

## АНАЛИЗ РАЗМЕРОВ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ БОБОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

### В.А. Базулева

преподаватель, кафедра «Биотехнология, химия и стандартизация»,  
Тверской государственный технический университет (г. Тверь, Россия)  
E-mail: silchenko555@mail.ru

### Е.А. Прутенская

к.б.н., доцент, кафедра «Биотехнология, химия и стандартизация»,  
Тверской государственный технический университет (г. Тверь, Россия)  
E-mail: prutenskaya@mail.ru

### О.В. Манаенков

к.х.н., доцент, кафедра «Биотехнология, химия и стандартизация»,  
Тверской государственный технический университет (г. Тверь, Россия)  
E-mail: ovman@yandex.ru

Ожирение является проблемой современного мира. Избыток веса приводит к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, сахарному диабету 2-го типа. Альтернативой диете с низким гликемическим индексом являются продукты, замедляющие усвоение углеводов за счет ингибирования ферментов, ответственных за их усвоение. Эти продукты включают ингибиторы  $\alpha$ -амилазы и глюкозидазы. Белковые вещества ингибиторного действия содержатся в больших количествах в фасоли разных сортов. В зависимости от способа извлечения, концентрирования, выделения многие ингибиторные препараты теряют свою активность при использовании. Поэтому получение очищенных ингибиторов с высокой биологической активностью является актуальной задачей. Разрабатываемые современные методы извлечения веществ из растительного сырья, например, фракционирование, сверхкритическая экстракция, приводят к увеличению активности биологически активных веществ.

Цель работы – с помощью метода светорассеяния исследовать размеры частиц белковых веществ, извлеченных из семян красной фасоли и определить их биологическую активность.

В качестве модельного объекта использовали бычий сывороточный альбумин. При изучении размеров частиц было показано, что детектирование при  $15^\circ$  выявляет только крупные частицы, а угол  $90^\circ$  позволяет зафиксировать одновременно мелкие (6–20 нм) и крупные (до 6000 нм) белковые фракции. В фосфатном буфере частицы сывороточного альбумина образуют агрегаты (~6000 нм), а в воде частицы могут присутствовать в мономерной и димерной формах (~1000 нм). Белковые вещества, полученные экстракцией из красной фасоли в буферный раствор pH 8, представляют собой укрупненные агрегаты. Под воздействием ультразвука происходит уменьшение размеров белковых частиц с 620 до 380 нм. Исследования биологической активности белковых веществ по отношению к панкреатической амилазе показали, что активность фермента снижается с 28 до 15 ед/г и до 5 ед/г при использовании белковых веществ, полученных путем мацерации и в кавитационном поле соответственно.

**Ключевые слова:** анализатор размеров частиц, белковые молекулы фасоли, ультразвук.

**Для цитирования:** Базулева В.А., Прутенская Е.А., Манаенков О.В. Анализ размеров белковых молекул, полученных из бобового растительного материала. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(1):34–38. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-01-05>

Ожирение является проблемой современного мира. Избыток веса приводит к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, сахарному диабету 2-го типа. Альтернативой диете с низким гликемическим индексом являются продукты, которые замедляют усвоение углеводов за счет ингибирования ферментов, ответственных за их усвоение. Эти продукты включают ингибиторы  $\alpha$ -амилазы и глюкозидазы [1].

Белковые вещества ингибиторного действия содержатся в больших количествах в фасоли раз-

ных сортов. На активность ингибиторов  $\alpha$ -амилазы влияют рН, температура, время инкубации, природа ионов экстрагента [1]. В зависимости от способа извлечения, концентрирования, выделения многие ингибиторные препараты теряют свою активность при использовании. Поэтому получение очищенных ингибиторов с высокой биологической активностью является актуальным. Разрабатываемые современные методы извлечения веществ из растительного сырья, например, фракционирование, сверхкритическая экстракция, приво-

дят к увеличению активности биологически активных веществ [2].

Цель работы – с помощью метода светорассеяния исследовать размеры частиц белковых веществ, извлеченных из семян красной фасоли, и определить их биологическую активность.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – красная фасоль Кидни (*Phaseolus vulgaris* Kidney) марки «Мистраль» (Россия), которая соответствует ТУ 9294-003-99621687-10. Извлечение белковых веществ проводили в соответствии с методикой, разработанной на кафедре биотехнологии, химии и стандартизации (Тверской государственный технический университет) [3]. Для эксперимента использовали бычий сывороточный альбумин («Диаэм», Россия).

Светорассеяние частиц коллоидных систем изучали на автоматическом анализаторе размеров частиц 90Plus/MAS («Brookhaven Instruments Corp», США) с лавинным детектором с доступными углами анализа 15° и 90° и с диапазоном работы прибора от < 1 нм до 6 мкм. При измерении белковых образцов, приготовленных в разное время, меняется вид распределения, а иногда и число пиков в нем. Для образцов с различным количеством пиков невозможно применение статистической обработки с усреднением результатов, так как часть достоверной информации теряется, поэтому в работе представлена серия экспериментов.

Определение ингибиторной активности полученных белковых веществ по отношению к амилазам («Sigma-Aldrich», США) осуществляли по модификации ГОСТ 20264.4-89 «Методы определения амилазной активности». Условия проведения ферментативной реакции: фосфатный буфер pH 8, температура 30 °С. Фосфаты определяли по МУК 4.1.3217-14 «Определение фосфатов в пищевых продуктах и продовольственном сырье»; pH измеряли на анализаторе жидкости pH-метре/иономере А4101. Ультразвуковую экстракцию проводили в ультразвуковой ванне «Elmasonic S15H» (Германия) с параметрами 95 В, 50/60 Гц без термостатирования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве модельных образцов использовали растворы бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 0,1%. В растворе альбумин может находиться в мономерной, в димерной формах, а также способен формировать крупные агрегаты.

Распределение частиц на рис. 1 состоит из трех пиков: первые два пика соответствуют мономерам и димерам белка, последний пик – агрегатам альбумина. Сравнив данные рис. 1, можно отметить, что при замене реакционной среды с воды на фосфатный буфер с pH 8 происходит изменение структуры белковых частиц. В буферном растворе они коагулируют и увеличиваются в размерах. Наличие в растворе белковых агрегатов, отличающихся друг от друга на порядок в размере, требует определения измерений на анализаторе под разными углами [4].

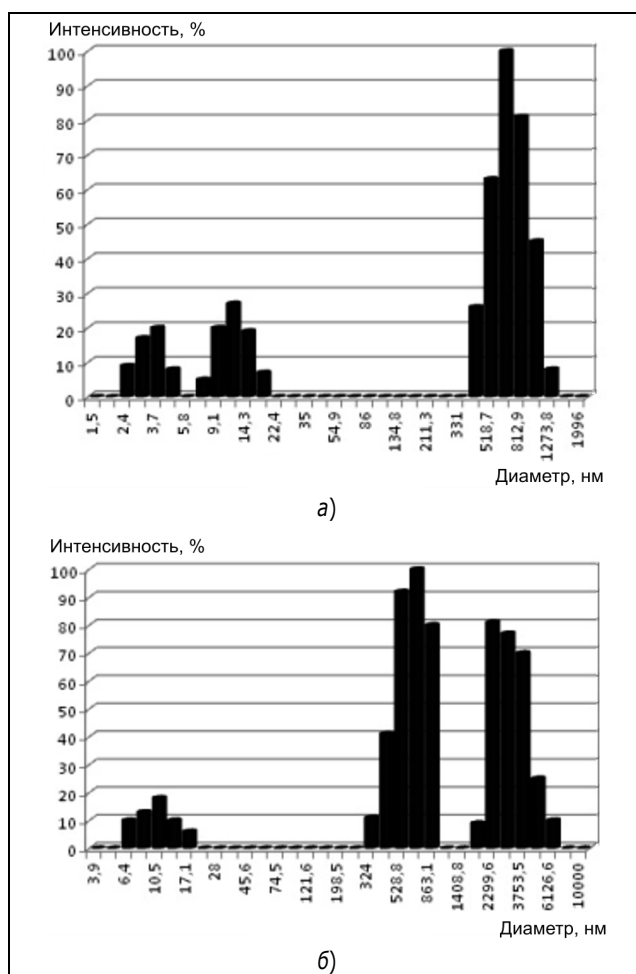
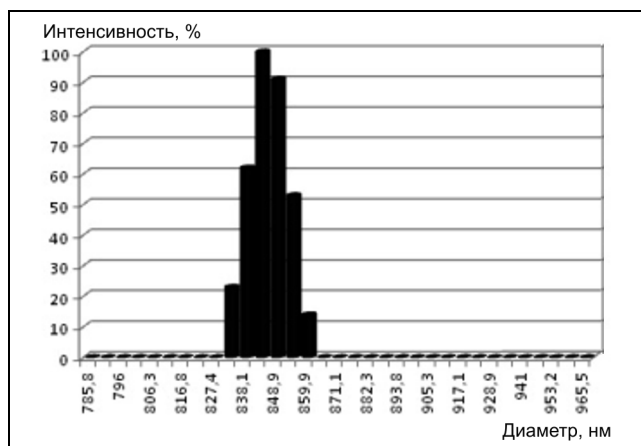
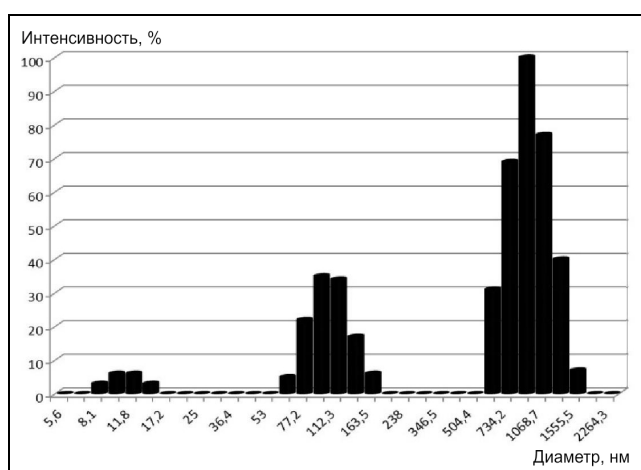


Рис. 1. Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в растворе альбумина под углом 90°: а – в воде; б – в фосфатном буфере

Для сравнения был выбран угол 15° (рис. 2). Большая доля интенсивности света, рассеянного под этим углом, приходится на один пик с максимумом 843,5 нм, что свидетельствует о том, что угол 15° является наиболее удачным только для детектирования больших агрегатов.



**Рис. 2.** Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в растворе альбумина под углом 15° в фосфатном буфере

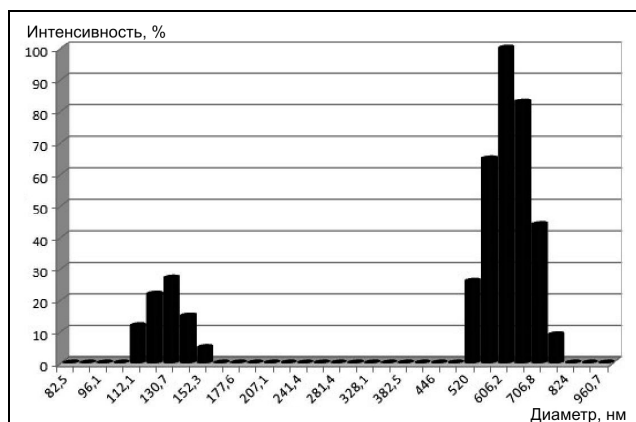


**Рис. 3.** Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в растворе белка фасоли под углом 90° в фосфатном буфере

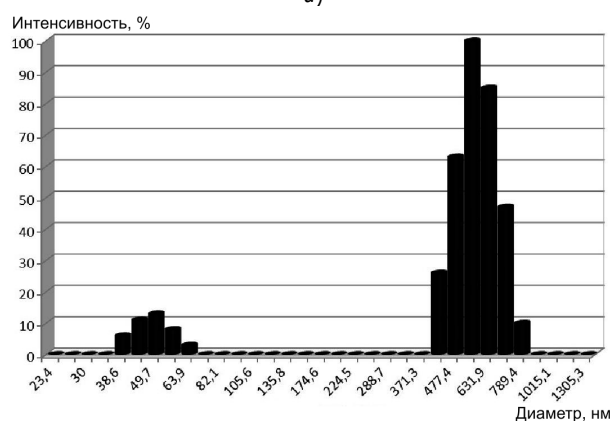
Таким образом, для точного определения размеров и идентификации агрегатов разных размеров в белковых растворах необходимо проводить измерения под бóльшим углом (90°).

Экспериментальные распределения частиц для белков фасоли (рис. 3) состоят из трех отдельных пиков. Наибольшая интенсивность представлена агрегатами белков с фосфатами. Содержание фосфатов в белковом продукте составило 21,97% от абсолютно сухого вещества.

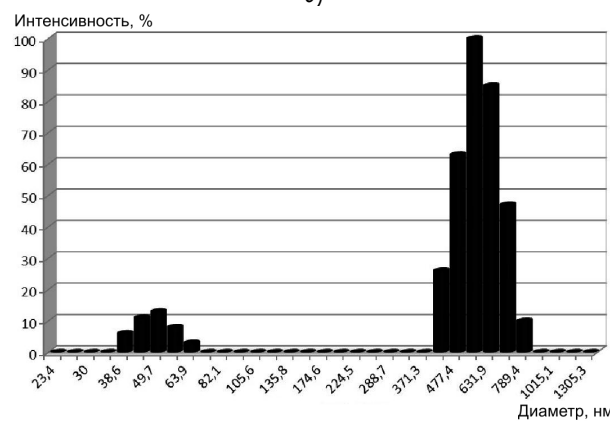
Исследования распределений, полученные в одной серии измерений для образцов белков фасоли, экстрагированных из сырья под действием ультразвука, позволили выявить уменьшение размера частиц агломератов белков, исчезновение фракции выше 800 нм, а также существенное снижение фракции димеров и мономеров (рис. 4,а).



а)



б)



в)

**Рис. 4.** Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в растворе белка фасоли: а – ультразвуковое воздействие 5 мин; б – ультразвуковое воздействие 10 мин; в – ультразвуковое воздействие 15 мин

Перераспределение материала частиц в сторону меньших размеров может происходить за счет деградации белковых мицелл с фосфатом под действием ультразвука [5].

Также была проанализирована серия проб, полученных с помощью ультразвука при разном

времени воздействия. В ходе опытов было зафиксировано, что при ультразвуковой обработке происходит нагревание растворов: при 5 мин до 29 °С, 10 мин – 35 °С, 15 мин – 41 °С. Так как температура не превышала 50 °С, то состав и структура белковых мицелл не изменялись, то есть не увеличивался их размер за счет образования оболочки из сывороточных белков [6]. Следовательно, температурный фактор не влиял на размеры частиц. Поэтому опыты при 20-минутной обработке не проводились, поскольку температура в растворе была не менее 52 °С. Результаты анализа размеров частиц представлены на рис. 4.

Снижение размеров белковых агрегатов происходило уже через 5 мин ультразвуковой обработки (рис. 4,а). Через 15 мин остались в основном частицы размером от 380 до 620 нм. Это свидетельствует о том, что раствор с белковыми частицами становится монодисперсным. В ультразвуковом поле происходит изменение структуры, формы и биологической активности молекулы белка. Данные изменения зависят от строения белковых и концевых групп белка [7]. Исследования биологической активности полученных белковых веществ по отношению к панкреатической амилазе показали, что активность фермента снижается с 28 до 15 и 5 ед/г при использовании белковых веществ, полученных путем мацерации, и в кавитационном поле соответственно.

## ВЫВОДЫ

При изучении размеров частиц было показано, что детектирование при 15° выявляет только крупные частицы, а угол 90° позволяет зафиксировать одновременно мелкие (6–20 нм) и крупные (до 6000 нм) белковые фракции. В фосфатном буфере частицы сывороточного альбумина образуют агрегаты (~6000 нм), а в воде частицы могут

присутствовать в мономерной и димерной формах (~1000 нм). Поэтому можно сказать, что белковые вещества, полученные экстракцией из красной фасоли в буферный раствор рН 8, представляют собой укрупненные агрегаты. Под воздействием ультразвука происходит уменьшение размеров белковых частиц с 620 до 380 нм, что приводит к увеличению ингибиторной активности по отношению к панкреатической амилазе.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Barrett M.L., Udani J.K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. Nutrition journal. 2011; 10(24): 1–10.
- 2 Wokadala Cuthbert Obiro, Tao Zhang, Bo Jiang. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* a-amylase inhibitor. British Journal of Nutrition. 2008; 100: 1–12.
- 3 Сильченко В.А., Савченко Е.А. Исследование и разработка технологии выделения ингибиторов ферментов из растительного материала для создания диагностикумов. Тверь. Материалы научно-практической конференции, приуроченной ко Дню российской науки. 2017; 6 с.
- 4 Кириченко М.Н. Динамика размеров и концентраций белков и их комплексов в плазме крови *in vitro* по данным светорассеяния: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук: 01.04.05: защищена: 15.06.2016. М.: Физический институт им П.Н. Лебедева РАН. 135 с.
- 5 Блинов А.В., Серов А.В., Кравцов В.А., Крандиевский С.О., Чапура О.М., Снежкова Ю.Ю. Применение акустической и электроакустической спектроскопии в молочном деле. Вестник Северо-Кавказского фед. ун-та. 2018; 2(65): 7–14.
- 6 Мизина П.Г., Левачев С.М., Масесе П.М., Панов А.В., Харлов А.Е., Сугак Н.В., Давыдова В.Н., Шатапов Д.О., Коваленко А.В. Изучение солубилизации растительных экстрактов в смесях сорбитанов различного строения. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016; 5: 3–8.
- 7 Хмелев В.Н., Сливин А.Н., Барсуков Р.В., Цыганок С.Н., Шалунов А.В. Применение ультразвука высокой интенсивности в промышленности. Бийск. Изд-во Алт. гос. техн. ун-та. 2010; 143–144.

Поступила после доработки 10 ноября 2021 г.

## ANALYSIS OF THE SIZE OF PROTEIN MOLECULES OBTAINED FROM A LEGUME PLANT MATERIAL

© Authors, 2022

**V.A. Bazuleva**

Lecturer, Department of Biotechnology, Chemistry and Standardization,  
Tver State Technical University (Tver, Russia)  
E-mail: silchenko555@mail.ru

**E.A. Prutenskaya**

Ph.D. (Biol.), Department of Biotechnology, Chemistry and Standardization,  
Tver State Technical University (Tver, Russia)  
E-mail: prutenskaya@mail.ru

**O.V. Manaenkov**

Ph.D. (Chem.), Department of Biotechnology, Chemistry and Standardization,  
Tver State Technical University (Tver, Russia)

E-mail: ovman@yandex.ru

Obesity is a problem in the present-day world. Excess weight leads to the cardiovascular diseases, type 2 diabetes mellitus. As an alternative to a low glycemic index diet, there are foods that slow down the absorption of carbohydrates by inhibiting the enzymes responsible for their fixation. These products include  $\alpha$ -amylase and glucosidase inhibitors. Protein compounds with an inhibitory activity are contained in large quantities in assorted of beans. Depending on the method of extraction, concentration, isolation, many inhibitor preparations can lose its activity during the use. Therefore, production of purified inhibitors with high biological activity is an urgent task. The modern methods for extracting substances from plant materials, for example, fractionation, supercritical extraction, lead to an increase in the activity of bioactive substances.

In this regard, the purpose of the work is to study the size of the particles of protein substances extracted from the seeds of red beans using the light-scattering method and to determine their biological activity.

Bovine serum albumin was used as a model object. When studying the particle size, it was shown that detection at 15° reveals only large particles, and an angle of 90° allows simultaneously small (6–20 nm) and large (up to 6000 nm) protein fractions to be fixed. In phosphate buffer, serum albumin particles form agglomerates (~ 6000 nm), and in water, particles can be present in monomeric and dimeric forms (~ 1000 nm). Protein substances obtained by extraction from red beans into a buffer solution of pH 8 are enlarged aggregates. The size of protein particles decreases from 620 nm to 380 nm when the ultrasonic irradiation was used. Studies of the biological activity of protein substances in relation to pancreatic amylase have shown that the activity of the enzyme decreases from 28 U/g to 15 U/g and to 5 U/g when using protein substances obtained by maceration and in a cavitation field, respectively.

**Key words:** *particle size analyzer, bean protein molecules, ultrasonic irradiation.*

---

**For citation:** Bazuleva V.A., Prutenskaya E.A., Manaenkov O.V. Analysis of the size of protein molecules obtained from a legume plant material. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2022;25(1):34–38. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-01-05>

**REFERENCES**

1. Barrett M.L., Udani J.K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutrition journal.* 2011; 10(24): 1–10.
2. Wokadala Cuthbert Obiro, Tao Zhang, Bo Jiang. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris*  $\alpha$ -amylase inhibitor. *British Journal of Nutrition.* 2008; 100: 1–12.
3. Sil'chenko V.A., Savchenko E.A. Issledovanie i razrabotka tehnologii vydelenija ingibitorov fermentov iz rastitel'nogo materiala dlja sozdanija diagnostikumov. Tver'. Materialy nauchno-prakticheskoy konferencii, priurochennoj ko Dnju rossijskoj nauki. 2017; 6 s.
4. Kirichenko M.N. Dinamika razmerov i koncentracij belkov i ih kompleksov v plazme krovi in vitro po dannym svetorassejaniya: Avtoref. dis. ... kand. fiz.-mat. nauk: 01.04.05: zashhishhena: 15.06.2016. M.: Fizicheskij institut im P.N. Lebedeva RAN. 135 s.
5. Blinov A.V., Serov A.V., Kravcov V.A., Krandievskij S.O., Chapura O.M., Snezhkova Ju.Ju. Primenenie akusticheskoy i jelektroakusticheskoy spektroskopii v molochnom dele. *Vest-nik Severo-Kavkazskogo fed. un-ta.* 2018; 2(65): 7–14.
6. Mizina P.G., Levachev S.M., Masese P.M., Panov A.V., Harlov A.E., Sugak N.V., Davydova V.N., Shatalov D.O., Kovalenko A.V. Izuchenie soljubilizacii rastitel'nyh jekstraktov v smesjah sorbitanov razlichnogo stroenija. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii.* 2016; 5: 3–8.
7. Hmelev V.N., Slivin A.N., Barsukov R.V., Cyganok S.N., Shalunov A.V. Primenenie ul'trazvuka vysokoj intensivnosti v promyshlennosti. *Bijsk. Izd-vo Alt. gos. tehn. un-ta.* 2010; 143–144.