

ОСОБЕННОСТИ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ И ПУТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Е. И. Медведева, С. В. Красильникова, К. А. Панченко, Е. Б. Петренко,
Л. И. Бойко

Использование водорослей как дополнительного источника белка не получает, по данным литературы, однозначной положительной оценки [3]. Это определяется, видимо, не только сложностью состава водорослей, но и специфическими особенностями их белковых веществ.

Цель настоящей работы — изучить некоторые особенности строения и состава щелочерастворимых белков красных агароносных водорослей *Phyllophora nervosa* и *Eurcellaria fastigiata* и определить пути их наиболее рационального использования.

Из свежих водорослей *Phyllophora nervosa* и *Furcellaria fastigiata* выделяли щелочерастворимый белок методом последовательной экстракции с осаждением при рН 4,5. Многократное пересаживание до постоянства состава [1, 6], препаративная гельфильтрация через сефадекс Г-100 и электрофорез в боратном буфере рН 10,8 позволили получить однородные белковые препараты [5] (рис. 1,2).

В выделенных таким образом щелочерастворимых белках филлофоры и фурцеллярии определяли: общий азот — полумикрометодом Кьельдаля; содержание аминокислот — на аминоксализаторе и методом хроматографии на бумаге в различных системах растворителей [5]; N-концевые аминокислоты — методом динитрофенилирования [10], используя в качестве моделей ДНФ-аминокислоты; аминсахара — методом Эльсон — Моргана [10] при использовании моделей [6]; углеводы — методом хроматографии на бумаге [2, 3]; аминный азот — методом Попе — Стивенса [1]; электрофорез проводили в полиакриламидном геле ярко-голубого цвета [15] и на бумаге в боратном буфере рН 10,8, а также с подвижной границей [10]; глубину протеолиза под действием протелина — по накоплению аминного азота [5, 20].

Характеристика аминокислотного состава препаративно выделенных однородных щелочерастворимых белков филлофоры и фурцеллярии приведена в табл. 1.

Приведенные в табл. 1 данные показывают, что содержание аминокислот в щелочерастворимых белках филлофоры и фурцеллярии различное. Отличия наблюдаются и по N-концевым аминокислотам, которыми для щелочерастворимого белка филлофоры является валин, а для фурцеллярии — аргинин. Как показал тщательно проведенный анализ, оба исследуемых белка содержали в своем составе не только аминокислоты, но и углеводы (табл. 2) [17].

Щелочерастворимые белки красных водорослей филлофоры и фурцеллярии значительно отличаются как по составу, так и по содержанию

Содержание аминокислот в щелочерастворимых белках филофоры и фуруцеллярии (в г на 100 г белка)

Аминокислоты	Щелочерастворимый белок из:		Аминокислоты	Щелочерастворимый белок из:	
	филофоры	фуруцеллярии		филофоры	фуруцеллярии
Лизин	4,2	4,0	Глицин	6,7	4,5
Гистидин	1,7	3,8	Аланин	6,3	5,1
Аргинин	4,6	9,1	Валин	2,9	3,7
Аспарагино- вая кислота	7,5	11,0	Метионин	0,2	1,4
Треонин	4,1	3,5	Изолейцин	1,4	4,4
Серин	4,1	4,4	Лейцин	4,2	2,6
Глютаминовая кислота	8,8	9,0	Тирозин	7,8	3,7
Пролин	6,3	5,0	Фенилаланин	4,9	8,1
			Триптофан	1,2	2,4
			Цистин	+	7,3

углеводов. По данным метилирования и периодатного окисления углеводная цепь щелочерастворимого белка филофоры значительно разветвлена. Электрофорез, гельфильтрация, гидролиз свидетельствуют о прочной связи углеводов с полипептидной цепью молекулы белка.

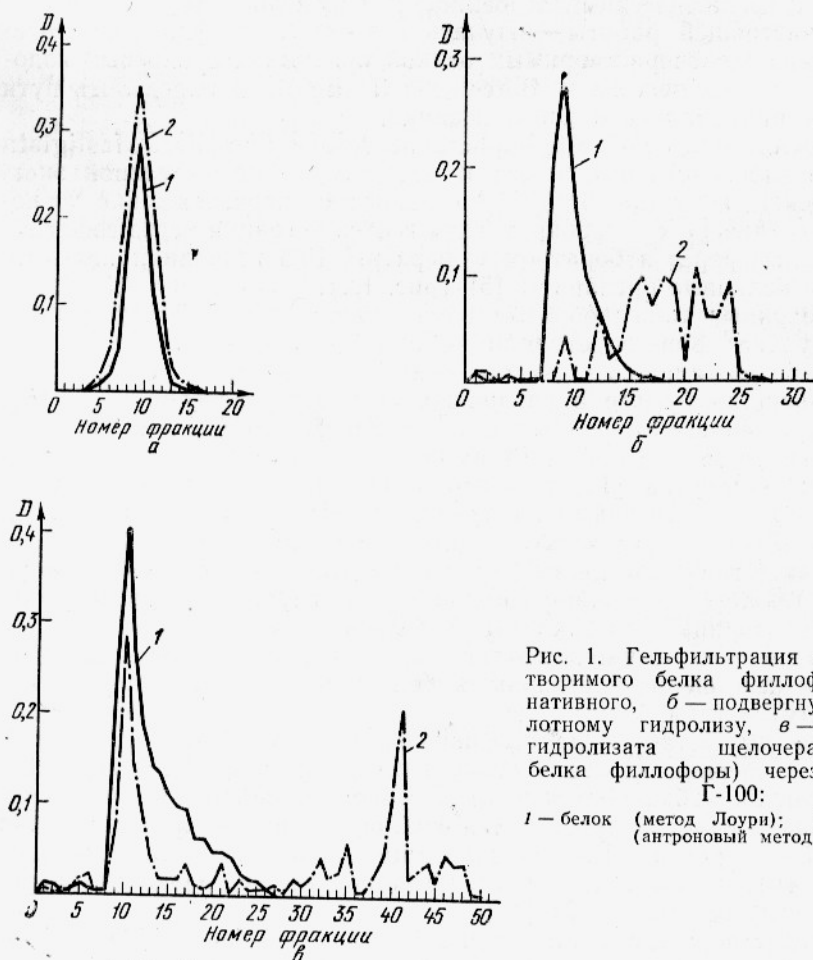


Рис. 1. Гельфильтрация щелочерастворимого белка филофоры (а — нативного, б — подвергнутого кислотному гидролизу, в — щелочного гидролизата щелочерастворимого белка филофоры) через сефадекс Г-100:

1 — белок (метод Лоури); 2 — углеводы (антроновый метод).

Таблица 2
Содержание углеводов в щелочерастворимых белках филофоры и фуруцеллярии (в г на 100 г белка)

Углеводы	Щелочерастворимый белок из	
	филофоры	фуруцеллярии
Галактоза	5,97	4,65
Глюкоза	1,44	6,50
Ксилоза	2,40	—

Удалить углеводы можно только в результате химического воздействия, например, кислотного гидролиза в присутствии 0,5 н. раствора соляной кислоты (см. рис. 1, б).

Оценивая характер кинетических кривых освобождения при мягком (рис. 3) кислотном гидролизе углеводов и некоторых аминокислот [10, 15], можно отметить различие щелочерастворимых белков филофоры и фуруцеллярии. Однако общим является то, что после полного освобождения углеводов в гидролизате отмечается резкое накопление отдельных аминокислот.

Рис. 2. Электрофорез щелочерастворимого белка филофоры в боратном буфере рН 10,8, ионная сила 0,05 (прибор ЭМИБ для микрофореза)



В случае щелочерастворимого белка филофоры такими аминокислотами являются аспарагиновая кислота, тирозин и лизин. Особо резкое появление аспарагиновой кислоты в гидролизате после удаления углеводов позволило (благодаря отсутствию аминокислот) предположить наличие сложноэфирной связи [9] с углеводом с β -карбоксильной группой аспарагиновой кислоты.

В случае щелочерастворимого белка фуруцеллярии при гидролизе с освобождением углеводов отмечается резкое накопление серина, тирозина и глютаминовой кислоты. Это дает основание предполагать существование нескольких типов связи углеводов с пептидной цепью белковой молекулы — с гидроксильной группой серина, либо с γ -карбоксильной группой глютаминовой кислоты с образованием сложноэфирной связи (*о*-ацилгликозидной).

Предполагаемые виды связи неустойчивы при щелочном гидролизе, который был нами использован по аналогии с исследованием других белковых систем [5, 11]. Используя гельфильтрацию через сефадекс Г-100, углеводы почти полностью отделяются при гидролизе в мягких условиях (0,05 н. раствор карбоната натрия, $t = 70^\circ \text{C}$) (см. рис. 1, в).

При рассмотрении ИК-спектров исследуемого белка филофоры и его щелочного гидролизата (рис. 4, а) можно отметить почти полное исчезновение при гидролизе максимума поглощения при 1740 см^{-1} , что

говорит о разрушении сложноэфирной связи β -карбоксильной группы аспарагиновой кислоты [7]. Таким образом, исчезновение максимума поглощения при 1740 см^{-1} , появление в гидролизате сначала углеводов, а затем разрыв цепи и накопление свободной аспарагиновой кислоты, лабильность предполагаемой связи углеводов — белок в щелочной среде дают основание полагать наличие в щелочерастворимом белке филлофоры связи углеводов — белок по типу сложноэфирной (*о*-ацилглюкозидной).

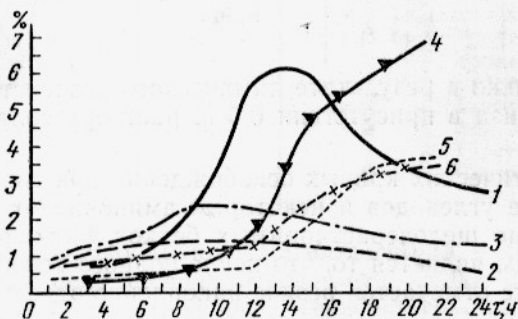


Рис. 3. Кинетические кривые освобождения углеводов и аминокислот при гидролизе щелочерастворимого белка филлофоры 0,5 н. раствором соляной кислоты:

1 — галактоза; 2 — глюкоза; 3 — арабиноза; 4 — аспарагиновая кислота; 5 — тирозин; 6 — лизин.

ИК-спектры щелочерастворимого белка фуруцеллярии (рис. 4, б) в исходном состоянии и после щелочного гидролиза позволили отметить появление в гидролизате резко выраженных характеристических полос в области 880 см^{-1} , а также наличие валентных колебаний в области $1585\text{—}1680 \text{ см}^{-1}$. Это характерно для непредельных соединений, содер-

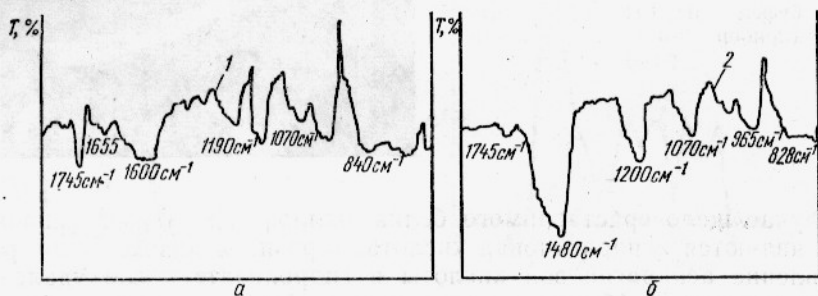


Рис. 4. ИК-спектры щелочерастворимого белка филлофоры (а) и фуруцеллярии (б): 1 — нативного; 2 — подвергнутого щелочному гидролизу.

жащих двойную связь. Приведенные данные свидетельствуют об ином характере связи углеводов — белок в щелочерастворимом белке фуруцеллярии по сравнению с филлофорой [1].

Участие серина в связи с углеводами при щелочном гидролизе позволяет ожидать расщепления связи по механизму β -элиминирования с образованием моносахарида и аминокриловой кислоты [5, 11]. Проведенное восстановление боргидридом натрия продуктов щелочного гидролиза щелочерастворимого белка фуруцеллярии показало увеличение количества аланина от 5,04 до 6,75% и соответственно падение количества серина от 4,26 до 2,86%. Это дало основание полагать, что в щелочерастворимом белке фуруцеллярии связь углеводов — белок, видимо, осуществляется по типу *о*-гликозидной.

Полученные нами данные позволяют рассматривать главенствующие по количественному содержанию белки водорослей филлофоры и фуруцеллярии как сложные белки — гликопротеины, характер возможной связи углеводов — белок которых различен. Хотя обе возможные свя-

зи лабильны, однако они-то могут и создавать условия замедления и предотвращения процесса протеолиза этих белков [11, 16], что при непосредственном использовании как дополнительного источника белка может играть отрицательную роль.

При осуществлении протеолиза исследуемых белков глубина его оказалась незначительной, несмотря на применение протелина — мощного комплекса протеолитических ферментов типа проназы. Так, для щелочерастворимого белка филлофоры глубина протеолиза при действии протелина составила за 24 ч 10,6%. В то же время даже только частичное нарушение связи углеводов — белок привело к большей глубине протеолиза, составившей 37,4%.

Эти данные дают основание полагать, что как и у других гликопротеинов, одной из функций простетической группировки в изучаемых щелочерастворимых белках красных водорослей является создание устойчивости, обеспечение малой доступности пептидной цепи по отношению к внешним воздействиям [16].

Таким образом, принадлежность основной группы белков красных водорослей к гликопротеинам дает возможность объяснить их малую эффективность при использовании для пищевых либо кормовых целей. В то же время повышение доступности пептидной цепи при удалении простетической группировки позволяет обосновать возможные пути использования белков водорослей.

Основываясь на приведенных данных, следует полагать, что необходимо нарушить связь углеводов — белок для повышения усвояемости белка водорослей. Исходя из особенностей строения белков филлофоры и фуцеллярии, мы предложили два основных пути повышения эффективности их использования: щелочная обработка 0,05 н. раствором гидроксида кальция при $t = 100^\circ\text{C}$ в течение 3 ч, что позволяет увеличить глубину протеолиза протелином от 13,4 до 48,2%; глубокая деструкция белковых веществ до аминокислот и пептидов, выделение которых возможно в виде растворимого водорослевого препарата.

Подобный процесс может быть осуществлен при катализирующем действии щелочей и кислот, последние, по нашему мнению, более перспективны, так как сохраняют аминокислоты в их природной L-форме, позволяют избежать значительные потери аминокислот за счет меланоидинообразования. Из-за низкого рН [18] и для осуществления кислотного гидролиза можно использовать серийное отечественное оборудование.

Нами была разработана и апробирована технологическая схема получения водорослевого аминокислотного препарата. Разработанный метод позволяет использовать для получения водорослевого аминокислотного препарата в качестве исходного сырья не только водоросли, но и отходы промышленной переработки красных агароносных водорослей, обеспечивая комплексное использование сырья. Разработанная технология после ее апробации на гидролизных заводах была одобрена. Эта технология состоит из следующих, последовательно осуществляемых процессов [18—22].

1. Гидролиз, осуществляемый в две стадии:

Первая стадия — предгидролиз, который проводят при $t = 100^\circ\text{C}$ в течение 2 ч при катализаторе 2 н. раствора минеральной кислоты. Эта стадия технологического процесса позволяет нарушить связь углеводов — белок (см. рис. 3). Одновременно при этом происходит гидролиз полисахаридов и образуемые моно- и олигосахариды переходят в раствор (предгидролизат) и могут быть затем удалены. Это уменьшает возможность их последующего нежелательного взаимодействия с аминокислотами.

Вторая стадия — гидролиз остатка после предгидролиза, который проводят при $t = 140^{\circ}\text{C}$ в течение 2 ч при катализаторе 1 н. раствора серной кислоты.

II. **Нейтрализация** и осаждение гидролизата, как показали проведенные опыты [18], осуществляется оксидом кальция до pH 5,0.

III. **Сушка** осажденного нейтрализата проводится на распылительной сушилке. Оптимальные режимы сушки: температура теплоносителя 200°C на входе в сушильную камеру и 90°C — при выходе из нее, скорость подачи нейтрализата $2\text{ м}^3/\text{ч}$.

Таким образом, разработанная технология позволяет комплексно использовать природное сырье; из одной и той же водоросли получают вначале агарпродукт (агароид, фуцелларан), а из образующихся отходов — водорослевый аминокислотный препарат.

На основании результатов апробации технологии в производственных условиях Южгипробiosинтез и ВНИИ гидролиз растительных материалов рассчитали, что себестоимость составляет 26,5—28,2 коп. за 1 кг.

Таблица 3

Характеристика препаратов, полученных из отходов переработки филлофоры и фуцеллярии (в % к сухому веществу препарата)

Показатели	Препараты, полученные из отходов промышленной переработки	
	филлофоры	фуцеллярии
Общий азот	9,30	8,0
Аминокислоты		
свободные	17,4	15,7
связанные	38,3	44,6
РВ	1,4	6,2
Зола	18,7	16,7
Иод	0,7	0,1

Таблица 4

Содержание аминокислот в водорослевых аминокислотных препаратах, полученных из отходов промышленной переработки филлофоры и фуцеллярии (в г на 100 г препарата)

Аминокислоты	Препараты, полученные из отходов переработки	
	филлофоры	фуцеллярии
Цистин	5,7	7,5
Лизин	4,8	3,7
Аргинин	5,2	5,1
Аспарагиновая кислота	4,9	4,1
Серин	1,8	2,2
Глицин	4,3	3,9
Глютаминовая кислота	4,5	5,8
Треонин	2,2	3,6
Аланин	8,0	9,3
Тирозин	3,5	4,4
α -Аминomásляная кислота	0,6	0,3
Метионин	1,3	1,8
Валин	3,2	3,5
Фенилаланин	2,6	1,3
Лейцин + изолейцин	4,5	5,2

Состав препаратов, полученных в производственных условиях из отходов переработки филлофоры и фуруцеллярии, представлен в табл. 3 и 4.

Полученный водорослевый аминокислотный препарат оказался эффективной добавкой в корм молодняка крупного рогатого скота, подсвинков и прудовой рыбы [19, 21]. Добавление препарата в корм прудовой рыбы [21, 22] способствовало повышению выживаемости сеголетков карпа на 16,5% и повышению рыбопродуктивности товарного карпа на 31,4%.

Выводы

1. Исследованы особенности строения белков красных агароносных водорослей филлофоры и фуруцеллярии, их принадлежность к гликопротеинам.

2. На базе этого исследования разработана технология использования ценных белковых веществ красных агароносных водорослей для нужд человека.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белки водорослей и возможные пути их использования. Растительные белки и их биосинтез. М., «Наука», 1975. 167 с. Авт.: Е. И. Медведева, С. В. Красильникова, К. А. Панченко, Е. Б. Петренко, Л. И. Бойко.
2. Биологическая характеристика водорослевых аминокислотных препаратов, полученных при комплексной переработке агароносов.—Сборник докладов Всесоюзного совещания по морской альгологии — макробиотентосу. М., 1974. 14 с. Авт.: Л. И. Бойко, К. А. Панченко, Е. Б. Петренко, С. В. Красильникова, Т. А. Качан, Е. И. Медведева.
3. Блэк У. А. Водоросли. Растительные белковые корма. М., «Колос», 1965. 546 с.
4. Влияние препарата, полученного из водоросли (филлофора), на привесы и состав крови телят.—«Животноводство», 1972, № 3. 82 с. Авт.: Н. И. Каранфилов, Р. О. Файтельберг, Г. П. Ткаченко, Е. И. Медведева, К. А. Панченко, Е. Б. Петренко, Г. Д. Лукина, Л. И. Бойко, Е. Ф. Селин.
5. Деревицкая В. А., Кара-Мурза С. Г., Кочетков Н. К. Структура групповых веществ крови.—«ДАН СССР», 1965, т. 163, № 3. 650 с.
6. Каверзнева Е. Д., Шамакова Ф. В. Гликопептиды в пепсиновых гидролизатах яичного альбумина.—«Биохимия», 1958, т. 23, вып. 5. 795 с.
7. Кочетков Н. К., Деревицкая В. А., Кара-Мурза С. Г. Расщепление пептидной цепи групповых веществ крови по оксинаминокислотным звеньям.—«Химия природных соединений», 1966, вып. 4. 271 с.
8. Красильникова С. В., Медведева Е. И. О некоторых особенностях щелочерастворимого белка водоросли *Furcellaria fastigiata*.—«Химия природных соединений», 1975, вып. 3. 400 с.
9. Медведева Е. И., Каганович Е. Б. О характере глобулина водоросли *Phyllophora pervosa*.—«Химия природных соединений», 1970, вып. 3. 351 с.
10. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. М., «Мир», 1965.
11. Нестерова Г. А., Каверзнева Е. Д., Михайлов А. Н. Действие некоторых протеаз на неколлагеновые компоненты кожного покрова животных.—«Прикладная биохимия и микробиология», 1970, т. 6, вып. 4. 430 с.
12. Об условиях сушки аминокислот.—«Гидролизная и лесохимическая промышленность», 1969, вып. 8, 21 с. Авт.: Е. И. Медведева, Б. М. Бобовников, Ю. П. Шолов, А. Т. Дружинина, С. В. Красильникова, К. А. Панченко, Е. Б. Петренко, Г. Д. Лукина.
13. О добавлении препарата аминокислот и пептидов в кормовую смесь.—«Рыбное хозяйство», 1971, № 5, 16 с. Авт.: В. С. Просяный, Л. Н. Швец, Ю. А. Желтов, Е. И. Медведева, С. В. Красильникова, Е. Б. Петренко.
14. Рассулин Ю. А., Каверзнева Е. Д. Характеристика комплекса протеолитических ферментов *Streptomyces griseus*.—«Биохимия», 1968, т. 33, вып. 4. 857 с.
15. Строение и некоторые свойства водоросли филлофоры.—«Биохимия», 1973, т. 38. Авт.: Е. И. Медведева, Г. Д. Лукина, Е. Ф. Селин, И. Г. Божко.
16. Сушка аминокислот в присутствии углеводов.—«Гидролизная и лесохимическая промышленность», 1974, вып. 4, 24 с. Авт.: Е. И. Медведева, К. А. Панченко, Е. Б. Петренко, Л. И. Бойко, Ю. И. Шинов, В. И. Форсов, Ю. П. Щедрин, Л. И. Дульник, Г. Ф. Рыбальченко.

17. Фрезер Р. Инфракрасная спектроскопия.— В кн.: Аналитические методы белковой химии, М., 1963, 329 с.

18. Medvedeva, E. J., S. V. Krasilnikova, K. A. Panchenko. Procédé d'obtention de produit riche en amionacids parter d'algues et de dechets resultant du traitement cellesi. Patent. France, 1968, N 155586.

19. Medvedeva, E. I., S. V. Krasilnikova, K. A. Panchenko. Method of producing of amino acid preparation from algae. Patent England 1969, No. 1166969.

20. Medvedeva, E. I., E. F. Selich, G. D. Lukina. Abstracts of communication presented at the Seventh Meeting of the Federation. Varna. 1971, No. 566. 218 p.

21. Medvedeva, E. I., S. V. Krasilnikova, K. A. Panchenko. Method of producing an amino acid preparation from algae and wastes from processing. Patent. Australia 1972, No. 420010.

22. Medvedeva, E. I., S. V. Krasilnikova, K. A. Panchenko. Fremgangs mate til fremstilling av et aminosyrepreparat fra algae eller avfall av alger. Patent. Norge 1973, No. 127599.

Peculiarities of algal glycoproteins and ways of using them

*E. I. Medvedeva, C. V. Krasilnikova,
K. A. Panchenko, E. B. Petrenko, L. I. Boiko*

SUMMARY

Using the modern methods of purification and investigations some peculiarities of the structure and composition of proteins in Phyllophora and Furcellaria are studied. It is shown that alkaline soluble proteins in the algae contain carbohydrates. Proceeding from the results of mild acid and alkaline hydrolysis, infrared spectroscopy, gel-filtration, methylating and periodate oxidation it is concluded that carbon and protein are chemically bound and the carbohydrate group is rather heavily branched in proteins from Phyllophora in particular. In order to use valuable proteins from Phyllophora and Furcellaria a method of making preparation of algal amino acids is suggested.