

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

В. М. КОЛЕСОВ

(Представлена проф. докт. хим. наук Л. П. Кулевым)

Одной из наиболее актуальных задач современной органической химии является раскрытие внутренней структуры белковых веществ. В связи с огромными размерами молекул протеинов применение чисто химических методов исследования для установления структуры последних становится явно недостаточным. Совершенно необходимым является привлечение для этой цели помимо биохимических и химических методов также физических и физико-химических методов исследования, начинающих приобретать в современной химии исключительно важное значение.

Белки растительного происхождения, в частности белки зерновых культур, продолжают оставаться до сего времени еще слабо изученными в отношении их физико-химических свойств, и какая-либо общая точка зрения в этом направлении совершенно отсутствует. В наших исследованиях [1] было показано, что по показателям физико-химической характеристики (относительной вязкости, поверхностного натяжения, изоэлектрической точки, удельного вращения, связывания водородных ионов и по количеству общего азота и аминного азота) у вышеисследованных белковых препаратов наблюдается тенденция к сближению между собой. Это обстоятельство дает основание высказать предположение о присутствии по всей вероятности единой пространственной конфигурации, лежащей в основе строения упомянутых выше белков.

Дальнейшим развитием этих исследований явилась необходимость подвергнуть наши белковые препараты электрофоретическому разделению и изучению с точки зрения их аминокислотного состава.

Изучение аминокислотного состава в проламинах и глюteniнах может явиться основанием для дальнейшего исследования в области структуры этих белков, главным образом при определении количества пептидных цепей с последующим установлением природы N- и C-аминокислотных остатков в молекулах этих протеинов.

Материал и методика

Объектом исследования служили нижеследующие препараты белковых веществ: глиадин ржи, глиадин пшеницы, гордеин ячменя, авенин овса и пыреин пырея. Белковые препараты группы проламинов были

получены методом Т. Осборна [2], видоизмененным А. Кизелем [3]. Для экстрагирования пырея была использована методика, описанная В. Л. Кретовичем [4]. Отмывание клейковины производилось способом П. Н. Шibaева [5]. Гордеин ячменя экстрагировался из клейковины последнего.

Аминокислотный состав проламинов зерновых культур, несмотря на длительный период изучения химического состава их, исследован до настоящего времени еще недостаточно полно. В списках аминокислот, характеризующих состав глинадины пшеницы, в монографии Р. Блока и Д. Болинга [6] отсутствуют фенилаланин, серин и валин. По своему химическому составу зерно ячменя и овса приближается к зерну пшеницы и ржи. Однако данные, характеризующие аминокислотный состав этих злаков, весьма ограничены. В таблицах аминокислотного состава белков, приведенных в учебном руководстве Н. П. Козьминой и В. Л. Кретовича [7], отсутствуют данные о наличии в глиадине пшеницы, гордеине и авенине таких важных аминокислот, как гликоколь, треонин, серин и метионин. Согласно исследованиям Т. Осборна и С. Клэппа [8, 9], в глиадине ржи не было установлено присутствие валина, треонина, метионина и в глютеине пшеницы—треонина и метионина. Однако данные, относящиеся к этому периоду исследования белков, значительным образом устарели. В связи с работами Н. В. Цицина [10] по проблемам пырейно-пшеничных гибридов и нахождением некоторыми исследователями [16, 17] клейковины в семенах пырея, не уступающей по своим хлебопекарным качествам клейковине пшеницы, возник интерес к изучению аминокислотного состава пырея спирторастворимой фракции белков семян пырея. В. Л. Кретович [4] сообщает лишь о содержании двух аминокислот—гистидина и аргинина, присутствующих в пыреине. В связи с вышеизложенным и было предпринято исследование аминокислотного состава упомянутых выше белков при помощи двухмерной распределительной хроматографии на бумаге [11, 12]. Наличие в испытуемых белках триптофана было подтверждено в отдельной пробе по Фюрту [13].

Результаты

Результаты определения аминокислотного состава приведены в табл. 1. На основании многократно полученных хроматограмм можно было установить присутствие 15 пятен и идентифицировать по показателям R_f свидетелей 15 различных аминокислот (рис. 1).

Анализируя результаты определения аминокислотного состава изучаемых протеинов, необходимо отметить, что по количественному содержанию многих аминокислот представляется возможным белковые препараты разделить приблизительно на три подгруппы. К первой подгруппе можно отнести глиадины ржи и пшеницы и пыреин пырея. Гидролизаты глиадины ржи и пшеницы заключают в себе одни и те же аминокислоты, однако в ином количественном соотношении. Различие между ними наблюдается по величине гликоколя, аланина, серина, пролина и триптофана. По количественному содержанию большинства аминокислот пыреин пырея приближается к глиадину ржи.

Вторую подгруппу представляют собой авенин и гордеин. При сравнении количественного содержания некоторых аминокислот, присутствующих в образцах авенина и гордеина, с содержанием этих аминокислот в родственных им проламинах пшеницы, ржи и пырея, обращает на себя внимание повышенное против глиадинов и пыреина содержание глютаминовой кислоты, вдвое превышающее содержание фенилаланина, и несколько пониженное содержание треонина, аланина и валина. Ха-

рактальной особенностью этой подгруппы является почти равное количество присутствующих в обоих белках лейцина, глутаминовой кислоты, фенилаланина, гликоколя, треонина и довольно близкое содержание других аминокислот, за исключением лизина, серина, пролина и отсутствия в авенине триптофана.

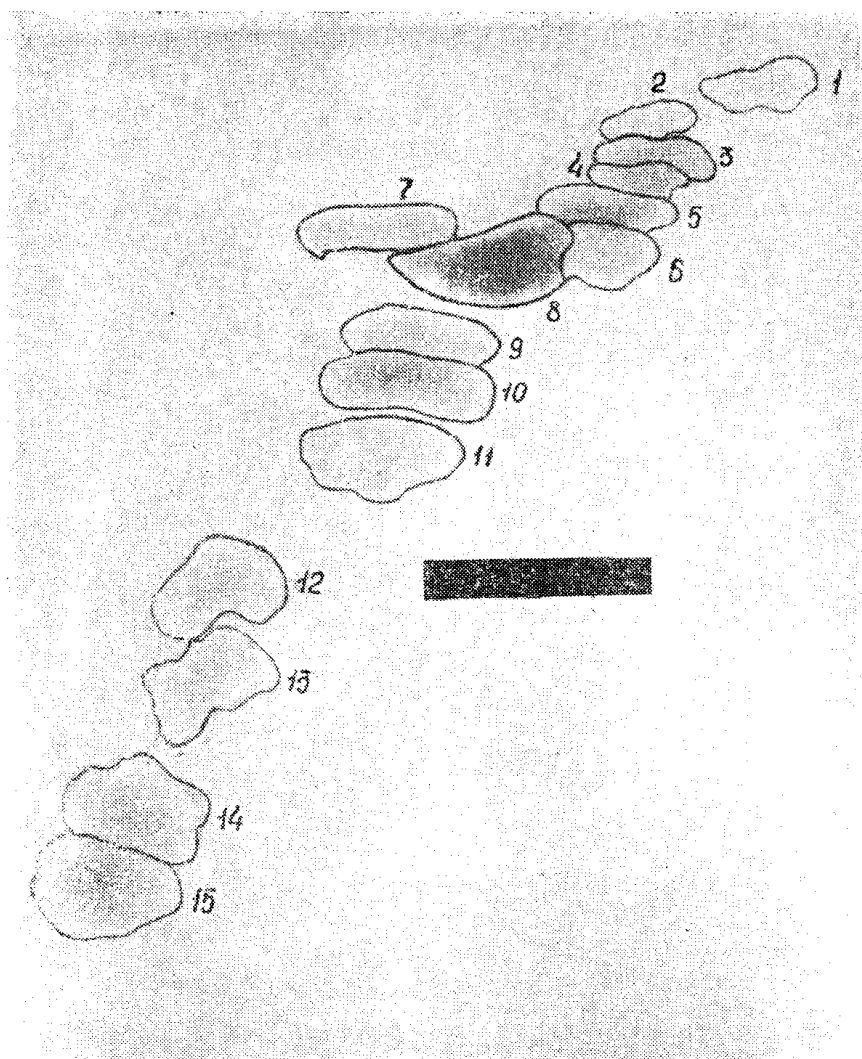


Рис. 1. Хроматограмма гидролизата глютенина ржи. Справа налево: пиридин — уксусная кислота; сверху вниз: бутанол — уксусная кислота: 1 — цистин, 2 — лизин, 3 — гистидин, 4 — аргинин, 5 — аспарагиновая кислота, 6 — гликоколь, 7 — серин, 8 — глутаминовая кислота, 9 — треонин, 10 — аланин, 11 — пролин, 12 — тирозин, 13 — валин (метионин), 14 — фенилаланин, 15 — лейцин.

К третьей подгруппе могут быть отнесены глютенин ржи и глютеин пшеницы. Из данных определения аминокислотного состава глютеинов ржи и пшеницы следует, что, как и рассмотренные выше проламины, они заключают в себе те же аминокислоты, но несколько отличаются от них по количественному соотношению последних. Обращает на себя внимание большое сходство по величине содержания в обоих глютеинах валина, лейцина, глутаминовой кислоты и триптофана. По содержанию других аминокислот наблюдается значительное различие.

В связи с одинаковым значением R_f валина и метионина и легкой окисляемостью последнего в процессе гидролиза в 20%-ной HCl наличие метионина не могло быть констатировано с достоверностью.

Электрофоретическое разделение белковых препаратов проводилось на микроаппарате Тизелиуса. Белки растворялись в 0,1 н. уксусной кислоте с рН 2,85 и ионной силой 0,1. Однопроцентные растворы белковых препаратов подвергались диализу против раствора 0,1 н. уксусной кислоты, а затем электрофоретическому анализу.

Электрофорез проводился в течение 1—3,5 час. при сопротивлении 45000—125000 ом, напряжении 250—350 в, силе тока 0,4—2,4 ма.

Таблица 1

Аминокислотный состав белковых препаратов

№ п.п.	Аминокислоты	Глиадин пшеницы	Глиадин ржи	Пыреин	Гордеин	Авенин	Глютелин пшеницы	Глютелин ржи
1	Гистидин	1,05	1,29	1,20	1,35	2,15	2,38	3,63
2	Аргинин	2,82	2,52	3,18	3,60	2,30	2,48	3,84
3	Лизин	1,15	1,10	0,75	1,16	0,52	1,73	3,12
4	Гликоколь	4,43	1,08	2,64	1,45	1,57	4,27	2,95
5	Аланин	3,25	2,98	2,94	1,32	2,05	2,88	3,57
6	Валин (метионин)	4,15	4,55	9,84	2,55	3,65	3,18	2,70
7	Лейцин	6,25	6,15	7,27	7,14	7,05	3,10	2,76
8	Глютаминовая кислота	44,30	43,20	36,72	49,46	50,58	23,12	24,34
9	Серин	2,06	5,40	5,77	4,85	8,10	6,52	4,87
10	Треонин	5,10	5,20	2,76	3,15	2,53	1,24	3,57
11	Пролин	12,60	8,10	9,87	9,36	7,14	7,03	11,72
12	Фенилаланин	3,55	3,15	3,00	6,26	6,52	7,74	2,82
13	Триптофан	0,86	0,47	—	1,85	—	1,35	1,36
14	Гуминовые вещества	4,75	4,40	2,00	2,20	3,50	2,75	4,60
	Всего	96,32	89,49	87,94	95,70	97,76	69,77	75,91

Было показано, что глиадин пшеницы № 1, глиадин пшеницы № 2, глиадин ржи № 2, пыреин и гордеин состоят из четырех фракций; глиадин ржи № 1, глиадин ржи № 3, гордеин № 2 и авенин — из трех фракций (рис. 2). Аналогичные результаты для глиадина пшеницы были получены Е. И. Медведевой [14] и Милсом [15] при электрофорезе на бумаге и на аппарате Тизелиуса-Свенсона.

Выводы

Методом распределительной хроматографии на бумаге в исследованных белках были найдены аминокислотные остатки гликокола, аланина, лейцина, лизина, гистидина, аргинина, глютаминовой кислоты, цистина, пролина, тирозина, треонина, серина, фенилаланина, валина, аспарагиновой кислоты.

Кроме известных по литературным данным структурных элементов глиадина в гидролизате глиадина ржи, впервые обнаружены валин

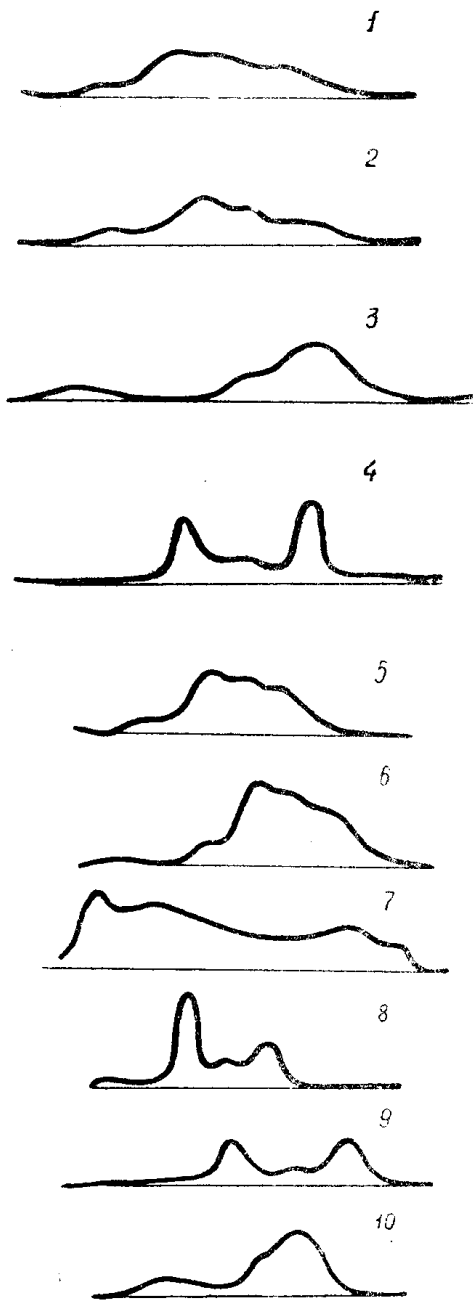


Рис. 2. Электрофореграммы белковых препаратов.
 1 — глиадин ржи № 2; 2 — глиадин пшеницы № 1; 3 — глиадин ржи № 3; 4 — гордеин № 2; 5 — глиадин пшеницы № 2; 6 — глиадин ржи № 2; 7 — пыреин; 8 — гордеин № 1; 9 — авенин; 10 — глиадин ржи № 1.

(+метионин), треонин, цистин и лизин. Впервые также был установлен методом распределительной хроматографии на бумаге аминокислотный состав пырея, констатировано наличие и определено количественное содержание в авенине треонина и серина и в глютенине пшеницы и глютенине ржи — триптофана.

На основании количественного определения многих аминокислот можно сделать вывод о близости химической природы глиадина, пшеницы, ржи пырея, гордеина и авенина.

Классическим методом электрофореза на аппарате Тизелнуса показано, что препараты проламинов, являясь неоднородными, состоят из четырех фракций (глиадины пшеницы № 1 и № 2, глиадин ржи № 2, гордеин № 1, пыреин), а некоторые из них (глиадины ржи № 1 и № 3, авенин, гордеин № 2) — из трех фракций, что также позволяет говорить о близкой химической природе исследованных белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. М. Колесов. Физико-химические свойства белков растительного происхождения. Тр. ТГУ, 145, 83, 1957.
2. T. B. Osborne. The proteins of the wheat kernel — Carnegie Institution of Washington Publ, № 84, 1907.
3. А. Р. Кизель. Практическое руководство по биохимии растений. М., Биомедгиз, 1934.
4. В. Л. Кретович. О химическом составе семян пырея. Докл. ВАСХНИЛ, 6, 313, 1937.
5. П. Н. Шибяев. Клейковина ячменя. М. Полиграфкнига. 1945.
6. Р. Блок и Д. Боллинг. Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов, М., ИЛ, 1949.
7. Н. П. Козьмина, В. Л. Кретович. Химия зерна и продуктов его переработки. М., Заготиздат, 1951.
8. T. Osborne, S. Clapp. Amer. J. Physiol, 20, 4, 494, 1907—08.
9. T. Osborne, S. Clapp. Amer. J. Physiol., 17, 231, 1906.
10. Н. В. Цицин. Краткие итоги работы отдела селекции Сибирского института зернового хозяйства. Селекция и семеноводство, 9, 5, 1936.
11. В. М. Колесов. Об аминокислотном составе пырея. Биохимия, 22, № 3, 445, 1957.
12. В. М. Колесов, М. С. Резниченко. Об аминокислотном составе гордеина ячменя и авенина овса. Биохимия, 21, № 6, 643, 1956.
13. O. Fürth, Z. Diesche. Kritisches und Experimentelles über die Tryptophanbestimmung in Protein. — Biochem. Zeitschr. 146, 275, 1924.
14. Е. И. Медведева. О методе выделения глиадина. Известия высших учебных заведений Министерства высшего образования СССР, № 4, 133, 1958.
15. D. L. Mills. Some observations on the electrophoresis of gliadin. Biochim, et biophys. acta, 14, № 2, 274, 1954.
16. М. М. Самсонов. Качество зерна пшенично-пырейных гибридов. Селекция и семеноводство, 11, 35, 1936.
17. П. Н. Шибяев. Качество зерна пырея и пшенично-пырейных гибридов. Селекция и семеноводство. 6, 46. 1936.