

Член-корреспондент АН СССР Н. М. СИСАКЯН, Э. Н. БЕЗИНГЕР
и Ф. Р. КИВКУЦАН

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ФИКОЭРИТРИНА

Белки фотосинтезирующих органов и тканей различных организмов находятся главным образом в связанном с пигментами состоянии, причем прочность связи для разных пигментов различная. Так, хлорофилл легко отделяется от белка уже воздействием органических растворителей. В случае же фикобилинов связь пигмента с белком настолько прочна, что ее удается нарушить лишь воздействием горячей соляной кислоты⁽¹⁾. Полагают, что эта связь химической природы⁽²⁾.

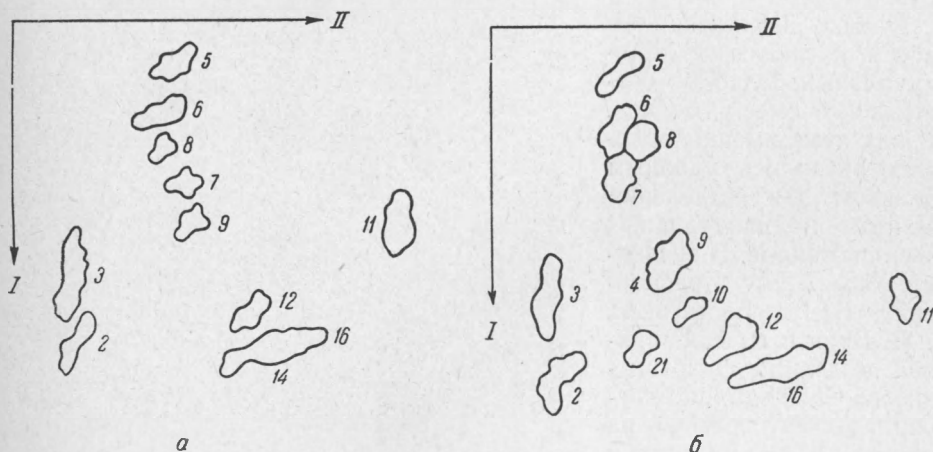


Рис. 1. *а* — контроль — смесь препаратов чистых аминокислот; *б* — гидролизат фикоэритрина (0,008 мл из 0,4 мл первоначального объема). *I* направление: фенол — вода, *II* направление: коллидин — α -пиколин — вода. 2 — аргинин, 3 — лизин, 4 — гистидин, 5 — аспарагиновая кислота, 6 — глутаминовая кислота, 7 — гликокол, 8 — серин, 9 — аланин, 10 — α -аминомасляная кислота, 11 — тирозин, 12 — валин, 14, 15 — лейцин(ы), 16 — фенилаланин, 21 — γ -аминомасляная кислота

Именно хлорофилл-белковый комплекс по современным представлениям принимает участие в процессах фотосинтеза. Однако этот хромопротеид до сих пор не выделен в чистом виде и не изучен. Сообщение Такашима⁽³⁾ о выделении кристаллического хлорофилл-липопротеидного комплекса из листьев клевера в настоящее время опровергается данными А. А. Красновского и Г. П. Брин⁽⁴⁾, которые показали, что кристаллические агрегаты, полученные по Такашима, являются кристаллами хлорофилла, а не хлорофилл-липопротеида. Белки же и липоиды в выделенном препарате представляют собой сопутствующие и загрязняющие препарат вещества. Таким образом, имеющиеся в литературе данные^(5, 6) все еще не дают основания для окончательного суждения о природе выделенного кристаллического вещества.

Фикобилины — фикоэритрин и фикоцианин из красных и сине-зеленых

водорослей, в противоположность хлорофилл-белковому комплексу из высших растений, выделены неоднократно в чистом виде (7, 8, 12). Так как фикоэритрин поглощает свет, который используется при фотосинтезе, то изучение белковой части этого хромопротеида представляет несомненный интерес в связи с выяснением природы фотосинтеза.

Белки водорослей изучены сравнительно мало. Недостаточно изучен и их аминокислотный состав. В связи с этим надо указать на работу последнего времени по количественному хроматографическому определению аминокислот в белках из выделенных суммарно *Chlorella vulgaris*, (9), и на более раннее исследование белков *Ulva lactuca* (10). Из различных морских водорослей были также выделены белки при помощи щелочных экстракций и в них после гидролиза установлено хроматографическим методом присутствие различных аминокислот (11). Кислотные гидролизаты, согласно этим данным, показали присутствие обычных аминокислот, характерных для белков наземных растений. В щелочных гидролизатах обнаружены, кроме того, иодсодержащие аминокислоты.

Однако все указанные работы касаются не индивидуальных белковых соединений, а смеси белков. Между тем, именно водоросли оказались удобным объектом для выделения из них индивидуальных хромопротеидов. В последние годы А. А. Красновский, В. Б. Евстигнеев, Г. П. Брин и В. А. Гаврилова выделили фикоэритрин из *Callithamnion rubrosum* хроматографией на колонке (1), а Вассинк и Рагетли изолировали фикоцианин из планктонных форм *Oscillatoria* при помощи хроматографии на бумаге (12). В фикоцианине после кислотного гидролиза авторы обнаружили цистин, дикарбоновые аминокислоты, гликокол, аланин, валин, лейцин(ы), серин, треонин, тирозин, пролин, гистидин, лизин, орнитин и три неизвестных соединения, среди которых предполагается оксиглутаминовая кислота.

Мы полагаем, что «неизвестные соединения», обнаруженные указанными авторами, могут быть пептидами, так как гидролиз фикоцианина был непродолжительным (12 час. при 100°, 6-н HCl).

Что касается фикоэритрина, выделенного в виде индивидуального соединения, то по его аминокислотному составу нет данных. Мы поставили перед собой задачу исследовать аминокислотный состав этого хромопротеида. Для этого мы использовали препарат, выделенный А. А. Краснов-



Рис. 2а

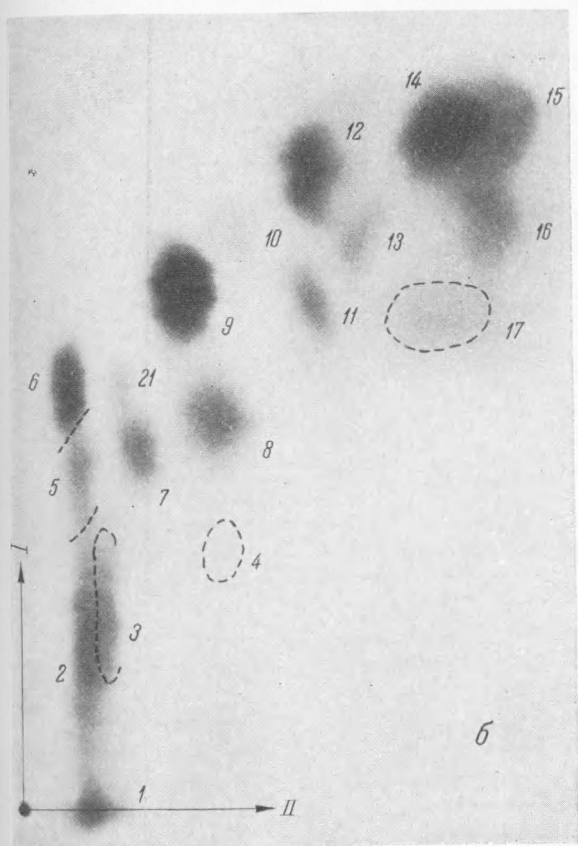


Рис. 2б

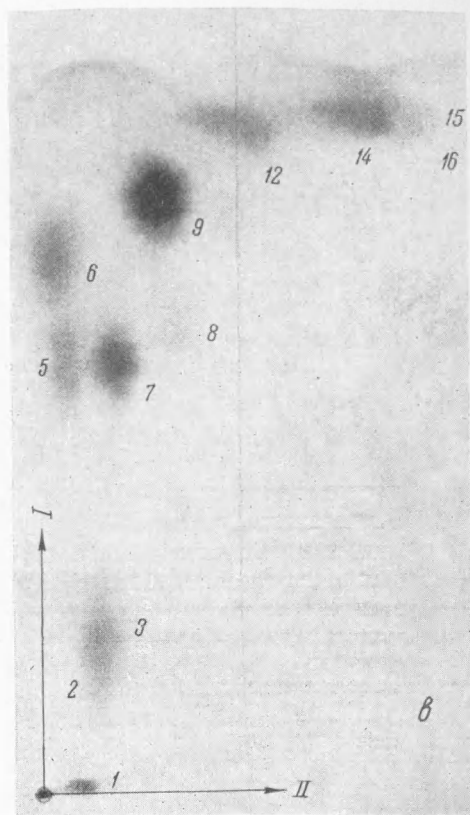


Рис. 2в

Рис. 2. а — контроль — смесь препаратов чистых аминокислот; б — гидролизат фикоэритрина (0,002 мл из 0,4 мл первоначального объема); в — гидролизат фикоэритрина (0,001 мл из 0,4 мл первоначального объема). I направление: метиловый спирт — пиридин — вода (40:2:10), II направление: *n*-бутиловый спирт — метилэтилкетон — диэтиламин — вода (20:20:2:10). 1 — цистин, 2 — аргинин, 3 — лизин, 4 — гистидин, 5 — аспарагиновая кислота, 6 — глутаминовая кислота, 7 — гликокол, 8 — серин, 9 — аланин, 10 — α -аминомасляная кислота, 11 — тирозин, 12 — валин, 13 — метионин, 14 — лейцин, 15 — изолейцин, 16 — фенилаланин, 17 — треонин, 18 — пролин, 19 — оксипролин, 20 — триптофан, 21 — γ -аминомасляная кислота

ским и Г. П. Брин * из красной водоросли *Callithamnion rubrosum*. Препарат фикоэритрина содержал 10,61% азота на сухой вес. Определение азота производилось по микро-Дюма (см. табл. 1).

Таблица 1

Содержание азота в препарате фикоэритрина

	Навеска в мг	Объем азота в мл	Т-ра в °С	R в мм рт. ст.	Азот в % на сух. вес
I	2,295	0,220	24,0	759,4	10,57
II	2,425	0,235	24,0	759,4	10,66

Таблица 2

R_f аминокислот в системе бензиловый спирт — вода

Аминокислоты	Контроль		Гидролизат фикоэритрина	
	I	II	I	II
Валин	0,11	0,11	0,11	0,11
Лейцин + изолейцин .	0,21	0,21	0,21	0,21
Норлейцин	0,27	0,27	нет	нет
Фенилаланин	0,33	0,35	0,32	0,33

Для гидролиза было взято 36,8 мг белка и гидролиз производился 0,5 мл 6-н соляной кислоты в течение 24 час. при слабом кипении. Гумины удалялись фильтрованием, а соляная кислота — в вакууме. Сухой остаток разводился до объема 0,4 мл.

Аминокислоты идентифицировались методом распределительной хроматографии на бумаге. В основном был применен двумерный способ анализа. Для этого использовались две системы растворителей. Первая система состояла из фенола — воды в первом направлении и коллидина — α -пиколина — воды во втором направлении ⁽¹³⁾. Вторая система растворителей состояла из метилового спирта — пиридина — воды в первом и из *n*-бутилового спирта — метилэтилкетона — диэтиламина — воды во втором направлении ⁽¹⁴⁾.

Применение второй системы растворителей для двумерной хроматографии позволило контролировать результаты, полученные в первой системе. Кроме того, второй метод как более чувствительный доказал полное выявление всех реагирующих с нингидрином веществ, а также позволил установить присутствие серусодержащих аминокислот. Как известно, в системе фенол — вода и коллидин — α -пиколлин — вода цистин и метионин можно идентифицировать лишь после их предварительного окисления перекисью водорода ⁽¹³⁾. Результаты хроматографического анализа гидролизата фикоэритрина представлены на рис. 1 в виде схемы и на рис. 2 в виде фотографии.

Кроме двумерных способов, для идентификации аминокислот применялись также одномерные хроматограммы. Во всех случаях ставился контроль из смеси препаратов чистых аминокислот. В системе фенол — вода был уточнен вопрос о присутствии серина и гликокола примешиванием к гидролизату чистых препаратов этих аминокислот. Такой же способ был применен для установления присутствия α -аминомасляной кислоты на двумерной хроматограмме.

Совпадение пятен и близкие с контролем значения R_f служили дополнительным доказательством правильности идентификации этих аминокислот. Дополнительное определение гистидина производилось на одномерной хроматограмме в системе коллидин — α -пиколлин — вода по реакции Паули. Гистидин дал отчетливую красную окраску. Присутствие фенилаланина было показано по значению R_F на одномерной хроматограмме в системе бензиловый спирт — вода (см. табл. 2).

Наконец, пролин, которого в фикоэритрине содержится сравнительно мало, был обнаружен на одномерной хроматограмме в смеси бензинового

* Пользуемся случаем выразить глубокую благодарность А. А. Красновскому и Г. П. Брин за предоставление препарата фикоэритрина.

и *n*-бутилового спирта (1:1), насыщенных водой. После опрыскивания хроматограммы изатином был обнаружен пролин по интенсивной синей окраске.

Таким образом, методом распределительной хроматографии на бумаге нами было установлено, что в состав кислотного гидролизата фикоэритрина входит 19 аминокислот. Нами обнаружены аспарагиновая и глутаминовая кислоты, гликокол, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, тирозин, фенилаланин, пролин, гистидин, лизин, аргинин, цистин и метионин. Кроме того, обнаружены α -аминомасляная и γ -аминомасляная кислоты. Так как последние две аминокислоты найдены в очень небольших количествах, то их присутствие в гидролизате можно объяснить и как следствие обработки белка. Действительно, γ -аминомасляная кислота могла образоваться из глутаминовой декарбоксилированием последней. Образование же α -аминомасляной кислоты показано из треонина при гидролизе белка (¹⁵).

Остальные 17 аминокислот, обнаруженные в фикоэритрине, являются аминокислотами, обычными для белков наземных растений и, в частности, для белков пластид высших растений (¹³, ¹⁶).

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
11 VI 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, В. Б. Евстигнеев, Г. П. Брин, В. А. Гаврилова, ДАН, 82, 947 (1952). ² R. Lemberg, Naturwiss., 17, 541 (1929). ³ Sh. Takashima, Nature, 169, 182 (1952). ⁴ А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 95, 611 (1954). ⁵ J. D. Spikes, R. Lumry, D. R. Anderson, Ann. Rev. Physiol. Chem., 4, 405 (1953). ⁶ H. S. A. Sherratt, W. Ch. Evans, Nature, 173, 540 (1954). ⁷ R. Lemberg, Lieb. Ann., 461, 46 (1928). ⁸ A. Tiselius, Trans. Farad. Soc., 33, 524 (1937). ⁹ L. Fowden, Biochem. J., 50, 355 (1951); 52, 310 (1952). ¹⁰ J. W. H. Lugg, ibid., 37, 132 (1943). ¹¹ C. B. Coulson, Chemistry and Industry, 997 (1953). ¹² E. C. Wassink, H. W. J. Ragetli, Proc. Acad. Sci. Amst., 55, 462 (1952). ¹³ Н. М. Сисакян, Э. Н. Безингер, Е. Б. Куваева, Биохимия, 16, 358 (1951). ¹⁴ Н. М. Сисакян, Э. Н. Безингер, П. Г. Гаркави, Г. Я. Кивман, ДАН, 96, 343 (1954). ¹⁵ K. Heyns, W. Walter, Naturwiss., 39, 507 (1952). ¹⁶ Н. М. Сисакян, Э. Н. Безингер, Е. Б. Куваева, ДАН, 87, 113 (1952).