

УДК 633.14:581.134.4

ФРАКЦИОННЫЙ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛЕГКОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ЗЕРНА РЖИ

В. П. КРИЩЕНКО, Б. П. ПЛЕШКОВ

(Кафедра агрономической и биологической химии)

Аминокислотный состав и молекулярная масса (ММ) являются основными характеристиками белков. При изучении компонентного состава белков особенно большие возможности дает использование метода разделения белков на целлюлозоионитах (ЦИ), а при определении ММ — ультрацентрифугирование.

Значения констант седиментации (S) для белков, как правило, находятся в пределах $1 \cdot 10^{-13}$ — $200 \cdot 10^{-13}$ с, а величина, равная $1 \cdot 10^{-13}$, принятая за единицу, получила название «единицы Сведберга» [1]. Коэффициент флотации белковых веществ обозначается S_f и рассчитывается аналогично S с той лишь разницей, что отсчет движения ведется не от мениска, а от дна ячейки. Определив S, можно рассчитывать ММ. Для этого в дополнительном опыте с помощью границеобразующей ячейки необходимо найти константу диффузии (D). Распространенными методами ультрацентрифугирования являются методы Арчибальда и Траутмана [20, 32]. Другие способы изучения белков с помощью центрифугирования подробно описаны в ряде работ [1, 15, 17, 21, 23, 24, 27, 31].

Седиментационные характеристики белков сельхозрастительных культур изучены довольно слабо. Несколько лучше других исследованы белки бобовых культур [18, 19]. Хорошие результаты дало ультрацентрифугирование белков в сочетании с разделением их на ЦИ [3, 15].

Сочетание метода деления белков на фракции и подфракции с помощью ЦИ с последующим определением их аминокислотного состава дает возможность вскрыть не только колоссальную гетерогенность белков, но и показать значительные различия отдельных фракций по их аминокислотному составу.

Белки при соблюдении установленных условий хроматографии на ЦИ сохраняют

свою первоначальную конфигурацию. Связывание их ионитами обуславливается ионным взаимодействием между замещенными ионообменными группами природного полимера — целлюлозы, субмикроскопическая структура которой при замещении остается в общем неизменной, и ионогенными группами белковых молекул. При этом главную роль играют так называемые «эффективные ионогенные группы», находящиеся на поверхности молекул. Связывание белков на ЦИ, по мнению ряда ученых, носит ионный характер [12, 17, 18, 33]. В пользу этого положения говорит тот факт, что при сорбции белков в раствор выделяются ионы водорода [2]. Но сила связи между белком и ЦИ — результат не только ионного взаимодействия ЦИ скелета с белком. Вторичное связывание по месту гидроксильных групп повышает селективную способность ЦИ. Последнее очень важно при сепарации поликомпонентных смесей.

Нами было установлено, что при хроматографии белков на ЦИ можно разделить ассоциаты одноименных молекул, а также белки, различающиеся между собой лишь несколькими молекулами аминокислот [4]. Высокая разрешающая способность ЦИ по отношению к белкам объясняется тем, что разделение вызывается наложением действия таких факторов, как суммарный заряд, количество заряженных групп, расположение их на поверхности молекул белков и в меньшей мере размеры этих молекул [13]. В конечном счете возможности и особенности сепарации белков на том или ином ЦИ в основном определяет эффективный заряд молекул [12].

ЦИ обладают меньшей удельной емкостью связывания белков, чем синтетические ионообменники, но у последних полезная емкость для белков вследствие меньшей доступности ионообменных мест — меньшая. Однако следует оговориться, что высокая

ионообменная емкость ионообменника внутри его элементарной частицы может быть вредной, поскольку иногда возникают столь прочные связи между ионитом и разделяемым веществом, что элюирование становится трудным. Сорбционное равновесие белка на ЦИ достигается в течение нескольких минут. Например, в опыте с рибонуклеазой на сульфэтилцеллюлозе (СЭЦ) равновесие устанавливалось в течение 5 мин [16]. С помощью хроматографии белков на ЦИ и дополнительных расчетов можно установить примерную эффективную валентность белка [16].

Из ЦИ наиболее распространены диэтил-аминоэтилцеллюлоза (ДЭАЭЦ) — слабый анионообменник, используемый для хроматографии белков, особо чувствительных к экстремальным изменениям pH и температуры; триэтиламиноэтилцеллюлоза (ТЭАЭЦ) — анионообменник; гуанидиноэтилцеллюлоза (ГЭЦ) — сильный анионообменник — и карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) — катионообменник. Получили признание также ЦИ на основе сефадексов. Последние улучшают разделение биополимеров, так как сепарация ведется одновременно по размерам и заряду молекул. Особые надежды можно возлагать на сферические ЦИ, во многом облегчающие работу экспериментатора и дающие возможность проводить опыты в более стабильных условиях внутри хроматографической колонки.

ЦИ весьма гидрофильные и рыхлые. Пространственное строение матрицы определя-

ет молекулярно-фильтрующее ее действие. Набухание (или сжатие) ЦИ происходит в основном перпендикулярно оси волокон, при этом их длина изменяется мало. Иониты на основе целлюлозы устойчивы при мягких условиях элюции и могут в той или иной мере разрушаться в присутствии крепких щелочей или окислителей. Микробиологическое разрушение обычно весьма невелико. Промывка водой достаточна для удаления продуктов распада. Из ЦИ менее устойчива фосфоцеллюлоза (ФЦ), в связи с чем промывать ее следует дольше, чем другие ЦИ. Данная работа проведена с целью более глубокого изучения компонентного состава белков зерна ржи сорта Вятка.

Методика исследований

На ультрацентрифуге Г-120 определены S и S_f белковых веществ, а на автоматическом анализаторе аминокислот также их аминокислотный состав. Схема разработанной нами специальной методики экстракции, хроматографии и рехроматографии белков зерна [10] приведена на рис. 1. С помощью экстрагирования белки разделены на группы легкорастворимых (a и b), среднерастворимых (v и z) и труднорастворимых (d и e). Белки остатка (неэкстрактивные) обозначены как отдельная фракция. Выделенные группы белков хроматографировали на ДЭАЭЦ, ТЭАЭЦ и ГЭЦ. Часть фракций, полученных при хроматографии, рехроматографировали на КМЦ и ТЭАЭЦ. Хромато-

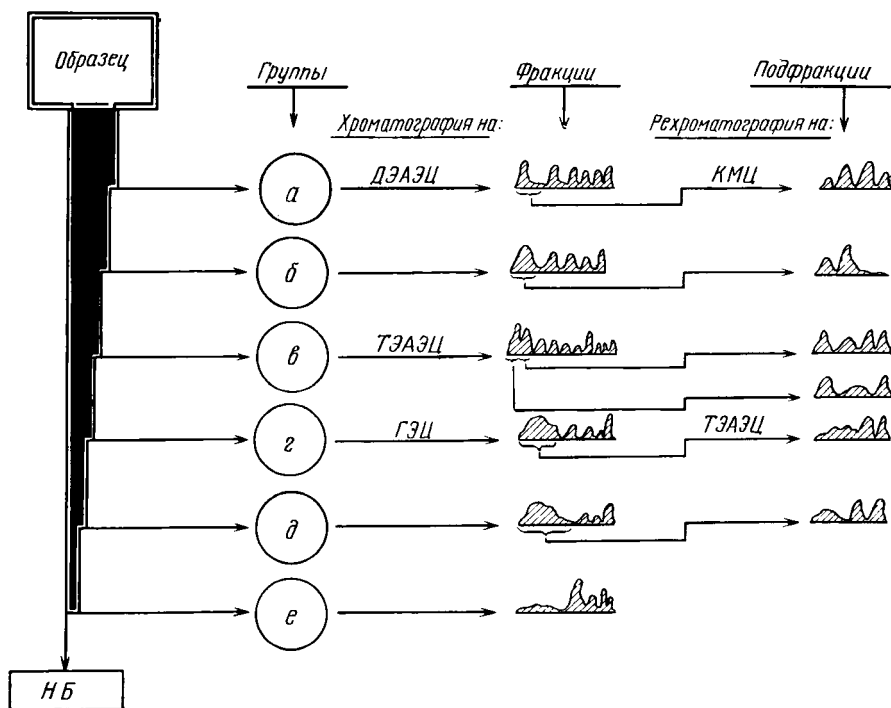


Рис. 1. Схема разделения белков.

Состав экстрагентов групп белков: a — обессоленная вода; $б$ — 0,005 М фосфатный буфер, pH 7,40; $в$ — 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,45; $г$ — 0,05 М карбонатный буфер, pH 9,35; $д$ — 0,1 М карбонатный буфер+0,1 М KCl, pH 10,70; $е$ — 0,16 М богатный буфер+0,17 М KCl+0,02 М Na_2SO_4 , pH 12,30; НБ — неэкстрактивный белок

графию и рехроматографию проводили на специальных колонках [6] в трех повторностях. Белки окрашивали по Лоури [26] и спектрофотометрировали при λ 660 нм. рН измеряли на прецизионном рН-метре. Перед заправкой колонок ЦИ переводили в рабочий буфер и отделяли наиболее крупные и наиболее мелкие частицы, т. е. те, которые после суспензирования оседали быстрее или медленнее основной массы. Эта операция позволила достичь более равномерной набивки колонки и избежать артефактов при хроматографии. Для достижения хорошего разделения наносили 1 мг белка на 10 мг ЦИ, который перед заправкой в колонки циклизировали. Для этого анионообменники суспензировали в растворе 0,5 н. HCl (10 г ЦИ на 150 мл раствора HCl) в течение часа, затем отфильтровывали и промывали деионизованной водой до рН 5. Осадок суспензировали в 0,5 н. растворе NaOH в тех же пропорциях, что и с раствором HCl, отфильтровывали и промывали деионизованной водой до рН 7. После этой операции анионообменник готов для работы. При работе с катионообменниками процедура подготовки ионита аналогична описанной, только в этом случае кислотная и щелочная обработки проводились в обратной последовательности.

рН-грамма элюата, как и диаграмма концентрации белка в элюате, — показатели до некоторой степени интерполяционные. Объясняется это тем, что элюат собирали порциями по 5 мл, рН-грамма элюента построена по значению рН всех растворов перед поступлением их в колоночное устройство. Элюаты, собранные в отдельную емкость для каждой фракции и подфракции, постепенно упаривали до 2—3 мл методом микрофильтрации через поры целлофана при обдувании его током воздуха. Концентрацию солей в полученном растворе понижали с помощью диализа против фосфатного буфера (0,25 М фосфатный буфер с добавлением KCl до ионной силы $\mu=0,2$; рН 7,2). Этот же буфер использовали при ультрацентрифугировании. В том случае, когда при упаривании фракций или подфракций белок выпадал в осадок, его растворяли, изменяя рН. Ультрацентрифугирование проводили в основном в двухсекторной капиллярной кювете методом наложения растворителя на раствор. Скорость вращения ротора обычно составляла 10—30 тыс. оборотов в минуту. В некоторых случаях, когда S по методу наложения была близкой нулю, опыт повторяли с использованием метода Арчибалда, позволяющего определить более низкие значения S. Следует, однако, отметить, что метод наложения дает возможность работать с более низкими концентрациями белков.

Оставшиеся растворы применяли для определения аминокислотного состава гидролизатов фракций и подфракций легко-, средне- и труднорастворимых белков. Установлен также аминокислотный состав гидролизата суммарного белка и отдельных его групп. Гидролиз и подготовку образцов к анализу на аминокислотный состав проводили методами, изложенными в [8, 14].

ММ «усредненной» аминокислоты и расчетную изоэлектрическую точку (ИЭТ) определяли с учетом ММ, ИЭТ и общего количества каждой аминокислоты. Биологическую ценность (БЦ) белков рассчитывали по [25].

Более детально методика разделения и состав экстрагентов изложены в [10], а особенности разделения на ЦИ — в [5, 10].

Результаты исследований

Легкорастворимые белки группы *a* составили 45% суммарного белка зерна ржи. Они экстрагированы водой и с помощью хроматографии на ДЭАЭЦ разделены на 6 фракций (рис. 2). В I фракцию вошли белки, свободно фильтрующиеся через ДЭАЭЦ; II фракцию элюировали 0,05 М NaCl; III — 0,1 М NaCl, IV — 0,2 М NaCl, V — 0,2 М NaCl+0,1 М Na₂CO₃ (здесь и дальше все растворы хлористого и углекислого натрия приготовлены на рабочем фосфатном буфере). Для элюции VI фракции использовали 0,25 М раствор NaOH. Соотношение между фракциями белков группы *a* 63,1:9,3:9,0:4,2:7,5:7,0. В общем комплексе белков зерна до сих пор фракций (в порядке элюции) составила 28,4; 4,2; 4,0; 1,9; 3,4 и 3,1%.

Хроматографический профиль интерполяционной диаграммы белков группы *a* (элюция каждой из этих фракций была продолжительной; белки элюировались несимметричными и многовершинными пиками) позволяет судить о значительной гетерогенности I, II и III фракций и меньшей гетерогенности IV и V фракций. Однако и у этих фракций, как показывает графическое фракционирование, имеются примеси, о чем свидетельствуют дополнительные небольшие пики на хроматограмме. II, III и IV фракции белков элюируются путем изменения μ элюента, V фракция — в результате повышения рН и μ элюата, VI фракция (белки, смываемые с колонки щелочью) — вследствие повышения рН. Часть белков I фракции (на интерполяционной диаграмме от 250 до 750 мл элюата), составляющая 15,9% белков группы *a*, или 7,2% общих белков, элюировалась в течение длительного времени. В дальнейшем мы будем рассматривать их отдельно, как фракцию I'.

Сопоставление рН-грамма элюата и элюента показало, что рН элюата по сравнению с рН исходного раствора белка (первые 50 мл элюата) несколько сдвигается в щелочную сторону. Дальнейший сдвиг рН в кислую сторону, который наблюдается почти до конца элюции I' фракции, свидетельствует о том, что более основные белки задерживаются на ДЭАЭЦ, а более кислые свободно фильтруются через колонку и подкисляют элюат. Но это, вероятно всего, относится к моменту элюции основной массы белка I' фракции. Дальнейшее понижение рН (порой более чем на единицу) мы склонны объяснить другими факторами, а не действием белков. Возможно, это влияние сопутствующих компонентов, например свободных аминокислот, которые как вещества с низким ММ при продвижении по колонке отстают

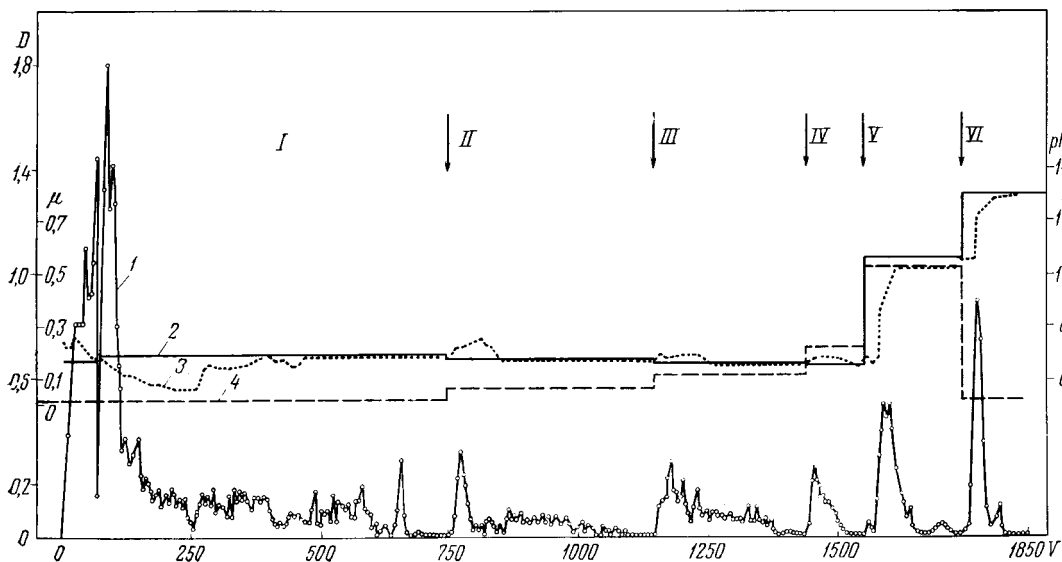


Рис. 2. Интерполяционная диаграмма хроматографии белковых веществ группы *a*. 1 — диаграмма элюата белковых веществ; 2 — рН-грамма элюата; 3 — рН-грамма элюата; 4 — ионная сила (μ) элюата; I—VI — фракции белковых веществ; D — оптическая плотность элюата при λ 660 нм; V — объем элюата, мл.

от фронта белка, в результате чего изменяется компонентный состав элюата и его рН. Возможны и другие причины.

При элюции II, III, IV фракций наметился сдвиг рН в щелочную сторону по сравнению с рН элюата, и это понятно. На анионите задерживаются белки с выраженной основностью, при элюции они несколько подщела-

чивают раствор. При элюировании II фракции изменение рН более значительное, чем у III и IV фракций. У V и VI фракций кислотность рабочих растворов уменьшалась. В данном случае применялись сильнощелочные элюенты, и белки как соединения амфолитонной природы с более низким значением функционального заряда, чем приме-

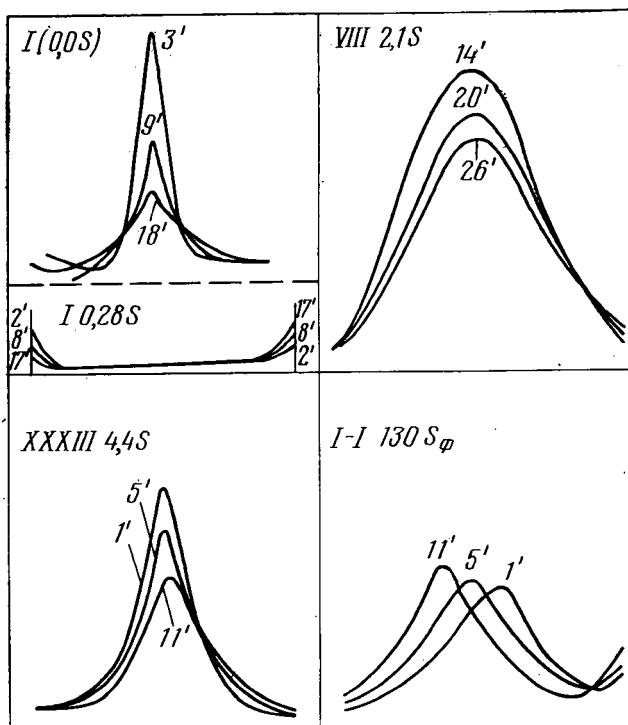


Рис. 3. Кривые седиментации и флотации некоторых белковых веществ групп *a* (I; I—I), *б* (VIII) и *в* (XXXIII).

I; VIII; XXXIII; I—I — номера фракций и подфракций белковых веществ; 3', 9', 18' и т. д. — время в минутах от начала седиментации (флотации) до фотографирования; S — константы седиментации; S_ϕ — флотации белковых веществ.

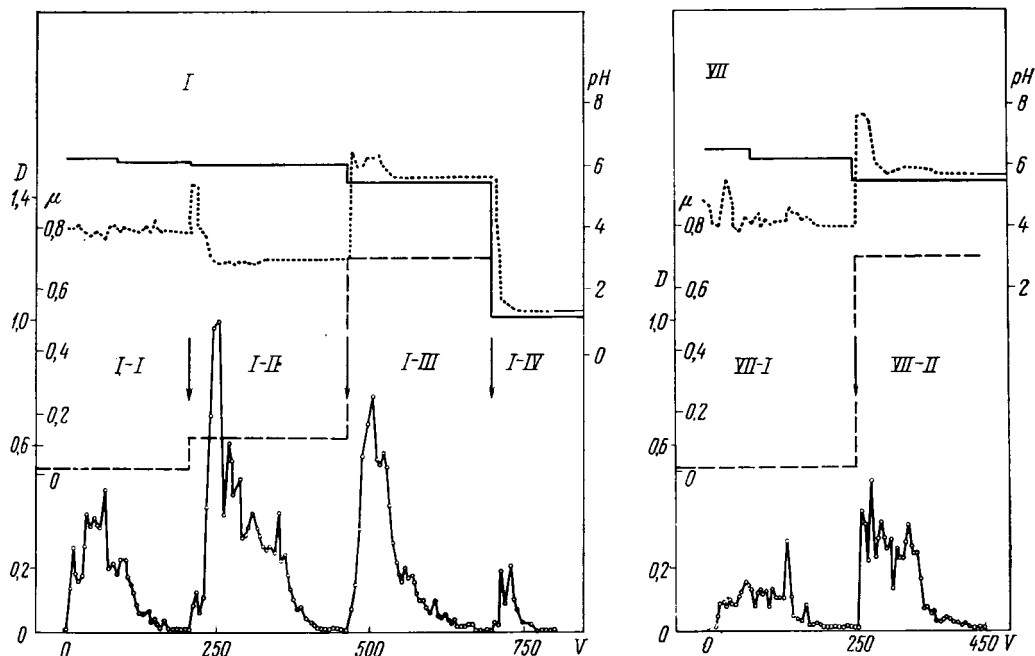


Рис. 4. Интерполяционная диаграмма рехроматографии I и VII фракции белковых веществ групп а и б.

I—I; I—II и т. д. — номера подфракций. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

няемые элюенты, сместили рН от более к менее щелочному.

Поведение этих фракций при ультрацентрифугировании сильно различалось. Одни из них (I и II фракции) седиментировали, другие (III—VI) флотировали. S белковых веществ I фракции, определенная методом перелива в двухсекторной капиллярной ячейке, близка нулю. В связи с этим повторное ультрацентрифугирование проведено по методу Арчибальда. S этой фракции белков оказалась равной 0,28 единицы Сведберга (рис. 3). У I' фракции, замедленно элюирующейся с колонки ДЭАЭЦ, S=12, а у II фракции S=40. Можно полагать, что во II фракции имеются примеси со значением S>40, поскольку при диффузии (наслоении растворителя на раствор) расширение границ седиментирующего пика не симметрично.

S_ф соответственно очередности элюции III, IV, V и VI фракций равнялся 170, 78, 78 и 280. При ультрацентрифугировании III, IV и V фракций (хотя опыт проводился методом наслаения растворителя на раствор) S_ф фиксировался не по передвижению пика, образующегося на границе наслаения, а по пику, образующемуся у дна ячейки. Появление S_ф у этих трех фракций указывает на то, что парциальный удельный объем молекул данных белков выше единицы.

I фракция белков группы а при рехроматографировании на КМЦ (рис. 4) разделяется на 4 подфракции: I—I, I—II, I—III, I—IV. Подфракции I—I — это белки, которые свободно фильтруются не только через ДЭАЭЦ, но и КМЦ. Подфракции I—II, I—III, I—IV элюированы соответственно

0,1 и 0,7 M NaCl и 0,5 M HCl. Соотношение между этими подфракциями 20,9:43,1:31,7:4,3, или 4,4; 9,2; 6,7 и 0,9 % от суммарных белков зерна. Анализ хроматограмм свидетельствует о гетерогенности этих подфракций. При фильтрации I—I и I—II подфракций рН-грамма элюата вычерчивается в более кислой зоне, чем рН-грамма элюента. Наблюдается сдвиг рН в кислую сторону на несколько единиц. Отмечаются некоторые пикообразные скачки рН-граммы, особенно для подфракции I—II. При элюции подфракции I—III различия между рН-граммами элюата и элюента менее значительны. Лишь при элюции основной массы белка подфракции значение рН сдвигается со слабокислого ближе к нейтральному, а затем снова приближается к рН элюента. Очень мало различаются рН-граммы элюата и элюента при элюции I—IV подфракции I фракции белков группы а. Изменения рН выходного раствора при хроматографии белков на ионитах целлюлозной основы мы объясняем прежде всего их свойствами. Некоторые изменения уровня вычерчивания рН-граммы элюата обусловлены особенностями элюентов и ЦИ.

Из четырех подфракций белковых веществ группы а нам удалось проультрацентрифугировать лишь две — I—I и I—IV. S_ф у обеих подфракций был высоким — соответственно 130 и 190. У подфракции I—I S_ф определен с места наслаения растворителя на раствор, а у подфракции I—IV — со дна ячейки. Поскольку вся I фракция характеризуется очень низким значением S — 0,28, а часть белков этой фракции, т. е. подфракции I—I и I—IV, — высоким S_ф,

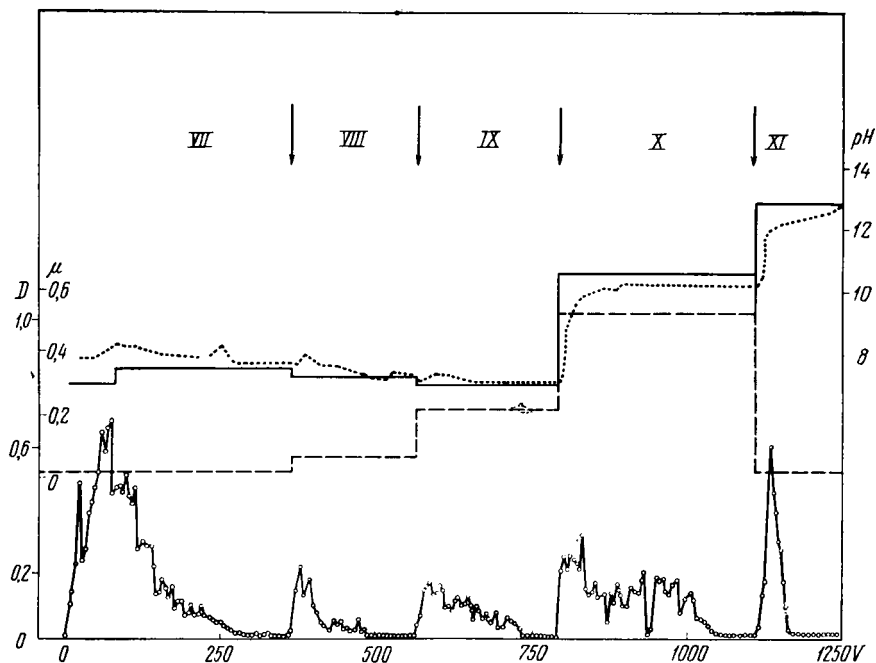


Рис. 5. Интерполяционная диаграмма хроматографии белковых веществ группы б.

Обозначения те же, что на рис. 2.

то, очевидно, у остальных белков S в основном довольно значительная. Низкое значение S всей фракции, возможно, связано с образованием комплексов (очень непрочных, но достаточно сильных, чтобы при ускорении в ультрацентрифуге в результате различий в их массе и плотности они не распались), которые имеют усредненную подвижность составляющих их компонентов. Анализируя хроматограмму, можно также предположить, что при рехроматографии на ЦИ в кислой среде слабо связанные комплексы диссоциируют до составляющих их компонентов.

Легкорастворимые белки группы б составили 20 % белков зерна. Экстрагировали их 0,005 M фосфатным буфером. При хроматографии на ДЭАЭЦ группа б разделена на 5 фракций (рис. 5): VII фракция — это белки, свободно фильтрующиеся через ДЭАЭЦ; белки VIII и IX фракций элюированы соответственно 0,05 и 0,2 M раствором NaHCl; X фракция вытеснена с анионита раствором 0,2 M NaCl + 0,1 Na₂CO₃. Белки XI фракции смывали с колонки ДЭАЭЦ 0,25 M раствором NaOH. Элюция VIII и IX фракций проведена ступенчатым повышением μ элюента, X — ступенчатым повышением pH и μ , XI — повышением pH. Соотношение между этими фракциями 46,6:6,6:11,7:25,5:9,6. Доля их в суммарном белке соответственно очередности элюции составила 9,3; 1,3; 2,3; 5,2 и 1,9 %.

Графическим фракционированием можно в первом приближении установить количество сокомпонентов во фракциях рассматриваемой группы белков, особенно X фракции. Исключение составляет XI фракция.

Симметричность пика XI фракции близка к той, которая наблюдается при элюции индивидуальных белков. Однако это еще не означает, что в данном случае элюируется индивидуальный белок. Симметричность может быть вызвана жесткими условиями элюции (0,25 M NaOH), при которых все белки, близкие по ММ, хотя, возможно, и различающиеся по заряду, движутся довольно компактной зоной. Вообще же симметричность пика — это косвенный показатель гомогенности.

Можно предполагать щелочной характер белков VII, VIII и IX фракций, поскольку pH-грамма элюата сдвинута в щелочную сторону по отношению к pH-грамме элюента. Для VII фракции сдвиг pH большой, чем для VIII, а для IX больший, чем для VII, т. е. сначала элюировались более щелочные, а затем менее щелочные белки. При элюировании X и XI фракций щелочность элюата была ниже щелочности элюента, различия достигали нескольких десятых единицы pH.

При ультрацентрифугировании VIII, IX, X и XI фракций белка группы б они седиментировали. S фракций белковых веществ этой группы сильно различались и составляли соответственно 2,1; 3,9; 0,31 и 28 единиц Сведберга (для определения S X фракции использовали метод Арчибалда). Следовательно, в эту группу входят белки с сильно различающимися ММ.

VII фракция белков группы б (белки, которые свободно фильтруются через ДЭАЭЦ) при рехроматографировании на КМЦ разделяется на 2 подфракции: VII—I — белки, свободно фильтрующиеся

через колонку КМЦ, и VII—II — элюируемые 0,7 М NaCl (рис. 4). Соотношение между этими подфракциями 34,8:65,2. В суммарном белке их доля равна соответственно 3,2 и 6,1%. Хроматографический профиль подфракций многовершинен. При фильтрации VII—I рН-грамма элюата вычерчивается в общем на 2 единицы ниже, чем рН-грамма элюента, а при элюции подфракции VII—II — на несколько десятых единицы выше. На хроматограмме наблюдаются пикообразные изменения рН элюата, что, очевидно, связано с характерной последовательностью элюирования различающихся между собой белков. Наиболее сильно рН изменяется с началом элюции подфракции VII—II. Значение рН изменяется от слабощелочного до слабощелочного, затем вновь снижается до слабощелочного и остается таковым до конца элюции.

Ультрацентрифугирование этих подфракций показало, что удельный парциальный объем их выше единицы. Белковые вещества подфракций флотировали. $S_{ф}$ подфракции VII—I составлял 67. Особо велико значение $S_{ф}$ у подфракции VII—II — 420. Очевидно, структура ее белков очень рыхлая. Флотация подфракции VII—I определена с границы наложения растворителя на раствор, а VII—II — со дна ячейки.

Об аминокислотном составе гидролизатов белков группы *a* можно судить по данным табл. 1. В белках этой группы и ее фракций обычно преобладают валин, глицин, аланин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты, в небольшом количестве содержится метионин (табл. 1). Цистеин присутствует в следовом количестве, что связано со значи-

тельным его разрушением в процессе гидролиза. Содержание отдельных аминокислот во фракциях и в исходной группе белков сильно различается (табл. 1). Однако общее содержание основных, слабощелочных и кислых аминокислот во всех фракциях, за исключением V, изменяется мало и составляет соответственно 9—14, 64—69 и 20—23%.

В результате анализа данных об аминокислотном составе фракций белков группы *a* можно высказать два предположения. Не исключена возможность сходства аминокислотного состава (набора аминокислот) многих индивидуальных легко растворимых белков. Об этом говорит тот факт, что аминокислотный состав поочередно элюируемых I, II, III и IV фракций закономерно изменяется (рис. 6, 7). Указанные изменения касаются 15 из 18 аминокислот гидролизатов фракций. Так, у поочередно элюируемых фракций увеличивается содержание аланина, глицина, фенилаланина (рис. 6) и уменьшается количество валина, лейцина, лизина и пролина. Кроме того, от I фракции ко II и III возрастает, а к IV уменьшается доля аргинина, тирозина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. В обратной последовательности меняется содержание треонина, изолейцина и гистидина. Аналогично изменяется сумма моноаминодикарбоновых и диаминодикарбоновых аминокислот (рис. 7). Второе предположение заключается в том, что при мягких условиях хроматографии белков на ЦИ в очередности их элюции имеется определенная связь с их аминокислотным составом.

ММ «усредненной» аминокислоты гидро-

Т а б л и ц а 1

Аминокислотный состав гидролизатов белков группы *a* (% от суммы аминокислот)

Аминокислота	Группа <i>a</i>	Фракции группы <i>a</i>					
		I	II	III	IV	V	VI
Основные							
Лизин	8,3	7,6	7,2	6,9	3,6	13,4	6,5
Гистидин	3,4	4,4	2,9	1,7	5,6	16,7	0,6
Аргинин	2,2	2,2	3,1	3,7	2,5	9,9	1,6
Сумма	13,9	14,2	13,2	12,3	11,7	40,9	8,7
Слабощелочные							
Фенилаланин	3,4	3,4	3,8	4,1	4,1	2,9	5,9
Тирозин	1,5	1,7	1,9	2,6	1,3	1,6	3,1
Серин	6,7	6,6	6,7	5,6	7,7	6,7	6,4
Метионин	0,5	0,6	0,7	0,4	0,6	0,1	0,4
Валин	10,4	11,1	10,8	19,4	7,1	2,5	9,1
Глицин	10,2	8,9	10,0	11,4	13,3	8,4	10,4
Лейцин	9,1	9,2	9,0	9,0	8,1	5,7	10,9
Изолейцин	4,3	4,9	4,4	4,3	4,4	2,9	5,7
Аланин	11,0	9,1	10,1	11,6	16,2	8,7	12,0
Треонин	5,2	6,2	5,4	4,5	5,8	3,7	2,5
Пролин	1,4	2,0	1,5	1,1	0,5	1,8	1,2
Сумма	64,0	62,2	64,6	64,9	68,1	45,3	68,8
Кислые							
Цистеин	Сл.	0,0	0,0	0,0	Сл.	0,0	0,0
Глутаминовая	10,5	10,6	10,7	11,0	8,6	7,3	10,6
Аспарагиновая	11,6	11,1	11,5	11,9	11,6	7,3	11,9
Сумма	22,1	21,7	22,2	22,9	20,2	14,6	22,5

Аминокислотный состав гидролизатов белков группы б (% от суммы аминокислот)

Аминокислота	Группа б	Фракции группы б				
		VII	VIII	IX	X	XI
Основные						
Лизин	10,3	7,3	7,2	28,7	4,8	5,8
Гистидин	2,4	1,2	8,8	9,7	6,8	2,6
Аргинин	1,5	0,9	3,8	1,9	1,9	1,0
Сумма	14,2	9,4	12,8	40,3	13,5	9,4
Слабокислые						
Фенилаланин	3,2	4,2	7,9	3,6	3,6	1,3
Тирозин	2,0	1,6	4,5	1,4	1,1	0,8
Серин	5,0	6,0	6,4	3,1	3,8	7,0
Метионин	Сл.	0,8	Сл.	0,0	0,0	0,0
Валин	7,6	8,0	»	11,0	7,4	12,2
Глицин	11,7	13,8	14,6	4,5	10,6	15,2
Лейцин	6,0	8,9	Сл.	6,4	5,5	5,2
Изолейцин	3,3	5,3	»	3,4	2,5	3,0
Аланин	17,1	13,1	13,4	5,1	28,2	22,0
Треонин	5,0	5,4	5,8	3,0	3,4	3,8
Пролин	0,6	0,9	2,1	0,0	0,0	0,5
Сумма	61,4	68,0	54,7	41,5	66,1	71,1
Кислые						
Цистеин	2,5	0,0	7,9	0,0	0,0	0,0
Глутаминовая	12,7	13,0	13,8	9,1	11,1	11,5
Аспарагиновая	9,3	9,8	10,7	9,1	9,5	7,9
Сумма	24,5	22,7	32,3	18,2	20,6	19,5

Т а б л и ц а 3

Биологическая характеристика белков группы а

Показатель	Группа а	Фракции группы а					
		I	II	III	IV	V	VI
Сумма незаменимых аминокислот, %	41,3	43,0	41,2	39,5	32,7	31,4	41,0
БЦ, %	65,7	65,9	66,9	64,1	60,8	42,7	69,2
ММ «усредненной» аминокислоты	126	126	107	107	118	125	134
Расчетная ИЭТ	5,86	5,74	5,60	5,32	6,03	6,24	5,40

Т а б л и ц а 4

Биологическая характеристика белков группы б

Показатель	Группа б	Фракции группы б				
		VII	VIII	IX	X	XI
Сумма незаменимых аминокислот, %	35,3	39,7	20,8	56,2	27,1	31,3
БЦ, %	56,1	74,8	19,1	41,9	40,7	39,7
ММ «усредненной» аминокислоты	128	126	118	141	113	104
Расчетная ИЭТ	6,02	5,59	5,59	6,73	5,40	5,69

лизата фракций белков группы а колеблется от 107 до 134, а группы б — от 104 до 141, расчетная ИЭТ изменяется соответственно от 5,32 до 6,24 и от 5,40 до 6,73. В гидролизатах белков группы б обычно преобладают глицин, аланин, аспарагиновая и глютами-

новая кислоты (табл. 2). Высокое содержание цистеина характерно для VIII фракции и лизина для IX фракции. Следует отметить, что не во всех гидролизатах фракций легко растворимых белков группы б имеются в определяемых количествах обычно встре-

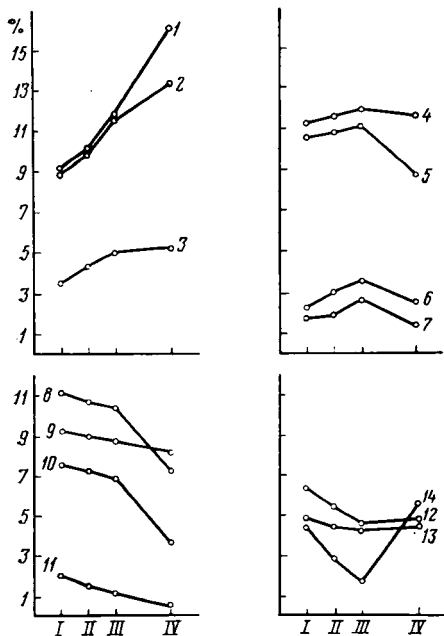


Рис. 6. Аминокислотный состав гидролизатов I—IV фракций белков группы а, % от суммы аминокислот гидролизата.

1 — аланин; 2 — глицин; 3 — фенилаланин; 4 — аспарагиновая кислота; 5 — глутаминовая кислота; 6 — аргинин; 7 — тирозин; 8 — валин; 9 — лейцин; 10 — лизин; 11 — пролин; 12 — треонин; 13 — изолейцин; 14 — гистидин.

чающиеся в суммарных белках аминокислоты. В гидролизатах IX и X фракций практически не обнаруживаются пролин и метионин, отсутствует метионин и в XI фракции. В гидролизате VIII фракции в очень небольшом количестве содержится метионин, валин, лейцин и изолейцин. Общее количество основных, слабокислых и кислых аминокислот в гидролизатах всех фракций белков группы б, за исключением IX, составляет соответственно 9—13, 55—71 и 20—32 %.

Наличие следовых количеств отдельных аминокислот или их отсутствие в гидролизатах некоторых фракций и подфракций белков еще не говорит о том, что их мало или что они не обнаруживаются в негидролизованном белке. Известно, что при кислотном гидролизе белков часть аминокислот разрушается [7, 9]. Однако, основываясь на полученных данных, можно с достаточной уверенностью говорить об очень низком со-

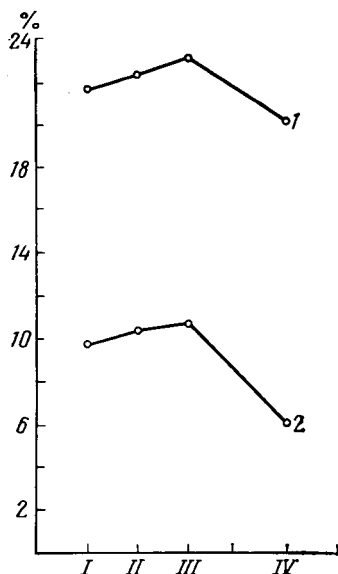


Рис. 7. Содержание моно- (1) и диаминомонокарбоновых (2) групп аминокислот в гидролизатах I—IV фракций белков группы а, % от суммы аминокислот гидролизата.

держании некоторых аминокислот в белках. Вполне вероятно, что при существующей чувствительности анализаторов аминокислот нельзя обнаружить очень небольшие количества аминокислот, содержащихся в белках.

Общее содержание незаменимых аминокислот и БЦ белков во фракциях группы а (табл. 3) больше, чем в группе б (табл. 4). Особенно низкой БЦ характеризуются белки VIII фракции.

Заключение

Хроматографией и рехроматографией на целлюлозононитах легко растворимые белки зерна ржи разделены на 11 фракций и 6 подфракций. Выделенные фракции и подфракции значительно различаются между собой как по аминокислотному составу, так и по седиментационным показателям, хроматографическому профилю и биологической ценности.

Наблюдаются закономерные изменения аминокислотного состава поочередно элюируемых фракций белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булл Г. Д. Физическая биохимия. М.: ИЛ, 1949. — 2. Давыдова Е. Г., Рачинский В. В. Сорбция белков на ионообменных целлюлозононитах. — Приклад. биохим. и микробиол., т. 3, № 3, 1967, с. 341—346. — 3. Крищенко В. П. Хроматография белков зерна ржи на целлюлозононитах. — В сб.: Агрохимия. М.: Московский рабочий, 1969, с. 7—11. — 4. Кри-

щенко В. П. О разделяющей способности целлюлозононитов по отношению к белкам. — Докл. ВАСХНИЛ, № 5, 1969, с. 34—39. — 5. Крищенко В. П. Методика разделения на фракции легко растворимых белковых веществ зерна ржи. — Докл. ТСХА, 1969, вып. 149, с. 187—193. — 6. Крищенко В. П. Колоночное устройство для хроматографии, очистки и концентрирования бел-

ков, пептидов, аминокислот и других веществ на ионитах и сефадексах. — Изв. ТСХА, 1969, вып. 1, с. 219—221. — 7. Крищенко В. П., Стойчев Д. А. Разрушение некоторых протеногенных аминокислот в растворе соляной кислоты при повышенной температуре. — Докл. ТСХА, 1969, вып. 154, с. 213—217. — 8. Крищенко В. П., Груздев Л. Г. Комплексная методика определения аминокислотного состава растений. — Химия в сельск. хоз-ве, 1971, № 11, с. 60—64. — 9. Крищенко В. П., Никишина Р. И., Плешков Б. П. О разрушении аминокислот при гидролизе белков зерна ржи. — Докл. ТСХА, 1968, вып. 144, с. 183—186. — 10. Крищенко В. П. О связывании фермента АТФ: Д-глюкозофосфотрансферазы триэтиламиноэтилцеллюлозной. — Изв. ТСХА, 1968, вып. 5, с. 230—231. — 11. Мелик-Саркисян С. С., Кузнецова М. Д., Автеева Т. А., Сисакян Н. М. Физико-химические свойства и ферментативная активность растворимых белков листа. — Биохимия, 1967, т. 32, вып. 1, с. 189—197. — 12. Николаев А. Я. Адсорбция суммарного белка и аспарагиназы экстракта *B. cadaveris* на диэтиламиноэтилцеллюлозе. — Биохимия, 1962, т. 27, вып. 3, с. 487—494. — 13. Николаев А. Я. Хроматография белков на целлюлозоионитах. — Успехи химии, 1963, т. XXXII, вып. 9, с. 1087—1092. — 14. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1968. — 15. Рафилов С. Р., Павлова С. А., Твердохлеб И. И. Методы определения молекулярного веса и полидисперсности высокомолекулярных соединений. М.: Медицина, 1963. — 16. Тонева-Давыдова Е. Г. Исследование сорбционных свойств ионообменных целлюлоз методом радиоактивных индикаторов. — Автореф. канд. дис., М., 1965. — 17. Шпекитер В. О. Методы исследования биополимеров с помощью аналитической ультрацентрифуги. — В кн.: Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1964, с. 5—37. — 18. Шутлов А. Д., Вайнтрауб И. А. Хроматографическое выделение и некоторые свойства легумина и вицилина вики. — Биохимия, 1966, т. 31, вып. 4, с. 726—735. — 19. Шутов А. Д., Нгуен-Тхань-Гуен, Крищенко В. П., Вайнтрауб И. А. О диссоциации легуминов кормовых бобов и вики в кислой и щелочной среде. — Тр. по химии природных соединений. Кишинев, 1970, вып. 8, № 5, с. 102—108. — 20. Archibald W. I. — *Phys. Colloid Chem.*, 1979, N 51, p. 1205. — 21. Bolduin R. I. — *J. Biochem.*, 1953, N 55, p. 644. — 22. Danielson C. S. — *Biochem. J.*, 1949, N 44, p. 387. — 23. Ehrenberg A. — *Acta. Chem. Scand.*, 1957, N 11, p. 1257. — 24. Nons-Georg Elias. — *Ultracentrifugation-methaler. Bekman Instruments Munden*, 1961. — 25. Korpczy G., Lindner K., Varga K. — *Qualias Plant. Mater. Veget.*, 1961, vol. 8, N 2, p. 130. — 26. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. T. — *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, N 1, p. 48. — 27. Labor F. E. — *Biochem.*, 1966, vol. 5, N 7, p. 123. — 28. Meitz M. A., Schlutler R. I. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, N 81. — 29. Sober H. A., Petersen E. B. — In book: *Ion Exchangers in Organic and Biochemistry*, N. Y., 1957. — 30. Svedberg T., Pedersen K. D. — *The ultracentrifuge clarendon Press. Oxford*, 1940. — 31. Schachman H. K. — *Ultracentrifugation in Biochemistry. Acad. Press. N. Y.*, 1965. — 32. Trautman R. — *J. Phyz. Chem.*, 1950, N 60, p. 1211. — 33. Tunba T. — *Advances in Enzymologies*, 1960, N 22, p. 417.

Статья поступила 29 октября 1979 г.

SUMMARY

By means of extraction readily soluble proteins of rye grain are divided into groups *a* and *b*.

By chromatography on diethyl-aminoethyl-cellulose, *a*-group is divided into 6 fractions. The first fraction of this group of proteins is rechromatographed on carboxymethyl-cellulose and divided into four subfractions. By chromatography on diethyl-aminoethyl-cellulose, *b*-group is divided into five fractions. The VII-th fraction of proteins of *b*-group is divided into 2 subfractions by rechromatography on carboxymethyl-cellulose. Coefficients of sedimentation and flotation of extracted fractions are determined. The amount of certain amino acids in the fractions differs greatly from their total amount in the initial group of proteins. For example, in hydrolysates of the V-th and the VI-th fractions the amount of lysine is 16.7 and 0.6%, while in the hydrolysate of the initial group—3.4%. Readily soluble proteins of rye grain consist of the components differing from each other both in amino acid composition and in sedimentative characteristics, chromatographic behaviour and biological value.