

Н. САДИКОВА

ИЗОЛИРОВАНИЕ ЗАМКНУТЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ДРОЖЖЕЙ

(Представлено академиком Н. Д. Зелинским 10 X 1939)

Изучение состава и строения белков дрожжей представляет исключительный интерес в том смысле, что этот микроорганизм обладает способностью в короткое время образовывать весьма большую биомассу за счет простейших органических соединений (например ацетальдегида, этилового спирта, уксусной кислоты) и минеральных солей; источником азота может служить нитрат аммония. Н. Fink ⁽¹⁾ получал из 100 кг ацетальдегида 200 кг сухого вещества дрожжей (*Torula utilis*) с содержанием в них 55—60% белка; из 100 кг уксусной кислоты получается 176 кг дрожжей (60% белка), из 100 кг этилового спирта 290 кг дрожжей (60% белка), из 100 кг глюкозы 210 кг дрожжей.

Превращение дрожжами уксусной кислоты в липиды было показано исследованиями L. Macleod, J. Smedley-Maclean ⁽²⁾ и др. Исходя из простейших органических соединений, как источника углерода, и минеральных солей, дрожжи, равно как и другие микроорганизмы, строят тысячи биорганических соединений своего биосубстрата, включая белки, витамины, энзимы и т. д.

Во избежание нарушений структуры белка, неизбежных при препаративном его выделении из дрожжевой биомассы, особенно при высушивании и экстракции спиртом и эфиром для удаления липидов, настоящее исследование продуктов каталитического распада белков было поставлено над непосредственной биомассой. Имелось в виду выделение циклопептидов, обычно образующихся при каталитическом расщеплении в автоклаве, при помощи 2% раствора карбоната натрия. Карбонатное автоклавное расщепление белков было осуществлено еще В. С. Садиковым, В. Розановой и Г. Новоселовой ⁽³⁾ на кровяном альбумине с 2% Na_2CO_3 и В. С. Садиковым и А. Г. Песиной ⁽⁴⁾ на мышечной ткани с 2% Li_2CO_3 . В обоих случаях было показано значительное образование циклопептидов, которые были учтены аналитически по формам азота, но не были изолированы и исследованы в индивидуальном состоянии. В настоящей работе был избран путь массовой переработки дрожжей для изолирования циклопептидов.

Пекарские дрожжи в количестве 30 кг были подвергнуты нагреванию в автоклаве до 210° с 2% раствором Na_2CO_3 . Нагревание до 210° требовало около 3 часов; по достижении 210° автоклав быстро охлаждался холодной водой; это мероприятие устраняет образование смолообразных продуктов. Твердая фаза была незначительна; она осмолялась под влиянием кисло-

рода воздуха. Темноокрашенный раствор автоклаволизата (жидкая фаза) был исчерпан хлороформом при помощи многократного вытряхивания в делительной воронке. После отгонки хлороформа получена кристаллическая масса; она легко отмывается от темноокрашенных, смолистых примесей при помощи серного эфира. Очищенное многократной перекристаллизацией из 96% этилового спирта вещество кристаллизуется в иглах, имеющих температуру плавления 286—287°. Из хлороформной фракции было добыто около 30 г сырого вещества, после очистки сохранилось 10 г.

Вещество растворимо в хлороформе при 64° (0.44%), в этиловом спирте при 78° (5.63%), в эфире при 36° (0.18%), в ледяной уксусной кислоте при 20° (0.15%), в 37% HCl при 20° (1.5%), при 100° (17.4%). 50%-й раствор едкого натра вызывает своеобразное набухание вещества с потерей кристаллической структуры.

Молекулярный вес, определенный эбулиоскопически в хлороформном растворе, дал следующие величины: 0.1474 г в 34.8 г CHCl₃ дали повышение температуры кипения 0.040°, что соответствует молекулярному весу 420.4; 0.1384 г в 40.24 г CHCl₃ дали повышение температуры кипения 0.031°, что соответствует молекулярному весу 432.8.

Вещество оптически недействительно. Оно возгоняется без разложения при умеренном нагревании.

Элементарный анализ дал следующие результаты:

1. Навеска	0.0625 г; 5.63 мл 0.1 N H ₂ SO ₄ или 7.88 мг N ₂ или 12.96%	Среднее из 4 определений азота по Кельдалю 12.90%
»	0.1504 » 13.50 » 0.1 N H ₂ SO ₄ » 18.9 » N ₂ » 12.83%	
»	0.1516 » 13.99 » 0.1 N H ₂ SO ₄ » 19.6 » N ₂ » 12.90%	
»	0.0824 » 7.57 » 0.1 N H ₂ SO ₄ » 10.6 » N ₂ » 12.86%	
»	0.003338 г; 0.367 мл N ₂ ; 764 мм; 23°: 12.75% N ₂	Среднее из 2 определений азота по микро-Дюма 12.57%
»	0.002941 » 0.320 » N ₂ ; 757 » 20°: 12.40% N ₂	
2. Навеска	0.0843 г; CO ₂ 0.1970 г; H ₂ O 0.0738 г; 62.44% C; 10.35% H	
»	0.1120 » CO ₂ 0.2558 » H ₂ O 0.1006 » 62.28% C; 10.05% H	
»	0.003595 » CO ₂ 0.00817 » H ₂ O 0.00311 » 61.91% C; 9.68% H	
»	0.004182 » CO ₂ 0.00954 » H ₂ O 0.00358 » 62.21% C; 9.58% H	

Показатели	Найдено	Вычислено на C ₂₃ H ₄₂ N ₄ O ₄
Молекулярный вес	426.6	438
Углерод, %	62.36; 62.06	63.01
Водород, %	10.20; 9.63	9.59
Азот, %	12.73	12.78

Вещество представляет собой циклопептид; оно не имеет аминокислотного азота, определяемого по Ван-Слайку. После продолжительного гидролиза весь азот превращается в аминокислотный азот.

Для выяснения природы аминокислот, слагающих циклопептид, он был подвергнут гидролизу с 37% HCl в запаянной трубке в течение 36 часов при 100° (в кипящей воде в колбе с обратным поставленным холодильником). После удаления соляной кислоты под вакуумом при 60° остаток был растворен в воде и переведен в мерную колбочку и раствор доведен до метки. Пробы на реакции показали отсутствие пролина, тирозина, триптофана, цистина, базических кислот и дикарбоновых аминокислот.

Полученные при гидролизе аминокислоты были переведены в медные соли по способу Town-Brazier⁽⁵⁾. Были получены 3 фракции медных солей:

I фракция, не растворимая в холодной воде и растворимая в большом объеме кипящей воды;

II фракция, растворимая в холодной воде и в абсолютном метаноле;

III фракция, растворимая в холодной воде, но не растворимая в абсолютном метаноле.

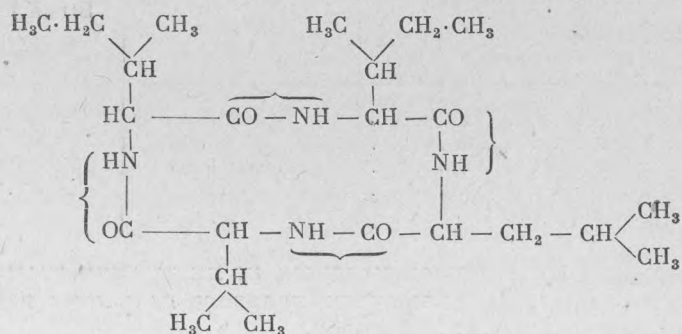
Их соотношение равно 1 : 2 : 1.

Медные соли: фракция I 0.0387 г и фракции (II + III) 0.1212 г } 1 : 3
 » I 0.0404 » » » (II + III) 0.1228 » }
 » II 0.0553 » » фракция III 0.0293 г }
 » II 0.0554 » » » III 0.0282 » } 2 : 1
 » II 0.0286 » » » III 0.0136 » }

Анализ медных солей дал следующие результаты:

Содержание в %	Фракция I	Фракция II	Лейцинат меди	Фракция III	Валинат меди
Общий азот по Кьельдалю	8.47		8.67		9.47
Аминоазот по Ван-Слайку	8.44	8.54		9.29	
Медь, титрование по Абдерхалдену	19.85	19.79	19.64	21.43	21.49

Анализ медных солей аминокислот указывает на наличие одной частицы лейцина (I фракция), двух частиц изолейцина (II фракция) и одной частицы изовалина (III фракция). Формула циклотетрапептида, состоящего из одной частицы лейцина, двух частиц изолейцина и одной частицы изовалина, $C_{23}H_{42}N_4O_4$, совпадает с данными элементарного анализа. Строение циклолейцил-диизолейцил-изовалина представляет собой 12-членный тетразин; ввиду его нерастворимости в щелочи он не содержит энольных групп.



циклолейцил-изолейцил-изовалил-изолейцин (1)

При нагревании с анилином этот циклотетрапептид не приобретает способности растворяться в щелочи, т. е. не испытывает энолизацию.

Таким образом, при помощи каталитического метода был получен замкнутый тетрапептид, подобный тем циклопептидам, которые были

(1) Возможно, что изолированный автором циклотетрапептид представляет продукт вторичного происхождения.

Н. Зелинский

изолированы из различных белковых веществ Fodor'ом (6) при нагревании белков с глицерином, резорцином, α -нафтолом.

Обнаружение замкнутых полипептидов, являющихся компонентами сложных акропептидных систем, создает представление о структуре белковых тел, как сверхассоциатов акропептидов, и помогает объяснить вторичное происхождение полипептидных цепей и образование из них циклопептидов и циклотрипептидов при каталитическом расщеплении белков.

В строении многих белков были обнаружены циклопептидные пары: циклолейцил-изолейцин, выделенный из кровяного альбумина, и циклоизовалил-изолейцин, полученный из казеина (7).

Лаборатория белков
Ленинградского государственного университета

Поступило
10 X 1939

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ H. Fink, F. Just, *Bioch. Zschr.*, **296**, 306 (1938); **290**, 135, 447 (1937); H. Fink, *Vorratspflege und Lebensmittelforschung*, **1**, 52 (1938). ² L. Macleod, J. Smedley - Maclean, *Bioch. Journ.*, **32**, 1671 (1938). ³ В. С. Садиков, В. Розанова, Г. Новоселова, *ДАН*, **IV**, № 4 (1934). ⁴ В. С. Садиков и А. Г. Песина, *ДАН*, **XII**, № 4 (1936). ⁵ В. С. Садиков, *Белковый практикум*, 155 (1938). ⁶ A. Fodor u. Sonja Kuk, *Enzymologia*, **V**, 1, 60 (1938); *Kolloid. Zschr.*, **74**, 1, 66 (1936); *Enzymologia*, **IV**, 36 (1937); *ibid.*, **1**, 5, 311 (1936). ⁷ В. С. Садиков, *Курс биологической химии*, 220 (1935).