

УДК 57.037, 57.044

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕВЫХ ИЗОФЛАВОНОИДОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РИБОНУКЛЕАЗЫ И ТРИПСИНА

© 2012 г. **Н.В. Хабибулина,**
А.В. Вострилкина,
А.А. Красноштанова

Российский химико-технологический университет
им. Д.И. Менделеева, Москва

Введение

Ключевое место в развитии современной биомолекулярной химии и технологии занимают ферменты. Большое разнообразие катализируемых ими реакций, доступность ферментов как химических объектов, глубокое понимание механизмов действия ферментов и возможности варьирования их свойств, основанные на современных методах химической энзимологии, позволяют использовать ферменты для решения многих задач промышленности, сельского хозяйства, экологии, медицины [1].

Широкое использование ферментов как катализаторов обусловлено тем, что они позволяют проводить процесс в мягких условиях с образованием строго специфичных продуктов. Однако их применение осложняется уменьшением стабильности и потерей каталитической активности с течением времени вследствие того, что конформация активного центра ферментов легко изменяется под воздействием внешних факторов [2]. Для увеличения каталитической активности ферментов используют вещества, повышающие скорость ферментативной реакции — активаторы. Активаторами могут служить вещества как органической, так и неорганической природы, в том числе так называемые химические шапероны (специфические лиганды, соли, хелатирующие и редуцирующие вещества, полиолы, сахара, метиламины, ПАВ, аминокислоты и др.) [3].

Однако в ряде случаев необходимо, напротив, снижать каталитическую активность ферментов.

Известно, что воспалительные и опухолевые процессы в организме человека в большой степени зависят от активности ферментов (в частности, сериновых протеаз), что делает актуальным поиск соответствующих ингибиторов [4].

Многие соединения, обладающие активирующей или ингибирующей активностью, являются достаточно токсичными, поэтому для регуляции ферментативной активности стараются подбирать вещества природного происхождения. В числе соединений, способных оказывать влияние на каталитическую активность ферментов, можно выделить соевые изофлавоноиды. Изофлавоноиды — это одно из семейств флавоноидов, относящихся к группе фенольных соединений. Базовая структура изофлавоноидов представляет собой два бензольных кольца, связанных через гетероциклическое пирановое углеродное кольцо (рис. 1). Соевые бобы содержат три вида изофлавонов, встречающихся в четырех химических формах, — агликоны, соответствующие им гликозиды и их ацетильные и малонильные производные [5–7].

Работы по изучению свойств изофлавоноидов направлены преимущественно на оценку изменения активности антиокислительных ферментов организма животных и человека и ферментов, прини-

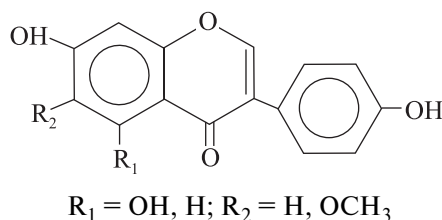


Рис. 1. Базовая структура молекул изофлавоноидов

Хабибулина Н.В. — аспирантка третьего года обучения кафедры биотехнологии. Тел.: (495) 495-23-79. E-mail: ernestine2007@ya.ru

Вострилкина А.В. — выпускница той же кафедры. Тел. тот же. E-mail: nafanua8989@mail.ru

Красноштанова А.А. — д-р хим. наук, проф. той же кафедры. Тел. тот же. E-mail: aak28@ya.ru

мающих участие в развитии раковых опухолей [8]. Одна из других сфер исследований, представляющих интерес, — влияние соевых изофлавоноидов на индивидуальные ферментные препараты, находящие применение в промышленности и медицине.

Так, в настоящей работе поставлена цель изучить влияние соевых изофлавоноидов на каталитическую активность высокоочищенных ферментных препаратов, в частности на степень гидролиза дрожжевой РНК панкреатической рибонуклеазой и казеината натрия трипсином. Решались следующие задачи:

- изучение влияния соевых изофлавоноидов на эффективность ферментативных процессов с использованием высокоочищенных ферментных препаратов (на примере рибонуклеазы и трипсина);
- исследование влияния соевых изофлавоноидов на стабильность высокоочищенных ферментных препаратов при изменении физико-химических параметров среды реакции (рН, температуры);
- разработка кинетической схемы процесса, расчет эффективных кинетических констант, определяющих ход различных стадий процесса.

Экспериментальная часть

Были использованы следующие препараты.

Субстраты: Дрожжевая РНК из паприна, полученная по методике, описанной в [9], с массовой долей основного вещества не менее 80 %; Натрий казеиновокислый (ЗАО «Вектон») с массовой долей основного вещества не менее 85 %.

Ферменты: Рибонуклеаза (РНК-аза) панкреатическая с активностью 14000 ед./мг и Трипсин с активностью 10000 ед./мг (ООО «Самсон мед»).

Экстракт соевых изофлавоноидов получали из белого лепестка (производство США, массовая доля сухих веществ — 93 %, сырого протеина — 52 %) путем спиртовой экстракции 80 %-м этанолом. Полученный спиртовой экстракт упаривали под вакуумом до полного удаления спирта, водный концентрат подвергали очистке от примесных белков и углеводов, после чего использовали в качестве модификатора ферментов. Содержание изофлавоноидов в полученном растворе определяли по цветной реакции с хлоридом железа(III). Калибровочный график был построен по дигидрокверцетину, определение оптической плотности проводили при $\lambda = 505$ нм.

Для изучения влияния изофлавоноидов на ферментативный гидролиз раствор изофлавоноидов

вносили в начальный момент времени в различных концентрациях. Гидролиз субстратов (исходный объем — 20 мл) проводили в термостате при заданных температуре и рН в течение 2 ч с отбором проб объемом 1 мл через фиксированные промежутки времени после начала гидролиза. При проведении предынкубации изофлавоноиды сначала выдерживали с субстратом или ферментом, а затем проводили гидролиз. После отбора к пробам добавляли 1 мл 50 %-ной трихлоруксусной кислоты для осаждения непрогидролизовавшихся соединений. Пробы выдерживали на холоде для формирования осадка, после чего осадок отделяли центрифугированием. В надосадочной жидкости измеряли содержание низкомолекулярной фракции, включающей олигопептиды или олигонуклеотиды в случае гидролиза трипсином и рибонуклеазой, соответственно, в осадке — высокомолекулярной фракции белка или рибонуклеиновой кислоты. Содержание белковых веществ в надосадочной жидкости и осадке (предварительно растворенном в 0,1 н NaOH) определяли по методу Лоури [10], нуклеиновых компонентов — по методу Спирина [11].

Во всех проводимых опытах за контроль принимали активность фермента без добавления изофлавоноидов. Степень гидролиза субстрата оценивали по отношению содержания в пробе низкомолекулярной фракции к общей концентрации субстрата.

Обсуждение результатов

Предварительные исследования, проведенные с высокоочищенными ферментами (рибонуклеазой и трипсином), показали, что оптимальной концентрацией соответствующих субстратов (РНК и казеината натрия) для проведения гидролиза является 10 г/л, норма внесения фермента составляет 0,2 % от массы субстрата, процесс следует проводить в течение 2 ч. Температурный оптимум для РНК-азы составляет 65 °С, для трипсина 40 °С; рН-оптимум для рибонуклеазы равен 7,5, для трипсина — 8,0. Результаты исследования процесса гидролиза в указанных условиях показали, что максимально достигаемая степень гидролиза не превышает 29 % для дрожжевой РНК и 25 % для казеината натрия, что является недостаточным в промышленных условиях.

На первом этапе исследований изучалось влияние концентрации соевых изофлавоноидов на степень гидролиза субстратов, соответствующих высокоочищенным ферментам, — РНК и казеина-

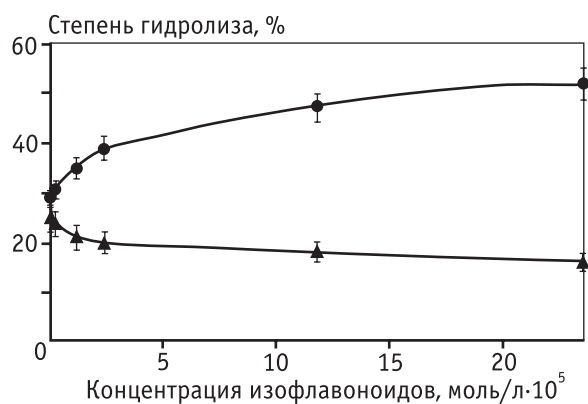


Рис. 2. Влияние концентрации изофлавоноидов на степень гидролиза РНК ($t = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,5$) рибонуклеазой (●) и казеината натрия ($t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$) трипсином (▲)

та натрия. Концентрацию изофлавоноидов (ИФ) варьировали в диапазоне от $2,4 \cdot 10^{-6}$ до $2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, что соответствует молярным соотношениям ИФ : фермент 1 : 34 — 1 : 0,34. Эксперимент проводили в оптимальных для каждого фермента условиях, указанных выше.

Из рис. 2 следует, что в случае РНК-азы при введении в среду гидролиза ИФ в концентрациях от $2,4 \cdot 10^{-6}$ до $2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л выход продуктов гидролиза повышается с увеличением концентрации внесенных ИФ, и при концентрации $2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л достигает 52 %, что в 1,8 раза превышает контроль. В случае трипсина при введении в среду гидролиза ИФ во всем исследованном диапазоне концентраций наблюдается снижение степени гидролиза при повышении концентрации вносимых ИФ. При концентрации ИФ $2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л степень гидролиза падает в 1,7 раза по сравнению с контролем. Полученные результаты показывают, что соевые изофлавоноиды способны влиять на каталитическую активность как РНК-азы, так и трипсина.

Влияние модификаторов

Известно, что модификаторы могут вступать в физико-химические взаимодействия как с ферментом, так и с субстратом. Для установления возможных типов взаимодействия в 3-компонентной системе (субстрат, фермент, ИФ) были проведены эксперименты по изучению взаимодействия в парных системах: «фермент — ИФ» и «субстрат — ИФ». Изучение проводили путем предынкубации раствора фермента или субстрата с ИФ с концентрацией $2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л в течение 30 мин при комнатной температуре.

На рис. 3 приведены зависимости степени гидролиза субстратов соответствующими ферментными препаратами от времени предынкубации ИФ с ферментом или субстратом.

Анализируя полученные результаты, можно заметить, что в случае предынкубации ИФ с ферментами наблюдается падение степени гидролиза с увеличением времени предынкубации во всем исследованном диапазоне продолжительности предынкубации. Это позволяет сделать предположение, что ферменты образуют с ИФ интермедиат, способный катализировать гидролиз субстрата с меньшей скоростью, чем свободный фермент. При образовании интермедиата часть молекул фермента обратимо взаимодействует с ИФ и не участвует непосредственно в ферментализе, что и приводит к снижению его скорости.

Характер зависимости взаимодействия ИФ с дрожжевой РНК (рис. 3, а) свидетельствует о том,

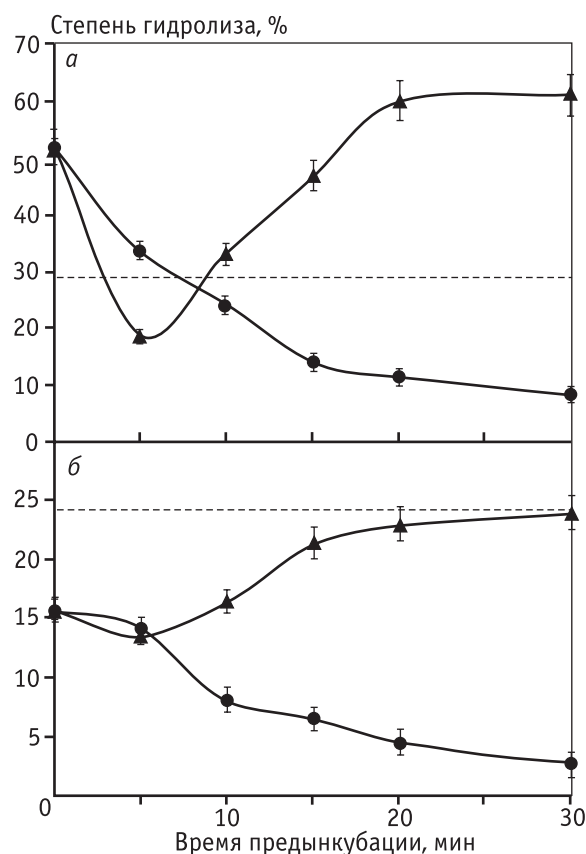


Рис. 3. Влияние продолжительности предынкубации изофлавоноидов ($2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л) с ферментом (●) и субстратом (▲) на степень гидролиза РНК при $t = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,5$ (а) и казеината натрия при $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$ (б). Пунктир — активность фермента без добавления изофлавоноидов

что в начальный момент происходит образование комплекса субстрата с ИФ, обладающего меньшим сродством к ферменту, о чем свидетельствует падение степени гидролиза при малом времени предынкубации. С увеличением времени предынкубации наблюдается увеличение скорости гидролиза выше уровня, достигнутого при добавлении той же концентрации ИФ, но без предынкубации. Это позволяет предположить, что предынкубация с субстратом, во-первых, не позволяет образовываться неактивному комплексу фермента с ИФ, во-вторых, образующийся с течением времени комплекс субстрата с ИФ способен вступать в ферментативную реакцию с большей скоростью, чем свободный субстрат. При времени предынкубации 20 мин конечная степень гидролиза достигает 60 %.

Полученные результаты свидетельствуют также о наличии взаимодействий между казеинатом натрия и ИФ (см. рис. 3, б). Видно, что при времени предынкубации 20 мин и более степень гидролиза практически достигает уровня контроля (24 %). Это позволяет предположить, что казеинат натрия способен связывать изофлавоноиды в устойчивый

комплекс, не позволяя им оказывать ингибирующее действие на трипсин. Образовавшийся комплекс субстрата с изофлавоноидами способен вступать в ферментативную реакцию с той же эффективностью, что и свободный субстрат.

Модификаторы оказывают влияние на температурный и pH-оптимумы активности ферментов. В связи с этим было исследовано влияние температуры и начальной кислотности среды на каталитическую активность высокоочищенных ферментов в присутствии соевых изофлавоноидов. Соответствующие экспериментальные данные приведены на рис. 4, 5.

Видно, что для РНК-азы оптимум pH сдвигается в сторону нейтральных значений (рис. 4, а). В случае трипсина значение оптимума pH не изменяется, но область оптимума заметно сужается (рис. 4, б).

Из представленных зависимостей степени гидролиза субстратов от температуры (рис. 5) следует, что добавление ИФ в случае обоих ферментных препаратов приводит к сдвигу оптимума в сторону более высоких температур (с 65 до 70 °С для РНК-азы, с 40 до 45 °С для трипсина). При этом область оптимума для рибонуклеазы расширяется, для трипсина

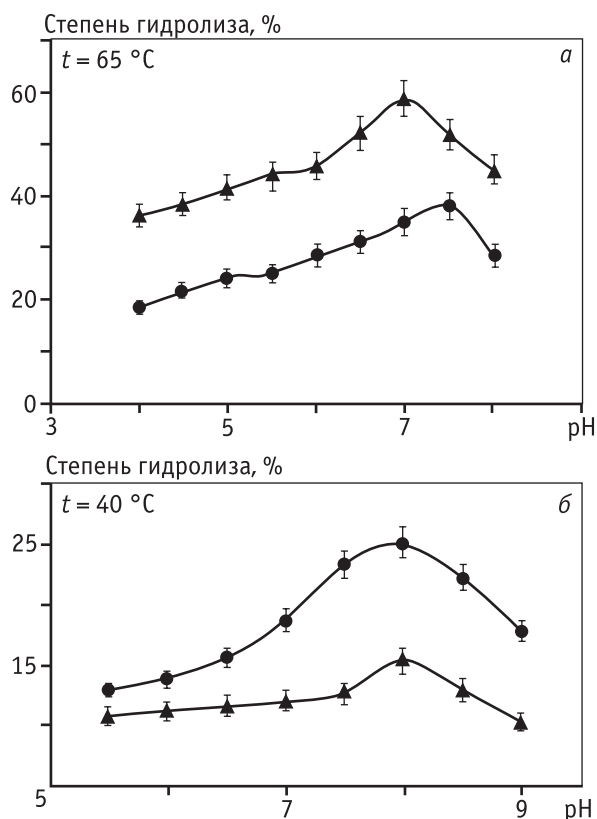


Рис. 4. Влияние pH на степень гидролиза РНК рибонуклеазой (а) и казеината натрия трипсином (б) без изофлавоноидов (●) и в их присутствии ($2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (▲)

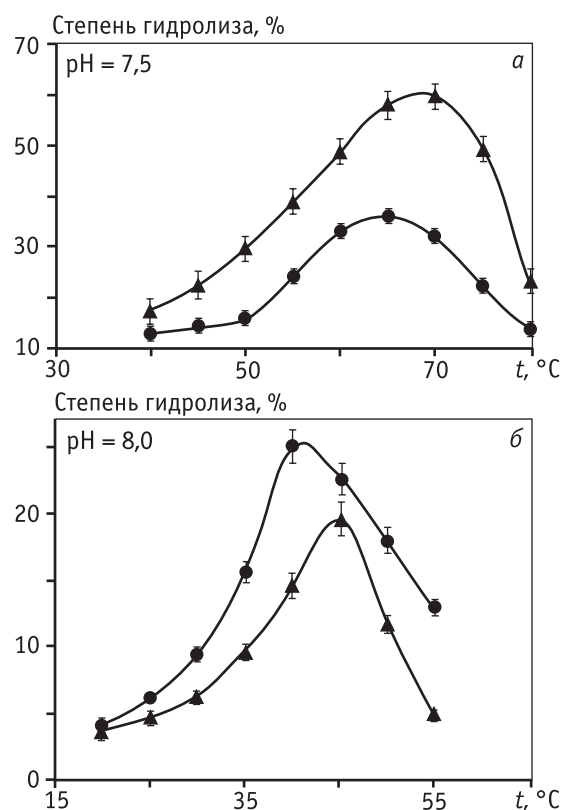


Рис. 5. Влияние температуры на степень гидролиза РНК рибонуклеазой (а) и казеината натрия трипсином (б) без изофлавоноидов (●) и в их присутствии ($2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (▲)

— несколько сужается. Сдвиг температурного оптимума для РНК-азы является свидетельством повышения стабильности фермента, так как в свободном состоянии при температуре выше 65 °С он начинает подвергаться тепловой денатурации. Во всем исследованном диапазоне температур для РНК-азы наблюдается общая тенденция увеличения активности фермента при внесении ИФ, для трипсина каталитическая активность в аналогичном эксперименте снижается.

Таким образом, для интенсификации процесса гидролиза РНК рибонуклеазой целесообразно применять соевые изофлавоноиды, которые максимально повышают скорость ферментативного гидролиза при следующих условиях ведения процесса: концентрация ИФ — $2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л; температура 70 °С; pH 7,0; предынкубация ИФ с субстратом — 20 мин.

Однако даже в этом случае степень гидролиза не превышает 60 %. Одним из приемов, позволяющих достичь более высокой степени гидролиза, является дробное внесение ферментного препарата. Как видно из данных, приведенных на рис. 6, при двукратном введении ферментного препарата без изофлавоноидов степень гидролиза не превышает 40 %, а при введении соевых изофлавоноидов в реакционную среду она достигает 90 %. При этом получаемый гидролизат по своим характеристикам отвечает показателям качества, предъявляемым к данному виду продукции [9].

Кинетическая схема гидролиза субстратов в присутствии соевых ИФ

Для объяснения механизма действия соевых изофлавоноидов на ферменты необходимо разработать кинетическую схему, описывающую процесс взаимодействия компонентов системы.

Полученные экспериментальные зависимости накопления продуктов гидролиза от времени имеют типичный для ферментативного гидролиза вид. При этом не наблюдается перегибов на кривой накопления продуктов гидролиза, что позволяет предположить отсутствие промежуточных субстратных интермедиатов, т.е. процесс расщепления идет в одну стадию. Для обоих субстратов (дрожжевой РНК и казеината натрия) были проведены серии кинетических экспериментов по зависимости начальной скорости от концентрации субстрата в области линейной зависимости скорости гидроли-

за от внесенного в среду фермента. Обработка этих кинетических кривых, выполненная в координатах Лайнуивера—Берка, позволила оценить численные значения равновесной константы K_S и константы скорости образования продукта k_1 в качестве основных параметров гидролиза.

Однако схема превращений, соответствующая классическому уравнению Михаэлиса—Ментен, как оказалось, не в состоянии адекватно описать кинетические кривые, полученные в ходе дальнейших экспериментов. Как было показано в ходе ранее выполненных работ [9], данный факт может быть связан с протеканием процессов ингибирования фермента.

Общеизвестно, что в ингибировании ферментативных реакций могут участвовать их продукты, а также происходить другие нежелательные превращения, приводящие к инактивации фермента или фермент-субстратных комплексов. Ранее была проведена экспериментальная проверка возможности ингибирования трипсина и РНК-азы продуктами гидролиза и исследования по инактивации свободных ферментов в среде реакции [9]. Результаты этих опытов показали, что в случае трипсина основной вклад вносит термоинактивация, для РНК-азы же более выражен процесс ингибирования продуктами гидролиза.

В ходе проведенных исследований установлено, что в кинетической схеме необходимо рассматривать не только уравнения, описывающие ферментативный процесс для чистого фермента, но и описывающие взаимодействие фермента и субстрата с ИФ. При этом, как было установлено, образование комплекса ИФ с ферментом представляет собой обратимый, но

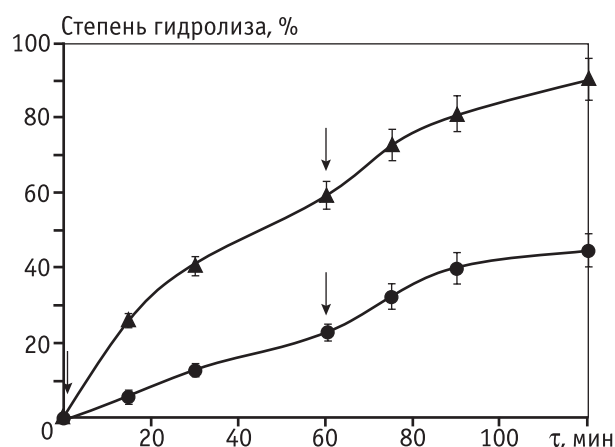
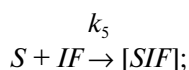
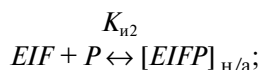
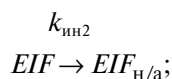
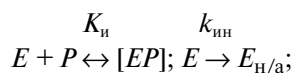
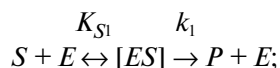


Рис. 6. Изменение степени гидролиза РНК ($t = 65$ °С, pH = 7,5) во времени при дробном внесении фермента в отсутствие (●) и в присутствии изофлавоноидов ($2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (▲)

не равновесный процесс, образование же комплекса с субстратом идет необратимо. Также надо учитывать, что ингибирование продуктом и инактивация возможны не только для свободного фермента, но и для фермента в комплексе с изофлавоноидами.

Исходя из результатов исследований, можно предложить следующую кинетическую схему процесса:



где S — концентрация субстрата; E — концентрация фермента; P — концентрация продукта; $[ES]$ — концентрация промежуточного комплекса фермента с субстратом, $[EP]$ — неактивный комплекс фермента с продуктом; $E_{н/а}$ — инактивированная форма фермента; K_{S1} — равновесная константа образования комплекса фермента с субстратом; $K_{и}$ — константа ингибирования фермента продуктом; k_1 — константа скорости образования продукта; $k_{ин}$ — константа скорости инактивации свободного фермента; $[IF]$ — концентрация изофлавоноидов; $[EIF]$, $[SIF]$ — концентрация комплексов фермента и субстрата с изофлавоноидами; $[EIFP]_{н/а}$ — инактивированная форма комплекса фермента с изофлавоноидами; $[EIFS]$ — концентрация тройного комплекса фермента, ИФ и субстрата; K_{S2} , K_{S3} — равновесные субстратные константы; k_2 , k_3 , k_4 , k_5 — константы скорости различных этапов превращения; $k_{ин2}$ — константа скорости инактивации комплекса фермента с изофлавоноидами; $K_{и2}$ — константа ингибирования продуктом комплекса фермента с ИФ.

Решение кинетической задачи может быть сведено к нахождению значений равновесных констант и констант скорости для исследуемых серий кинетических кривых. Найти их возможно только путем подбора численных значений в ходе интегрирования системы дифференциальных уравнений, отвечающих полученной схеме превращений. Данные расчеты были проведены с использованием пакета программ MathCad. Аналогичные расчеты были проделаны в отношении серий кинетических кривых, полученных при различных температурах и pH среды. В качестве уравнения связи эффективной константы с температурой использовали уравнение Аррениуса:

$$k_{эфф} = A_0 e^{-E/RT},$$

где A_0 — предэкспоненциальный множитель; E — энергия активации; R — универсальная газовая постоянная; T — температура, К.

Линеаризация уравнения Аррениуса позволила рассчитать энергию активации для различных стадий процесса. Для pH-зависимости использовали уравнение специфического кислотно-основного катализа:

$$k_{эфф} = k^* (1 + a_H/K_a),$$

где K_a — константа протонирования фермент-субстратного комплекса; a_H — величина активности ионов водорода.

В результате расчетов были найдены все значения эффективных констант, отвечающих приведенной выше схеме превращений. Полученные значения даны в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Значения эффективных констант и энергий активации стадий процесса гидролиза РНК РНК-азой в присутствии соевых ИФ

Путь	E , кДж/моль	K_{gr} л/моль	k^* , с ⁻¹
k_1	40,6±2,8	$(8,20±1,07) \cdot 10^{-5}$	0,51±0,06
k_2	8,4±0,6	$(1,27±0,15) \cdot 10^{-4}$	126,6±1,21
k_3	60,2±4,1	$(4,16±0,47) \cdot 10^{-4}$	$(5,2±0,41) \cdot 10^{-2}$
k_4	64,5±5,2	$(9,44±1,09) \cdot 10^{-5}$	4,72±0,36
k_5	53,3±4,8	$(9,60±1,17) \cdot 10^{-5}$	2,40±0,14
$k_{ин1}$	46,2±3,2	$(3,07±0,40) \cdot 10^{-5}$	$(5,7±0,7) \cdot 10^{-4}$
$k_{ин2}$	78,7±5,7	$(1,89±0,19) \cdot 10^{-4}$	$(1,89±0,27) \cdot 10^{-2}$
$K_{S1} = 0,85±0,07$ л/моль; $K_{S2} = 0,10±0,01$ л/моль; $K_{S3} = 1,00±0,09$ л/моль; $K_{и1} = 0,40±0,04$ л/моль; $K_{и2} = 0,65±0,05$ л/моль.			

Таблица 2

Значения эффективных констант и энергий активации стадий процесса гидролиза казеината натрия трипсином в присутствии соевых ИФ

Путь	E , кДж/моль	K_{ar} , л/моль	k^* , с ⁻¹
k_1	18,0±1,2	$(1,05±0,14) \cdot 10^{-5}$	$(1,51±0,12) \cdot 10^{-2}$
k_2	7,4±0,5	$(1,11±0,11) \cdot 10^{-5}$	222,2±2,04
k_3	96,0±8,7	$(1,08±0,10) \cdot 10^{-5}$	$(1,08±0,17) \cdot 10^{-1}$
k_4	102,2±9,4	$(1,46±0,14) \cdot 10^{-4}$	2,92±0,16
k_5	112,1±10,2	$(1,20±0,17) \cdot 10^{-5}$	3,99±0,24
$k_{ин1}$	20,2±2,0	$(1,19±0,15) \cdot 10^{-6}$	$(2,30±0,21) \cdot 10^{-4}$
$k_{ин2}$	76,1±5,2	$(9,74±0,87) \cdot 10^{-5}$	$(4,87±0,31) \cdot 10^{-2}$
$K_{S1} = 0,51 \pm 0,04$ л/моль, $K_{S2} = 12,5 \pm 0,81$ л/моль, $K_{S3} = 1,30 \pm 0,11$ л/моль, $K_{i1} = 0,45 \pm 0,05$ л/моль, $K_{i2} = 6,67 \pm 0,07$ л/моль.			

Полученную кинетическую схему процесса можно использовать для создания алгоритма управления, под которым понимается математическое описание процесса, позволяющее определить выход продукта при заданных условиях гидролиза, а также условия его проведения для получения заданного выхода. В условиях реального производства математическое описание, естественно, должно быть оформлено в виде компьютерной программы.

Разработанная кинетическая схема аналогична схеме, полученной для других модификаторов ферментативной активности, — алкилоксибензолов (АОБ) [9], из чего можно сделать вывод, что соевые изофлавоноиды имеют аналогичный механизм воздействия на ферменты.

Выводы

1. Показано, что соевые изофлавоноиды оказывают влияние на каталитическую активность высокоочищенных ферментных препаратов: в случае рибонуклеазы каталитическая активность повышается, в случае трипсина — понижается. Установлено, что соевые изофлавоноиды могут вступать во взаимодействие как с ферментом, так и с субстратом.

2. Выявлено, что добавление соевых изофлавоноидов к ферментным препаратам оказывает влияние на их температурный и pH-оптимумы активности: в случае рибонуклеазы происходит сдвиг pH-оптимума и температурного оптимума, причем последний заметно расширяется; для трипсина смещения pH-

оптимума не происходит, температурный оптимум смещается в сторону более высоких температур и сужается, что свидетельствует об уменьшении стабильности фермента.

3. Показано, что кинетическая схема, ранее разработанная для взаимодействия ферментных препаратов с алкилоксибензолами, адекватно описывает взаимодействие изофлавоноидов с ферментными препаратами. Рассчитаны эффективные константы отдельных стадий процесса.

Литература

1. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М.: Издательский центр «Академия». 2005. 480 с.
2. Страйер Л. Биохимия (пер. с англ.). М.: Мир, 1984. Т. 1. 232 с.
3. Tzanov T., Andreus J., Guebitz G., Cavac-Paulo A. Protein interaction in enzymatic processes in textiles // Electron J. Biotechnol. 2003. V. 36. P. 1002—1005.
4. Messina Mark, Flickinger Brent. Hypothesized anticancer effects of soy: evidence points to isoflavones as the primary anticarcinogenes // Pharmaceutical Biology. 2002. V. 40. P. 6—23.
5. Abdul Faraj, Hava Vasanthan. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits // Food Reviews International. 2004. V. 20. № 1. P. 51—75.
6. Казаков А.Л., Хиля В.П., Межеричкий В.В., Литкеи Ю. Природные и модифицированные изофлавоноиды. Изд-во Ростовского университета, 1985. 184 с.
7. Penalvo Jose L., Nurmi Tarja, Adlercreutz Herman. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products // Food Chemistry. 2004. V. 87. P. 297—305.
8. Prachi Mishra, Anand Kar, Raosaheb K. Kale. Prevention of chemically induced mammary tumorigenesis by daidzein in pre-pubertal rats: the role of peroxidative damage and antioxidative enzymes // Molecular and Cellular Biochemistry. 2009. V. 325. № 1—2. P. 149—157.
9. Красноштанова А.А. Разработка научных основ технологии получения ферментативных гидролизатов биополимеров из отходов пищевой и микробиологической промышленности: Дис. д-ра хим. наук: 03.00.23 / Рос. хим.-технол. ун-т им. Д.И. Менделеева. М., 2009. 370 с.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents // J. Biol. Chem. 1951. 193. P. 265—275.
11. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. 1958. Т. 23. С. 656—662.