

## **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ В СОСТАВЕ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР**

**Кубасова А. Н., Манжесов В. И., Галочкина Н. А., Глотова И. А.**

*ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Воронеж, e-mail: glotova-irina@yandex.ru*

Перспективными объектами растительного происхождения с высоким биотехнологическим потенциалом в области получения белковых продуктов и обогащения пищи минорными компонентами являются продукты промышленной переработки масличных культур – жмых и шрот рапса и подсолнечника. Среди белков подсолнечника преобладает щелочерастворимая фракция с низкой растворимостью в технологических средах, характерных для пищевой промышленности. Среди белков рапса преобладает водорастворимая фракция, однако суммарное содержание глютенинов и нерастворимых фракций в нативном жмыхе превосходит исходное содержание водорастворимых белков, Это обуславливает целесообразность получения биомодифицированных белковых препаратов, в том числе в связи с комплексным составом субстратов (белковые фракции находятся в комплексе с углеводными фракциями). Проведен скрининг ферментных препаратов отечественного и зарубежного производства по уровню преобладающей биохимической активности и физико-химическим характеристикам с прогнозируемым эффектом целенаправленной биотрансформации белково-углеводных субстратов. Исследовано влияние ферментативной обработки на распределение электрофоретических фракций модифицированных белковых фракций жмыха рапса и подсолнечника. Установлено изменение количества белковых фракций, различающихся электрофоретической подвижностью в условиях неденатурирующего электрофореза в ПААГ. Путем электрофоретического исследования структурных особенностей продуктов биомодификации белков в составе жмыха рапса и подсолнечника установлено соответствие направления биотрансформации нативных биополимеров поставленной цели в случае использования комплексного препарата Целлолюкс-А, который обладает комплексной активностью в отношении углеводных и белковых субстратов.

Ключевые слова: рапс, продукты переработки, жмых, белок, биомодификация, ферментные препараты, электрофорез.

## **BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL AND ELECTROPHORETIC MOBILITY OF PROTEIN FRACTIONS IN THE COMPOSITION OF SECONDARY PRODUCTS OF PROCESSING OF OIL CROPS**

**Kubasova A. N., Manzhesov V. I., Galochkina N. A., Glotova I. A.**

*Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, glotova-irina@yandex.ru*

Press cake and meal rapeseed and sunflower-products of industrial processing of oilseeds, are promising targets of plant origin with a high biotechnological potential in the field of protein foods and the enrichment of food minor components-products of industrial processing of oilseeds. Among proteins of sunflower dilacerations fraction with low solubility prevails in technological environments that are typical for the food industry. Among the proteins of rapeseed soluble fraction predominates, but the total content of glutelins and insoluble fractions in native meal exceeds the original content of water-soluble proteins, This leads to the viability of biomodified protein preparations, including in connection with the complex composition of the substrates (protein fractions are in the complex carbohydrate fractions). Screening of enzyme preparations of domestic and foreign production in the level prevailing biochemical activity and physico-chemical characteristics of the projected effect of targeted biotransformation of protein-carbohydrate substrates. The effect of enzymatic treatment on the distribution of the electrophoretic fractions of the modified protein fractions of rapeseed meal and sunflower. The change in amount of protein fractions with different electrophoretic mobility under electrophoresis in non-denaturing PAGE. By electrophoretic studies of the structural features of the protein modification products in the composition of rapeseed meal and sunflower established by appropriate directions biotransformation of native biopolymers goal in the case of a complex preparation Cellolux-A, which has a complex activity with respect to carbohydrate and protein substrates.

Keywords: rape, products of processing, cake, protein, biomodification, enzyme preparations, electrophoresis.

Как объект агробиотехнологии рапс имеет большое значение в качестве источника продовольствия, традиционно в виде рапсового масла [5-6], а также выступает источником производства кормовой продукции на основе рапсового жмыха. В структуре производства и переработки продукции растениеводства рапс позиционируется как культура, имеющая большое продовольственное, кормовое, техническое, агротехническое и экологическое значение. Он является одной из важнейших масличных и кормовых культур. Расширение его посевных площадей имеет широкие перспективы в России, прежде всего для производства растительного масла, а также как источник биотоплива [9].

Рапсовые жмых и шрот – хорошие источники минеральных веществ, богаты жиро- и водорастворимыми витаминами: токоферолом, ретинолом, рибофлавином, холином, биотином, а по содержанию кальция, фосфора, магния, меди и марганца превосходят соевые [9]. Хорошо сбалансированный по незаменимым аминокислотам, и особенно по серусодержащим [4], белок рапса весьма интересует специалистов в области питания. Однако потенциальные возможности жмыхов масличных культур как источников пищевых белковых веществ, в том числе эссенциальных компонентов питания, реализованы крайне недостаточно [1, 3].

SWOT-анализ жмыхов масличных культур является эффективным инструментом в обосновании биотехнологических подходов к их использованию в качестве источников пищи и кормов. До недавнего времени использование жмыха рапса ограничивалось в связи с наличием в семенах рапса и продуктах его переработки антипитательных веществ. Важнейшие из них – тиогликозиды, предшественники соединений, вызывающих нежелательный вкус или приводящих к расстройству функции щитовидной железы. В настоящее время эта проблема решается выведением новых селекционных сортов и гибридов рапса с низким содержанием антипитательных веществ (сорта рапса типа «00» содержат эруковую кислоту в количестве не более 5 % от суммы жирных кислот и гликозинолаты – не выше 3 % от массы семян), что позволяет рассматривать его семена как весьма перспективный источник растительного масла, а жмых и шрот – как дополнительные источники пищевого белка.

Цель работы – обоснование подходов к реализации эффективных экологически чистых биотехнологических способов получения отечественных растительных белковых препаратов, перспективными, дешевыми и доступными источниками получения которых являются продукты переработки масличных культур, в том числе рапса и подсолнечника.

#### **Материалы и методы исследования**

Объектами исследования служили: жмых, полученный методом прессования от низкоэрукового сорта рапса «Гонар» урожая 2013 г. (производитель – ЗАО «Алые поля»

Воронежской обл.), ферментные препараты отечественного и импортного производства, характеристика которых, по данным производителей, представлена в работе [7], а также продукты биомодификации биополимерных систем жмыха рапса с их использованием.

Существенный интерес представляет изучение условий применения в реализации поставленной цели следующих ферментных препаратов.

1) Препарат протеолитического действия животного происхождения – коллагеназа, полученный из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* (производитель – ЗАО «Биопрогресс», г. Щелково, Московской области). pH-оптимум 7,5-7,75, протеолитическая активность 100 ед/г. Температурный оптимум 37-45 °С.

2) Препарат протеолитического действия бактериального происхождения – GC-401 (производитель – «Дженикор интернешенел», США). Продуцент *Aspergillus niger*, pH-оптимум 5,5–6,6, протеолитическая активность 600 ед./см<sup>3</sup>. Температурный оптимум 55–65 °С.

Производителем следующих ферментных препаратов является ООО ПО «Сиббиофарм» (Россия, Новосибирская обл., г. Бердск).

3) Препарат Амилолюкс А., который имеет грибное происхождение. Продуцент – *Aspergillus awamori*, pH-оптимум 5,0-7,0, протеолитическая активность 1500 ед./см<sup>3</sup>. Температурный оптимум 50–70 °С.

Основной фермент амилолитических препаратов –  $\alpha$ -амилаза – гидролизует внутренние  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи крахмала. Комплекс сопутствующих ферментов (ксиланаза,  $\beta$ -глюканаза, целлюлаза, протеаза) позволяет освободить крахмал из эндосперма и разрушить глюкопротеиновые связи.

4) Препарат протеолитического действия бактериального происхождения – Протосубтилин ГЗх. Продуцент *Bacillus subtilis*, pH-оптимум 6,0–7,0, протеолитическая активность 70 ед./см<sup>3</sup>, плотность 1,05 г/см<sup>3</sup>. Температурный оптимум 45–50 °С.

Протосубтилин ГЗх катализирует расщепление растительных белков, т.е. обеспечивает разрыв связи – СО - NH – с образованием пептидов низкой молекулярной массы и аминокислот. Еще одной функцией Протосубтилина ГЗх является разрушение углеводно-протеиновых связей, что позволяет повысить степень очистки белковых фракций до категории изолятов.

Нейтральные протеазы являются одними из наиболее активных протеолитических ферментов. Щелочные протеазы гидролизуют не только внутренние, но и терминальные пептидные связи. Комплекс протеаз гидролизует высокомолекулярные растительные белки до пептидов и аминокислот, однако, в данном случае, повышение степени гидролиза белка сопряжено с дополнительными потерями в виде водорастворимых фракций.

5) ЦеллоЛюкс-А – комплексный ферментный препарат грибного происхождения. Протеолитическая активность 2000 ед./см<sup>3</sup>, температурный оптимум 50–60 °С, рН-оптимум 4,0–6,0. Проявляет активность в отношении углеводных субстратов. По рекомендациям производителя ООО ПО «Сиббиофарм», применение комплекса ферментов в составе препарата Целлолюкс-А позволяет: повысить эффективность использования сырья за счет более глубокого гидролиза; стабилизировать технологический процесс; повысить качество готовой продукции; обеспечить безопасную эксплуатацию оборудования; повысить культуру производства.

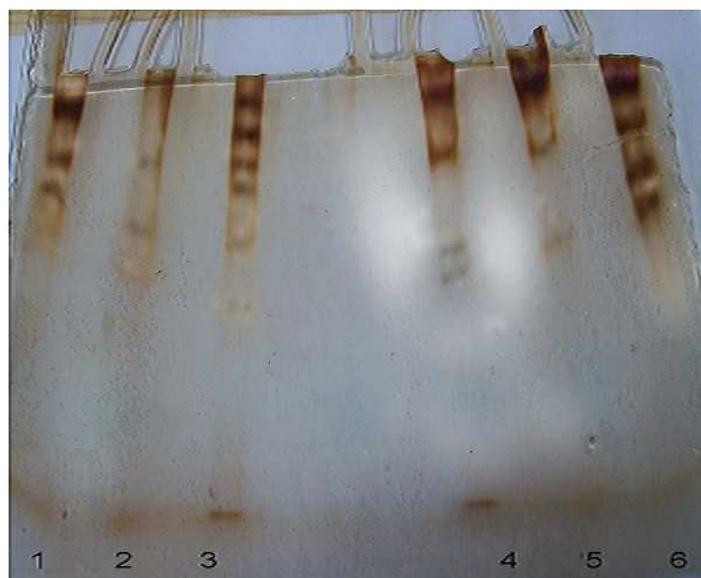
Идентификацию структурных особенностей продуктов биомодификации белков в составе жмыхов рапса и подсолнечника проводили по методу Davis [10]. Разделяющий гель содержал Трис-НСI, рН 8,3, ТЕМЕД, акриламидную смесь (30 % АСА / 0,8 % МВА), персульфат аммония. Концентрирующий гель содержал Трис-НСI рН 6,7, ТЕМЕД, акриламидную смесь (10% АСА / 2,5% МВА). Концентрация концентрирующего геля составляла 4 %, а разделяющего – 8 %.

Идентификацию белковых фракций проводили нитратом серебра по следующей методике. 1. Фиксация. Гель помещали в раствор, содержащий 50 % ацетона, 1,5 % ТХУ, 0,2 % формальдегида. Отмывали водой 5–10 мин. 2. Гель помещали в 50 %-ный ацетон на 5–10 мин. После этого отмывали несколькими порциями воды. 3. На следующем этапе пластинку геля инкубировали в 0,02 % растворе тиосульфата натрия в течение 1 мин, после чего отмывали водой в течение 5 мин. 4. На следующей стадии идентификации белковых фракций гель помещали на 8 мин в раствор, содержащий 0,2 % нитрата серебра и 0,1 % формальдегида, после чего отмывали водой 3–5 раз по 2 мин. 5. Проявление геля проводили в растворе, содержащем 0,7 % бикарбоната натрия, 0,01 % формальдегида. Окраску геля осуществляли до появления полос, после чего помещали его в 7 % уксусную кислоту.

Электродный буфер представлял собой смесь 0,5 М Трис-глицинового буфера рН 8,3. Напряжение электрического тока подбирали из расчета 5 мА на один слот.

### **Результаты исследований и их обсуждение**

В результате исследований получены электрофореграммы, общий вид которых на примере белковых фракций жмыха рапса представлен на рисунке.



*Электрофореграммы белковых фракций жмыха рапса: 1 – без ферментного препарата; после биомодификации с использованием ферментных препаратов: 2 – коллагеназа; 3 – GS-401; 4 – Амилолюкс А; 5 – Целлолюкс А; 6 – протосубтилин ГЗх*

Для определения относительной электрофоретической подвижности и количества белковых фракций в результате действия комплексных ферментных препаратов на жмых рапса был проведен неденатурирующий электрофорез в ПААГ, результаты которого представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Результаты неденатурирующего электрофореза в ПААГ белков жмыха рапса

Ферментный препарат	Количество полос	Относительная электрофоретическая подвижность ( $R_f$ ), отн. Ед.	Интенсивность окраски, %
Без ферментного препарата	3	0,029	50
		0,155	30
		0,223	20
Коллагеназа	2	0,174	50
		0,34	50
GS-401	6	0,029	25
		0,107	30
		0,175	20
		0,233	15
		0,359	7
Амилолюкс А	4	0,534	3
		0,058	50
		0,204	30
		0,427	10
Целлолюкс А	3	0,485	10
		0,039	70
		0,204	20

		0,427	10
Протосубтилин ГЗх	4	0,049	30
		0,136	20
		0,243	25
		0,33	25

Таблица 2

Результаты неденатурирующего электрофореза в ПААГ белков жмыха подсолнечника

Ферментный препарат	Количество полос	Относительная электрофоретическая подвижность ( $R_f$ ), отн. ед.	Интенсивность окраски, %
Без фермента	4	0,025	40
		0,132	30
		0,157	20
		0,212	10
Коллагеназа	3	0,176	35
		0,218	33
		0,36	32
GS-401	9	0,025	20
		0,076	30
		0,158	18
		0,240	15
		0,285	12
		0,298	7
		0,370	6
		0,420	4
		0,480	3
Амилолюкс А	5	0,05	30
		0,202	25
		0,360	25
		0,420	10
		0,460	10
Целлолюкс А	4	0,035	60
		0,210	20
		0,360	10
		0,420	10
Протосубтилин ГЗХ	5	0,045	25
		0,148	20
		0,245	20
		0,285	20
		0,354	15

В результате анализа полученных электрофореграмм и данных об использованных ферментных комплексах можно сделать следующие выводы по отношению к белковым фракциям рапса.

1. Пробы, обработанные коллагеназой, характеризуются наименьшим количеством полос.

2. Эффективный протеолиз под действием GS-401 привел к появлению 6 фрагментов белков в случае жмыха рапса. Анализ полученных электрофореграмм позволяет предположить, что часть белковых фрагментов имеет небольшую молекулярную массу, так как нами были обнаружены белковые полосы,  $R_f$  которых приближается к 0,3–0,5

3. Использование препарата Амилолюкс А привело к появлению четырех фрагментов белков по сравнению с контролем. Кроме того, весьма интересен факт, что по  $R_f$  имеются совпадающие белковые зоны между Амилолюкс А и Целлолюкс А. Белковые фрагменты, полученные в результате воздействия ферментного комплекса Амилолюкс А, имеют более высокую электрофоретическую подвижность, что обусловлено, видимо, удалением из белковой глобулы крахмальных компонентов (под действием  $\alpha$ -амилаз).

4. После применения препарата Целлолюкс А электрофоретический анализ показал наличие трех белковых зон с  $R_f$  0,039; 0,204; 0,427 соответственно.

Удаление целлюлозы из углеводов-протеинового комплекса увеличило значение  $R_f$  у всех белков. Особое внимание следует обратить на третью белковую зону, в которой  $R_f$  увеличивается в 2 раза, что обусловлено интенсивным протеолитическим действием препарата.

5. Применение препарата Протосубтилил ГЗх, являющегося комплексным ферментным препаратом бактериального происхождения, приводит к появлению большого количества пептидов в пробе.

Таким образом, в результате визуального анализа электрофореграммы можно заключить, что наибольшее интенсивное протеолитическое действие на белковые фракции рапса оказывает препарат GS-401, однако малое количество полос при обработке коллагеназой и другими препаратами может быть связано с более глубоким гидролизом пептидов из пробы до низкомолекулярных фрагментов, которые не идентифицируются при данных условиях проведения электрофореза.

Результаты показывают, что количество полос на электрофореграммах подсолнечника во всех случаях превосходит этот показатель для белков рапса. Среди белков подсолнечника преобладает щелочерастворимая фракция с низкой растворимостью в технологических средах, характерных для пищевой промышленности. Среди белков рапса преобладает водорастворимая фракция, однако суммарное содержание глютенинов и нерастворимых фракций в нативном жмыхе превосходит исходное содержание водорастворимых белков, обуславливая в качестве задачи работы получение биомодифицированных белковых препаратов, в том числе, в связи с комплексным составом субстратов (белковые фракции находятся в комплексе с углеводными фракциями). Использование комплексных ферментных препаратов целесообразно для повышения степени экстрагирования белковых

фракций из жмыха рапса и подсолнечника и последующего обеспечения их функциональности в пищевых системах [2, 8].

### **Выводы**

Установлено изменение количества белковых фракций, различающихся электрофоретической подвижностью в условиях неденатурирующего электрофореза в ПААГ и растворимостью в воде, солевых и щелочных модельных технологических средах. Путем электрофоретического исследования структурных особенностей продуктов биомодификации белков в составе жмыха рапса и подсолнечника установлено соответствие направления биотранс-формации нативных биополимеров поставленной цели в случае использования комплексного препарата Целлолюкс-А, который обладает комплексной активностью в отношении углеводных и белковых субстратов.

### **Список литературы**

1. Антипова Л. В., Глотова И. А., Астанина В. Ю. Способ получения концентрата белков из растительного сырья // Патент России № 2174757.2000. Бюл. № 29.
2. Антипова Л. В., Глотова И. А., Жаринов А. И. Методы исследования мяса и мясных продуктов. – Воронеж, 2000.
3. Белова Е. И. Биотехнология комплексной переработки рапсового жмыха / Е. И. Белова, А. Н. Кубасова // Технологии и товароведение сельскохозяйственной продукции. – 2013. – № 1. – С. 68-72.
4. Королькова Н. В., Калашникова С. В. Изменение содержания белка при хранении семян рапса в различных газовых средах // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2007. – № 1. – С. 13-14.
5. Королькова Н. В., Котик О. А., Трухман С. В. Исследование процесса рафинации рапсового масла // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2007. – № 15. – С. 127-129.
6. Королькова Н. В., Котик О. А., Калашникова С. В. Биохимический состав семян рапса при хранении в различных газовых средах // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2002. – № 5–6. – С. 11-13.
7. Манжесов В. И., Кубасова А. Н., Курчаева Е. Е., Сысоева М. Г., Глотова И. А. Экзогенный биокатализ в решении проблемы рационального использования жмыха рапса // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24227> (дата обращения: 01.04.2016).

8. Рензеева Т. В. Функциональные свойства белковых продуктов из жмыхов рапса и рыжика/ Т. В. Рензеева // Техника и технология пищевых производств. – 2009. – № 4.
9. Федотов В. А., Гончаров С. В., Савенков В. П. Рапс России. – М.: Агролига России, 2008. – 336 с.
10. Davis B. J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein / B. J. Davis // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1994. – Vol. 121. – P. 404-427.