

СОДЕРЖАНИЕ АЗОТА БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ В ЗРЕЛЫХ СЕМЕНАХ СОИ И ИХ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ СПЕКТРЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ВЕРТИКАЛЬНОГО МИКРОЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Н. А. Нарбут, В. И. Сафонов, М. П. Сафонова

(Биолого-почвен. ин-т ДВ научного центра АН СССР, Институт физиологии растений АН СССР)

Сою давно использовали как источник питания, поэтому пищевая ценность белков семян этой культуры изучена довольно неплохо. Ценность растительного белка определяется характером его растворимости в различных растворителях (воде, слабых растворах нейтральных солей, спирте, растворе щелочи) и аминокислотным составом.

Работы М. И. Смирновой-Иконниковой (1951, 1952), И. Ф. Беликова и Н. П. Тюленевой (1959) показали большую изменчивость в содержании различных по растворимости белковых форм азота. По степени изменчивости в содержании белка М. И. Смирнова-Иконникова (1952) делит зернобобовые на две группы: сильно- и слабореагирующие на условия произрастания. Сою автор относит к первой группе. По ее данным, общий белок в зерне этой культуры колеблется от 29 до 55% на сухой вес. На примере 24 изученных образцов М. И. Смирнова-Иконникова приводит цифры колебания отдельных белковых фракций азота по растворимости. Так, фракция, извлекаемая водой, составляет 72—94%, азот, извлекаемый 10%-ным NaCl — от 3 до 23% и азот, извлекаемый NaOH, — от 3 до 22%. Считается установленным, что под влиянием сухих погодных условий в семенах бобовых накапливается больше солерастворимых белков и меньше водорастворимых, тогда как дождливая и холодная погода в период созревания семян способствует увеличению водорастворимых белков.

Изучая содержание азотистых веществ в соевой муке с целью установления ее пищевой ценности, М. И. Смирнова-Иконникова с сотрудниками (Смирнова-Иконникова, 1952; Смирнова-Иконникова, Веселова, 1951), И. Ф. Беликов и Н. П. Тюленева (1959) не выделяли отдельные белковые фракции водной вытяжки. В водную вытяжку, наряду с альбуминами, переходит большая часть глобулинов и небелковый растворимый азот, который, по данным Кробера и Гиббонса (Krober, Gibbons, 1962), а также И. Ф. Беликова и Е. Я. Неделько (1953), может составлять 15% от общего азота.

Мы в своей работе расфракционировали белковый азот на альбумины, глобулины и глютелины и провели электрофоретическое исследование полученных белковых фракций.

Методика определения. Для работы использовали три Приморских сорта сои, выращенных на опытном поле Приморского

сельскохозяйственного института Уссурийского района (Приморский край). Исследовали зрелые семена сортов: позднеспелого Приморская 529, раннеспелого Приморская 494 и среднеспелого кормового Уссурийская 154.

Для анализа семена освобождали от кожуры и зародышей, размалывали на кофейной мельнице, просеивали через капроновое сито (0,25 мм). Из полученной муки удаляли жир петролейным эфиром с декантацией эфирного слоя и последующей сушкой обезжиренной муки на воздухе. В опыте использовали три параллельные навески муки.

Экстракцию альбуминов и глобулинов проводили 0,1%-ным фосфатным буфером pH 7,0, содержащим 0,05% ЭДТА и 10% поваренной соли. Глютелины извлекали 0,2%-ной щелочью. Альбумины и глобулины осаждали сухим сернистым аммонием при полном насыщении из расчета 76 г на 100 мл раствора. Центрифугировали в центрифуге с водяным охлаждением при 6000 об/мин. в течение 15 мин. и ставили в холодную камеру на диализ против дистиллированной воды при температуре +4° на 3—4 суток. После диализа альбумины отделяли от глобулинов подкислением раствора слабой уксусной кислотой до pH 4,5 (Hartman, Cheng, 1936) и центрифугированием. Альбумины, растворенные в воде, использовали для электрофореза и количественного определения азота. Глобулины для электрофоретического анализа растворяли повторно в 0,1%-ном фосфатном буфере, содержащем 0,05% ЭДТА и 10% поваренной соли, центрифугировали и ставили на диализ против дистиллированной воды в холодной камере при температуре +4°. После окончания диализа глобулины переводили в осадок подкислением раствора до pH 4,5 слабой уксусной кислотой и центрифугированием. Часть глобулинов растворяли в трис-глициновом буфере, содержащем мочевины в концентрации 2 М. Количественное определение азота каждой белковой фракции, а также остатка муки, полученного после экстракции альбуминов, глобулинов и глютелинов, проводили методом микрокельдыля (Белозерский, Проскуряков, 1951). Препараты, полученные из двух-трех параллельных навесок, сжигали с добавлением катализатора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{Se}$ в отношении 10:7,1 (Purs, Obrtelova, 1966). Пересчет сделан на 1 г абсолютно сухой обезжиренной муки и на вес двух абсолютно сухих семядолей.

Количественное определение в растворе белка, предназначенного для электрофореза, проводили биуретовым микрометодом (Mergsk, 1964).

Полученные препараты белков исследовали методом дискэлектрофореза в 7,5%-ном полиакриламидном геле в щелочной и кислой системах буферов. В опытах использован прибор для электрофореза типа ЭГА-1 с охлаждением буфера и электрофоретических трубок тающим льдом (Сафонова, 1967).

Результаты. Определение содержания азота отдельных фракций в семядолях зрелой сои показывает, что у разных сортов оно различно. Из данных табл. 1 видно, что наибольшая разница между сортами наблюдается во фракции глобулинов и в азоте остатка. Причем, чем больше азота содержится во фракции глобулинов, тем меньше его входит в азот остатка, и наоборот. Наибольшее количество азота глобулинов содержится в семядолях сорта Уссурийская 154. На азот остатка в сое этого сорта приходится 5,64 мг. Наименьшее количество азота глобулинов содержат семядоли сорта Приморская 494. На один грамм абсолютно сухого обезжиренного вещества приходится 24,9 мг азота, тогда как азот остатка в этом сорте составляет 27,1 мг.

Колебания в содержании азота альбуминов и глютелинов в семенах различных сортов небольшие. Данные табл. 1 показывают, что на 1 г абсолютно сухой обезжиренной муки семядоли сорта Приморская 529

содержат 8,20 мг, сорта Приморская 494 — 5,60 мг, а Уссурийская 154 — 7,46 мг азота, приходящегося на альбумины. Глютелины составляют 13,40, 14,00 и 17,93 мг соответственно по этим сортам.

Таблица 1

Содержание азота в зрелых семядолях
(в мг на 1 г абсолютно сухого обезжиренного вещества)

Сорт	Альбумины	Глобулины	Глютелины	Остаток	Сумма
Приморская 529	8,20	33,90	13,40	17,10	72,60
Приморская 494	5,60	24,90	14,00	27,10	71,60
Уссурийская 154	7,46	43,47	17,93	5,64	74,46

Содержание азота суммарного белка, включая и азот остатка, колеблется в зависимости от сорта. По данным табл. 1, наибольшее количество (74,46 мг) приходится на азот сорта Уссурийская 154, наименьшее (71,6 мг) на азот сорта Приморская 494.

Интересно было выяснить абсолютное содержание отдельных форм азота в одном семени. Для этого сделали пересчет на содержание альбуминов, глобулинов и азота остатка на вес двух семядолей. Из результатов, представленных в табл. 2, видно, что азот отдельных белковых фракций не находится в прямой зависимости от суммарного белкового азота. Наибольшее количество (в мг на абсолютно сухой вес двух семядолей) альбуминов, глобулинов и глютелинов обнаружено в семенах сорта Приморская 529, в которых определено наибольшее количество суммарного белкового азота. Наименьшее количество альбуминов, глютелинов и глобулинов приходится на семядоли сорта Приморская 494, тогда как наименьший суммарный белковый азот составляют семядоли сорта Уссурийская 154.

Таблица 2

Содержание азота в зрелых семядолях
(в мг на абсолютно сухой вес двух семядолей)

Сорт	Альбумины	Глобулины	Глютелины	Остаток	Сумма
Приморская 529	1,60	6,60	2,62	3,34	14,16
Приморская 494	0,89	3,98	2,24	4,32	11,43
Уссурийская 154	1,04	6,04	2,48	0,78	10,34

Для выявления доли отдельных белков азот каждой фракции представлен в процентах от суммарного белкового азота двух семядолей. Данные табл. 3 показывают, что наименьшая доля азота приходится на азот альбуминов. В семядолях трех сортов азот этой фракции составляет от 8 до 11%. Наибольшую долю занимает азот глобулинов. В разных сортах сои он составляет от 35 до 58%. Доля остатка в трех сортах различна. 37,7% его приходится на сорт Приморская 494, наименьший процент — 7,54 — на сорт Уссурийская 154. Чем больше азота приходится на глобулиновую фракцию, тем меньше на азот остатка, и наоборот.

Электрофоретический анализ альбуминов. Альбумины семядолей трех сортов сои в щелочном теле при движении к аноду разделялись на 14—17 компонентов. Сравнивая компоненты по относительной подвижности (табл. 4), можно отметить большое сходство между белками сортов Приморская 529 и Приморская 494. Альбумины этих двух сортов имеют 14 компонентов с близкой электрофоретической подвижностью.

Таблица 3
Содержание азота в зрелых семядолях
(в % от суммарного белкового азота двух семядолей)

Сорт	Альбумины	Глобулины	Глютелины	Остаток
Приморская 529	11,20	46,61	18,50	23,59
Приморская 494	7,79	34,82	19,59	37,78
Уссурийская 154	10,05	58,41	23,98	7,54

Таблица 4

Относительная подвижность альбуминов в щелочном геле (движение к аноду)

Сорт	Относительная электрофоретическая подвижность																
Уссурийская 154	0,13	0,20	0,30	0,33	0,38	0,43	0,48	0,53	0,63	0,75	0,83	0,88	0,93	I			
Приморская 494	0,16	0,18	0,28	0,34	0,39	0,44	0,50	0,54	0,58	0,64	0,76	0,83	0,94	I			
Приморская 529	0,02	0,15	0,18	0,28	0,35	0,38	0,42	0,47	0,52	0,54	0,57	0,68	0,78	0,81	0,89	0,95	I

Альбумины сорта Уссурийская 154 имеют восемь компонентов, близких к альбуминам сортов Приморская 529 и Приморская 494. Несколько больше их насчитывается при сравнении альбуминов семядолей двух сортов сои: Уссурийская 154 и Приморская 494. В этом случае наблюдается до одиннадцати близких по подвижности компонентов.

В кислом геле при движении к катоду альбумины семядолей всех трех сортов сои разделились на пять компонентов (табл. 5).

Таблица 5
Относительная подвижность альбуминов
в кислом геле (движение к катоду)

Сорт	Относительная электрофоретическая подвижность					
Уссурийская 154	0,10	0,29	0,47	0,57	0,65	
Приморская 494	0,18	0,39	0,59	0,69	0,73	
Приморская 529	0,21	0,33	0,58	0,67	0,79	

Чтобы проверить, есть ли среди белков компоненты, которые в кислой среде движутся как основные, а в щелочной, как кислые, все белковые зоны, мигрирующие к аноду в щелочном геле, извлекали из геля (без фиксации и окраски зон) трис-глициновым буферным раствором. Этот экстракт вносили в трубки с кислым гелем для повторного электрофореза в системе кислых буферов. На электрофореграмме альбуминов сои сорта Приморская 529 выявлены две белковые зоны, почти совпадающие по подвижности (0,32 и 0,52) с двумя компонентами (0,33 и 0,58), видимыми при электрофорезе исходного препарата в кислой среде. Альбумины сои сорта Приморская 494 после повторного электрофореза разделились также на две белковые зоны с подвижностью 0,35 и 0,58. На этом основании можно утверждать, что фракция альбу-

минов семядолей сои состоит в основном из кислых белков, но содержит также три щелочных белка и два белка, близких к нейтральным.

Электрофоретический анализ глобулинов. Глобулины — основной запасной белок в семенах бобовых. Методами с применением ультрацентрифуги (Danielsson, 1949; Naismith, 1955; Кретович с соавторами, 1956) и электрофореза (Briggs, Mann, 1950; Кретович с соавт., 1958; Вайнтрауб, 1960; и др.) показан сложный состав его. Данные по определению количества азота этой фракции указывают на различное содержание его в семядолях трех сортов сои (табл. 1, 2, 3).

Для установления возможных сортовых различий мы исследовали эту фракцию методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в двух системах буферных растворов. При движении к катоду в кислом геле глобулины семядолей трех сортов разделились на ряд компонентов, которые по подвижности условно делим на три группы: малоподвижные, среднеподвижные и подвижные. К малоподвижным у сортов Приморская 529 и Приморская 494 относятся четыре белковые зоны. В глобулинах сои сорта Уссурийская 154 удалось обнаружить только два компонента, относящихся к этой группе белков (8 и 9). К среднеподвижным компонентам у сорта Приморская 529 и Приморская 494 относятся четыре компонента (2, 3, 4 и 5). У обоих сортов они близки по подвижности и по интенсивности проявления. В сорте Уссурийская 154 в этой группе компонентов не удалось выявить самой слабой пятой зоны, которая установлена в глобулинах двух других сортов. Самый подвижный компонент — первый, присутствует в глобулинах семядолей всех трех сортов сои.

При движении к аноду у глобулинов сои сортов Приморская 529 и Приморская 494 выявлено 7 компонентов, а в сое сорта Уссурийская 154 — шесть. Ряд авторов (Grant, Lawrence, 1964; Вайнтрауб и Шуттов, 1966) наблюдали диссоциацию отдельных белковых компонентов под действием 2—8 м мочевины. Мы в своих опытах применяли мочевины в концентрации 2 м. При движении к катоду в кислом геле в присутствии мочевины в глобулинах семядолей всех трех сортов наблюдалось увеличение числа среднеподвижных компонентов. Происходило увеличение электрофоретической подвижности у малоподвижных компонентов. Без мочевины в семядолях всех трех сортов сои малоподвижные компоненты глобулинов занимали широкую зону, близкую к старту. В присутствии мочевины эта зона становилась более подвижной. Электрофоретическая подвижность отражает суммарные свойства белковой молекулы и зависит от общего заряда молекулы и ее размеров. Если в 7,5%-ном полиакриламидном геле в присутствии мочевины произошло изменение электрофоретической подвижности некоторых компонентов, то можно говорить об изменении свойств отдельных белковых молекул. Увеличение числа среднеподвижных компонентов в присутствии мочевины в глобулинах семядолей трех сортов указывает на диссоциацию отдельных белковых компонентов по водородным связям.

Несмотря на то, что мочевина увеличивает подвижность малоподвижных компонентов и число среднеподвижных компонентов в глобулинах семядолей всех трех сортов сои, общая электрофоретическая картина белков одного сорта отлична от другого. Если отдельные компоненты глобулинов сои сорта Приморская 529 и Приморская 494 повторяют друг друга по подвижности, числу и интенсивности проявления, то в присутствии мочевины изменяется подвижность и интенсивность проявления отдельных компонентов.

При использовании кислой системы буферов (при движении к аноду) присутствие мочевины не помогает добиться более четкого разделе-

ния на отдельные компоненты, как это наблюдалось в кислом геле. Наоборот, появлялся сильный фон, на котором трудно различить отдельные белковые зоны.

Электрофоретический анализ глютелинов. Данные по содержанию азота глютелинов (табл. 1, 2, 3) показывают, что различия этой фракции в трех сортах невелики. Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле нам удалось показать сложный состав этих белков.

Глютелины сои сорта Приморская 529 в щелочном геле при движении к аноду разделились на 11 компонентов. На электрофореграммах глютелинов двух других сортов появляется сильный фон, на котором можно различить у сои сорта Приморская 494 одиннадцать компонентов, а у сои сорта Уссурийская 154 — пять (табл. 6).

Таблица 6

Относительная подвижность глютелинов в щелочном геле (движение к аноду)

Сорт	Относительная подвижность										
Приморская 529	0,06	0,13	0,17	0,28	0,33	0,39	0,50	0,63	0,73	I	
Приморская 494	0	0,11	0,24	0,32	0,39	0,46	0,64	0,69	0,73	0,80	I
Уссурийская 154	0	0,11				0,47	0,59	0,68			I

При движении к катоду в кислом геле деление на отдельные компоненты происходит значительно яснее. Глютелины семян сои сорта Приморская 529 и Приморская 494 разделились на семь компонентов. Количество их одинаково, но подвижность и электрофоретический спектр различны (табл. 7).

Таблица 7

Относительная подвижность глютелинов в кислом геле (движение к катоду)

Сорт	Относительная подвижность									
Приморская 529			0,23	0,26	0,29	0,39	0,42	0,55	0,70	
Приморская 494	0,09	0,14	0,26	0,34	0,40	0,48	0,53			
Уссурийская 154	0	0,17	0,27	0,38	0,40	0,51	0,56	0,64	0,71	0,79

При повторном электрофорезе (все белковые зоны элюировали из щелочного геля и вносили в кислый гель) в глютелинах сои сорта Приморская 529 были обнаружены три белковые зоны с относительной электрофоретической подвижностью 0,26; 0,37; 0,57; а в белках сои сорта Приморская 494 — две зоны с подвижностью 0,35 и 0,57. Глютелины семядолей сорта Уссурийская 154 при движении к катоду разделились на 10 компонентов (табл. 7).

Выводы

1. Применение метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле позволило более полно выявить гетерогенность разных белков семядолей сои.

2. В зрелых семенах сои отдельные белковые фракции (альбумины, глобулины, глютелины) состоят из многих электрофоретически различимых компонентов с кислыми и щелочными свойствами. Альбумины, глобулины и глютелины сои различаются по числу компонентов и их электрофоретической подвижности.

3. Даже при небольших сортовых различиях в содержании суммарных белков содержание отдельных белков в разных сортах сои тоже различно; особенно велики эти различия во фракции глобулинов и остатке азота.

4. Сортоспецифичность белков, выявленная методом электрофореза, особенно хорошо выражена во фракциях глютелинов и глобулинов, обработанных мочевиной.

ЛИТЕРАТУРА

Беликов И. Ф. и Е. Я. Неделько, 1953. Ход биохимических процессов в сое при послеуборочном дозревании в зависимости от сроков уборки. Сообщ. Прим. ВХО им. Менделеева, 3.

Беликов И. Ф. и Н. П. Тюленева, 1959. Биохимическая характеристика сортов сои Приморского края. «Маслобояно-жировая промышленность», № 10.

Белозерский А. Н., Н. И. Проскураков, 1951. Практическое руководство по биохимии растений. М.

Вайнтрауб И. А., 1960. Изучение глобулинов семян сои электрофорезом на бумаге. Тр. по химии природ. соедин. Кишиневского ун-та, вып. 3.

Вайнтрауб И. А. и А. Д. Шутов, 1966. Некоторые данные о четвертичной структуре II S-белка сои. Матер. симпозиум по химии и биохимии растит. белков. Кишинев.

Кретович В. Л., Т. И. Смирнова и С. Я. Френкель, 1956. Исследование запасных белков сои в ультрацентрифуге. Биохимия, т. 21, вып. 6.

Кретович В. Л., Т. И. Смирнова, М. К. Вейнова, 1958. Электрохимические свойства белков семян сои и конопли. В сб.: Биохимия зерна, № 4.

Смирнова-Иконникова М. И., Е. П. Веселова, 1951. Фракционный состав белков семян зерновых бобовых культур. ДАН СССР, 77.

Смирнова-Иконникова М. И., 1952. Характеристика растительных культур по количественному и качественному составу белка. В сб.: Белки в промышленности и сельском хозяйстве, М.—Л.

Сафонова М. П., 1967. Изменение белков и протеолитических ферментов зерновки пшеницы при созревании и прорастании. Автореф. канд. диссерт. М.

Briggs D. K., R. L. Mann, 1950. An electrophoretic analysis of soybean protein. *Cereal chem.*, 2.

Danielsson C. E., 1949. Seed globulins of the gramineae and Leguminosae. I Seed globulins of the most common species of the gramineae and their differentiation in the seed. *Biochem. j.* 44, 4.

Naismith W. E. F., 1955. Ultracentrifuge studies on soya bean protein. *Biochim. and Biophys. Acta*, 16.

Hartman R. J., L. T. Cheng, 1936. Soybean proteins I. A new method of preparing soybean proteins. *J. Chinese Chem. Soc.* 4.

Krober A., J. Gibbons, 1962. Nonprotein nitrogen in soybean. *J. Agri and Food Chem.* 10, 11.

Merck A. G., 1964. *Chemical methods of medical investigation*. p. 103. Darmstadt.

Grant D. R. and J. M. Lawrence, 1964. Effect of sodium dodecylsulfate and other dissociating reagent on the globulins of peas. *Arch. Biochem. Biophys.* 108, N3.

Purs J., V. Obrtelova, 1966. Zrychlene metody Urcovani obsanu N. latek v rostlinnem materialu. *Postl. v yroba*, 12, N5.