легуминов:

1) молекулярных параметров в растворе (молекулярной массы, поверхностного заряда, гидродинамического размера, радиуса инерции, термодинамического сродства к растворителю);

2) конформационной стабильности;

3) поверхностной активности на границе воздух/раствор, динамики формирования и реологических свойств адсорбционных слоев;

4) функциональных свойств (атакуемости ферментами желудочно-кишечного тракта *in vitro*, пенообразующей способности).

### **Научная новизна**

1) Систематически изучено влияние ограниченного протеолиза папаином на структуру, термодинамическую стабильность и адсорбционное поведение (поверхностную активность, динамику формирования и дилатационные свойства адсорбционных слоев) на границе воздух/раствор легуминов бобов *Glycine max* и *Vicia faba*.

2) Установлена связь между структурными, термодинамическими и поверхностными свойствами легуминов, модифицированных ограниченным протеолизом папаином. Найденные закономерности имеют общий характер. Это позволяет прогнозировать изменения функциональных свойств легуминов и использовать ограниченный протеолиз для их регулирования.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в установлении взаимосвязи между изменением структурных, гидродинамических и термодинамических параметров легуминов в результате ограниченного протеолиза папаином и их адсорбционным поведением и функциональными свойствами. Показано, что изменение этих параметров (понижение молекулярной массы, термодинамического сродства к растворителю, гидродинамического размера и термодинамической стабильности) приводит к повышению поверхностной активности глицинина и легумина *V.f.*, увеличению скорости формирования ими адсорбционных слоев на границе воздух/вода и повышению дилатационного модуля упругости адсорбционных слоев. Повышение адсорбционных свойств легуминов коррелирует с увеличением их пенообразующей способности. Ограниченный протеолиз сопровождается повышением биологической ценности легуминов за счет увеличения их атакуемости ферментами желудочно-кишечного тракта. Наблюдаемые эффекты изменения структуры и свойств легуминов представляют интерес для исследования таких процессов как

проращение семян и индуцированный автолиз, в ходе которых происходят изменения структуры легуминов под влиянием папаиноподобных эндогенных протеиназ.

Практическая значимость работы заключается в возможности использовать установленные закономерности для регулирования функциональных свойств легуминов и повышения эффективности их использования для целей традиционного, функционального и лечебного питания. Полученные результаты имеют принципиальное значение для повышения технофункциональных свойств и биологической ценности растительных глобулинов и, таким образом, для диверсификации сырьевой базы производства пищевого белка.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Влияние ограниченного протеолиза глицинина и легумина *V.f.* (легуминов *Glycine max* и *Vicia faba*, соответственно) папаином на:

- молекулярные параметры в растворе;
- термодинамическое сродство к растворителю;
- конформационную стабильность;
- поверхностную активность на границе раздела фаз воздух/раствор, скорость формирования и вязкоупругие дилатационные характеристики адсорбционных слоев;
- атакуемость ферментами желудочно-кишечного тракта человека *in vitro*;
- пенообразующую способность.

2. Связь между изменением структурных, гидро- и термодинамических параметров легуминов в результате ограниченного протеолиза папаином, их адсорбционным поведением и функциональными свойствами.

#### **Достоверность и обоснованность результатов**

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивали использованием общепринятых методов и аттестованных средств измерения, удовлетворительной оценкой погрешности измерений, согласованием полученных результатов с литературными данными, а также согласованием данных, полученных различными методами исследования.

#### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены на IX, X, XI, XV и XVI Ежегодных Международных конференциях ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Россия, Москва, 9-11 ноября 2009 г., 8-10 ноября 2010 г., 9-11 ноября 2011 г., 23-25 ноября 2015 г., 24-26 октября 2016 г.), 54-й научной конференции МФТИ "Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе" (Долгопрудный, 2011 г.), VI Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 21-25 марта 2011 г.), 6-м Международном симпозиуме «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические

процессы в технологиях продуктов питания и кормов» (Москва, 25-26 апреля 2012 г.), Международной научно-практической Конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 18-20 марта 2014 г.).

Автор был удостоен 1-го места на Конкурсе молодых ученых на лучшую научно-исследовательскую работу в рамках XI Международной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (2011 г.), 1-го места на Конкурсе научных работ по 54-й научной конференции МФТИ (2011 г., секция биохимической физики).

### **Публикации**

По результатам диссертации опубликовано 6 статей (из них 5 – в изданиях, рекомендованных ВАК) и 9 статей в сборниках материалов конференций.

### **Личный вклад автора**

Планирование эксперимента, полученный экспериментальный материал, его обработка, анализ и интерпретация являются результатом деятельности диссертанта. Формулирование цели и задач исследования, основных выводов и научных положений проводилась совместно с руководителем – к.х.н., И.Г. Плащиной. В работах, выполненных в соавторстве, диссертант внес основной вклад, принимая участие на всех этапах исследования – от планирования эксперимента, получения образцов для исследования и проведения эксперимента до обсуждения, оформления и публикации результатов.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений цитируемой литературы, включающего 357 ссылок. Работа изложена на 151 странице, содержит 37 рисунков и 12 таблиц.

### **Основное содержание работы**

#### **Глава 1. Обзор литературы**

В обзоре литературы проанализированы современные представления об особенностях зернобобовых культур как источников пищевого белка; о структурной организации легуминов и их ключевых с точки зрения функциональности физико-химических свойствах (конформационной стабильности и адсорбционном поведении); об основных функциональных свойствах легуминов и способах их регулирования; о процессе ограниченного протеолиза белков и особенностях протеолиза легуминов; о кинетике гидролиза глицинина папаином. Анализ литературных данных подтвердил актуальность темы и позволил сформулировать цель и задачи настоящего исследования.

#### **Глава 2. Материалы и методы исследования**

Описаны методы и условия выделения интактных глицинина и легумина *V.f.* и их модификации путем ограниченного протеолиза папаином с образованием глицинина-П и легумина *V.f.*-П. Контроль результатов протеолиза осуществляли методом электрофореза в

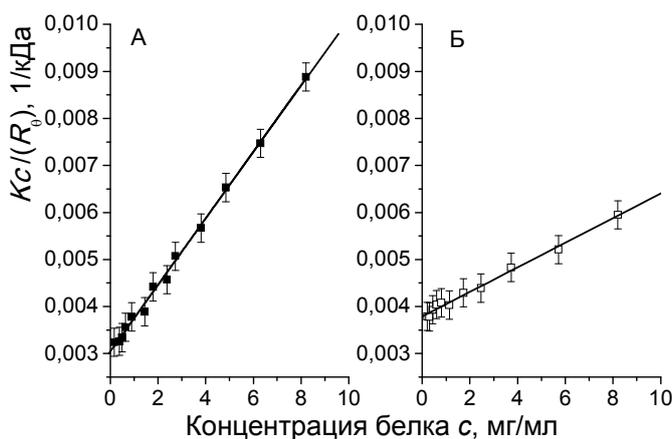
полиакриламидном геле. Дано краткое описание методов исследования, условий их проведения и используемого оборудования. Молекулярные параметры белков исследовали методами статического рассеяния света (молекулярная масса и второй вириальный коэффициент), динамического рассеяния света (коэффициент диффузии и эффективный гидродинамический радиус), электрофореза по Допплеру (зависимость  $\zeta$ -потенциала от pH среды), малоуглового рентгеновского рассеяния (радиус инерции), скоростной седиментации (коэффициент седиментации). Комбинированием полученных параметров оценена степень асимметрии и проницаемости молекул интактных и модифицированных легуминов для растворителя.

Конформационная стабильность легуминов и степень кооперативности процесса их термической денатурации исследована методом высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии (ВЧ-ДСК). Исследование поверхностного натяжения, динамики формирования и реологических свойств адсорбционных слоев интактных и модифицированных белков на границе воздух/раствор проводили методом динамической капельной тензиометрии и двумерной динамической дилатометрии.

Определение степени атакуемости белков ферментами желудочно-кишечного тракта человека в условиях, приближенным к физиологическим, осуществляли методом ТНБС (спектрофотометрический метод с использованием 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты) и микробиуретовым методом (МКБ). Пенообразующую способность белков оценивали с помощью параметров пенообразующей емкости и стабильности (времени полураспада) пен.

### Глава 3. Результаты исследований и их обсуждение

#### Влияние ограниченного протеолиза на молекулярные параметры легуминов в растворе



**Рисунок 1.** Графики Дебая для растворов глицинина (А) и глицинина-II (Б) в фосфатном буфере с pH 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

В разделе приведены результаты сравнительного исследования молекулярных параметров интактных и модифицированных ограниченным протеолизом папаином легуминов (таблица 1).

**Молекулярная масса и второй вириальный коэффициент.** На рисунке 1 в качестве примера представлены графики Дебая растворов глицинина и глицинина-II. Средневесовые молекулярные массы ( $M_w$ ) интактных и модифицированных

легуминов, рассчитанные как обратные величины значений отрезков, отсекаемых на оси ординат при линейной экстраполяции графиков Дебая, представлены в таблице 1.

Для интактных белков полученные значения молекулярных масс соответствует литературным данным. Значения молекулярных масс модифицированных белков ниже, чем интактных, приблизительно на 70 кДа. Величины второго вириального коэффициента  $B$ , служащего мерой изменения термодинамического сродства легуминов к растворителю и определяемого из угла наклона графиков Дебая, для растворов обоих интактных легуминов и их модифицированных форм в используемом растворителе (рН 7,6, 0,5 М NaCl) имеют положительные значения. Это свидетельствует о термодинамической предпочтительности взаимодействий белок–растворитель. Однако в результате модификации наблюдается двукратное понижение параметра  $B$ , т.е. термодинамическое сродство легуминов к растворителю достоверно снижается. Вероятно, это является результатом удаления в процессе модификации части гидрофильных слабоупорядоченных С-концевых участков  $\alpha$ -цепей, располагающихся на поверхности глобулы, и дополнительного экспонирования к растворителю некоторых гидрофобных аминокислотных остатков.

**Спектральные характеристики.** Подтверждением высказанного предположения об изменении гидрофобности поверхности молекул служат характерные изменения в спектрах собственной флуоресценции легуминов. Сдвиг максимума эмиссии в красную сторону и понижение молярной интенсивности флуоресценции происходит вследствие экспонирования к полярной среде (растворителю) части триптофановых остатков в результате модификации.

**$\zeta$ -потенциал.** Практически во всем интервале значений рН абсолютная величина  $\zeta$ -потенциала интактных молекул выше, чем модифицированных, что свидетельствует о понижении суммарного поверхностного заряда в результате ограниченного протеолиза папаином.

**Гидродинамические параметры.** Для характеристики гидродинамических размеров интактных и модифицированных молекул легуминов использовали метод динамического светорассеяния. Установлено, что ограниченный протеолиз сопровождается повышением константы диффузии  $D^0$  и понижением эффективного гидродинамического радиуса  $R_h$  макромолекул глицинина и легумина *V.f.* вследствие понижения молекулярной массы и, возможно, вследствие увеличения плотности упаковки молекулы белка в связи с отщеплением слабоструктурированного С-концевого участка  $\alpha$ -цепей.

Радиус инерции  $R_g$  глицинина слабо понижается в результате протеолиза. Отношение радиуса инерции к гидродинамическому радиусу используют для характеристики структуры молекулы белка ( $\rho_B$ , параметр Бурхарда). Установлено, что при переходе от молекул интактного глицинина к модифицированному наблюдается увеличение параметра  $\rho_B$ , что соответствует переходу от более проницаемой структуры (за счет наличия

слабоструктурированных фрагментов цепей  $\alpha$ -цепей на поверхности глобулы глицинина) к модели более гомогенной непроницаемой сферы.

Сочетание данных статического и динамического рассеяния света позволяет оценить форму молекулы белка с помощью величин фрикционных отношений ( $f/f_{\min}$ ). Согласно полученным данным, модифицированные легумины характеризуются более низкими значениями  $f/f_{\min}$ , что указывает на меньшую степень асимметрии их молекул по сравнению с интактными.

**Таблица 1.** Молекулярные параметры интактных и модифицированных легуминов в растворе

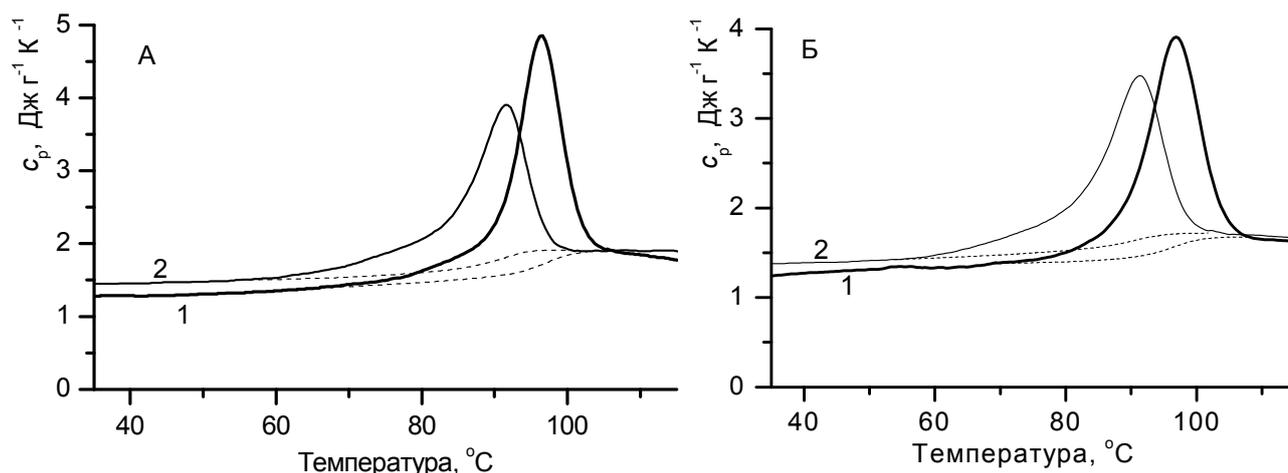
Параметр/белок	Глицинин	Глицинин-П	Легумин $V.f.$	Легумин $V.f.$ -П
$M_w$ , кДа	331±16	264±15	327±16	258±14
$B$ , $10^{-4}$ мл·моль/г <sup>2</sup>	3,57±0,21	1,31±0,16	3,20±0,16	1,59±0,17
$D^\circ$ , $10^{-7}$ см <sup>2</sup> /сек	3,36±0,13	4,19±0,12	3,41±0,12	4,17±0,13
$R_h$ , нм	6,37±0,11	5,16±0,10	6,22±0,10	5,09±0,11
$R_g$ , нм	4,25±0,05	4,15±0,02	–	–
$v_2$ , см <sup>3</sup> /г	0,730±0,00	0,721±0,002	0,727±0,002	0,720±0,002
$s$ , Св	10,8±0,2	10,6±0,2	10,9±0,2	10,7±0,2
$\rho_B$	0,667±0,01	0,804±0,017	–	–
$f/f_{\min}$	1,40±0,06	1,22±0,05	1,37±0,06	1,21±0,05

### **Влияние ограниченного протеолиза на конформационную стабильность легуминов**

**Термодинамические параметры денатурации.** Для характеристики конформационной стабильности интактных и модифицированных легуминов методом ВЧ-ДСК определены термодинамические параметры их термической денатурации как функции концентрации хлорида натрия и рассчитаны значения свободной энергии денатурации Гиббса как функции температуры при каждой концентрации соли.

На рисунке 2 приведены типичные термограммы денатурации исследуемых интактных и модифицированных глицинина и легумина  $V.f.$ .

Каждая из термограмм характеризуется единственным относительно симметричным пиком теплопоглощения, соответствующим переходу молекулы белка из упорядоченного (глобулярного) в менее упорядоченное (клубкообразное) состояние. В результате ограниченного протеолиза папаином происходит изменение структуры легуминов, проявляющееся в смещении термограмм в область более низких температур, уменьшении площади пика теплопоглощения, а также в его уширении во всем изученном диапазоне концентраций NaCl (0-1,0 М).



**Рисунок 2.** Термограммы глицинина (А, линия 1), глицинина-П (А, линия 2), легумина *V.f.* (Б, линия 1) и легумина *V.f.*-П (Б, линия 2) в фосфатном буфере с рН 7,6 и 0,5 М NaCl.

В таблице 2 приведены удельные термодинамические параметры денатурации интактных и модифицированных легуминов при различных концентрациях NaCl. Очевидно, что температура  $T_d$  и удельная калориметрическая энтальпия денатурации  $\Delta_d h^{cal}$  легуминов в модифицированной форме ниже соответствующих величин интактной формы. Удельные энтальпии денатурации всех исследованных белков являются линейными функциями температуры денатурации. Их наклоны  $\Delta c_p$  близки величинам инкрементов теплоемкости  $\Delta_d c_p$ , экспериментально установленным из термограмм соответствующих легуминов. Это совпадение является признаком термодинамического соответствия полученных данных. Модификация практически не изменяет величину  $\Delta_d c_p$ , то есть гидратационный вклад в энтальпию не изменяется. Следовательно, изменение энтальпии денатурации является преимущественно следствием нарушения компактности третичной структуры белка. Уширение пика теплопоглощения  $\Delta T$  в результате протеолиза означает снижение уровня кооперативности процесса денатурации белка.

**Расчет свободной энергии денатурации.** В связи с необратимостью процесса термической денатурации легуминов неизбежно возникает вопрос о применимости законов равновесной термодинамики к анализу результатов, полученных методом ВЧ-ДСК (расчет эффективной энтальпии, энтропии и свободной энергии денатурации). Предварительное изучение кинетических параметров денатурации легуминов позволило установить, что процессу конформационного перехода субъединиц предшествует процесс диссоциации молекул легуминов на субъединицы, и в используемом диапазоне концентраций белка (1-10 мг/мл) и скоростей сканирования (0,25-2,0 К/мин) температура и энтальпия денатурации меняются слабо. Это означает, что агрегация не вносит заметного вклада в величину измеряемых параметров, и экспериментальная термограмма мало отличается от кривой обратимого перехода. В этих условиях применение к определению термодинамических

параметров подхода с позиций равновесной термодинамики не приводит к значимым ошибкам.

В таблице 2 также приведены значения молярной калориметрической энтальпии денатурации ( $\Delta_d H^{cal}$ ) и эффективной энтальпии (вант-Гоффа) ( $\Delta_d H^{v.H}$ ) интактных и модифицированных легуминов, а также величины отношений  $\Delta_d H^{cal}/\Delta_d H^{v.H}$ , служащих эмпирическим критерием применимости модели двух состояний к описанию процесса

**Таблица 2.** Экспериментальные и рассчитанные параметры процесса термической денатурации легуминов в 0,05 М фосфатном буфере при рН 7,6 при различных концентрациях NaCl.

Белок	$C_{NaCl}$ , М	Удельные параметры					Молярные параметры			
		$T_d$ , °С	$\Delta_d h^{cal}$ , Дж/г	$c_p^{298}$ , Дж/г/К	$\Delta_d C_p$ , Дж/г/К	$\Delta T$ , К	$\Delta_d H^{cal}$ , кДж/моль	$\Delta_d H^{v.H}$ , кДж/моль	$\Delta_d H^{cal}/\Delta_d H^{v.H}$	$\Delta_d G^{max}$ , кДж/моль
Глицин	0	78,8	20,4	1,35	0,32	7,4	6752	424	15,9	625
	0,10	83,0	22,4	1,24	0,35	7,8	7414	471	15,7	742
	0,25	92,4	25,0	1,42	0,28	8,1	8275	507	16,3	896
	0,50	96,7	26,3	1,32	0,44	7,5	8705	536	16,2	976
	0,75	99,8	26,8	1,38	0,38	7,9	8870	570	15,6	1008
	1,0	101,2	27,1	1,24	0,47	7,1	8970	623	14,4	1026
Глицин-П	0	69,5	17,0	1,40	0,22	9,9	4488	310	14,5	344
	0,10	77,3	18,9	1,55	0,44	9,9	4990	333	15,0	413
	0,25	85,2	21,7	1,53	0,35	8,6	5729	343	16,7	529
	0,50	91,6	23,7	1,47	0,42	8,9	6257	392	16,0	616
	0,75	95,5	25,0	1,43	0,26	8,4	6600	416	15,9	676
	1,0	98,4	25,6	1,45	0,37	8,4	6758	449	15,1	702
Легумин <i>V.f.</i>	0	76,3	18,5	1,23	0,34	7,2	6050	356	17,0	502
	0,10	82,1	19,8	1,23	0,45	7,0	6470	393	16,5	562
	0,25	91,0	21,8	1,36	0,37	7,4	7120	411	17,3	658
	0,50	96,6	24,1	1,34	0,34	7,1	7890	441	17,9	791
	0,75	99,7	25,4	1,25	0,46	7,4	8320	480	17,3	871
	1,0	101,7	26,1	1,36	0,25	7,8	8535	512	16,7	910
Легумин <i>V.f.</i> -П	0	68,0	16,1	1,47	0,38	9,2	4154	279	14,9	319
	0,10	77,5	18,3	1,40	0,41	8,9	4721	279	16,9	400
	0,25	85,1	21,0	1,49	0,26	8,2	5418	321	16,9	512
	0,50	91,1	23,2	1,42	0,34	8,6	5986	348	17,2	606
	0,75	95,2	23,8	1,33	0,30	8,3	6140	357	17,2	634
	1,0	98,1	24,5	1,42	0,47	8,0	6321	376	16,8	665

денатурации белков. Величины отношений  $\Delta_d H^{cal}/\Delta_d H^{v.H}$  близки к числу структурных доменов, а именно к 12, в составе молекулы легуминов. При расчете на 1 домен величина параметра близка 1 (а именно 1,3-1,4), что свидетельствует о правомерности в первом приближении применения модели двух состояний к анализу процесса термоденатурации как интактных, так и модифицированных легуминов. Зависимости энтальпии денатурации от температуры денатурации (зависимости Кирхгоффа) для каждого из белков имеют линейный вид, что позволяет допустить независимость скачка теплоемкости процесса денатурации от температуры в рассматриваемом диапазоне температур. На основе параметров, полученных из термограмм, и использования уравнения (1) рассчитаны температурные зависимости свободной энергии денатурации Гиббса исследуемых белков [Privalov 2008]:

$$\Delta_d G(T) = \Delta_d H(T_d)(1 - T/T_d) - \Delta_d C_p [(T_d - T) - T \ln(T_d/T)] \quad (1)$$

В таблице 2 приведены максимальные значения свободной энергии денатурации  $\Delta_d G^{max}$  интактных и модифицированных легуминов при различных концентрациях NaCl. Максимальные значения свободной энергии денатурации наблюдаются в области температур 30-40 °С как для интактных, так и модифицированных белков. Ограниченный протеолиз приводит к понижению  $\Delta_d G$  и, таким образом, уменьшению конформационной стабильности легуминов. Увеличение концентрации соли в растворе сопровождается ростом  $\Delta_d G$ , что свидетельствует о повышении термодинамической стабильности обеих форм белков.

Повышение свободной энергии денатурации с ростом концентрации соли обусловлено уменьшением ионной атмосферы макромолекулы и, как следствие, понижением эффекта отталкивания одноименных зарядов аминокрупп, дестабилизирующего глобулу.

**Анализ термограмм.** Асимметрия пиков теплопоглощения на термограммах, а также значения отношений  $\Delta_d H^{cal}/\Delta_d H^{v.H} > 1$  свидетельствуют о сложном характере процесса термоденатурации легуминов: наличии более чем одного типа кооперативных единиц при конформационном превращении. Сложный характер термограмм может быть обусловлен либо несколькими последовательными переходами внутри макромолекулы как целого, либо независимыми переходами различных доменов в составе макромолекулы белка. Последняя версия наиболее вероятна для олигомерных белков.

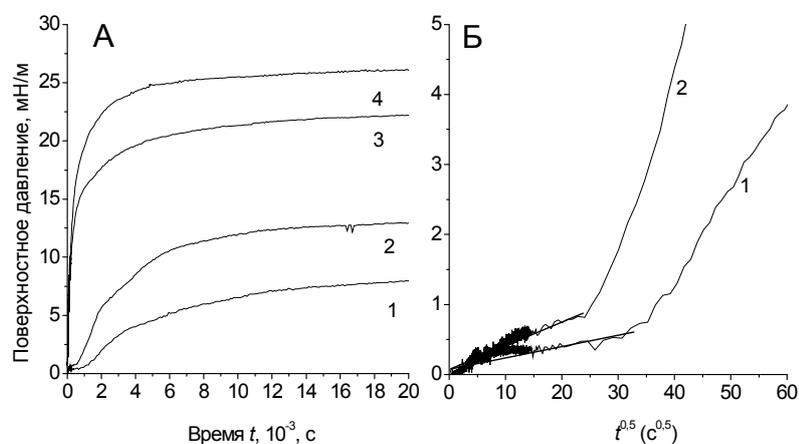
Учитывая известный из литературы факт, что денатурации легуминов предшествует стадия диссоциации гексамеров на субъединицы и наличие в составе субъединицы 2 типов ( $\alpha$ - и  $\beta$ -) доменов [Hashizume 1975], для деконволюции термограмм была выбрана модель  $n$  независимых переходов «все или ничего». Предварительная деконволюция пиков избыточной теплоемкости на основе выбранной модели показала наличие 3-х пиков теплопоглощения. Предполагается, что низкотемпературный переход обусловлен диссоциацией макромолекул легуминов на субъединицы, а два последующих высокотемпературных перехода вызваны раздельной денатурацией доменов, образованных  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями.

Таким образом, установлено, что ограниченный протеолиз существенно влияет на конформационную стабильность легуминов. Он вызывает понижение как свободной энергии денатурации глицинина и легумина  $V.f.$ , так и уровня кооперативности конформационного перехода. Сопоставление изменений параметров молекулярной структуры и конформационной стабильности молекул легуминов позволяет заключить, что ограниченный протеолиз папаином не сопровождается потерей четвертичной и третичной структуры, а лишь их дестабилизацией вследствие перестройки внутримолекулярных связей.

### **Влияние ограниченного протеолиза на адсорбционное поведение легуминов на границе воздух/раствор**

Способность белков образовывать адсорбционные слои на межфазных границах обусловлена дифильным характером их структуры. Для большинства глобулярных белков гидрофобные участки составляют около 40 % от общей площади доступной поверхности. Движущей силой процесса перемещения молекул белка из объемной фазы к поверхности раздела фаз является гидрофобный эффект, заключающийся в вытеснении гидрофобных областей поверхности белка из водного окружения.

**Динамика формирования адсорбционных слоев.** Примеры динамических кривых поверхностного давления адсорбционных слоев, формируемых на границе воздух/водный раствор глицинином и глицинином-II при различных концентрациях белка за время наблюдения 20 тыс сек, представлены на рисунке 3.



**Рисунок 3.** Динамические кривые поверхностного давления адсорбционных слоев (А) и зависимости поверхностного давления адсорбционных слоев от  $t^{0.5}$  (Б) для молекул глицинина (1, 3) и глицинина-II (2, 4) на границе буферный раствор/воздух при 25°C. Концентрация белка: 0,01 (1), 0,01 (2), 1,0 (3) и 1,0 (4) мг/мл. Растворитель: фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

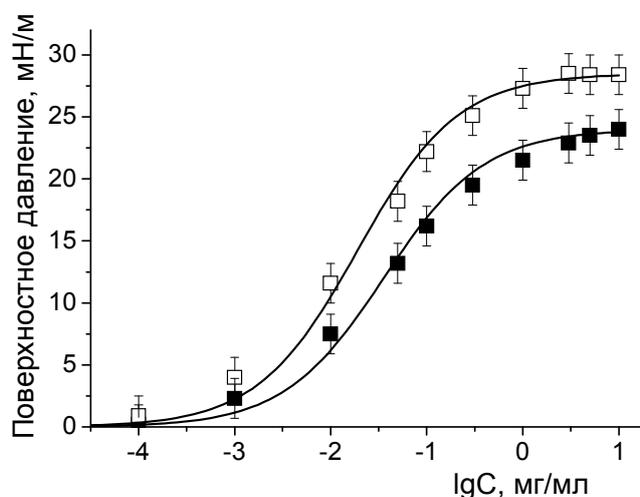
(рисунок 3, Б). Наблюдаемый эффект является следствием повышения скорости диффузии модифицированных молекул в результате понижения их молекулярной массы и размера.

При концентрациях белка  $\leq 0,01$  мг/мл динамические кривые имеют типичную сигмоидальную форму, на которой можно выделить следующие основные участки: 1) индукционный период; 2) постиндукционный период; 3) стационарный период.

Установлено, что при одинаковых концентрациях динамические кривые адсорбции модифицированных легуминов характеризуются меньшей продолжительностью индукционного периода

В постиндукционный период скорость адсорбции, оцениваемая по начальному наклону динамических кривых, также выше в случае модифицированных белков по сравнению с интактными. Повышение скорости формирования адсорбционного слоя в случае модифицированных легуминов в постиндукционный период обусловлено понижением активационного барьера адсорбции вследствие: 1) уменьшения конформационной стабильности (понижение свободной энергии денатурации, таблица 2); 2) уменьшения поверхностного заряда (понижение  $\zeta$ -потенциала, таблица 1); 3) уменьшения молекулярной массы и размера молекулы белка, приводящее к понижению свободной энергии адсорбции.

**Изотермы адсорбции.** На рисунке 4 представлены изотермы поверхностного давления растворов глицинина и глицинина-П на границе воздух/буферный раствор в полулогарифмических координатах.



**Рисунок 4.** Изотермы адсорбции глицинина (■) и глицинина-П (□) на границе воздух/буферный раствор при 25 °С. Время формирования адсорбционного слоя – 72 тыс сек. Растворитель: 0,05 М фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl.

находится в интервале 5-10 мг/мл, глицинина-П – 1-3 мг/мл; легумина *V.f.* – 1-3 мг/мл, легумина *V.f.*-П – 0,1-1 мг/мл.

Установленные различия изотерм адсорбции интактных и модифицированных белков свидетельствуют о том, что модификация молекул легуминов папаином приводит к повышению поверхностной активности белков и понижению критической концентрации белка, соответствующей формированию насыщенного адсорбционного слоя. Причины наблюдаемых эффектов заключаются в изменении параметров молекулярной структуры легуминов: 1) согласно расчету, уменьшение молекулярной массы на 70 кДа сопровождается понижением свободной энергии адсорбции для глицинина и легумина *V.f.* на 374 Дж/моль и 391 Дж/моль, соответственно; 2) понижение термодинамического сродства легуминов к

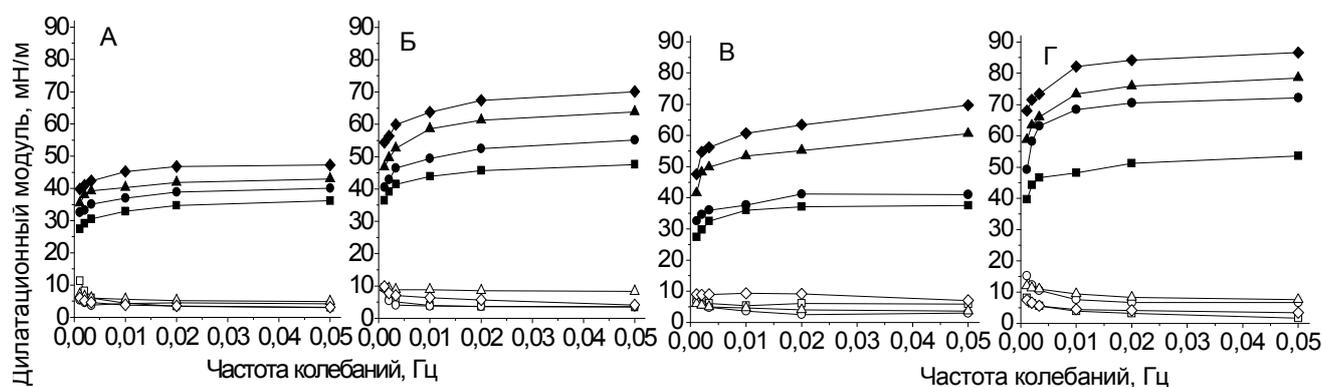
Глицинин-П и легумин *V.f.*-П во всем интервале концентраций в растворе характеризуются более высокими значениями поверхностного давления  $\pi$  по сравнению с интактными белками. Максимальное значение  $\pi$  (поверхностная активность) в данном растворителе составляет для глицинина – 23,9 мН/м, глицинина-П – 28,4 мН/м, легумина *V.f.* – 24,5 мН/м и легумина *V.f.*-П – 30,3 мН/м.

Концентрация белка, при которой функция достигает  $\pi=f(\tau)$  постоянного значения, т.е. происходит насыщение поверхностного слоя, ниже для модифицированных белков в сравнении с интактными: для глицинина эта величина

растворителю за счет экспонирования дополнительного количества ароматических аминокислотных остатков; 3) понижение конформационной стабильности легуминов в результате ограниченного протеолиза, благоприятствующее, по-видимому, формированию большего числа контактов с поверхностью раздела фаз и между молекулами белка в слое.

**Дилатационные свойства адсорбционных слоев.** Межфазная реология является весьма чувствительным методом характеристики структурообразующих свойств молекул на межфазной границе. Данный раздел посвящен сравнительному исследованию реологических свойств адсорбционных слоев интактных и модифицированных легуминов, исследованных в линейной области путем измерения комплексного модуля вязкоупругости в синусоидальном режиме.

На рисунке 5 приведены частотные зависимости действительной  $E'$  и мнимой  $E''$  составляющих комплексного модуля вязкоупругости адсорбционных слоев глицинина и легумина  $V.f.$  в интактной и модифицированной форме.

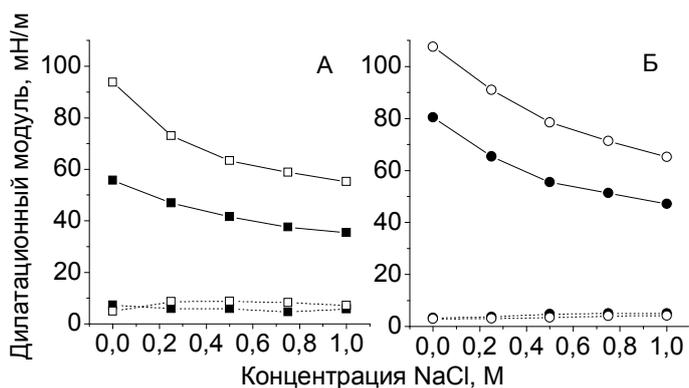


**Рисунок 5.** Действительная ( $E'$ , темные символы) и мнимая ( $E''$ , светлые символы) составляющие дилатационного модуля адсорбционных слоев глицинина (А), глицинина-П (Б), легумина  $V.f.$  (В) и легумина  $V.f.$ -П (Г) при различных концентрациях белков: 0,001 мг/мл (■/□), 0,01 мг/мл (●/○), 0,1 мг/мл (▲/△), 1 мг/мл (◆/◇). Время формирования слоя – 72 тыс сек. Растворитель – фосфатный буфер с рН 7,6 и содержанием 0,5 М NaCl, температура 25 °С.

Общими характеристиками реологического поведения адсорбционных слоев как интактных, так и модифицированных легуминов является близость значений комплексного модуля вязкоупругости (данные не приведены) и его упругой составляющей (модуля накопления  $E'$ ). Величина модуля накопления намного превышает величину модуля потерь ( $E' \gg E''$ ). Общность реологического поведения всех исследованных белков проявляется также в увеличении комплексного модуля и его упругой составляющей с ростом концентрации белка и частоты приложенного напряжения. В то же время модуль потерь  $E''$  претерпевает существенно меньшие изменения как при повышении концентрации белка, так и при увеличении частоты деформации.

Дилатационный модуль накопления модифицированных белков превосходит по величине таковой интактных белков, то есть адсорбционные слои модифицированных белков демонстрируют более высокую упругость при одинаковых концентрациях белка.

На рисунке 6 представлены зависимости  $E'$  и  $E''$  интактных и модифицированных белков от концентрации NaCl в растворе. Наблюдается уменьшение  $E'$  как для интактных, так и для модифицированных легуминов. Величина  $E''$  не проявляла существенной зависимости от ионной силы и различий между исследуемыми белками, оставаясь значительно ниже действительной части.



**Рисунок 6.** Зависимость модуля накопления (сплошная линия) и модуля потерь (пунктирная линия) составляющих комплексного дилатационного модуля интактных (■/●) и модифицированных (□/○) белков: глицинин (А) и легумин *V.f.* (Б) от концентрации NaCl в растворе. Температура – 25 °С, концентрация белка в растворе – 0,1 мг/мл, частота дилатационных колебаний – 0,02 Гц, растворитель – фосфатный буфер с рН 7,6.

легуминов увеличивает активационный барьер адсорбции и может приводить к уменьшению числа контактов молекулы белка в адсорбционном слое, реализуемых в результате денатурации. Данная тенденция проявляется как в случае интактных, так и модифицированных легуминов.

Понижение молекулярной массы, гидродинамического радиуса и поверхностного заряда белка приводит к снижению энергетического барьера адсорбции и, как следствие – к повышению скорости адсорбции. Понижение свободной энергии адсорбции в сочетании с большей конформационной подвижностью модифицированных белков благоприятствуют проявлению более высокой поверхностной активности легуминов, возможно, вследствие более совершенной упаковки адсорбционного слоя, обеспечивающей большее число контактов между макромолекулами. Большая поверхностная гидрофобность модифицированных молекул также благоприятна для стабилизации адсорбционного слоя как

Как показано выше, повышение концентрации NaCl приводит к увеличению конформационной стабильности легуминов. В таком случае наблюдаемое понижение величины комплексного дилатационного модуля (а также модуля накопления) с ростом концентрации соли обусловлено, вероятно, превалирующим вкладом в наблюдаемый эффект повышения конформационной стабильности молекул легуминов, а не экранирования заряда, который способствует усилению межмолекулярных взаимодействий и формированию более упругих адсорбционных слоев. Повышение конформационной стабильности молекул

за счет гидрофобных взаимодействий между макромолекулами и неполярной фазой, так и между макромолекулами внутри слоя. Таким образом, ограниченный протеолиз глицинина и легумина *V.f.* папаином приводит к существенному повышению их поверхностной активности, увеличению скорости формирования и упругости формируемых адсорбционных слоев на границе с воздухом.

### **Влияние ограниченного протеолиза на функциональные свойства легуминов**

**Атакуемость ферментами желудочно-кишечного тракта.** Сравнительное исследование атакуемости интактных и модифицированных легуминов ферментами желудочно-кишечного тракта человека проводили в условиях, приближенных к физиологическим. В частности, использовали двустадийную схему гидролиза, имитирующую процесс переваривания в среде желудка и тонкого кишечника при последовательном действии пепсина на первой стадии в кислой среде, химотрипсина и трипсина – на второй в нейтральной среде. Результаты гидролиза представлены в таблице 3.

Максимальные отличия в скорости атакуемости наблюдаются на первом этапе (под действием пепсина). Степень превращения модифицированных легуминов за полное время гидролиза выше по сравнению с интактными.

**Таблица 3.** Скорость и степень гидролиза легуминов ферментами желудочно-кишечного тракта. Стадия 1: действие пепсина, 120 минут; стадия 2: действие трипсина и химотрипсина, с 120 по 320 минуты.

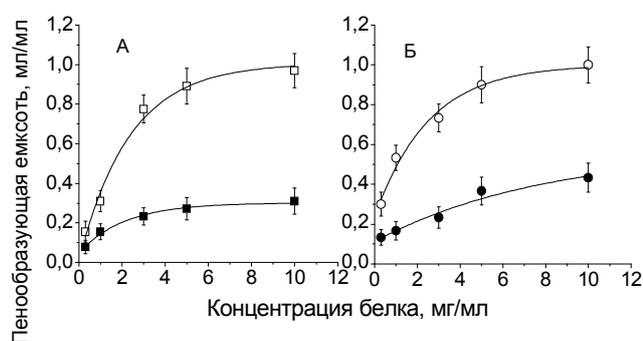
Стадия	Скорость гидролиза, нмоль пептидных связей/мин				Степень гидролиза, %			
	Стадия 1		Стадия 2		Стадия 1		Суммарно по двум стадиям	
Метод	ТНБС	МКБ	ТНБС	МКБ	ТНБС	МКБ	ТНБС	МКБ
Глицинин	5,7	6,3	6,2	5,9	7,8	8,1	21,8	21,0
Глицинин-П	8,6	10,4	7,1	6,0	11,8	13,5	28,0	26,5
Легумин <i>V.f.</i>	5,3	5,7	7,4	6,4	7,3	7,5	24,1	21,4
Легумин <i>V.f.</i> -П	9,1	10,0	7,5	6,2	12,4	13,1	29,5	26,7

Более высокая атакуемость ферментами ЖКТ модифицированных молекул, вероятно, объясняется отличиями в их структуре: после удаления в результате ограниченного протеолиза С-концевого участка кислых цепей субъединиц легуминов становятся более доступными протеолитическим ферментам скрытые ранее пептидные связи. Кроме того, более интенсивному гидролизу модифицированных легуминов ферментами ЖКТ способствует их более низкая конформационная стабильность.

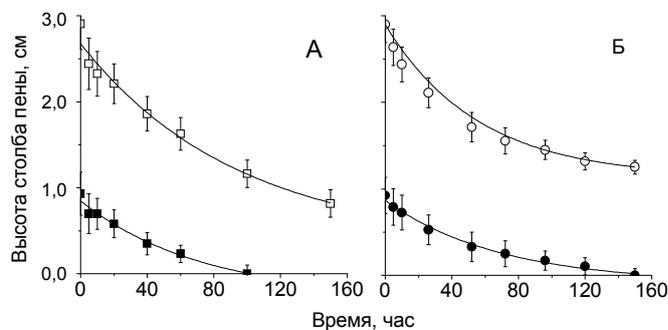
**Пенообразующие свойства.** Для сравнения пенообразующих свойств исследуемых белков использовали параметр пенообразующей емкости, представляющий собой отношение объема сформированной пены к объему исходного раствора.

На рисунке 7 представлены графики зависимости пенообразующей емкости от концентрации белка. Очевидно, что во всем исследуемом диапазоне концентраций модифицированные белки характеризуются бóльшим объемом сформированной пены по сравнению с интактными. Максимальный эффект составляют двукратное увеличение в случае легумина *V.f.* и трехкратное в случае глицинина.

На рисунке 8 представлены зависимости объема сформированной пены растворов интактных и модифицированных белков от времени старения. Время полураспада (двукратное сокращение объема) пены, образованной интактным глицинином составляет 30 часов, глицинином-П – 72 часа. Времена полураспада пены легумина *V.f.* и легумина *V.f.*-П составили 40 часов и 96 часов, соответственно.



**Рисунок 7.** Зависимость пенообразующей емкости от концентрации интактных (■/●) и модифицированных (□/○) глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б).



**Рисунок 8.** Стабильность пен растворов интактных (■/●) и модифицированных (□/○) глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б). Концентрация белка – 10 мг/мл.

В процессе образования дисперсных систем (эмульсий и пен) непрерывно формируется новая межфазная поверхность в диапазоне времен, типичных для дилатационной реологии. Типы деформации, которым подвергается межфазный слой в процессе эмульгирования и пенообразования, это расширение и, в меньшей степени – сжатие. Межфазная реология является весьма чувствительным методом характеристики структурообразующих свойств молекул на межфазной границе. Это позволяет проследить связь между реологическими свойствами адсорбционных слоев и их пенообразующей и эмульгирующей способностями.

Как выше было показано, изменения структуры легуминов в процессе ограниченного протеолиза приводят к повышению их поверхностной активности, увеличению скорости формирования адсорбционных слоев и повышению дилатационного комплексного модуля вязкоупругости. Совместным влиянием этих факторов обусловлено повышению пенообразующей способности легуминов.

## Заключение

Запасные белки семян зернобобовых культур, в частности их 11S фракция – легумины, являются ценным источником пищевого белка, однако не находят широкого применения в этом качестве ввиду недостаточно высоких функциональных свойств, обусловленных особенностями молекулярной структуры, такими как компактность, высокая конформационная стабильность, низкая поверхностная гидрофобность. Эффективным и достаточно мягким способом модификации структуры легуминов является ограниченный протеолиз, основанный на избирательном действии протеаз на слабоструктурированные и расположенные на поверхности глобулы С-концевые фрагменты  $\alpha$ -цепей.

В работе предпринято систематическое исследование влияния ограниченного протеолиза папаином на структурные, термодинамические и гидродинамические характеристики двух практически значимых легуминов – легумина соевых бобов *Glycine max* и легумина кормовых бобов *Vicia faba*.

В настоящей работе акцент сделан на общих закономерностях в изменении структуры и свойств исследованных легуминов. Показано, что ограниченный протеолиз папаином вызывает изменения молекулярных параметров легуминов, приводящее к существенным изменениям их физико-химических свойств, и, как следствие, функциональных свойств. Однако несомненный интерес представляет и изучение особенностей поведения различных глобулинов, а также действие ферментов различного происхождения, в том числе иммобилизованных.

В настоящее время работа продолжена в направлении исследования адсорбционного поведения интактных и модифицированных ограниченным протеолизом папаином легуминов на границе масло/раствор в сопоставлении с их эмульгирующими и стабилизирующими свойствами.

## Выводы

1. Отщепление слабоструктурированных С-концевых фрагментов  $\alpha$ -цепей приводит к понижению молекулярной массы, гидродинамического размера, радиуса инерции, степени асимметрии и проницаемости молекул легуминов для растворителя.

2. Удаление в результате протеолиза части гидрофильных слабоупорядоченных фрагментов приводит к понижению термодинамического сродства (второго вириального коэффициента) молекул легуминов к воде, понижению поверхностного заряда и увеличению доступной для растворителя гидрофобной поверхности за счет экспонирования дополнительного числа остатков ароматических аминокислот.

3. Ограниченный протеолиз приводит к понижению конформационной стабильности (свободной энергии денатурации Гиббса) молекул легуминов и уровня кооперативности процесса их термической денатурации; процесс денатурации как интактных, так и модифицированных легуминов имеет многостадийный характер, включающий стадию

диссоциации молекулы на субъединицы и последовательное плавление двух энергетически неэквивалентных доменов; процесс ограниченного протеолиза не вызывает потерю четвертичной и третичной структуры легуминов, а проявляется лишь в понижении их стабильности.

4. Повышение скорости диффузии модифицированных молекул в результате уменьшения молекулярной массы и гидродинамического размера, а также понижение энергетического барьера адсорбции за счет снижения конформационной стабильности и уменьшение поверхностного заряда вызывают повышение скорости формирования адсорбционных слоев легуминов на границе воздух/раствор.

5. Повышение поверхностной активности легуминов (понижение свободной энергии адсорбции) и понижение критической концентрации формирования насыщенного адсорбционного слоя являются результатом понижения их термодинамического сродства к растворителю, понижения конформационной стабильности, а также уменьшения молекулярной массы и гидродинамического размера молекул легуминов.

6. Превалирующий вклад в повышение комплексного дилатационного модуля вязкоупругости адсорбционных слоев модифицированных легуминов вносит фактор дестабилизации конформации молекул белка, при этом типичный для глобулярных белков упругий характер реологического поведения адсорбционных слоев сохраняется.

7. Ограниченный протеолиз папаином приводит к повышению атакуемости глицинина и легумина *V.f.* ферментами желудочно-кишечного тракта *in vitro*.

8. В результате ограниченного протеолиза наблюдается повышение пенообразующей емкости и стабильности пен, образуемых легуминами, что является следствием изменения их адсорбционного поведения на границе воздух/раствор (повышения скорости формирования адсорбционных слоев, увеличением поверхностной активности и увеличением дилатационного модуля упругости адсорбционных слоев).

### **Основные публикации по теме диссертации**

1. Поляков А.В. Изменение молекулярных параметров глицинина под действием ограниченного протеолиза папаином / Поляков А.В., Даниленко А.Н., Кривандин А.В., Рудаков С.В., Рудакова А.С., Шутов А.Д., Плащина И.Г., Заиков Г.Е., Кузнецова О.Н. // Вестник Казанского Технологического Университета – 2013. – №9. – с. 184-189.

2. Даниленко А.Н. Сравнительный анализ интегральной гидрофобности легуминов гороха различной сортовой принадлежности/ Даниленко А.Н., Поляков А.В., Павловская Н.Е., Плащина И.Г. // Вестник Орел ГАУ – 2013. – №1, т.40. – с. 77-83.

3. Поляков А.В. Влияние ограниченного протеолиза папаином на термодинамическую стабильность глицинина / Поляков А.В., Даниленко А.Н., Рудаков С.В., Рудакова А.С.,

Шутов А.Д., Плащина И.Г., Шкодич В.Ф., Кочнев А.М., Заиков Г.Е. // Вестник Казанского Технологического Университета. – 2014. – Т17, №1. – с. 203-208.

4. Поляков А.В. Изменение поверхностной активности и реологических свойств адсорбционных слоев глицинина на границе воздух/раствор в результате ограниченного протеолиза папаином / Поляков А.В., Даниленко А.Н., Шутов А.Д., Плащина И.Г., Шкодич В.Ф., Кочнев А.М., Заиков Г.Е.// Вестник Казанского Технологического Университета. – 2014. – Т.17, №1. – с. 210-215.

5. Polyakov A.V. Improving of the functionality of glycinin by limited papain hydrolysis / Polyakov A.V., Danilenko A.N., Zhuravleva I.L., Plashchina I.G., Rudakov S.V., Rudakova A.S., Shutov A.D., Shkodich V.F., Kochnev A.M., Zaikov G.E. // Вестник Казанского Технологического Университета – 2014. – Т17 №2. – с. 239-242.

6. Polyakov A.V. Improving of the functionality of glycinin by limited papain hydrolysis / Polyakov A.V., Danilenko A.N., Zhuravleva I.L., Plashchina I.G., Rudakov S.V., Rudakova A.S., Shutov A.D. // Chapter 6 In: Functional Materials Properties, Performance and Evaluation (Ed. Klodzinska E.) /Apple Academic Press – 2015. – p. 133–142.

7. Поляков А.В. Влияние ограниченного протеолиза папаином на молекулярные параметры и термодинамическую стабильность глицинина / Поляков А.В., Журавлева И.Л., Даниленко А.Н., Плащина И.Г.// Труды десятой ежегодной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Российская Академия Наук, отделение химии и наук о материалах) 8-10 ноября 2010, Москва. – с. 194-201.

8. Поляков А.В. Сравнительная характеристика молекулярных параметров, физико-химических и функциональных свойств глицинина Glycine max и продукта его ограниченного протеолиза папаином // Труды пятнадцатой ежегодной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Российская Академия Наук, отделение химии наук о материалах) – Москва. – 2015. – С. 169-174.

9. Поляков А.В. Повышение поверхностной активности, скорости формирования и вязкоупругости адсорбционных слоев глицинина на границе воздух/вода в результате ограниченного протеолиза папаином / Поляков А.В., Даниленко А.Н., Журавлева И.Л., Плащина И.Г., Рудаков С.В., Рудакова А.С., Шутов А.Д.// 6-й Международного симпозиум «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов». – Москва. – 2012. – С. 147-151.

10. Поляков А.В. Организация в растворе и термодинамическая стабильность основного 7S глобулина соевых бобов Glycine max/ Поляков А.В., Журавлева И.Л., Плащина И.Г. // Труды 54-й научной конференции МФТИ "Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе". Молекулярная и биологическая физика (Долгопрудный, 2011). Тезисы. – М.:МФТИ. – 2011. – С. 201-202.

11. Поляков А.В. Влияние ограниченного протеолиза папаином на молекулярные параметры и термодинамическую стабильность глицинина/ Поляков А.В., Даниленко А.Н., Журавлева И.Л., Плащина И.Г.// VI Московский международный конгресс – Биотехнология: состояние и перспективы развития (VI Moscow international congress – Biotechnology: state of the art and prospects of development) Секция 7. «Биотехнология и пища для жизни». Тезисы.– Москва. – 2011. – том 2 – с.147-148.

12. Polyakov A.V. Plant Globulins Functional Properties Improving By Papain Limited Proteolysis / Polyakov A.V., Danilenko A.N., Krivandin A.V., Rudakov S.V., Rudakova A.S., Shutov A.D., Plashchina I.G. // The International Conference “Biotechnology And Quality Of Life”. Conference Proceedings. Section 8 “Biotechnology Food. Health Food Products”. C.08.05. Материалы Международной научно-практической Конференции «Биотехнология и качество жизни». Тезисы. – Москва – 2014. – с. 350-352.

#### Цитируемая литература

1. Ehrlich P.R., Ehrlich A.H. Population, Resources, and the Faith-Based Economy: the Situation in 2016 // *Biophys Econ ResourQual*– 2016. – V. 1: 3
2. Архангельский В.И. Питание и здоровье человека // В кн: Гигиена с основами экологии человека (ред. П.И. Мельниченко) – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 752 с.
3. Распоряжение Правительства РФ «Основы государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года», утвержденные распоряжением Правительства Российской Федерации от 25 октября 2010 г. № 1873-р
4. Damodaran S. Amino acids, peptides and proteins // In: *Food Chemistry* (Ed. Fennema, R.O.) – CRC Press, New York, 1996. – P. 321-416.
5. Толстогузов В.Б. Экономика новых форм производства пищевых продуктов / Толстогузов В.Б. – М.: Экономика. 1986 – 176 с.
6. Black M. Seed Technology and its Biological Basis // Ed. Black M., Bewley J. D. – Sheffield Academic Press, UK and CRC Press, Florida, 2000. – 419 p.
7. Shutov A. D., Vaintraub I. A. Degradation of storage proteins in germinating seeds // *Phytochemistry* – 1987. – V. 26 (6). – P. 1557-1566.
8. Barać M. B., Stanojević S. P., Jovanović S. T., Pešić M. B. Soy protein modification – a review // *APTEFF*. – 2004. – V. 35. – P. 1-280.
9. Shutov A. D., Senyuk V. I., Kakhovskaya I. A., Pineda J. High molecular mass products of hydrolysis of soybean glycinin by trypsin. // *Biokhimiya*. – 1993. – V. 58. – P. 174-182.
10. Privalov P. L. Microcalorimetry of proteins and their complexes // In.: *Protein Structure, Stability, and Interactions* (Ed. John W. Shriver) – The Humana Press Inc., Totowa, New Jersey., 2008. – P. 1-39.
11. Hashizume K., Watanabe T. Influence of Heating Temperature on Conformational Changes of Soybean Proteins // *Food Nutr*. – 1979. – V. 43 (4). – P. 683-690.