

## ФРАКЦИОННЫЙ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СРЕДНЕ- И ТРУДНОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ЗЕРНА РЖИ

В. П. КРИЩЕНКО, Б. П. ПЛЕШКОВ

(Кафедра агрономической и биологической химии)

В предыдущих работах были приведены методика разделения белкового комплекса зерна ржи на легко-, средне- и трудно-растворимые группы, а также методика разделения этих групп на фракции и подфракции [1, 2]. Опубликованы результаты изучения свойств легкорастворимых белков зерна ржи сорта Вятка [2]. Настоящее сообщение посвящено исследованию средне- и труднорастворимых белков.

К среднерастворимым отнесены белки, которые экстрагированы 0,05 М фосфатным буфером (группа *в*) и извлечены 0,05 М карбонатным буфером (группа *г*), они составляют соответственно 20 и 2 % общего количества белков зерна. Их хроматографировали на триэтиламиноэтил-(ТЭАЭЦ) и гуанидиноэтилцеллюлозе (ГЭЦ).

К труднорастворимым отнесены белки, которые после предварительной экстракции легко- и среднерастворимых белков экстрагированы 0,1 М карбонатным буфером с добавками (группа *д*), и белки, экстрагируемые 0,16 М боратным буфером с добавками (группа *е*). В зерне ржи сорта Вятка первая группа труднорастворимых белков составляла 2,5 %, вторая — 2 %.

### Среднерастворимые белки

Ступенчатой хроматографией на целлюлозонитах (ЦН) белки группы *в* разделены на 10 фракций (XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI — рис. 1). Соотношение между ними следующее — 25,4 : 27,4 : 6,1 : 4,3 : 5,9 : 6,8 : 12,6 : 4,7 : 2,1, или 7,1; 7,7; 1,7; 1,2; 1,7; 1,9; 3,5; 1,3 и 0,6 % общего количества белков зерна. Двумя первыми фракциями группы *в* смывались белки, свободно фильтрующиеся через колонку ТЭАЭЦ. Свободная филь-

рация двух равных по количеству фракций (XII и XIII), а не одной указывает на то, что в зерне ржи имеется довольно много среднерастворимых белков с очень близкими значениями эффективного заряда составляющих их компонентов. Очевидно, белки фракции XII имеют большую среднемoleкулярную массу компонентов, чем фракции XIII. В связи с этим последние при хроматографии обособились в отдельную четко выраженную зону. При повторном хроматографировании этой группы белков, даже при некотором изменении условий его проведения, получен практически аналогичный хроматографический профиль.

Белки фракций XIV, XV, XVI и XVII элюировали путем ступенчатого повышения концентрации NaCl в элюенте (0,05; 0,1; 0,2; 0,3 М). Следующие три фракции элюировали увеличением  $\mu$  элюента при общем повышении pH. В качестве элюентов использовали 0,3 М NaCl + 0,1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,3 М NaCl + 0,2 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 0,3 М NaCl + 0,3 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Белки последней фракции смывали с колонок при помощи ступенчатого повышения pH элюента 0,25 М раствором NaOH.

Анализ хроматографического профиля фракций этой группы белков и графическое фракционирование показывают, что все они весьма гетерогенные. Высокая гетерогенность белков группы *в* выразилась и в том, что при хроматографии на ТЭАЭЦ на всех ступенях повышения  $\mu$  и pH раствора были получены отдельные фракции белков, тогда как при хроматографии других групп этого не наблюдалось.

Следует отметить, что pH-грамма элюата изменяется менее значительно, чем pH-грамма элюента. Лишь при фильтрации фракций XII и XIII белков групп

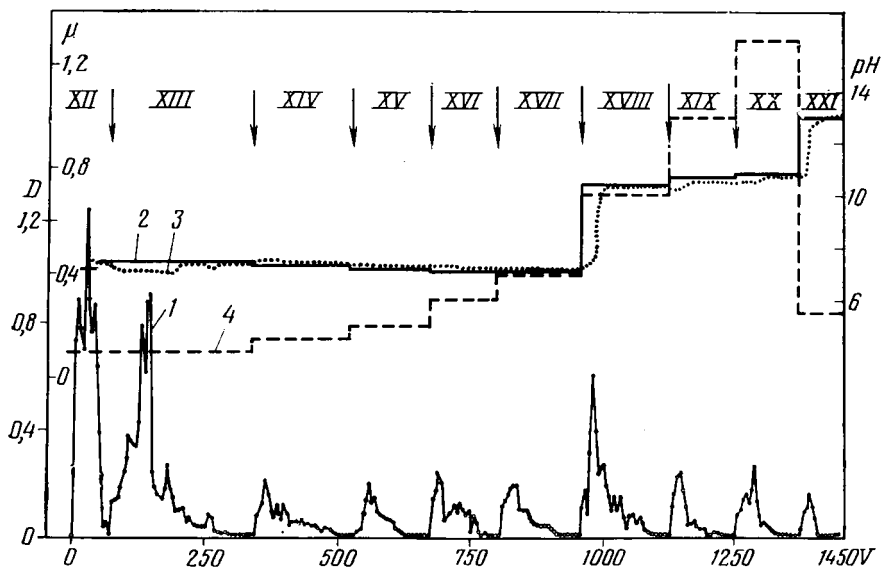


Рис. 1. Интерполяционная диаграмма хроматографии белковых веществ группы *v*.

1 — диаграмма элюата белковых веществ; 2 — pH-грамма элюата; 3 — pH-грамма элюата; 4 — ионная сила ( $\mu$ ) элюента; XII—XXI — фракции белковых веществ; D — оптическая плотность элюата при  $\lambda$  660 нм; V — объем элюата, мл.

*v* сдвиг pH более или менее заметен. Фильтрация фракции XII сопряжена с понижением, а фракции XIII — с повышением концентрации водородных ионов в элюате по сравнению с элюентом. Концентрация водородных ионов в элюате несколько повышается и при элюции фракций XIX и XX.

Скорости седиментации (*S*) белков этих фракций, определенные в двухсекторной капиллярной ячейке методом наложения растворителя на раствор, неодинаковые: у фракции XIV — 0,0; XV — 9,3; XVI — 32; XVII — 18; XVIII — 0,0; XX — 31; XXI — 8,8. Следовательно, фракции белков группы *v* сильно различаются по молекулярной массе (ММ). Анализ фотоснимков седиментации позволяет предположить, что особо больших различий по ММ белковых компонентов в пределах фракций ожидать не следует.

Белки группы *v*, не адсорбирующиеся ТЭАЭЦ (фракции XII и XIII), рехроматографировали на карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ). При рехроматографии фракция XII разделена на 4 подфракции: XII — I, XII — II, XII — III, XII — IV (рис. 2). В первую подфракцию вошли белки — фракции XII группы *v*, свободно фильтрующиеся через колонку КМЦ. Подфракция белков XII — II элюирована в результате снижения pH буфера (элюента) с 6,05 до 3,6, а подфракция XII — III — главным образом вследствие повышения  $\mu$  элюента. Элюцию проводили 0,5 М раствором NaCl. Последнюю подфракцию смывали с колонки 0,25 М раствором NaOH (изменением pH). Соотношение между этими подфракциями 36,8 : 27,0 : 16,5 : 19,6. В общем комплексе суммарного белка доля их рав-

на 2,6; 1,9; 1,2 и 1,4 %. Полученные подфракции белков, особенно XII — I и XII — II, гетерогенны. pH-грамма элюата по сравнению с pH-граммой элюента меняется мало. Лишь при элюции подфракции XII — III в элюате несколько понизилась концентрация водородных ионов.

Ультрацентрифугирование подфракции белков фракции XII показало, что три из них при ускорении седиментируют и одна флотирует. У подфракций XII — I, XII — III и XII — IV *S* равна соответственно 11,0; 6,3 и 1,8. У белков подфракции XII — II скорость флотации (*S<sub>ф</sub>*) составляет 25.

Фракция XIII при рехроматографии разделена на 3 подфракции — XIII — I, XIII — II и XIII — III (рис. 2). В первую подфракцию вошли белки, свободно фильтрующиеся через колонку целлюлозного катионита. Подфракция XIII — II, как и подфракция XII — II, элюировалась из-за смещения pH буфера в процессе хроматографии с 6,05 до 3,6. Третью подфракцию смывали с колонки 0,25 М раствором NaOH. Соотношение между подфракциями белков 20,1 : 42,7 : 37,1. Их доля в суммарных белках зерна 1,5; 3,3 и 2,9 %. Все три подфракции многокомпонентны. Более гетерогенна подфракция XIII — I, pH-грамма элюата по сравнению с pH-граммой элюента изменяется мало. Из трех подфракций в ультрацентрифуге исследована подфракция XIII — III, *S* = 1,6.

Белки группы *z* при хроматографии на ГЭЦ были разделены на 5 фракций: XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI (рис. 3). Разделение белков на фракции проводили с помощью ступенчатого повышения  $\mu$  элюента. Лишь белки фракции XXVI смывали с колонок с помощью повышения pH элю-

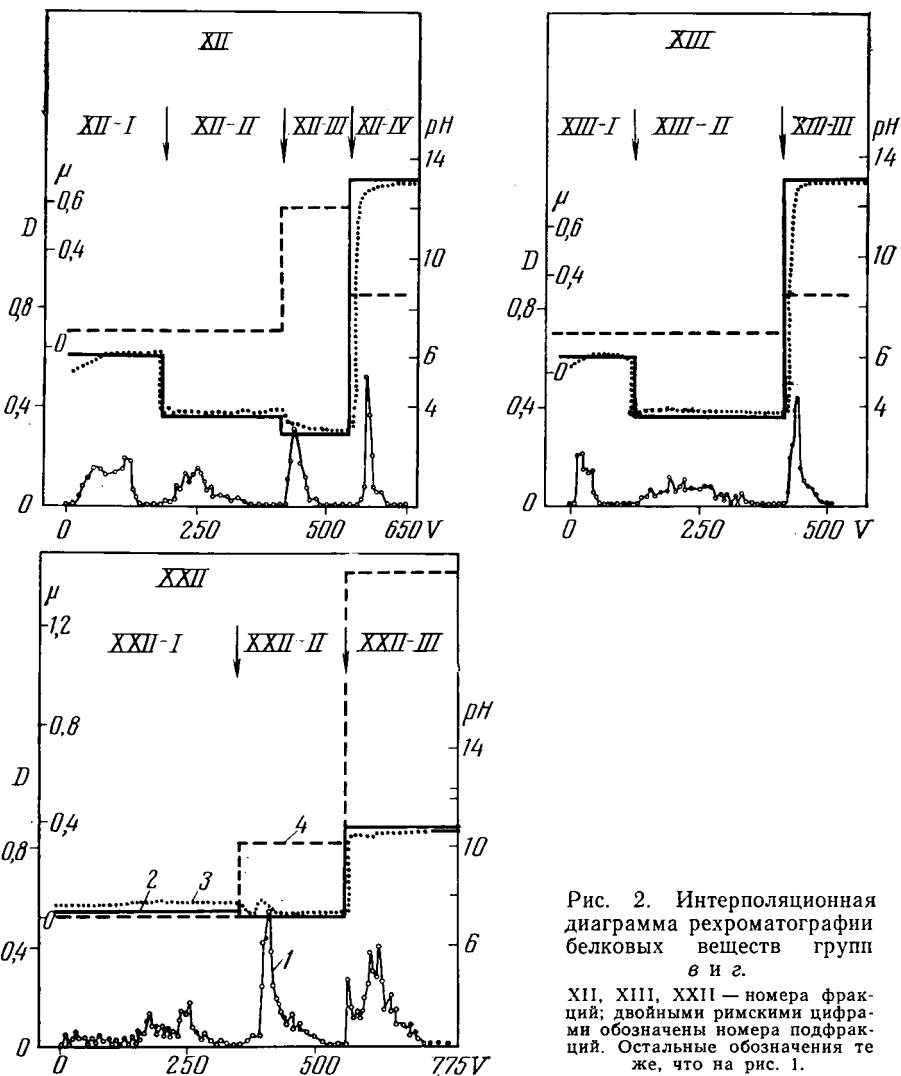


Рис. 2. Интерполяционная диаграмма рехроматографии белковых веществ групп *в* и *г*.

XII, XIII, XXII — номера фракций; двойными римскими цифрами обозначены номера подфракций. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

ента — 0,25 М раствором NaOH. Фракция XXII — это белки группы *г*, свободно фильтрующиеся через колонку ГЭЦ. Элюция фракций XXIII и XXIV проведена 0,05 и 0,1 М раствором NaOH, а фракции XXV — 0,3 М NaCl + 0,3 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Соотношение между этими фракциями 53,5 : 9,8 : 17,2 : 9,3 : 10,2. Доля их в общей сумме белков очень невелика — 1,1; 0,1; 0,3; 0,3 и 0,2 %. Судя по хроматографическому профилю гетерогенность белков группы *г* значительно большая, чем фракций, рассмотренных ранее. рН-грамма элюата по сравнению с рН-граммой элюента изменяется мало. Лишь при пропускании через колонку раствора белка рН несколько сдвигается в щелочную сторону.

Все фракции этой группы белков проультрацентрифугированы. Анализы выявили следующие *S* (очередно элюции фракций) — 12; 32; 44; 0,0; 40. Таким образом, скорость оседания различных фракций данной группы белковых веществ при ус-

корении в ультрacentрифуге изменяется от 0 до 40 и более единиц Сведберга.

Фракция белков XXII рехроматографирована на ТЭАЭЦ (рис. 2). Необходимость рехроматографии вызвана тем, что в эту фракцию входят белки группы *г*, свободно фильтрующиеся через колонку ГЭЦ. В результате рехроматографии белки группы *г* дополнительно разделены на 3 подфракции: XXII — I, XXII — II и XXII — III. В подфракцию XXII — I вошли белки, свободно фильтрующиеся не только через колонку ГЭЦ, но и ТЭАЭЦ. Подфракция XXII — II элюирована повышением  $\mu$  элюента (0,3 М NaCl), а XXII — III — повышением  $\mu$  и рН (0,5 М NaCl + 0,3 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Соотношение между подфракциями 29,3 : 35,1 : 35,5, доля белков в общей сумме 0,3; 0,4 и 0,4 %. Все три подфракции и в большей мере XXII — III многокомпонентны.

При элюции фракции XXII наблюдается сдвиг рН-граммы элюата по отношению к

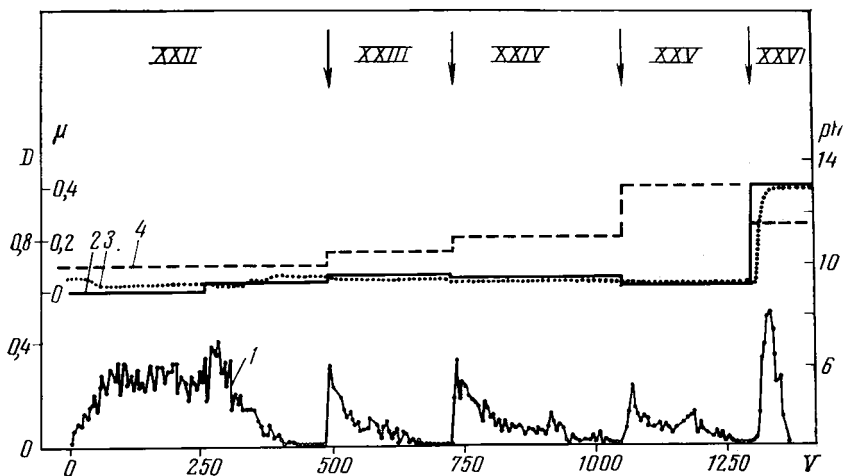


Рис. 3. Интерполяционная диаграмма хроматографии белковых веществ группы z.  
XXII—XXVI — фракции белковых веществ. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

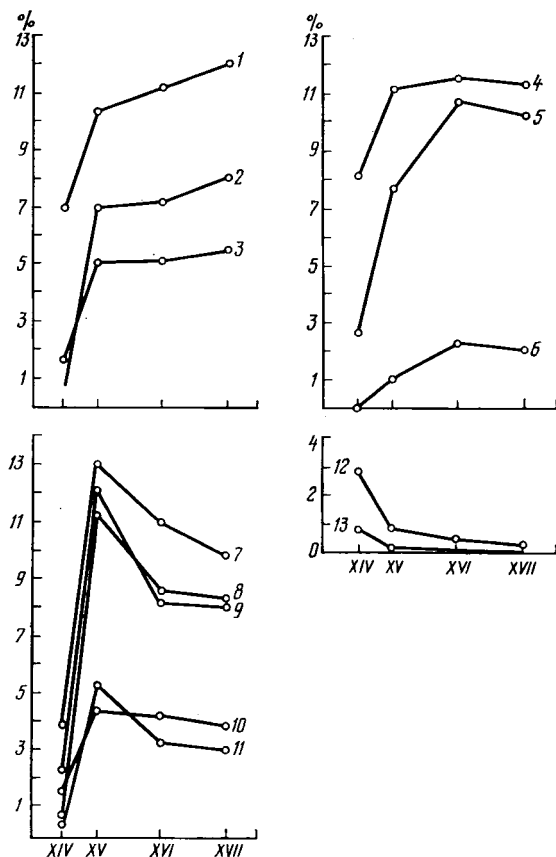


Рис. 4. Аминокислотный состав гидролизатов фракций XIV—XVII белков группы z (% от суммы аминокислот гидролизата).

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

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

Аминокислоты	Группа <i>v</i>	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI
Основные											
Лизин	6,9	7,5	5,6	58,5	0,0	6,3	7,1	8,1	2,2	8,2	0,0
Гистидин	2,1	2,1	1,0	7,0	10,4	11,1	12,0	0,0	Сл.	10,1	9,1
Аргинин	3,2	3,7	2,5	0,4	6,9	7,2	8,1	1,4	9,0	14,1	1,2
Сумма	12,2	13,3	9,1	65,9	17,3	24,6	27,2	9,5	11,2	32,3	9,8
Слабокислые											
Фенилаланин	2,0	1,4	2,9	0,0	0,9	2,2	2,0	3,9	2,6	2,5	5,4
Тирозин	2,1	2,9	2,1	2,8	0,9	0,5	0,3	0,3	0,0	2,0	1,6
Серин	9,3	10,3	6,1	2,3	11,2	8,5	7,4	8,8	13,9	10,1	13,1
Метнионин	0,9	0,4	1,9	0,9	0,0	Следы				0,3	0,6
Валин	7,1	3,8	9,6	0,7	12,1	8,1	8,0	9,1	7,4	6,3	5,7
Глицин	12,3	12,3	11,9	8,1	11,2	11,5	11,4	11,6	16,2	10,6	14,8
Лейцин	7,2	7,4	8,2	1,7	5,0	5,0	5,6	8,5	6,8	6,3	8,5
Изолейцин	3,6	3,3	3,9	0,3	5,2	3,2	3,0	3,5	3,1	2,0	2,9
Аланин	15,3	15,2	15,5	8,6	9,5	8,4	9,0	13,2	10,0	7,2	12,8
Треонин	5,1	5,4	4,7	1,4	4,3	4,2	3,9	4,2	8,8	5,3	3,6
Пролин	1,1	1,5	1,2	0,6	1,7	1,0	1,0	1,0	1,8	0,6	2,2
Сумма	66,0	64,6	69,1	27,4	62,0	52,6	51,6	68,7	70,5	53,3	71,1
Кислые											
Цистеин	Сл.	1,0	0,0	0,0	Следы				0,0	0,0	0,0
Глютаминовая	11,3	10,3	12,5	3,9	12,5	11,0	9,8	9,3	7,7	6,0	6,7
Аспарагиновая	10,5	10,9	9,5	2,8	7,8	11,8	11,3	12,4	10,5	8,3	11,8
Сумма	21,8	22,2	22,0	6,7	20,3	22,8	21,1	21,7	18,2	14,3	18,5

pH-грамме элюента в щелочную сторону. Элюция подфракций XXII—I и XXII—II также сопряжена со сдвигом pH элюента в щелочную сторону.

У белковых веществ фракции XXII S составляет 12. После рехроматографии на ТЭАЭЦ полученные три подфракции имели иные показатели S: у подфракции XXII—I — 0,0, XXII—II — 13 и подфракции XXII—III — 9,8. Поскольку фракция XXII при ультрацентрифугировании седиментировала с усредненным (приближенно) S по сравнению с S ее подфракции, это дает основание полагать, что между белками фракции образован ассоциативный комплекс. При хроматографии на ЦИ комплекс распался на несколько подфракций, различающихся по значениям S.

Основную массу белков группы *v* составляют аланин, глицин, серин, аспарагиновая и глютаминовая аминокислоты (табл. 1). У фракции XIV соотношение всех аминокислот в гидролизате иное, чем в гидролизате других фракций, что обусловлено необычайно высоким содержанием лизина. Следует отметить высокое количество аргинина во фракции XX и гистидина во фракциях XV, XVI, XVII и XX. В ряде гидролизатов находятся в небольших количествах или отсутствуют лизин, гистидин, аргинин, тирозин, метионин и цистеин. Мало изменяется содержание глицина. Общее содержание основных, слабокислых и кислых аминокислот во фракциях белков группы *v* (если не брать во внимание фракцию XIV) составляет соответственно 9—32, 52—71 и 14—23 %.

Для среднерастворимых белков, как и для легкорастворимых [2], характерна определенная закономерность в изменении по мере элюции аминокислотного состава от

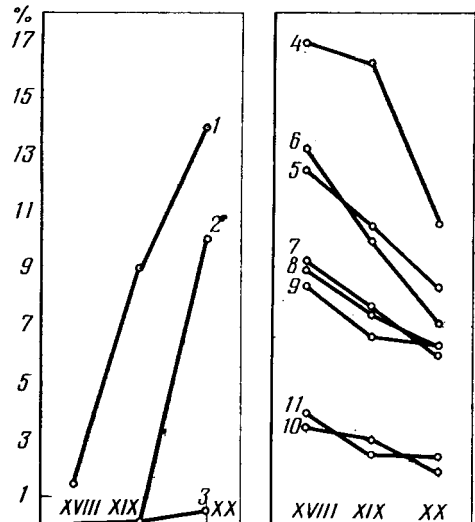


Рис. 5. Аминокислотный состав гидролизатов фракций XVIII—XX белков группы *v* (% от суммы аминокислот гидролизата).

1 — аргинин; 2 — гистидин; 3 — метионин; 4 — глицин; 5 — аспарагиновая кислота; 6 — аланин; 7 — глютаминовая кислота; 8 — валин; 9 — лейцин; 10 — изолейцин; 11 — фенилаланин.



Рис. 6. Содержание моноаминодикарбоновых (1) и диаминомонокарбоновых (2) аминокислот в гидролизатах фракций XIV—XVII белков группы *в* (% от суммы аминокислот гидролизата).

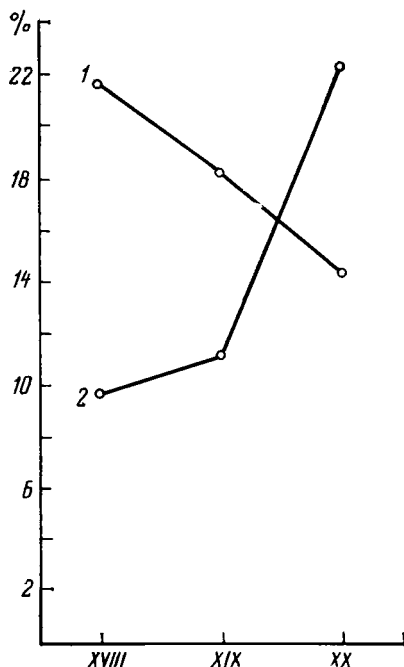


Рис. 7. Содержание моноаминодикарбоновых (1) и диаминомонокарбоновых (2) аминокислот в гидролизатах фракций XVIII—XX белков группы *в* (% от суммы аминокислот гидролизата).

фракции к фракции. Это выразилось в том, что по мере повышения концентрации NaCl в элюенте (0,05; 0,1; 0,2 и 0,3 M) в элюируемых фракциях (XIV, XV, XVI и XVII) возрастало содержание гистидина, аргинина и лейцина (рис. 4). От фракции XIV к фракции XV увеличилась, а затем уменьшилась доля глютаминовой кислоты, валина, серина, треонина и изолейцина, содержание тирозина и метионина снизилось. Количество глицина, аспарагиновой кислоты и фенилаланина от XIV к XV и XVI фракциям повышалось и в XVII несколько снижалось. В целом содержание 12 из 17 аминокислот гидролизата изменялось закономерно.

Отмечены также закономерные изменения аминокислотного состава гидролизата среднерастворимых белков при элюции нарастающими концентрациями  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,1; 0,2 и 0,3 M). Так, от фракции XVIII к XIX в гидролизате повышалось содержание аргинина, гистидина, метионина и снижалось количество глицина, аспарагиновой и глютаминовой кислот, аланина, валина, фенилаланина, лейцина и изолейцина (рис. 5). В этих же фракциях закономерно изменялось содержание моноаминодикарбоновых и диаминомонокарбоновых аминокислот (рис. 6 и 7).

Рехроматография фракций XII и XIII и определение аминокислотного состава подфракций показали, что последние в преде-

лах фракции различаются по аминокислотному составу (табл. 2). И если в гидролизате фракций XII и XIII обнаружены почти все аминокислоты, обычно встречающиеся в гидролизатах суммарных белков, то в гидролизатах тех или иных подфракций некоторые из них иногда отсутствуют или находятся на уровне следов. Некоторые подфракции отличаются относительно высоким содержанием отдельных аминокислот. Например, много цистеина содержится в подфракции XII—II, серина — в XII—IV, лизина, треонина и глютаминовой кислоты — в подфракции XIII—III. Заметны изменения ММ «усредненной» аминокислоты и расчетной изоэлектрической точки (ИЭТ). Во фракциях белков группы *в* они менялись от 104 до 133 и от 5,89 до 8,11 (табл. 3 и 4).

Аминокислотный состав белков группы *г* отличается от такового группы *в*. В среднерастворимых белках группы *г* в наибольшем количестве содержится аспарагиновая кислота и глицин, а также лейцин, аланин и глютаминовая кислота (табл. 5). Во всех фракциях этой группы обнаружены все определяемые в белках аминокислоты, за исключением цистеина. В целом во фракции XXIII по сравнению со всей группой количество лизина повышено, а фенилаланина, тирозина и треонина — понижено. Во фракции XXV повышено содержание аргинина и мало валина и изо-

Аминокислотный состав гидролизатов подфракций XII и XIII фракций белков группы *e* (% от суммы аминокислот)

Аминокислота	XII—I	XII—II	XII—III	XII—IV	XIII—I	XIII—II	XIII—III
Основные							
Лизин	7,3	9,9	12,8	0,0	0,2	11,2	25,0
Гистидин	2,0	3,9	Сл.	3,4	0,2	4,2	0,0
Аргинин	1,9	1,2	10,4	1,2	7,4	1,5	0,0
Сумма	10,1	15,1	32,2	4,6	7,9	16,9	25,0
Слабокислые							
Фенилаланин	2,2	3,3	0,0	4,1	2,8	3,4	2,2
Тирозин	1,8	2,7	0,0	2,7	2,5	1,4	2,2
Серин	7,2	9,3	8,6	16,3	6,9	7,7	2,5
Метионин	0,0	1,5	Сл.	Сл.	4,5	Сл.	0,0
Валин	9,3	0,8	»	5,3	8,3	11,9	7,5
Глицин	16,1	9,4	12,3	11,4	13,2	8,8	9,5
Лейцин	6,6	7,8	6,0	9,2	13,9	7,0	4,8
Изолейцин	3,6	2,4	2,5	4,5	0,1	3,7	5,2
Аланин	18,9	18,2	13,4	10,2	16,1	7,4	5,8
Треонин	5,2	2,7	9,0	4,8	Сл.	8,8	10,7
Пролин	1,5	1,1	1,2	2,2	2,4	0,8	0,6
Сумма	74,3	60,1	53,0	70,6	72,9	60,8	51,1
Кислые							
Цистеин	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Глютаминовая	7,3	13,8	7,5	12,7	9,0	12,5	20,2
Аспарагиновая	8,3	10,9	12,3	12,0	10,1	9,8	3,8
Сумма	15,6	24,7	23,7	24,7	19,1	22,3	24,0

Таблица 3

Биологическая характеристика фракции X и подфракций белков группы *e*

Показатель	Группа <i>e</i>	XII	XII—I	XII—II	XII—III	XII—IV
Сумма незаменимых аминокислот, %	32,9	29,2	34,1	28,4	30,3	28,9
БЦ, %*	59,7	48,5	44,1	47,6	23,5	33,4
ММ «усредненной» аминокислоты	123	122	118	122	125	115
Расчетная ИЭТ	5,69	6,02	6,14	5,98	6,25	5,67

\* БЦ — биологическая ценность.

Таблица 4

Биологическая характеристика фракций XIII—XXI белков группы *e*

Фракции и подфракции	Сумма незаменимых аминокислот, %	БЦ, %	ММ «усредненной» аминокислоты	Расчетная ИЭТ	Фракции	Сумма незаменимых аминокислот, %	БЦ, %	ММ «усредненной» аминокислоты	Расчетная ИЭТ
XIII	36,9	68,8	125	5,89	XVI	28,9	41,3	116	6,33
XIII—I	29,9	23,6	123	5,85	XVII	29,6	47,1	120	6,46
XIII—II	46,1	48,5	132	6,14	XVIII	37,3	50,7	124	5,92
XIII—III	55,5	51,0	133	6,31	XIX	30,8	38,1	108	6,08
XIV	53,5	29,2	137	8,11	XX	31,0	50,5	134	6,84
XV	27,5	21,8	104	6,18	XXI	26,6	41,5	122	6,00

Аминокислотный состав гидролизатов фракций белков группы  $\varepsilon$   
(% от суммы аминокислот)

Аминокислота	Группа $\varepsilon$	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI
Основные						
Лизин	4,9	2,9	18,5	4,5	5,9	12,5
Гистидин	4,1	3,5	6,2	1,2	6,0	1,5
Аргинин	1,2	1,2	0,2	1,6	4,3	1,9
Сумма	10,2	7,6	24,9	7,3	16,2	15,9
Слабокислые						
Фенилаланин	2,9	3,3	0,1	3,9	3,6	4,6
Тирозин	1,2	1,9	0,2	1,1	0,7	2,0
Серин	7,5	7,6	7,4	8,2	10,4	6,4
Метионин	0,7	1,6	0,2	0,5	0,6	0,2
Валин	9,9	10,3	8,8	7,7	3,2	6,0
Глицин	12,7	12,7	13,0	13,7	17,4	6,9
Лейцин	10,4	9,5	11,6	10,0	4,9	7,2
Изолейцин	4,0	4,3	3,6	4,3	3,9	3,8
Аланин	11,3	9,4	10,8	14,2	13,2	7,2
Треонин	5,2	6,2	1,7	3,5	5,2	2,8
Пролин	0,5	0,5	0,2	0,8	2,3	4,8
Сумма	66,6	67,4	57,7	68,1	67,2	51,8
Кислые						
Цистеин	Сл.	0,3	Сл.	0,0	0,0	0,0
Глютаминовая	10,9	11,1	8,7	12,3	7,0	26,8
Аспарагиновая	12,3	13,6	8,9	12,5	9,6	5,4
Сумма	23,2	25,0	17,6	24,8	16,6	32,2

лейцина. Во фракции XXVI содержится повышенное количество глютаминовой кислоты и пролина, а доля треонина и аспарагиновой кислоты понижена. Общее содержание основных, слабокислых и кислых аминокислот составляет соответственно 7—25, 52—68 и 17—32 %, а ММ «усредненной» аминокислоты и расчетная ИЭТ колеблется в пределах 109—127 и 5,74—6,49 (табл. 6).

Рехроматография фракции XXII и определение аминокислотного состава подфракций показали большие различия в их аминокислотном составе (табл. 7). Лишь содержание фенилаланина, валина и аланина относительно стабильно. Общее содержание основных, слабокислых и кислых

групп аминокислот колеблется в пределах соответственно 4—10, 63—74 и 16—31 %, а ММ «усредненной» аминокислоты — 121—127.

БЦ и общее содержание незаменимых аминокислот во фракциях белков групп  $\varepsilon$  и  $\zeta$  меняются в столь же широких пределах, как и соотношение между аминокислотами. Во фракции XIV содержание незаменимых аминокислот составляет 53,5 %, а их БЦ — лишь 29,2 %, во фракции XX — соответственно 31,0 и 50,5 %, фракции XXII — 38,1 и 68,1 %. БЦ и общее содержание незаменимых аминокислот в подфракциях белков иное, чем во фракциях белков (табл. 4 и 6).

Таблица 6

Биологическая характеристика фракций и подфракций белков группы  $\varepsilon$ 

Показатель	Группа $\alpha$									
	XXII	XXII-I	XXII-II	XXII-III	XXII-IV	XXIV	XXV	XXVI		
Сумма незаменимых аминокислот, %	37,9	38,1	38,2	35,6	46,6	44,5	34,2	27,4	37,0	
БЦ, %	60,1	68,1	38,7	53,1	85,2	44,6	70,8	55,5	55,4	
ММ «усредненной» аминокислоты	127	127	127	125	121	127	119	121	109	
Расчетная ИЭТ	5,43	5,74	5,68	5,45	6,14	6,49	5,76	6,29	5,75	



**Т а б л и ц а 7**  
**Аминокислотный состав гидролизатов**  
**подфракций XXII фракций белков группы *z***  
**(% от суммы аминокислот)**

Аминокислота	I	II	III
	XXII	XXII	XXII-III
<b>Основные</b>			
Лизин	0,0	1,5	7,3
Гистидин	8,2	1,3	0,9
Аргинин	0,0	1,4	2,1
Сумма	8,2	4,2	10,2
<b>Слабокислые</b>			
Фенилаланин	3,1	4,6	2,3
Тирозин	Сл.	2,3	3,5
Серин	5,5	4,5	12,8
Метионин	1,0	0,4	3,5
Валин	13,0	7,7	10,1
Глицин	18,7	11,5	7,8
Лейцин	7,0	7,9	13,7
Изолейцин	2,8	4,5	5,6
Аланин	6,6	11,7	10,0
Треонин	5,4	9,3	4,2
Пролин	Сл.	0,7	0,7
Сумма	62,9	65,2	74,2
<b>Кислые</b>			
Цистеин	Сл.	0,0	0,9
Глутаминовая	16,9	6,5	9,8
Аспарагиновая	11,9	24,0	4,9
Сумма	28,8	30,5	15,6

**Труднорастворимые белки**

При ступенчатой хроматографии на ГЭЦ белки группы *d* были разделены на 4

фракции: XXVII, XXVIII, XXIX и XXX (рис. 8). Фракцию XXVII составляют белки, свободно фильтрующиеся через колонку. Следующие две фракции, количество которых небольшое, элюировали ступенчатым наращиванием  $\mu$  элюента — 0,1 М и 0,3 М растворами NaCl. XXX фракцию смывали с колонки путем повышения pH элюента (0,25 раствором NaOH). Соотношение между этими фракциями 78,4:5,7:3,9:12,0. Доля их в общей сумме белков зерна невелика — 2,0; 0,1; 0,1 и 0,3%. Судя по хроматографическому профилю все фракции и особенно XXVII гетерогенные. Фракцию XXVII графически даже можно расчленить на подфракции.

При фильтрации фракции XXVII через колонку наблюдается сдвиг pH-граммы элюата по отношению к pH-грамме элюента в сторону менее щелочного значения. Иными словами, в момент, когда белки фильтруются через анионит и с ЦИ взаимодействуют те белки, которые задерживаются на колонке, концентрация водородных ионов в элюате относительно элюента ниже. При элюции остальных фракций этой группы белков (XXVIII, XXIX, XXX) pH-грамма элюата почти аналогична pH-грамме элюента.

Из 4 фракций белковых веществ ультрацентрифугирована лишь фракция XXX. Ее  $S_0$ , определенная в двухсекторной капиллярной ячейке методом перелива, оказалась равной 2,7 единицы Сведберга. При рассмотрении кривых седиментации складывается мнение, что в этой фракции белков присутствуют компоненты со значительно большей ММ, чем средняя ММ белков всей фракции, седиментирующая со скоростью 2,7 S.

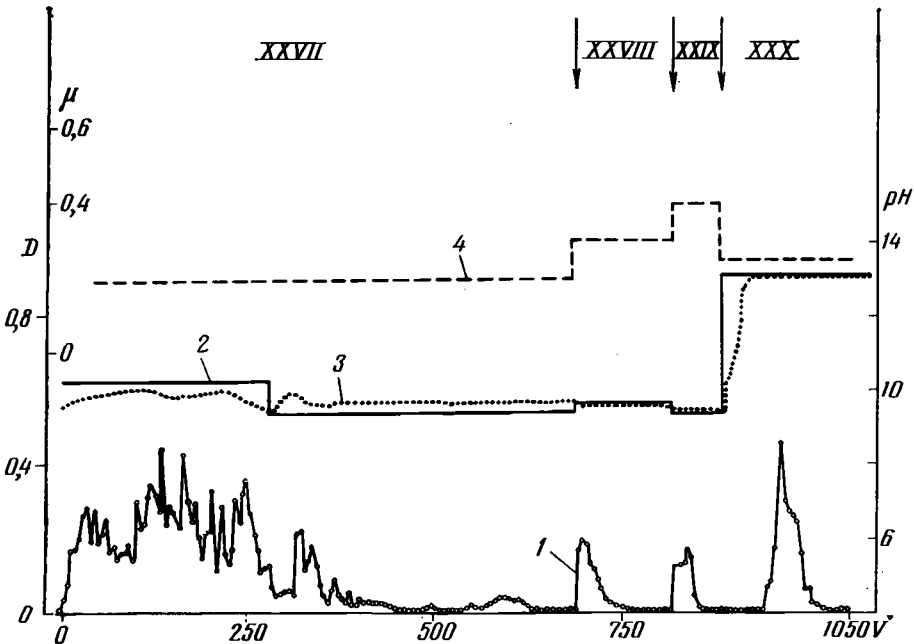


Рис. 8. Интерполяционная диаграмма хроматографии белковых веществ группы *d*. XXVII—XXX — фракции белковых веществ. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

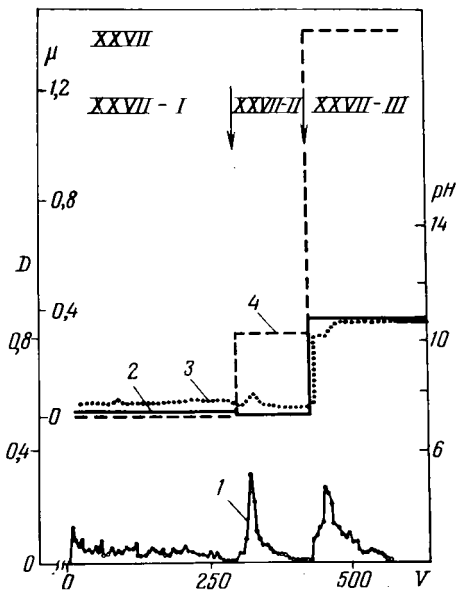


Рис. 9. Интерполяционная диаграмма хроматографии фракции XXVII белковых веществ группы  $\delta$ .

Обозначения те же, что на рис. 1 и 2.

Фракцию XXVII белков группы  $\delta$ , свободно фильтрующуюся через колонку ГЭЦ, рехроматографировали на ТЭАЭЦ. При рехроматографии она была разделена на 3 дополнительные подфракции: XXVII—I;

XXVII — II и XXVII — III (рис. 9). Соотношение между ними 35,1 : 23,3 : 41,5, в общей сумме белков зерна оно составляет 0,7; 0,4 и 0,8 %. Подфракция XXVII—I — это белки группы  $\delta$ , свободно фильтрующиеся не только через колонку ГЭЦ, но и ТЭАЭЦ. Подфракцию XXVII — II элюировали путем повышения  $\mu$  элюента (0,3 M раствор NaCl), а подфракцию XXVII — III — путем повышения  $\mu$  и pH (0,5 M NaCl + 0,3 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). При элюции подфракций XXVII—I и XXVII—II pH-грамма элюата сдвигалась в щелочную сторону по отношению к pH-грамме элюента. Элюция этих подфракций сопряжена с увеличением концентрации водородных ионов в элюате. Полученные подфракции, по крайней мере XXVII—I и XXVII—III, гетерогенны. В результате ультрацентрифугирования подфракций определены следующие значения S: 1,1; 21 и 7,9.

При хроматографии на ГЭЦ белки группы  $\epsilon$  были разделены на 5 фракций: XXXI, XXXII, XXXIII, XXXIV и XXXV (рис. 10). Фракцию XXXI составили белки группы  $\epsilon$ , свободно фильтрующиеся через колонку ГЭЦ. Фракцию XXXII элюировали повышением элюента (0,3 M раствор NaCl), XXXIII — повышением pH и  $\mu$  элюента (0,3 M раствор NaCl + 0,3 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), XXXIV — повышением pH элюента (0,25 M раствором NaOH). После смыва с колонки ЦИ фракции XXXIV продолжал крайне медленно вытекать слегка апплицирующий раствор. Для того чтобы собрать эту фракцию, скорость элюции уменьшили в 10 раз (до 3 мл в 1 ч на 1 см<sup>2</sup> сечения колонки). В результате

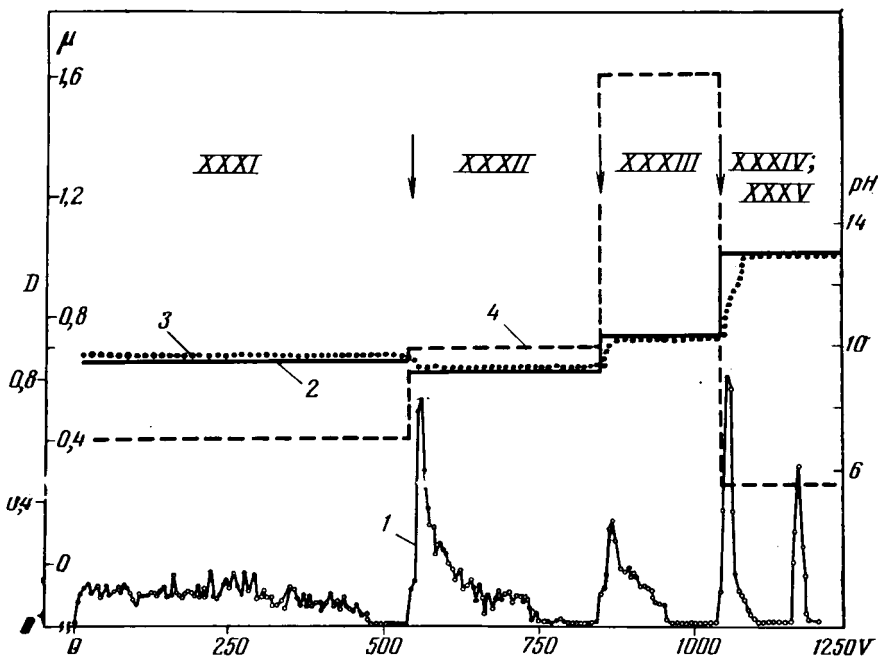


Рис. 10. Интерполяционная диаграмма хроматографии белковых веществ группы  $\epsilon$ .

XXXI—XXXV — фракции белковых веществ. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Таблица 8

Аминокислотный состав гидролизатов фракции XXVII и подфракций белков группы *g* (% от суммы аминокислот)

Аминокислота	Группа <i>g</i>	XXVII	XXVII—I	XXVII—II	XXVII—III
Основные					
Лизин	7,7	9,5	9,4	Сл.	0,0
Гистидин	0,7	1,7	1,7	0,0	Сл.
Аргинин	0,6	1,7	1,6	Сл.	»
Сумма	9,0	12,9	12,7	»	»
Слабокислые					
Фенилаланин	1,6	2,6	2,6	Сл.	Сл.
Тирозин	1,3	1,7	1,4	»	»
Серин	7,5	7,1	5,3	18,0	8,5
Метионин	0,9	1,0	0,3	15,0	Сл.
Валин	9,3	8,0	4,9	Сл.	13,0
Глицин	10,1	10,9	12,5	Сл.	9,6
Лейцин	12,5	7,3	7,1	«	17,0
Изолейцин	10,3	7,3	3,4	Сл.	12,8
Аланин	11,9	9,9	17,3	4,6	9,7
Треонин	3,9	4,8	3,2	11,6	Сл.
Пролин	0,6	0,6	0,6	0,0	»
Сумма	65,9	61,2	58,5	49,3	80,4
Кислые					
Цистеин	Сл.	Сл.	0,0	Сл.	Сл.
Глютаминовая	10,1	10,0	15,7	5,3	8,2
Аспарагиновая	14,9	15,9	13,1	45,0	11,2
Сумма	25,0	25,9	28,8	50,3	19,4

идентифицирована фракция белков, медленно элюирующаяся с колонки ГЭЦ. Соотношение между фракциями белков группы *e* согласно очередности элюирования 35,7:31,2:14,3:12,4:6,4. Доля их в общей сумме белков зерна также очень мала — 0,7; 0,6; 0,3; 0,3; 0,1%. При элюции всех 5 фракций белков группы *e* рН-грамма элюата отличалась от рН-граммы элюента весьма незначительно. По хроматографическому профилю фракции XXXI, XXXII и XXXIII гетерогенны. Фракция XXXV элюировалась как гомогенные белки. Можно полагать, что это гомогенный белок.

Ультрацентрифугирование белковых веществ этих фракций показало, что фракции XXXI и XXXII при ускорении в ультрацентрифуге не седиментируют, но и не флотируют ( $S=0,0$ ). Белковые вещества фракции XXXIII седиментируют при  $S=4,4$ , а XXXIV флотируют при  $S_{\phi}=29$ . Наконец, фракция белков, которая очень медленно элюировалась с колонки ГЭЦ, имела высокую  $S=34$ . Кривые седиментации и диффузии этой фракции белков, равно как и XXXIV, косвенно указывают на их гомогенность.

В гидролизатах белков группы *g* по сравнению с другими группами содержание аспарагиновой кислоты высокое, а гистидина и аргинина — низкое. В большом количестве содержатся глицин, лейцин, изолейцин и glutаминовая кислота (табл. 8). Подфракции фракции XXVII по аминокислотному составу весьма различны. Особого внимания заслуживают гидролизаты подфракций XXVII—II и XXVII—III. Первый из них состоит главным образом из 6 аминокислот, причем на долю аспарагиновой кислоты приходится 45% массы этого белка. Очевидно, это какие-то остатки белковых молекул, трудноизвлекаемые из растительной ткани. Содержание 9 аминокислот находится на уровне следов, а 3 вообще не обнаружены. Гидролизат подфракции XXVII—III состоит из 8 аминокислот, остальные аминокислоты находятся на уровне следов. Для этих белков характерно особо высокое содержание лейцина.

Особенностью белков группы *e* является высокое содержание аланина, а также лизина, глицина и glutаминовой кислоты (табл. 9). Во фракции XXXV белков группы *e* доля аланина еще больше, чем в группе в целом. В этой фракции повышено содержание лизина.

Неполный набор аминокислот в гидролизатах подфракций труднорастворимых белков, очевидно, можно объяснить тем, что при их экстрагировании из-за сильной ще-

Таблица 9

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

Аминокислота	Группа <i>e</i>	XXXIV	XXXV
Основные			
Лизин	10,4	8,5	18,9
Гистидин	1,7	1,6	1,7
Аргинин	1,4	1,7	0,3
Сумма	13,5	11,8	20,9
Слабокислые			
Фенилаланин	4,3	4,5	3,7
Тирозин	1,7	1,7	1,1
Серин	7,1	6,3	8,6
Метионин	0,6	0,6	0,5
Валин	7,3	7,7	6,5
Глицин	10,0	8,4	13,7
Лейцин	7,4	9,9	2,6
Изолейцин	4,8	5,0	3,9
Аланин	16,1	14,9	19,6
Треонин	4,9	5,0	2,5
Пролин	1,3	1,8	Сл.
Сумма	66,5	66,8	62,7
Кислые			
Цистеин	0,0	0,0	0,0
Глютаминовая	12,4	12,9	10,8
Аспарагиновая	7,6	8,5	5,5
Сумма	20,0	21,4	16,3

**Биологическая характеристика фракций и подфракций  
труднорастворимых белков зерна ржи**

Показатель	Группа <i>д</i>					Группа <i>е</i>		
	всего	фракция XXVII			всего	фракция		
		всего	XXVII — I	XXVII — II		XXVII — III	XXXIV	XXXV
Сумма незаменимых аминокислот, %	44,3	40,6	30,7	26,6	52,8	39,7	41,3	38,7
БЦ, %	37,5	69,0	50,1	22,3	26,9	66,9	69,3	51,1
ММ «усредненной» аминокислоты	127	128	127	127	128	127	127	127
Расчетная ИЭТ	5,48	5,88	5,77	4,65	5,69	5,79	5,99	6,45

лочки экстрагентов они расщепляются до пептидов. Эти белки входят в состав тканей и, очевидно, при экстрагировании происходит их фрагментирование.

ММ «усредненной» аминокислоты и расчетная ИЭТ групп, фракций и подфракций труднорастворимых белков соответственно находятся на уровне 127—128 и 4,65—6,45 (табл. 10). В отличие от ММ «усредненной» аминокислоты общее содержание незаменимых аминокислот и БЦ групп, фракций и подфракций меняются существенно. Наибольшей ценностью обладают белки фракций XXVII и XXXIV. БЦ белков группы *е* выше, чем группы *д*.

Таким образом, аминокислотный состав фракций и подфракций труднорастворимых белков зерна ржи весьма различен. По седиментационным показателям и БЦ труднорастворимые белки существенно отличаются от легко- и среднерастворимых, но ММ «усредненной» аминокислоты у них довольно постоянная.

После экстрагирования белков группы *е* в зерне ржи еще оставалось небольшое количество неэкстрактивных белков — фракция XXXVI. Ввиду очень малого количества этих белков попытки их экстракции и дальнейшего изучения не предпринимались.

### Заключение

Хроматографией и рехроматографией на целлюлозоонитах среднерастворимые белки зерна ржи разделены на 15 фракций и 10 подфракций, а труднорастворимые — на 9 фракций и 3 подфракции.

Среднерастворимые белки зерна состоят из компонентов, сильно различающихся между собой как по аминокислотному составу и седиментационным показателям, так и по БЦ.

Труднорастворимые белки зерна ржи имеют неполный набор протеиногенных аминокислот.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Крищенко В. П. О разделении белкового комплекса зерна ржи на фракции с близкими физико-химическими свойствами. — Изв. ТСХА, 1968, вып. 6, с. 223—229.
2. Крищенко В. П., Плешков Б. П. Фракционный и аминокислотный состав легко- и среднерастворимых белков зерна ржи. — Изв. ТСХА, 1980, вып. 5, с. 91—100.

*Статья поступила 9 октября 1980 г.*

### SUMMARY

Middle-soluble proteins of rye grain were divided into 15 fractions and 10 subfractions by means of chromatography on TEAECA and GEC and rechromatography on CMC and TEAEC. Most fractions and subfractions are heterogenous to a considerable extent. Middle-soluble grain proteins consist of the components differing both in amino-acid composition and in biological value.

Those proteins which after preliminary extraction of readily- and middle-soluble proteins are extracted by carbonated and borated buffers are considered to be almost insoluble. These proteins differ greatly in chromatographic profile and amino acid composition. They differ greatly from readily- and middle-soluble proteins in sedimentative characteristics and in biological value.