

УДК 577.15.156.1.644.3.38

ПЛАСТИНЫ. ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПИТАНИИ

В. М. Беликов, М. Ю. Гололобов

Рассмотрены теоретические и практические аспекты пластинной реакции, заключающейся в образовании геля при добавлении эндопептидазы в концентрированный раствор частичного гидролизата белка. Детально обсуждены свойства и возможности применения пластин в питании. Показано, что с помощью пластинной реакции можно получать полноценные белковые продукты питания из белков несбалансированного аминокислотного состава и химически синтезируемых аминокислот. Обсуждены другие направления пищевого использования пластин. Рассмотрены имеющиеся к настоящему времени работы, посвященные механизму и движущим силам пластинобразования.

Библиография — 143 ссылки.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1684
II. Условия и реагенты, необходимые для осуществления пластинной реакции	1685
III. Физические свойства и строение пластин	1686
IV. Влияние различных факторов на пластинобразование	1693
V. Включение различных аминокислот в пластин	1701
VI. Пищевое использование пластин	1704

I. ВВЕДЕНИЕ

Одна из важнейших задач пищевой промышленности в настоящее время — обеспечение быстро растущего населения земного шара полноценными продуктами питания, прежде всего белковыми. Белки, употребляемые человеком в пищу, должны быть нетоксичными, не иметь токсичных или других нежелательных примесей и быть сбалансированными по аминокислотному составу, т. е. содержать прежде всего незаменимые аминокислоты* в нужных количествах и пропорциях^{1, 2}. Животные белки полностью удовлетворяют указанным требованиям, но резкое увеличение их производства, необходимое для удовлетворения потребностей человека, наталкивается на многие трудности как экономического, так и технического характера. Поэтому все более насущной становится задача широкого использования белков, полученных из нетрадиционных источников, например растительного или микробиологического происхождения.

Однако такие белки обычно содержат токсичные и другие нежелательные примеси и имеют несбалансированный аминокислотный состав. Для широкого использования в питании человека белков из нетрадиционных источников необходимо, во-первых, освободить эти белки от примесей и, во-вторых, сбалансировать их аминокислотный состав. Для улучшения аминокислотного состава белка необходимо, как правило, увеличить в нем содержание незаменимых аминокислот. С экономической точки зрения наиболее перспективным является использование для это-

* Незаменимыми называются аминокислоты, которые в организме человека не синтезируются и должны поступать в его организм в составе продуктов питания. К ним относятся: изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин. Гистидин является незаменимой аминокислотой только для детей².

го химически синтезируемых аминокислот, которые можно получать в больших количествах из дешевого сырья³. Поскольку наличие в пищевых белковых продуктах свободных аминокислот отрицательно влияет на их пищевую ценность, то необходимо, чтобы добавленные незаменимые аминокислоты находились в конечном продукте в виде полипептидов, состоящих из одной или разных аминокислот. Одним из способов получения чистых высокопитательных белковых продуктов из загрязненных, несбалансированных по аминокислотному составу белков и химически синтезируемых аминокислот является применение так называемой пластеиновой реакции.

Почти 100 лет тому назад А. Я. Данилевский нашел, что при добавлении желудочного сока к концентрированному раствору ферментативного гидролизата какого-нибудь белка через некоторое время образуется непрозрачный раствор, постепенно переходящий в гель⁴. Позже Завьялов предложил назвать эту реакцию пластеиновой, а получившийся гель — пластеином⁵. До конца 50-х годов нашего века пластеиновая реакция рассматривалась как возможный путь синтеза белков в организме человека, однако после открытия действительного механизма биосинтеза белка⁶⁻⁹ исследования пластеинообразования временно прекратились. Интерес к пластеиновой реакции вновь возрос в начале 70-х годов нашего века, поскольку она во многих случаях оказалась удобной для получения продуктов питания.

Наиболее вероятным представляется применение пластеиновой реакции для следующих практических целей: 1) очистка белков и получение белковых продуктов с необходимым аминокислотным составом; 2) удаление горечи из ферментативных гидролизатов белка; 3) приготовление высокопитательных белковых паст и желе для использования их в качестве наполнителей в различных пищевых продуктах, а также способных иметь самостоятельное пищевое значение; 4) приготовление смесей пептидов с определенными запахом, вкусом и другими характеристиками для использования их в качестве пищевых добавок и отдушек.

Различные аспекты пластеиновой реакции были рассмотрены в обзорах¹⁰⁻¹⁷. Из этого рассмотрения видно, что хотя пути практического использования пластеинов в целом уже определены, многое, особенно с теоретической точки зрения, остается неясным. Подведению итогов исследований, выполненных в данной области к настоящему времени, и рассмотрению перспектив пластеиновой реакции и посвящен настоящий обзор.

II. УСЛОВИЯ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ПЛАСТЕИНОВОЙ РЕАКЦИИ

Пластеиновая реакция протекает в более концентрированных, чем 10%-ные, растворах пептидов¹⁸⁻²¹ молекулярной массы от 500 до 1500^{5, 22-30} при pH реакционной смеси от 4 до 7^{22, 23, 31-33}.

В настоящее время можно вероятно считать доказанным, что пластеины получают при действии любой эндопептидазы на гидролизаты практически любых белков. Гидролизаты могут быть получены как при действии любой из эндопептидаз, так и путем частичного неферментативного гидролиза белка. Подробно влияние свойств используемого фермента и белка на пластеинообразование будет рассмотрено ниже в разделе, посвященном влиянию различных факторов на протекание пластеиновой реакции. Необходимо отметить, что до сих пор не было проведено экспериментального исследования вопроса о том, какие свойства того или иного пластеина можно считать общими для всех пластеинов, а какие зависят от способа его получения.

III. ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СТРОЕНИЕ ПЛАСТИНОВ

1. Строение пластинов

Пластины по строению напоминают денатурированные белки. Рентгеновские исследования пластинов показали наличие линейных полипептидов с плотно упакованными предельно вытянутыми цепями^{23, 34}; у исследуемых пластинов не было обнаружено структур, сходных со вторичными и третичными структурами белка, из гидролизата которого они были получены. То, что при пластинообразовании не происходит восстановления структуры исходного белка, подтверждается отсутствием ферментативной активности у пластинов, полученных из гидролизатов пепсина и трипсина³⁵, а также отсутствием гормональной активности у пластинов, полученных из инсулина³⁶. Иммунологическая активность некоторых пластинов объясняется захватом некоторого количества активного фермента и примесей из исходного белка^{31, 37-40}. Денатурирующие агенты не влияют на растворимость пластинов, что указывает на отсутствие у них упорядоченной структуры⁴¹. Третичная структура типа α -спирали, возможно, существует только у обогащенных глутаминовой кислотой пластинов, у которых содержание последней составляет 42% против 24% в исходном белке. Спектры кругового дихроизма растворов таких пластинов свидетельствуют о возможности образования остатками глутаминовой кислоты олигомеров со структурой типа α -спирали⁴²; спектры кругового дихроизма обычных пластинов не указывают на наличие у них таких структур. Одно время полагали, что в структуре пластинов большую роль играют циклические полипептиды^{43, 44}. В посвященных пластиновой реакции работах последних лет таких предположений не высказывается.

Таким образом, перечисленные выше данные говорят о том, что пластины представляют собой конгломерат перепутанных полипептидных цепей различной длины и строения.

2. Свойства пластинов

Несмотря на то, что пластины отличаются от исходных белков своими вторичными и третичными структурами, они напоминают белки по многим химическим и физическим свойствам. Они расщепляются различными протеолитическими ферментами, как эндо-, так и экзопептидазами^{20, 23, 42, 45-47}. Пластины имеют минимум растворимости в районе изоэлектрической точки и показывают зависимость растворимости от pH раствора, аналогичную зависимости для исходного белка⁴⁸. Изоэлектрическая точка определена для пластинов, полученных при действии α -химотрипсина на пепсиновый гидролизат соевого белка. Методом изоэлектрического фокусирования показано, что она лежит в области pH от 3,7 до 4,8^{42, 48}. Изоэлектрическое фокусирование пластина, обогащенного глутаминовой кислотой, показало, что такой пластин имеет несколько изоэлектрических зон в районе pH от 1,5 до 4,0. Пластины, полученные из сывороточного альбумина человека и из казеина, оказались в отличие от исходных белков электрофоретически однородными, причем их электрофоретическая подвижность несколько меньше электрофоретической подвижности исходных белков. Пластины, синтезированные из различных белков, несколько отличаются между собой по электрофоретической подвижности^{43, 49-51}. Пластины, как и белки, реагируют с нингидрином с образованием окрашенных соединений, образуют комплексы с ионами Cu^{2+} и осаждаются такими типичными осадителями белков как трихлоруксусная кислота или различные красители^{20, 44, 52-55}.

3. Молекулярные массы пластеинов

Молекулярные массы пластеинов определялись неоднократно и различными методами, однако вопрос о том, какую молекулярную массу могут иметь пластеины и от чего она зависит, не решен окончательно. Величины молекулярных масс и применяемые для их определения методы представлены в табл. 1.

ТАБЛИЦА 1

Молекулярные массы пластеинов и методы их определения

Величина молекулярной массы	Метод	Ссылки
Гидролизат 685—1045, пластеин 25000	Электрофорез в полиакриламидном геле	22
Пластеин < 21000	Электрофорез в полиакриламидном геле	32
Пластеин > 1200	Электрофорез в полиакриламидном геле; осаждение трихлоруксусной кислотой, красителями	41
Гидролизат 1280, пластеин без добавок 12050, пластеин, обогащенный глутаминовой кислотой 6240	Аминный азот по Ван-Слайку	42
Пластеин < 1000	Ультрацентрифугирование	44
Пластеин 250000—500000	Ультрацентрифугирование	57
Пластеин ~ 5000	Ультрацентрифугирование	58
Гидролизат 1550, пластеин 5490	Аминный азот по Ван-Слайку	59
Пластеин без добавок 12000, пластеин, обогащенный глутаминовой кислотой 6500	Электрофорез в полиакриламидном геле	60
Пластеин, обогащенный метионином 12000	Аминный азот по Ван-Слайку	61
Молекулярный вес при пластеинообразовании не меняется	Хроматография на сефадексе	62
Гидролизат 1089, пластеин без добавок 2748, пластеин, обогащенный триптофаном 3019, треонином 2832, лизином 2791	Аминный азот по Ван-Слайку	63
Пластеин 5000—6000	Аминный азот по методу медных комплексов и криоскопически	64
Пластеин ~ 1000	Ультрацентрифугирование	65
Пластеин 300	Криоскопия	66
Показано, что пластеины не содержат низкомолекулярных пептидов в отличие от субстрата	Хроматография на сефадексе	67
		68

Необходимо отметить, что чрезвычайно высокое значение молекулярной массы, найденное в работе ⁵⁷, обусловлено, по-видимому, ярко выраженной способностью пластеинов к агрегации; вследствие этого определяется молекулярная масса не самих полимерных молекул, составляющих пластеины, а их агрегатов, связанных за счет гидрофобных взаимодействий ⁴⁸. Что касается остальных значений молекулярных масс, то трудно сказать, чем вызвано наблюдаемое различие. Единственная закономерность проявляется в том, что пластеины, обогащенные глутаминовой кислотой, имеют меньшую молекулярную массу. Пластеины полидисперсны ⁵⁸, и наиболее вероятно, что в большинстве случаев величины их молекулярных масс находятся в интервале от 5 до 15 тыс. ^{41, 42, 58—61}.

Однако имеются достаточно достоверные данные, свидетельствующие, что молекулярная масса при пластеинообразовании не изменяется ^{42, 52, 62}. По-видимому, при разных условиях проведения процесса преобладает либо реакция поликонденсации, в результате которой молекулярная масса увеличивается, либо реакция транспептидации, при

которой молекулярная масса остается без изменений. В настоящее время нельзя указать точно, благодаря изменению каких именно условий меняется механизм пластеинообразования, что приводит к получению образцов пластеинов с различными молекулярными массами. Факторы, предполагаемые в различных работах ответственными за изменение механизма пластеиновой реакции, будут рассматриваться далее по мере изложения материала.

4. Аминокислотный состав и растворимость различных фракций пластеинов *

Пластеины в целом отличаются плохой растворимостью во всех исследованных растворителях и смесях. К сожалению, в большинстве работ растворимость пластеинов изучалась только качественно. Ориентировочно можно считать, что при рН 4,0 растворимость пластеинов в воде <1% ⁴². Чем выше концентрация гидролизата, из которого образуется пластеин, тем больше вес растворимой в воде фракции ⁴¹.

Изучена растворимость пластеинов в зависимости от рН раствора,

ТАБЛИЦА 2

Зависимость растворимости пластеина, синтезируемого пепсином из пепсинового гидролизата соевого белка, от значений рН раствора⁴⁸

рН	A_{600}^*	рН	A_{600}	рН	A_{600}^*	рН	A_{600}
2,0	0,155	4,5	0,307	6,0	0,253	10,0	0,009
4,0	0,294	5,0	0,267	8,0	0,206	—	—

* Определение проводилось турбидиметрическим методом; A_{600} — оптическая плотность суспензии пластеина при 600 н.м.

его ионной силы, от концентрации мочевины, хлорида гуанидина, додецилсульфата натрия ^{47, 48, 62, 53}. Зависимость растворимости пластеина, синтезированного пепсином из пепсинового гидролизата соевого белка, от рН раствора представлена в табл. 2. Видно, что, исследованный пластеин имеет минимум растворимости при рН ~4, т. е. в районе изoeлектрической точки ⁴². Можно предположить поэтому, что все пластеины будут иметь минимум растворимости при рН 3—4, поскольку именно в этом районе значений рН лежат изoeлектрические точки большинства пептидов. Данные о растворимости пластеинов в концентрированных кислотах и щелочах противоречивы. Показано ^{20, 53}, что некоторые пластеины растворяются в концентрированных азотной и соляной кислотах. С другой стороны, имеются данные, утверждающие противоположное ²⁴. В концентрированных щелочах пластеины, по-видимому, растворяются лучше ^{20, 24, 50}.

Отмечено, что от ионной силы в нейтральных растворах растворимость пластеинов зависит слабо, и при увеличении ионной силы от 0,1 до 1 она увеличивается только на 40% ⁴⁸. Однако наиболее вероятно, что

* Аминокислотный состав исходных белков и различных фракций пластеинов, выделяемых главным образом по их растворимости в воде, приведен в работах ^{19, 41, 42, 48, 52, 57, 63, 69—77}. Необходимо отметить, что под понятием «аминокислотный состав пластеинов» обычно понимают аминокислотный состав выделенной тем или иным способом фракции продукта пластеинообразования. Аминокислотный состав пластеинов в целом меняться не должен. При сравнении аминокислотных составов различных фракций пластеинов влияние способа фракционирования на аминокислотный состав фракции, как правило, не рассматривается, что может приводить к неправильным выводам о природе и механизме образования пластеинов.

у разных пластенинов зависимость растворимости от величины ионной силы разная. Замечено⁵³ высаливание пластенинов из их растворов в 0,025 М водном растворе едкого натра при добавлении NaCl. В некоторых случаях отмечалось, что зависимость растворимости пластенинов от величины ионной силы имеет вид кривой с минимумом при ионной силе 0,5⁷⁸.

Растворимость пластенинов сильно увеличивается в водных растворах мочевины, хлорида гуанидина и додецилсульфата натрия, причем действие 6 М водного раствора мочевины или хлорида гуанидина эквивалентно действию $2 \cdot 10^{-3}$ М водного раствора додецилсульфата натрия^{37, 48}. Некоторые пластенины⁶² хорошо растворяются также в 50%-ном водном растворе уксусной кислоты и в 2 М водном растворе перхлората натрия при pH 6—7. Точный механизм действия этих растворителей на пластенины и белки неизвестен, но весьма вероятно, что они уменьшают гидрофобные взаимодействия, чем способствуют переходу неполярных аминокислотных остатков в водную фазу^{79—81}.

ТАБЛИЦА 3

Аминокислотный состав различных фракций пластенина, полученного при помощи пепсина из пепсинового гидролизата соевого белка⁴¹

Аминокислота	Содержание аминокислоты в данной фракции, масс.% *			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
Asp	17,92	11,21	5,42	11,83
Glu	37,22	7,21	5,89	14,90
Lys	5,73	6,03	6,65	3,54
Arg	3,25	3,20	1,12	1,76
His	1,10	1,50	0,62	0,87
Met	0,74	1,70	0,95	0,38
Cys	0,73	2,26	1,21	1,34
Trp	0,63	2,47	0,79	1,72
Gly	5,79	5,26	5,10	3,52
Ser	6,93	5,95	4,75	7,24
Thr	2,05	3,72	2,55	2,53
Ala	2,67	4,95	6,02	3,34
Val	2,00	5,39	8,41	4,60
Leu	4,51	16,91	31,00	22,34
Pro	4,84	10,83	7,70	5,39
Tyr	0,63	1,23	1,32	1,84
Ile	1,76	4,40	7,61	5,96

* Фракция № 1 растворяется в нейтральных буферных растворах; фракция № 2 не растворяется в нейтральных буферных растворах, но растворяется в растворе додецилсульфата натрия; фракция № 3 не растворяется ни в нейтральных буферных растворах, ни в растворе додецилсульфата натрия; фракция № 4 растворяется в 50%-ном водном этаноле, но не растворяется в воде.

ТАБЛИЦА 4

Аминокислотный состав фракции пластенина *, растворимой в 50%-ном водном этаноле, но не растворимый в воде (P), по сравнению с аминокислотным составом исходного гидролизата (S)⁷⁴

Аминокислоты	S	P	P/S
Asp	1,25	0,85	0,69
Glu	1,35	0,84	0,62
Lys	0,87	0,68	0,78
Arg	0,40	0,39	0,98
Gly	1,00	1,00	1,00
Ser	0,76	0,79	1,04
Thr	0,62	0,57	0,92
Ala	1,31	1,32	1,01
Val	0,76	1,18	1,55
Leu	0,91	2,98	3,27
Pro	0,23	0,68	2,44
Phe	0,45	1,39	3,09
Tyr	0,50	0,60	1,20
Ile	0,62	1,15	1,85

* Пластенины синтезировали при помощи биопразы из пепсинового гидролизата белка пекарских дрожжей. Весовое содержание глицина принято за единицу.

Увеличение растворимости пластенинов при действии веществ, уменьшающих гидрофобные взаимодействия, позволяет предположить, что пластенины плохо растворимы в воде именно благодаря гидрофобности полипептидных цепей пластенинов. Следовательно, должно наблюдаться увеличение содержания гидрофобных аминокислот в нерастворимой в воде фракции. Из данных, помещенных в табл. 3 и 4, видно, что нерастворимой в додецилсульфате натрия фракции гидрофобных аминокислот значительно больше, чем во фракции, нерастворимой в буферном раство-

ре. Увеличивается содержание гидрофобных аминокислот и во фракции, растворимой в 50%-ном водном этаноле, но нерастворимой в воде. Иначе говоря, чем труднее фракция пластеина растворима в воде, тем больше в ней гидрофобных аминокислот, независимо от того, каким ферментом и из какого гидролизата получают пластеин. Все это свидетельствует о том, что плохая растворимость пластеинов обусловлена накоплением в плохо растворимой фракции гидрофобных аминокислот⁴⁸.

Отличие в аминокислотном составе обнаруживается также у тех фракций, которые отделяли от реакционной смеси ультрафильтрацией

ТАБЛИЦА 5

Аминокислотный состав высокомолекулярной фракции пластеина, полученного при действии папаина на папаиновый гидролизат зеина, по сравнению с аминокислотным составом исходного белка⁴⁸

Аминокислоты	Содержание аминокислот, масс. %		γ *	Аминокислоты	Содержание аминокислот, масс. %		γ *
	белок	пластеин			белок	пластеин	
Asp	4,61	3,91	0,85	Ser	4,42	4,28	0,97
Glu	21,70	13,02	0,60	Thr	2,40	2,13	0,89
Lys	0,20	0,19	0,95	Ala	7,56	8,77	1,16
Arg	1,56	1,74	1,11	Val	3,62	6,20	1,71
His	1,07	1,06	0,99	Leu	20,18	23,49	1,16
Met	1,58	2,04	1,29	Pro	10,93	9,37	0,86
Cys	1,00	0,92	0,92	Phe	6,63	6,98	1,05
Try	0,32	0,33	1,03	Tyr	4,73	5,54	1,17
Gly	1,48	1,52	1,03	Ile	4,39	5,67	1,29

* γ — отношение содержания аминокислот в образце пластеина к их содержанию в белке.

или диализом, т. е. фракций, состоящих из пептидов с молекулярным весом выше некоторой определенной величины. Из представленных в табл. 5 данных видно, что в этом случае в исследуемой фракции также наблюдается увеличение содержания гидрофобных и уменьшение содержания гидрофильных аминокислот по сравнению с исходным гидролизатом, хотя и не столь ярко выраженное.

Таким образом, можно предположить, что растворимость какой-либо фракции пластеинов в первую очередь определяется ее аминокислотным составом, причем в процессе пластеинообразования происходит пере-

ТАБЛИЦА 6

Увеличение содержания по весу (γ) некоторых аминокислот в высокомолекулярных (молекулярный вес >500) фракциях пластеинов из разных белков * при введении в реакционную смесь этиловых эфиров этих аминокислот¹⁹

Аминокислота	Номер белка				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Lys	—	1,36	1,69	1,37	9,29
Glu	2,80	—	—	—	—
Met	6,76	8,40	6,0	2,79	—
Try	—	1,81	1,94	1,25	—

* Глутаминовая кислота использовалась в виде α , γ -дизеилового эфира. При проведении пластеиновой реакции обычным способом содержание этих аминокислот в исследуемой фракции пластеинов уменьшается. Использовались белки из сои (белок № 1), клевера *Trifolium repens* L. (белок № 2), морской водоросли *Spirulina maxima* (белок № 3), бактериальный белок из *Phodopseudomonas capsulatis* (белок № 4), а также глютен (белок № 5).

группировка аминокислотных остатков с образованием труднорастворимой фракции с повышенным содержанием гидрофобных аминокислот.

Показана возможность изменения аминокислотного состава высокомолекулярной фракции пластеинов при добавлении в исходную реакционную смесь этиловых эфиров аминокислот. Типичные величины изменения аминокислотного состава в этом случае представлены в табл. 6. Видно, что аминокислотный состав высокомолекулярной фракции может ме-

ТАБЛИЦА 7

Зависимость растворимости при комнатной температуре от pH раствора для соевого белка (А), пластеина, синтезированного при помощи палаина из пепсинового гидролизата соевого белка (Б), и пластеина, обогащенного глутаминовой кислотой из того же гидролизата палаином (В). Содержание глутаминовой кислоты в (А) и (Б) равно 24%, в (В) — 42% ⁴²

Обра- зец	Процентное содержание азота в растворе по отношению к общему азоту пробы в 1%-ной смеси при указанных значениях pH							
	1	2	3	4	5	6	7	9
А	75,1	80,2	70,3	12,5	18,3	44,4	83,7	97,5
Б	90,2	88,5	81,0	75,0	77,2	80,3	83,5	87,4
В	98,1	98,0	97,6	97,5	97,7	98,0	98,3	98,3

няться довольно значительно по сравнению с аминокислотным составом той же фракции данного пластеина, полученного обычным способом — без добавления в реакционную смесь этиловых эфиров аминокислот. Механизм этого процесса и возможные пути использования таких пластеинов будут обсуждаться в следующих главах. Пока укажем, что полученные образцы высокомолекулярных фракций пластеинов, обогащенных глутаминовой кислотой, обладают значительно большей растворимостью и по сравнению с пластеинами неизмененного состава, и по сравнению с исходным белком ⁴².

Из представленных в табл. 7 данных видно, что введение глутаминовой кислоты позволяет существенно повысить растворимость пластеинов. На растворимость пластеинов, обогащенных глутаминовой кислотой, не влияет нагревание раствора при 60° С в течение 30 мин, в то время как растворимость обычных пластеинов при тех же условиях уменьшается в три раза ⁴². Это указывает на большой вклад гидрофобных взаимодействий в образование пластеинов ⁸²⁻⁸⁴. Повышенная растворимость и термическая стабильность пластеинов, обогащенных глутаминовой кислотой, обусловлены, вероятно, их сравнительно небольшим молекулярным весом и повышенным содержанием глутаминовой кислоты, в результате чего гидрофобные взаимодействия в таких пластеинах сильно ослаблены.

5. Реологические свойства пластеинов

Реологические свойства пластеинов были систематически изучены на примере пластеина, полученного при помощи биопразы из пепсинового гидролизата соевого белка ⁴⁸. Показано, что полученные гели пластеинов являются тиксотропными, причем с увеличением начальной концентрации субстрата реологические свойства меняются в направлении от пластичности к эластичности. Это свидетельствует в пользу того, что пластеины являются типичными коагуляционными структурами ⁸⁵, т. е. структурами, получающимися за счет сцепления частиц силами Ван-дер-Ваальса. Основным условием образования коагуляционных структур

является мозаичность, неоднородность строения, наличие относительно гидрофобных участков цепи на поверхности частиц, покрытых сольватными оболочками. На этих гидрофобных участках возникают точечные контакты — первичные звенья структуры. Действительно, исследования показывают, что именно гидрофобные силы являются причиной гелеобразования при получении пластеинов^{41, 48}.

Таким образом, реакция гелеобразования при получении пластеинов относится к третьему классу переходов раствор — гель⁸⁶. К этому классу переходов принадлежат процессы, в которых гель образуется за счет потери растворимости растворенным веществом, при изменении температуры, при замене растворителя или при протекании химической реакции. В исходном растворе субстрата все частицы гидратированы. В результате химической реакции образуются менее склонные к гид-

ТАБЛИЦА 8

Относительная вязкость (η) 5%-ного раствора или суспензии соевого белка, пепсинового гидролизата соевого белка и различных образцов пластеинов, полученных из пепсинового гидролизата соевого белка при помощи биопразы¹⁸ *

Образец	Гидролизат	Соевый белок	P-10	P-20	P-25	P-30	P-35	P-45
η	13	33	9,3	12,5	15	15,8	19	14

* Исследовались образцы пластеинов, полученные из гидролизатов с начальной концентрацией субстрата 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 45%. Эти образцы обозначены соответственно P-10, P-20, P-25, P-30, P-35, P-45.

ратации частицы; это приводит к тому, что их слияние становится термодинамически выгодным процессом за счет увеличения энтропии системы^{82, 83, 87}.

Из исследованных реологических свойств образцов пластеинов, полученных при разной начальной концентрации субстрата, следует, что наиболее развитая сетчатая структура наблюдается у образцов, которые получали из 35%-ного раствора гидролизата¹⁸. При дальнейшем повышении концентрации субстрата продукт пластеиновой реакции затвердевает и начинает проявлять свойства конденсационно-кристаллизационных структур⁸⁵. Большую прочность структур, полученных из растворов субстрата с начальной концентрацией выше 35%, подтверждает тот факт, что такие образцы не расслаиваются с освобождением воды даже при центрифугировании в течение 30 мин при 6500 g при комнатной температуре^{18, 88}. Интересно, что полученные гели пластеинов практически не обнаруживают явления синерезиса.

Изучена относительная вязкость различных образцов пластеинов в зависимости от их концентрации в растворе или суспензии¹⁸. Результаты исследования относительной вязкости 5%-ной суспензии образцов представлены в табл. 8. Вязкость образца P-10 меньше вязкости гидролизата. Это говорит о том, что при концентрации субстрата 10% в значительной степени проходит гидролиз субстрата, что приводит к уменьшению вязкости. Резкое падение вязкости от образца P-35 к образцу P-45 является, по-видимому, следствием качественной перестройки структуры пластеина от коагуляционной к конденсационно-кристаллизационной при начальной концентрации субстрата >35%.

Для понимания движущих сил пластеиновой реакции рассмотрим, насколько важно с термодинамической точки зрения образование осадка и геля при пластеинообразовании. На термодинамику пластеиновой ре-

акции оказывают влияние только свойства пептидов, составляющих субстрат, поскольку фермент добавляют в таком количестве, что он не может существенно влиять на положение равновесия системы. Изучению термодинамики пептидной связи посвящено сравнительно небольшое количество работ⁸⁹⁻⁹⁶. К сожалению, из-за трудностей экспериментального характера изучали термодинамические параметры только защищенных дипептидов и некоторых производных аминокислот. Можно показать, что гидролиз защищенного дипептида является хорошей, с термодинамической точки зрения, моделью гидролиза длинного пептида, при гидролизе которого не меняются константы ионизации концевых ионогенных групп. Как будет показано в разделе, посвященном влиянию длины пептидов субстрата на пластеинообразование, синтез и гидролиз пептидов именно такой длины происходит при пластеиновой реакции. Было найдено, что величина изменения стандартной свободной энергии при гидролизе длинного полипептида до более коротких пептидов отрицательна и составляет от $-0,5$ до $1,5$ ккал/моль. Если принять, что в качестве субстрата используется смесь пептидов со средней молекулярной массой 1000, а концентрация субстрата в реакционной смеси равна 50%, то молярная концентрация субстрата равна 0,5 М. Учитывая указанные выше значения изменений стандартной свободной энергии при гидролизе, легко подсчитать, что в реакционной смеси будет содержаться от 2 до 12% димеров первоначально взятых пептидов. Ясно, что пептидов с более высокой степенью полимеризации будет содержаться совсем ничтожное количество.

Таким образом, уменьшение свободной энергии системы при пластеинообразовании не может быть обусловлено образованием новых пептидных связей в концентрированных растворах белковых гидролизатов. Следовательно, главной движущей силой пластеинообразования является увеличение энтропии системы, которое происходит при слиянии гидрофобных аминокислотных цепей, образованных путем перегруппировки аминокислотных остатков исходных пептидов. К сожалению, до сих пор ни в одном случае пластеинообразования не было проведено сравнение аминокислотных последовательностей пептидов, составляющих субстрат и пластеин.

Таким образом, несмотря на то, что реологические свойства пластеинов изучены на весьма ограниченном числе объектов, проведенные исследования позволяют не только оценить возможные пути практического использования пластеинов (см. гл. VI), но и сделать определенные выводы о движущих силах пластеинообразования и строения их молекул.

IV. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ПЛАСТЕИНООБРАЗОВАНИЕ

Для корректного рассмотрения влияния различных факторов на пластеинообразование необходимо точно знать, находится ли система в момент измерения в состоянии термодинамического равновесия, или нет. К настоящему времени не ясно, относятся ли к равновесным наблюдаемые выходы пластеиновой реакции. В одних исследованиях показано, что параметры процесса перестают изменяться во времени через 6—8 час⁴⁸, в других указывается, что для этого требуется 2—3 суток⁷³. Никаких закономерностей в этом вопросе пока не обнаружено. Неизвестно также, одновременно ли перестают изменяться все параметры системы, например, такие как, мутность, молекулярный вес, количество фракции, осаждаемой в 10%-ном растворе трихлоруксусной кислоты и др. Но даже если было бы известно, что все параметры к некоторому времени пе-

рестают изменяться, существует возможность того, что система при этом находится в локальном минимуме свободной энергии и активационный барьер дальнейшего превращения слишком велик, т. е. система неравновесна, но кинетически заторможена. В силу этих причин понятие выхода пластеиновой реакции лучше заменить понятием эффективности пластеиновой реакции, понимая под этим степень пластеинообразования при некоторых указанных условиях по некоторому указанному параметру.

1. Зависимость эффективности пластеинообразования от характеристик используемого белка

В работе ⁹⁷ изучали эффективность пластеинообразования в зависимости от того, пепсиновый гидролизат какого белка брали в качестве субстрата. Эффективность пластеинообразования оценивали по количеству пластеина, осаждаемого в 10%-ном растворе трихлоруксусной кислоты. Опыты проводили при концентрации субстрата 20% и концентрации α -химотрипсина, синтезирующего пластеин, равной 0,1%. Смесь инкубировали в течение 24 час при 37° С, затем добавляли раствор трихлоруксусной кислоты такой концентрации, чтобы ее конечная концентрация равнялась 10%. В этих условиях пластеинообразование из гидролизата соевого белка проходит на 94%, белка трески — на 58%, смеси белка трески и соевого белка в отношении 9:1 на 61%, белка хлореллы — на 54%, глютена — на 80%, казеина — на 35%, белка из пекарских дрожжей — на 65%, нефтяных дрожжей — на 93%.

Как было упомянуто выше, образование нерастворимой в воде фракции является одним из главных движущих факторов пластеиновой реакции. Гидрофильные субстраты не образуют пластеинов со значительными выходами из-за того, что продукты пластеиновой реакции при этом растворимы и с трудом удаляются из системы ^{97, 98}. Так, попытки синтезировать пластеины из высоко гидрофильного белка — желатины окончились неудачей ^{53, 98}. С другой стороны, если гидролизат слишком гидрофобен, продукт легко осаждается еще до того, как реакция пластеинообразования проходит на значительную глубину ⁹³.

В работе ⁹⁹ показано, что, зная выход пластеиновой реакции по высокомолекулярной фракции для гидролизатов отдельных белков, можно предсказать, при каком соотношении компонентов выход пластеиновой реакции по высокомолекулярной фракции будет максимальным для их смеси. С этой целью был введен параметр, обозначенный β/α , где β — нерастворимость пластеина, определяемая как отношение азота, нерастворимого в 20%-ном водном растворе ацетона, к общему содержанию азота в пластеине; α — выход пластеиновой реакции, равный отношению количества азота, осаждаемого в 10%-ном растворе трихлоруксусной кислоты, к общему содержанию азота в пластеине. На большом экспериментальном материале показано, что для любых субстратов и их смесей график зависимости выхода пластеиновой реакции по его высокомолекулярной фракции от параметра β/α имеет колоколообразный характер с максимумом при $\beta/\alpha \sim 0,5$. При этом зависимость параметра β/α от соотношения содержания (по весу) двух субстратов линейна. Таким образом, соотношение субстратов в смеси, при котором пластеиновая реакция будет иметь максимальный выход по высокомолекулярной фракции, можно вычислить по формуле,

$$x/y = \frac{0,5 - \beta/\alpha(x)}{\Delta\beta/\alpha},$$

где x/y — отношение весовых частей двух субстратов;

$\beta/\alpha(x)$ — значение параметра β/α для субстрата x ;

$\Delta\beta/\alpha$ — разность между значениями параметра β/α субстратов x и y .

Таким образом, при использовании параметра β/α возможно подбирать смеси субстратов, дающие максимальный выход пластеиновой реакции по высокомолекулярной фракции.

2. Влияние строения субстрата на эффективность пластеинообразования

Рассмотрим требования, которым должны удовлетворять входящие в состав субстрата пептиды для того, чтобы пластеинообразование проходило наиболее успешно.

В работе²² сравнивалась эффективность фракций гидролизата соевого белка различного молекулярного веса в пластеиновой реакции. Начальная концентрация субстрата 35%, отношение весовых концентраций субтилизина BPN' и субстрата 0,01. Реакционную смесь инкубировали 24 час при 37° С. Интенсивность пластеинообразования оценивалась по количеству осаждаемой фракции в 10%-ном растворе трихлоруксусной кислоты. Результаты исследования представлены в табл. 9. Из данных

ТАБЛИЦА 9

Зависимость эффективности пластеинообразования от величины молекулярного веса субстрата²²

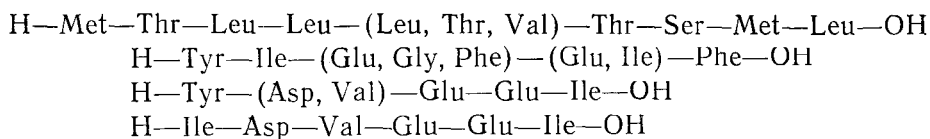
Молекулярный вес	Процентное содержание фракции, осаждаемой 10%-ной трихлоруксусной кислотой, после инкубации:		Молекулярный вес	Процентное содержание фракции, осаждаемой 10%-ной трихлоруксусной кислотой, после инкубации:	
	с ферментом	без фермента		с ферментом	без фермента
>1043	6,6	3,3	685	33,2	0,0
1043	23,0	0,0	<685	0,0	0,0

табл. 9 можно сделать вывод, что наиболее эффективно идет пластеинообразование в системе, которая содержит пептиды, состоящие из 5—8 аминокислотных остатков^{5, 22—24}. Кроме того, найдено, что пластеиновая реакция проходит наиболее эффективно, если глубина гидролиза исходного белка такова, что в 10%-ном растворе трихлоруксусной кислоты осаждается 20% гидролизата (по весу)^{10, 15, 25}. Синтез пластеинов и пептидов из чистых аминокислот кончился неудачей^{26, 27}. То, что свободные аминокислоты не принимают участия в пластеиновой реакции, подтверждают многочисленные опыты, показавшие невозможность обогащения пластеина аминокислотами при введении их в реакционную смесь в свободном виде^{52, 94}, а также то, что из недифференцируемой фракции белкового гидролизата пластеинообразование проходит успешнее³².

Существует мнение, что при увеличении молекулярной массы субстрата механизм пластеинообразования изменяется от поликонденсации к транспептидации²³. Одной из непонятных особенностей пластеиновой реакции является характер изменения содержания аминного азота в реакционной смеси при образовании пластеинов. Отмечено, что в исследуемом процессе количество первичных аминогрупп может уменьшаться^{47, 64}, возрастать^{25, 62}, оставаться неизменным^{32, 101}, проходить через минимум^{23, 32, 68}. Весьма вероятно, что при использовании 5—8-членных пептидов протекает реакция поликонденсации, сопровождающаяся уменьшением содержания первичных аминогрупп в реакционной смеси.

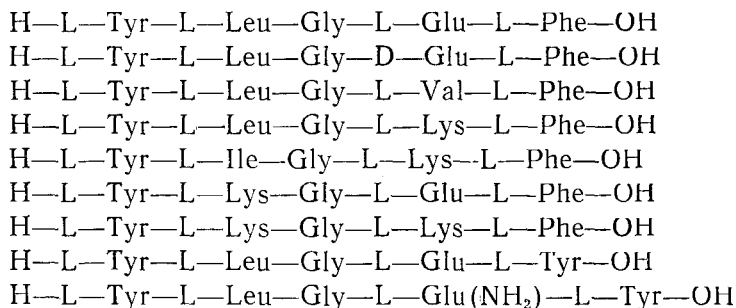
В дальнейшем после достижения некоторой критической длины пептидов происходит главным образом перегруппировка аминокислотных остатков с образованием плохо растворимых пептидов и освобождением свободных аминокислот и низкомолекулярных пептидов^{23, 73}. Это приводит к тому, что содержание первичных аминогрупп в реакционной смеси возрастает. Возможно, что противоречивые данные по изменению содержания аминного азота при пластеинообразовании объясняются использованием субстратов различной молекулярной массы.

Очень интересен вопрос о том, из каких аминокислот должны состоять пептиды, чтобы из них могли образоваться пластеины. В предыдущей главе указывалось, что белки для того, чтобы их гидролизаты образовывали пластеины с хорошим выходом, должны иметь среднюю гидрофобность. Впервые идентифицировать пластеин-активные пептиды удалось в работах¹⁰²⁻¹⁰⁴. Было показано, что пептиды, образующие пластеин при действии пепсина и α -химотрипсина, имеют следующее строение:



Строение этих пептидов показывает, что эффективность пластеинообразования в первую очередь определяется конечной аминокислотой. Это предположение впервые высказано в работе⁵¹.

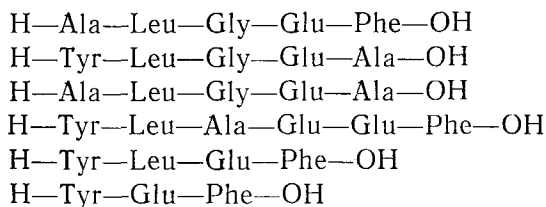
Для установления взаимосвязи между структурой пептидов и их способностью к образованию пластеинов были проведены исследования с использованием в качестве субстратов различных пептидов определенного строения^{24, 28-30, 105, 106}. Пластеиновую реакцию проводили при помощи пепсина при pH 4,0 и химотрипсина при pH 8,6. Использовали 25—50%-ный раствор субстрата, который инкубировали с ферментом при 37° С в течение 24 час. Высокомолекулярные фракции пластеинов отделяли центрифугированием или осаждали трихлоруксусной кислотой. Полученные при действии пепсина пластеины имеют молекулярную массу ~2250 при средней степени полимеризации 2,5, что установлено фотометрическим определением количества концевых аминокислотных остатков в виде динитрофенильных производных³⁰. Низкую степень полимеризации авторы этой работы объясняют плохой растворимостью полученных пластеинов. Найдено, что пептиды следующего строения:



образуют пластеины в указанных выше условиях²⁸. На основании этого был сделан вывод об отсутствии влияния аминокислотных остатков, расположенных в середине пептидной цепи на пластеиновую реакцию, ка-

тализируемую пепсином и химотрипсином. Несущественно также, является ли пептид основным, нейтральным или кислым.

Было изучено влияние длины цепи и природы N- и C-концевых аминокислотных остатков на пластеиновую реакцию²⁴. С этой целью были синтезированы следующие пептиды:



Оказалось, что для того, чтобы пептид участвовал в пластеиновой реакции, катализируемой пепсином или химотрипсином, необходимо, чтобы он имел гидрофобные C-концевые аминокислоты и состоял как минимум из четырех аминокислотных остатков.

Таким образом, к субстрату пластеиновой реакции в случае синтеза при помощи пепсина или химотрипсина предъявляется два основных требования: он должен состоять из пептидов, образованных 5—8 аминокислотными остатками, и, кроме того, находящиеся на концах этих пептидов аминокислотные остатки должны быть гидрофобными. Возможная причина того, что пластеиновая реакция успешнее всего идет с пептидами определенной длины, заключается в следующем. Из исследований термодинамики пептидной связи следует, что поликонденсация пептидов термодинамически более выгодна, чем поликонденсация аминокислот^{89–96}. Но в растворах пептидов одинаковой весовой концентрации количество amino- и карбоксильных групп тем меньше, чем выше молекулярный вес субстрата. Вероятно, в растворах пептидов, состоящих из 5—8 аминокислотных остатков, с одной стороны, еще достаточно высока концентрация amino- и карбоксильных групп и, с другой стороны, термодинамически образование пептидной связи между такими пептидами уже более выгодно, чем между аминокислотами. То, что для пластеинообразования необходимо наличие на концах полипептидов гидрофобных аминокислот, возможно объяснить двумя причинами. Во-первых, термодинамика пептидной связи может быть такова, что образованная гидрофобными аминокислотами связь термодинамически наиболее выгодна. Вряд ли можно ожидать большой разницы в термодинамических параметрах связей, образованных различными аминокислотами^{89–96}; в то же время известно, что большинство протеолитических ферментов обладает большей или меньшей специфичностью к гидрофобным аминокислотам^{107, 112}. Поэтому более вероятно, что ограничения на структуру пластеин-активных пептидов накладывается специфичностью используемых ферментов. В пользу этого предположения говорит то, что трипсин — фермент, гидролизующий и синтезирующий только связи, образованные карбоксильными группами лизина и аргинина¹¹³, не обладает пластеинообразующей активностью¹¹⁴. Невозможно также получить пластеины из гидролизатов, полученных при действии трипсина¹¹⁵.

3. Влияние концентрации субстрата на пластеинообразование

В работе¹⁸ изучали зависимость эффективности пластеинообразования от концентрации субстрата при использовании разных ферментов. Пластеины синтезировали из пепсинового гидролизата соевого белка при

концентрациях субстрата 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% и отношениях концентраций фермента и субстрата по весу 0,01—0,03. Реакционную смесь инкубировали 24 час при 37°С. Использовали следующие ферменты: химотрипсин, пепсин, короназу, биопразу, молсин. Значения pH реакционной смеси поддерживали в соответствии указанной в работе^{11а}. Эффективность пластеинообразования оценивали по весу фракции, осаждаемой 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Показано, что во всех случаях выход пластеина имеет максимум при концентрациях субстрата от 30 до 40%. При концентрациях субстрата меньше 6—8% происходит гидролиз субстрата^{18, 19}.

Аналогичные результаты получены в работах^{23, 44} при образовании пластеина под действием пепсина из пепсинового гидролизата зеина и в работах^{20, 21} при получении пластеина под действием пепсина и папаина из пепсинового и папаинового гидролизатов яичного белка. Исходя из современных взглядов на механизм пластеинообразования, вывод о том, что оптимальной концентрацией для пластеинообразования является концентрация субстрата 30—40% и что при концентрации субстрата ниже 6—8% пластеинообразование не происходит, является, вероятно, общим для пластеинов, полученных из любых белков под действием любых ферментов.

4. Влияние фермента и его концентрации на эффективность пластеинообразования

Как уже упоминалось, в пластеиновой реакции использовали очень большое количество протеолитических ферментов разнообразного происхождения. Эти ферменты объединяет только то, что они являются эндопептидазами. Систематическое сравнение эффективности пластеинообразования под действием различных ферментов проведено в работе⁹⁷. Из представленных в табл. 10 данных видно, что наиболее эффективен в пластеиновой реакции α -химотрипсин; остальные ферменты менее эффективны. Необходимо отметить, что величины эффективности пластеинообразования, представленные в табл. 10, по ряду ферментов (например, папаину, пепсину) находятся в противоречии с фактами широкого использования этих ферментов для получения пластеинов.

ТАБЛИЦА 10
Сравнительная эффективность* различных ферментов в пластеиновой реакции⁹⁷

Фермент	Выход пластеина, %	Фермент	Выход пластеина, %
Эндопептидазы:		Микробные протеазы:	
α -химотрипсин	95,0	биопраза	85,5
бромелин	29,0	короназа	52,1
папаин	26,8	молсин	21,3
пепсин	20,0	проназа	36,3
трипсин	21,9	прозим	77,0
Экзопептидазы:		рапидаза	20,0
аспергиллокарбоксипептидаза	20,0	термоаза PC-10	32,3
карбоксипептидаза А	26,5		20,0
лейцинаминопептидаза	22,1		

* Пластеины синтезировали из пепсинового гидролизата соевого белка. Эффективность пластеинообразования оценивалась по весу фракции пластеина, осаждаемой в 10%-ном растворе трихлоруксусной кислоты.

Отсутствие пластеинообразующей активности у экзопептидаз можно объяснить большей термодинамической выгодностью связи между пептидами, чем между пептидом и аминокислотой. Различную пластеинообразующую активность разных эндопептидаз можно объяснить только тем, что в момент измерения выход пластеиновой реакции еще далек от равновесного, поскольку фермент как катализатор не может влиять на положение равновесия системы. Причина отсутствия пластеинообразующей активности у трипсина рассмотрена выше.

Влияние концентрации фермента на эффективность пластеинообразования изучена в работах^{20, 33, 53, 47, 31}. Показано, что, во-первых, при пластеиновой реакции концентрация фермента может быть примерно такой же как и при гидролизе белков — до 1% по весу, и, во-вторых, эффективность пластеинообразования зависит от концентрации фермента весьма слабо. Так, при увеличении концентрации фермента (пепсина) с 0,1 до 8% количество нерастворимой в реакционной смеси фракции пластеина из пепсинового гидролизата яичного альбумина увеличивается всего с 13,1 до 33,3%⁵³. Для случая получения пластеина этим способом в работе³¹ найдено соотношение, связывающее вес нерастворимой фракции и вес используемого фермента: $P = 13,9 E^{0,213}$, где P — вес полученной фракции пластеина, E — вес используемого фермента. Аналогичный результат получен в работе⁴⁷, в которой изучали пластеинообразование под действием пепсина из пепсинового гидролизата зеина. Эффективность пластеинообразования в данном случае оценивали по уменьшению содержания аминного азота, определенного методом медных комплексов¹¹⁶.

Влияние концентрации фермента на скорость пластеинообразования практически не рассматривали. Только в одной работе²⁰ указано, что скорость пластеиновой реакции, определяемая как увеличение во времени количества азота, осаждаемого 2,5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты, пропорциональна корню квадратному из концентрации фермента.

Вещества, ингибирующие ферментативную активность используемого фермента, замедляют или совсем прекращают пластеинообразование^{20, 25, 78, 117}.

При рассмотрении влияния ферментов на пластеиновую реакцию необходимо учитывать следующее. Известно, что во всех ферментных препаратах содержится некоторое количество неактивного белка; поэтому концентрация ферментов в растворе, найденная исходя из их весовых концентраций, не соответствует их действительной концентрации (нормальности) в растворе. Для определения нормальности растворов ферментов необходимо найти концентрации их активных центров. Однако работ по пластеинообразованию с ферментами известной нормальности не проводилось.

5. Зависимость эффективности пластеинообразования от pH реакционной смеси

Зависимость эффективности пластеинообразования от pH реакционной смеси изучали в работах^{22, 23, 31–33}. Впервые зависимость пластеиновой реакции от pH раствора исследовали на примере пластеина, синтезируемого пепсином из пепсинового гидролизата яичного альбумина³¹. Эффективность пластеинообразования определяли по весу отфильтрованной фракции. Показано, что в этом случае нерастворимая фракция пластеина лучше всего образуется при pH 4,0. Та же величина оптимума

pH для пластеиновой реакции, катализируемой пепсином, получена в работе²³.

Изучена pH зависимость скорости пластеинообразования из пепсинового гидролизата соевого белка для разных ферментов^{22, 32, 73}. Скорость пластеинообразования определяли по приросту фракции, осаждаемой в 10%-ном растворе трихлоруксусной кислоты, на прямолинейном участке кинетической кривой. Показано, что в то время, как оптимум гидролитического действия использованных ферментов лежит в районе pH от 2 до 11, оптимум пластеинообразования для тех же ферментов находится в районе pH от 3 до 7, а для большинства ферментов — от 4 до 6. Так, найдено, что для α -химотрипсина оптимальное значение pH для гидролиза равно 8,0, а для пластеинообразования 5,3. Если обозначить разность между оптимальными значениями pH пластеинообразования и гидролиза как ΔpH , то все исследованные ферменты можно разбить на три группы: пепсиновый тип, $\Delta pH > 0$; химотрипсиновый тип, $\Delta pH < 0$; папаиновый тип, $\Delta pH = 0$. Исключение составляет трипсин, который не обнаруживает пластеинообразующей активности во всем исследованном интервале значений pH. Как правило, величины ΔpH больше для ферментов, относящихся к химотрипсиновому типу.

Однако существуют данные о том, что химотрипсин наиболее эффективен в пластеиновой реакции при pH 7,3³⁷. Эффективность пластеинообразования в этом случае оценивали по весу отфильтрованной фракции. В чем причина такого расхождения между данными разных авторов, остается неясным. Несмотря на это, из факта наличия зависимости эффективности пластеинообразования от pH, не совпадающей с pH-зависимостью гидролиза белков для всех исследованных ферментов, можно сделать вывод, что ионная природа субстрата является одним из важных факторов, влияющих на образование пластеинов.

6. Влияние температуры на пластеинообразование

Изучение влияния температуры на пластеинообразование показало, что вес нерастворимой в реакционной смеси и 10%-ном растворе трихлоруксусной кислоты фракции значительно повышается вплоть до тепловой денатурации фермента при 60—65°С^{20, 33, 118, 119}. Причины изменения выхода пластеиновой реакции при изменении температуры до конца не ясны. Предполагали¹¹⁸, что это обусловлено крайне малой величиной свободной энергии синтеза полипептидов в пластеиновой реакции. В свете современных знаний о механизме пластеинообразования и его термодинамике это объяснение едва ли справедливо. Скорее всего причина в том, что с увеличением температуры до 55—60°С возрастает энергия гидрофобных взаимодействий^{82, 83}, ответственных за образование геля при пластеиновой реакции, что приводит к увеличению количества фракции, трудно растворимой в воде.

7. Влияние величины ионной силы раствора на пластеинообразование

Величина ионной силы раствора может влиять на пластеинообразование или изменяя активность используемого фермента, или влияя на растворимость пластеина и смещая тем самым положение равновесия в ту либо иную сторону. О значении величины ионной силы при пластеинообразовании говорит тот факт, что показана возможность образования гелей при действии химотрипсина на 4%-ный раствор пепсинового гидролизата яичного альбумина при pH 7,3, если такой раствор содержал

26% NaCl⁴⁹. Как уже указывалось, без добавления NaCl при такой концентрации субстрата пластенины не образуются.

Подробное исследование влияния величины ионной силы на скорость пластеинообразования проведено на примере образования пластеина из яичного альбумина, получаемом при помощи α -химотрипсина и нейтральной бактериальной протеазы, устойчивой к воздействию больших концентраций солей⁷⁸. Найдено, что различные соли воздействуют на пластеинообразование по-разному при концентрации 1М. Сила воздействия увеличивается при увеличении заряда катиона соли. Добавление хлоридов Na, K, Li увеличивает скорость пластеинообразования на 10%, в то время как добавление в реакционную смесь хлоридов Fe, Al, Zn понижает скорость пластеиновой реакции на 80—95%. Зависимость скорости пластеинообразования от величины ионной силы, создаваемой при помощи NaCl, при использовании α -химотрипсина имеет вид кривой с двумя максимумами примерно одинаковой величины (20—30%) при ионной силе 0,1 и 0,8; после второго максимума наблюдается резкое падение скорости пластеинообразования. При использовании протеазы, не теряющей своей активности в концентрированных растворах, показано, что скорость пластеинообразования возрастает с ростом величины ионной силы, и в 3 М растворе NaCl она увеличивается в два раза от первоначального значения.

Эти исследования, совместно с исследованиями зависимости активности α -химотрипсина и растворимости полученных пластеинов в растворах NaCl разных концентраций, позволяют считать, что величина ионной силы воздействует на скорость пластеинообразования по разным механизмам при разных концентрациях соли. При малых концентрациях соли наблюдается возрастание скорости пластеинообразования за счет увеличения активности фермента. При больших концентрациях соли наблюдается высаливание пластеина, что способствует увеличению скорости его образования, но при этом фермент может потерять свою активность. Если потери активности фермента не произойдет, то скорость пластеиновой реакции возрастет; если фермент инактивируется, то пластеин будет образовываться медленнее.

В. ВКЛЮЧЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПЛАСТЕНИНЫ

Вопрос о возможности изменения аминокислотного состава высокомолекулярных фракций пластеинов в желаемую сторону изучен в ряде работ достаточно широко^{12, 42, 52, 60, 61, 63, 70, 71, 100, 120—124}. В этих работах показана возможность повышения содержания в высокомолекулярной фракции всех незаменимых аминокислот по сравнению с их содержанием в исходном белке. Обогащение можно проводить как в лабораторных, так и в полупромышленных масштабах¹²⁰. Показано, что свободные аминокислоты практически не включаются в пластеины^{42, 52, 100, 121}. Для успешного введения той или иной аминокислоты в пластеин необходимо использовать производные аминокислот. Из представленных в табл. 11 данных видно, что количество высокомолекулярной фракции пластеинов не меняется при использовании для их синтеза разных ферментов, но содержание метионина в образовавшемся пластеине существенно зависит от того, какой фермент использован. Видно, что разные производные метионина существенно различаются по своей способности увеличивать содержание этой аминокислоты в пластеине. Включения метионина совсем не происходит, если аминогруппа защищена ацетильной группой. Несколько успешнее происходит включение метионина в пластеин, если в качестве его источника используется амид метионина. Это указывает на то, что аминогруппа вводимой аминокислоты непосредственно участ-

ТАБЛИЦА 11

Эффективность пластеинообразования и включения метионина в пластеин, синтезируемый при помощи различных ферментов с использованием различных источников метионина*

Фермент	Выход пластеиновой реакции	Содержание метионина в исследуемой фракции пластеина в масс. % при добавлении в реакционную смесь следующих производных метионина:				
		Met	AcMet	MetNH ₂	MetOEt	Met—Met
—	—	—	—	—	—	—
Фицин	71,68	1,15	1,44	1,57	2,10	1,50
Молсин	68,30	1,05	1,47	1,32	—	—
Нагарза	75,00	1,18	1,53	2,09	3,87	2,70
Папаин	78,20	1,20	1,22	3,12	7,22	5,10
Проназа	70,10	1,15	1,32	1,43	—	—
—	—	1,25	1,22	1,25	1,23	1,27

* Выход пластеина определяли по отношению недиализующейся фракции ко всей смеси по весу.

вует в реакции при включении метионина в пластеин. Значительно увеличивается содержание метионина в пластеине при использовании в качестве источника метионина диметионина и, в особенности, этилового эфира метионина. Это указывает на то, что хотя карбоксильная группа аминокислоты непосредственного участия в реакции не принимает, сохранение ее в активной форме необходимо для успешного включения метионина в пластеин.

С практической точки зрения большой интерес представляет возможность обогащения высокомолекулярной фракции пластеинов глутаминовой кислотой¹²³. Были предприняты исследования сравнительной эффективности различных эфиров глутаминовой кислоты в качестве ее источников в пластеиновой реакции, катализируемой папаином⁴². Результаты исследования представлены в табл. 12. Видно, что содержание глу-

ТАБЛИЦА 12

Сравнительная эффективность использования различных эфиров глутаминовой кислоты в качестве ее источников в пластеиновой реакции, катализируемой папаином⁴²*

L-Глутаминовая кислота и ее эфиры	Выход, масс. %		Содержание глутаминовой кислоты, масс. %
	по гидролизату	по субстрату	
Glu- α , γ -OEt ₂	95,7	63,8	41,93
Glu- α -OEt	54,3	36,3	32,18
Glu- γ -OEt	58,1	38,7	25,34
Glu	56,9	37,9	25,00
—	60,0	60,0	24,81

* Гидролизат—пепсиновый гидролизат соевого белка, субстрат—смесь 2:1 (по весу) гидролизата и производного глутаминовой кислоты.

таминовой кислоты в высокомолекулярной фракции пластеинов можно значительно повысить, применяя в качестве ее источника гидрофобный α , γ -диэтиловый эфир. Гидрофобность диэтилового эфира глутаминовой кислоты почти такая же, как у лейцина¹².

Для процесса обогащения лизином пластеина из пепсинового гидролизата глютена, синтезируемого при помощи папаина, исследовано влияние отношения весовых концентраций этилового эфира лизина и гидролизата глютена на эффективность включения лизина в пластеин. Найдено, что максимальная величина включения лизина в пластеин дости-

гается при отношении концентраций этилового эфира лизина и гидролизата глутена 1 : 2¹⁹. Для случаев обогащения пластеинов другими аминокислотами исследований подобного рода не проводилось, но в большинстве работ использовалось именно такое отношение весовых концентраций эфира аминокислоты и гидролизата белка.

Для пластеинообразования, катализируемого папаином, изучена зависимость скорости и глубины включения в пластеины различных аминокислот, добавляемых в реакционную смесь в виде эфиров алифатических спиртов различного строения^{19, 70}. Найдено, что при использовании производных таких аминокислот, к которым папаин неспецифичен (глицин, аланин), количество включенного в состав пластеина этилового эфира аминокислоты линейно увеличивается со временем протекания реакции пластеинообразования в присутствии эфира аминокислоты, и через 6 час составляет 20% от общего количества взятого в реакцию эфира. При использовании этиловых эфиров аминокислот, к которым папаин специфичен (*L*- α -аминомасляная кислота, норвалин, норлейцин), при тех же условиях включение аминокислот практически заканчивается через 2 час после начала пластеинообразования; при этом в реакцию вступает от 50 до 80% первоначального количества эфира аминокислоты. Пластеинообразование за 2 час проходит всего на 50%. Найдена хорошо выраженная корреляция между гидрофобностью боковой цепи аминокислот и скоростью их включения в пластеин при использовании этиловых эфиров аминокислот. Глубина включения глутаминовой кислоты, используемой в виде диэтилового эфира, такая же, как у норлейцина. Исключение составляют аминокислоты, разветвленные в β -положении — валин и изолейцин. Для успешного включения аминокислоты спирт, которым она этерифицируется, должен иметь неразветвленную структуру. Это требование особенно важно при включении аминокислот, к которым папаин неспецифичен. Включение любых аминокислот проходит тем быстрее, чем длиннее алифатическая цепь спирта, которым этерифицировалась аминокислота. Метионин связывается с полипептидными цепями пластеина пептидными связями¹²², и при этом не образуются участки цепей, состоящих исключительно из остатков метионина. *D*-Аминокислоты никогда не включаются в состав пластеина.

Таким образом, строение боковой цепи аминокислот влияет в первую очередь на глубину и скорость ее включения в пластеин. Строение спирта, которым она этерифицирована, влияет меньше. В отношении механизма включения метионина можно сказать следующее. Из анализа конечных аминокроп молекул пластеина, обогащенного метионином, найдено, что остаток метионина расположен главным образом ближе к С-концу полипептидной цепи молекулы пластеина^{61, 122}. Для папаина можно считать доказанным¹²⁵ трехстадийный механизм катализа, включающий образование ацилфермента. В таком случае подобный характер расположения остатков метионина говорит о том, что в процессе его включения в полипептидную цепь происходит образование пептидилфермента, который подвергается нуклеофильной атаке аминокропной этерифицированного метионина с освобождением свободного папаина и удлинением цепи на один остаток метионина. В дальнейшем молекула спирта отщепляется и процесс может повториться. Этерификация карбоксильной группы в данном случае способствует повышению нуклеофильной способности аминокропной метионина. Аналогично действует на реакционную способность аминокропной метионина любая модификация карбоксильной группы, например, превращение метионина в амид или образование дипептида, но спиртовые группы легко отщепляются, давая возможность процессу повториться снова. Альтернативный механизм

включает образование метионин-папаина и нуклеофильную атаку аминоксигруппой пептида.

В пользу того, что действительно имеет место первый механизм, включающий образование пептидил-фермента, говорит и расположение остатков метионина преимущественно на С-конце пептидных цепей, и отсутствие включения метионина в цепь при использовании в качестве его источника метионина с защищенной аминоксигруппой. В пользу того же механизма присоединения метионина свидетельствует факт, что в реакционной смеси не обнаружено свободного метионина, который неизбежно бы образовался за счет гидролиза метионин-папаина. Если справедлив механизм реакции, включающий образование пептидил-фермента, то наблюдаемые различия в скоростях включения различных аминоксиглот, используемых в виде их эфиров, можно отнести к различию в связывании разных частей молекулы эфира аминоксиглоты с субцентрами S_1 для боковой цепи аминоксиглоты и S_2 для цепи спирта ^{125, 128}.

Подобного исследования механизма включения в состав пластеинов других аминоксиглот при действии других ферментов проведено не было. Можно только предполагать, исходя из общих сведений о механизме действия эндопептидаз ^{107-111, 113, 125}, что механизм включения в этих случаях аналогичен рассмотренному выше. Необходимо отметить, что во многих случаях весьма вероятен механизм, включающий ацилирование фермента производным аминоксиглоты. На это указывает значительное включение в пластеин фенилаланина и лизина при использовании их в виде этиловых эфиров с защищенной аминоксигруппой ^{52, 93, 121}.

Побочные реакции при обогащении пластеинов аминоксиглотами отмечены только при обогащении пластеинов лизином, катализируемом папаином ⁶³. Заметное количество лизина, дилизина, трилизина и этилового эфира дилизина обнаружено в реакционной смеси уже через полтора часа после начала реакции.

VI. ПИЩЕВОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛАСТЕИНОВ

1. Очистка белков и получение белковых продуктов с необходимым аминоксиглотным составом

Многочисленные исследования ^{19, 42, 52, 60, 61, 63, 70-72, 100, 120-122, 129-132} показали, что при помощи пластеиновой реакции можно получать белковые продукты высокой питательной ценности из белков, имеющих токсичные и другие нежелательные примеси или несбалансированные по аминоксиглотному составу. При этом содержание аминоксиглот в полученных пластеинах близко к идеальному ^{1, 2}. Схема процесса представлена на рис. 1. Конечно, белковые продукты сбалансированного аминоксиглотного состава можно получать, просто смешивая в определенных пропорциях белки, несбалансированные по разным аминоксиглотам. Однако такие белки далеко не всегда имеются в чистом виде. Производить очистку гидролизатов от примесей значительно проще, чем очистку исходных белков, поскольку в белках примеси заключены в сетке из полипептидных цепей. Использование в пищу ферментативных гидролизатов белков затруднено, так как они горькие на вкус, и использование твердых белковых продуктов для человека более привычно. Поэтому главная цель применения пластеиновой реакции в данном случае состоит в том, что с ее помощью можно получать белковоподобные вещества из очищенных гидролизатов. Кроме того, конечно, важно, что обогащение можно проводить химически синтезируемыми аминоксиглотами, вводя их в реакционную смесь в виде этиловых эфиров.

Исследования показали, что пластеины не обладают токсичными или какими-либо другими нежелательными свойствами и их питательные

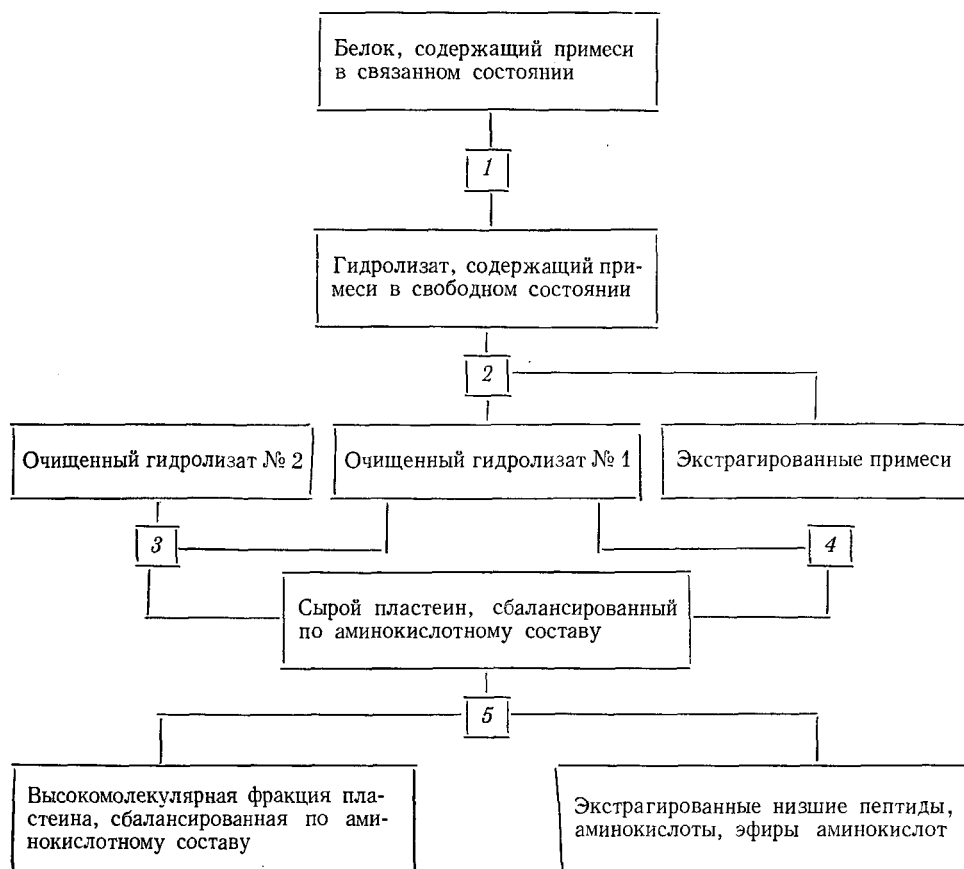


Рис. 1. Получение пластеина сбалансированного аминокислотного состава. Цифрами 1—5 обозначены следующие операции: 1 — гидролиз эндопептидазами; 2 — обработка органическими растворителями; 3 — добавление эндопептидазы; 4 — добавление эфиров незаменимых аминокислот и эндопептидазы; 5 — обработка водным этанолом

свойства во всяком случае не хуже, чем у исходных белков, а у пластеинов, обогащенных незаменимыми аминокислотами — даже лучше⁷².

При помощи пластеиновой реакции можно получать белковоподобные продукты с пониженным содержанием какой-нибудь аминокислоты, например фенилаланина^{124, 129}. Использование таких белковых продуктов является единственным способом обеспечения белком больных фенилкетонурией. Схема получения пластеинов, содержащих малое количество фенилаланина, приведена на рис. 2. Последовательный гидролиз пепсином и проназой* необходим для того, чтобы ароматические аминокислоты находились в гидролизате в свободном состоянии. Найдено, что можно подобрать условия гель-фильтрации, при которых ароматические аминокислоты практически количественно удаляются из раствора. Для восстановления в полученных пластеинах необходимых уровней содержания тирозина и триптофана в реакционную смесь перед пластеинообразованием добавляют этиловые эфиры указанных выше аминокислот. Последующие операции служат для очистки и более полного выде-

* Щелочная бактериальная протеаза из *Streptomyces griseus*.

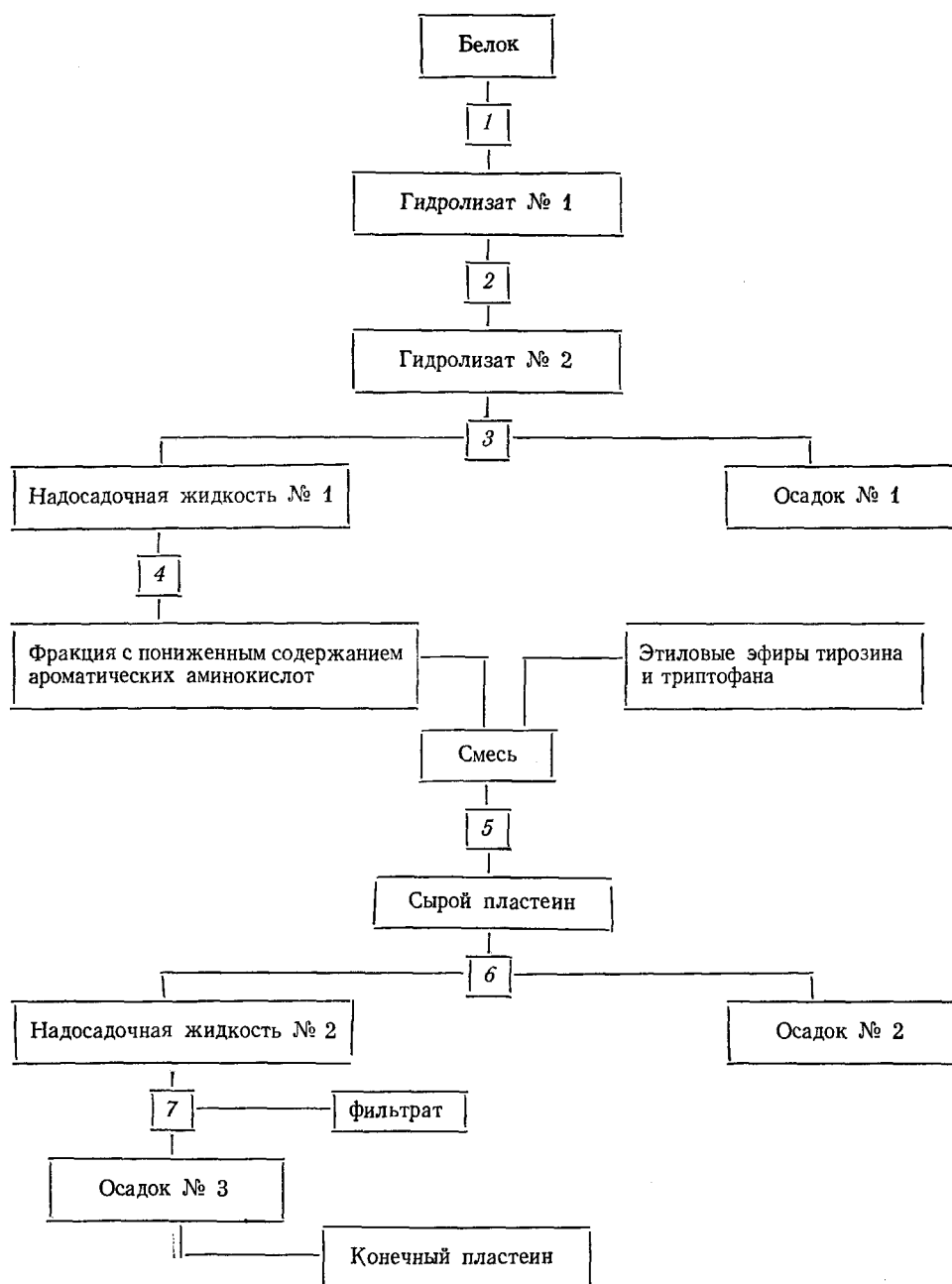


Рис. 2. Получение пластеина с низким уровнем содержания фенилаланина. Цифрами 1—7 обозначены следующие операции: 1 — гидролиз пепсином; 2 — гидролиз проназой; 3 — центрифугирование; 4 — гель-фильтрация; 5 — синтез папанином; 6 — центрифугирование; 7 — ультрафильтрация

ления полученного пластеина. В результате проведения описанного процесса содержание фенилаланина понижается с 4—5% до 0,05—0,20% при высоком содержании всех остальных незаменимых аминокислот.

2. Удаление горечи из ферментативных гидролизатов

Как уже упоминалось, одной из причин невозможности применения ферментативных гидролизатов белков в питании является их горький вкус⁸⁷. Вывод об образовании при ферментативном гидролизе белков горьких пептидов, вероятно, можно считать общим для всех белков и всех эндопептидаз. Из пепсинового гидролизата соевого белка выделены горькие пептиды различного строения¹³³⁻¹⁴¹. Характерной чертой таких пептидов является наличие остатка лейцина на концах молекулы, особенно на С-конце. Вообще обнаружена важная роль гидрофобных концевых аминокислот в возникновении горького вкуса пептидов.

Для удаления горечи ферментативных гидролизатов белков можно применять различные способы. При пропускании гидролизатов белков через колонку с углем на нем преимущественно адсорбируются горькие пептиды¹⁴². Уменьшается горечь ферментативных гидролизатов белков при обработке их экзопептидазами^{135, 138, 139}. Этот метод, однако, имеет определенные ограничения, поскольку при обработке гидролизатов экзопептидазами выделяются свободные аминокислоты в значительном количестве, что может влиять на пищевую ценность гидролизатов.

Пластениновая реакция оказалась удобным способом удаления горечи из ферментативных гидролизатов белков. Найдено, что если горькие гидролизаты использовать в качестве субстрата пластениновой реакции, то полученный продукт будет безвкусным^{59, 97, 133, 143}. Показано, что исчезновение горечи при пластениновой реакции связано с образованием более длинных пептидов, в которых горькие пептиды являются составными частями⁷³. При ферментативном гидролизе пластенинов горький вкус появляется снова.

Интересно влияние повышенного содержания глутаминовой кислоты на вкус ферментативных гидролизатов и пластенинов. Пластенины, обогащенные глутаминовой кислотой, не имеют вкуса, так же как и обычные пластенины. Однако, если эндопептидазами гидролизовать пластенины с повышенным содержанием глутаминовой кислоты, то горечь вновь не появится^{42, 60}. В таком гидролизате содержатся пептиды трех типов: основного, нейтрального и кислого. Пептиды первых двух типов горькие, пептиды третьего типа не имеют вкуса. Если не имеющие вкуса пептиды смешать с пептидами первых двух типов (вместе или в отдельности), то горечь исчезнет⁴². Основным компонентом пептидов третьего типа является диглутаминовая кислота. Найдено, что диглутаминовая кислота обладает способностью маскировать горечь не только пептидов, но и других горьких веществ, таких как $MgCl_2$, кофеин, фенилтиомочевина, бруцин¹³⁰. Следовательно, в этом случае горечь исчезает за счет маскирующего действия диглутаминовой кислоты, а не за счет образования новых пептидов.

Таким образом, пластениновая реакция может оказаться полезной не только при получении высокопитательных белковоподобных веществ из белков несбалансированного аминокислотного состава, но и при получении безвкусных ферментативных гидролизатов белков из горьких гидролизатов.

3. Приготовление высокопитательных белковых паст и желе для использования их в качестве наполнителей, а также имеющих самостоятельное пищевое значение

Возможность использования пластенинов в этом направлении обусловлена их подходящими реологическими свойствами. Вопрос о питательности таких белковых паст и желе был рассмотрен выше.

4. Приготовление смесей пептидов с особыми запахом, вкусом и другими характеристиками для использования их в качестве пищевых добавок и отдушек

Как уже упоминалось, пластейны обычно безвкусны. Показано, что ферментативные гидролизаты пластейнов, обогащенных глутаминовой кислотой, имеют мясной запах и вкус⁴². Нельзя исключить, что при определенных условиях можно получить пластейны или их гидролизаты с какими-либо другими запахом и вкусом, однако систематических исследований этого вопроса проведено не было.

* * *

Подводя итог исследованиям, выполненным в области пластейнообразования, необходимо отметить следующее. К настоящему времени уже намечены основные пути практического использования пластейнов. Показано, что с их помощью можно использовать в питании белки из нетрадиционных источников и химически синтезируемые аминокислоты. Однако механизм пластейновой реакции установлен пока еще только в самых общих чертах. Установление механизма пластейнообразования интересно не только с научной, но и с практической точки зрения, поскольку это может открыть новые пути получения и применения пластейнов, что будет способствовать увеличению сырьевой базы пищевой промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO Technical Report Ser., № 301, Protein Requirements. Report of Joint FAO/WHO Expert Group, Rome, 1965, p. 36.
2. WHO Technical Report Ser. № 522, Energy and Protein Requirements. Report of Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee, Rome, 1973, p. 53.
3. А. Н. Несмеянов, В. М. Беликов, С. В. Рогожин, Г. Л. Слонимский, Р. В. Головня, В. Б. Толстогузов, Вестник АН СССР, 1969, № 1, 27.
4. А. Я. Данилевский, Очерк органопластических сил организмов, Харьков, 1886.
5. W. Sawjelow, Z. Physiol. Chem., 54, 119 (1907—1908).
6. M. B. Hoagland, Biochim. Biophys. Acta, 16, 288 (1955).
7. M. B. Hoagland, P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, Там же, 24, 215 (1957).
8. H. Nohara, K. Ogata, Там же, 25, 659 (1957).
9. R. W. Holley, J. Am. Chem. Soc., 79, 658 (1957).
10. M. Fujimaki, H. Kato, S. Arai, M. Yamashita, J. Appl. Bact., 34, 119 (1971).
11. E. W. Flosdorf, Science, 93, 157 (1941).
12. S. Arai, M. Yamashita, M. Fujimaki, Cereal Foods World, 20, 107 (1975).
13. Е. Ф. Ефимочкина, Вopr. мед. химии, 4, 26 (1952).
14. H. Schmandke, Die Nahrung, 20, 567 (1976).
15. M. Fujimaki, S. Arai, M. Yamashita, Proc. Intern. Symp. on Conversion and Manufacture of Foodstuffs by Microorganisms, Kyoto, Japan, Tokyo, 1972, стр. 19.
16. S. Eriksen, I. S. Fagerson, J. Food Sci., 41, 490 (1976).
17. А. С. Коникова, М. Г. Крицман, Пути синтеза белка, «Медицина», М., 1965, стр. 64.
18. S.-J. Tsai, M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, Agr. Biol. Chem., 36, 1045 (1972).
19. M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, J. Agr. Food Chem., 24, 1100 (1976).
20. H. B. Collier, Canad. J. Res., 18B, 255 (1940).
21. H. Borsook, H. Wasteneys, J. Biol. Chem., 63, 563 (1925).
22. S.-J. Tsai, M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, Agr. Biol. Chem., 38, 641 (1974).
23. A. I. Virtanen, Makromol. Chem., 6, 94 (1951).
24. H. Determann, K. Bonnard, R. Kohler, T. Wieland, Helv. Chem. Acta, 46, 2498 (1963).
25. Б. И. Гольдштейн, А. С. Циперович, Укр. биохим. ж., 16, 165 (1940).
26. E. Abdergalden, P. Rona, Z. Physiol. Chem., 49, 31 (1906).
27. И. Л. Каганова, В. Н. Орехович, ДАН СССР, 95, 1259 (1954).
28. H. Determann, S. Eggenschwiller, W. Michel, Ann. Chem., 690, 182 (1965).
29. H. Determann, O. Zipp, T. Wieland, Ann. Chem., 651, 172 (1962).
30. H. Determann, T. Wieland, Makromol. Chem., 44—46, 312 (1961).
31. H. Wasteneys, H. Borsook, J. Biol. Chem., 62, 675 (1924—1925).
32. M. Yamashita, S. Arai, S.-Y. Tanimoto, M. Fujimaki, Biochim. Biophys. Acta, 358, 105 (1974).

33. D. Guthberson, S. Tompsett, *Biochem. J.*, 25, 2004 (1931).
34. H. Kantala, A. J. Virtanen, *Acta Chem. Scand.*, 4, 1314 (1950).
35. J. H. Northrop, *J. Gen. Physiol.*, 30, 377 (1947).
36. J. N. Haddock, L. E. Thomas, *J. Biol. Chem.*, 144, 691 (1942).
37. H. B. Collier, *Canad. J. Res.*, 18B, 305 (1940).
38. T.-T. Chen, *Clin. J. Physiol.*, 15, 159 (1940).
39. E. W. Flodsdorf, S. Mudd, E. W. Flodsdorf, *J. Immunol.*, 32, 441 (1937).
40. R. S. Alcock, *Physiol. Rev.*, 16, 1 (1936).
41. K. Aso, M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, *Agr. Biol. Chem.*, 37, 2505 (1973).
42. M. Yamashita, S. Arai, S. Kokubo, K. Aso, M. Fujimaki, *J. Agr. Food Chem.*, 23, 27 (1975).
43. К. С. Макаров, Н. И. Гаврилов, *Вестник МГУ*, 1955, № 2, 81.
44. S. J. Folley, *Biochem. J.*, 26, 99 (1932).
45. И. Г. Мензоров, *Биохимия*, 4, 648 (1939).
46. H. B. Collier, *Canad. J. Res.*, 18B, 272 (1940).
47. A. J. Virtanen, H. K. Kerkkonen, T. Laaksonen, *Acta Chem. Scand.*, 2, 933 (1948).
48. K. Aso, M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, *J. Biochem.*, 76, 341 (1974).
49. H. Tauber, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 4965 (1951).
50. К. С. Макаров, *ДАН СССР*, 87, 975 (1952).
51. A. I. Virtanen, H. K. Kerkkonen, M. Hakala, T. Laaksonen, *Naturwissenschaften*, 37, 139 (1950).
52. J. Horowitz, F. Haurowitz, *Biochim. Biophys. Acta*, 33, 231 (1959).
53. H. Wasteneys, H. Borsook, *J. Biol. Chem.*, 62, 15 (1924—1925).
54. Н. И. Гаврилов, А. И. Парадзишвили, А. И. Говоров, *Биохимия*, 4, 35 (1939).
55. H. Tauber, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 2952 (1949).
56. Л. Н. Анисимова, Н. И. Гаврилов, *Ж. общ. химии*, 24, 1457 (1954).
57. H. Tauber, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 1288 (1951).
58. С. Е. Бреслер, К. С. Макаров, С. Я. Френкель, *Биохимия*, 19, 88 (1954).
59. M. Yamashita, S. Arai, J. Matsuyama, M. Gondo, H. Kato, M. Fujimaki, *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1484 (1970).
60. M. Yamashita, S. Arai, S. Kokubo, K. Aso, M. Fujimaki, Там же, 38, 1269 (1974).
61. M. Yamashita, S. Arai, K. Aso, M. Fujimaki, Там же, 36, 1353 (1972).
62. B. v. Hofsten, G. Lalasidis, *J. Agr. Food Chem.*, 24, 460 (1976).
63. K. Aso, M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, *Agr. Biol. Chem.*, 38, 679 (1974).
64. A. I. Virtanen, H. K. Kerkkonen, T. Laaksonen, M. Hakala, *Acta Chem. Scand.*, 3, 520 (1949).
65. H. Kantala, A. I. Virtanen, Там же, 4, 1314 (1950).
66. P. G. Ecker, *J. Gen. Physiol.*, 30, 399 (1947).
67. A. I. Virtanen, H. K. Kerkkonen, *Acta Chem. Scand.*, 1, 140 (1947).
68. А. И. Шульмина, П. В. Афанасьев, *ДАН СССР*, 170, 1220 (1966).
69. И. Г. Мензоров, *Бюлл. эксп. биол. мед.*, 6, 301 (1938).
70. K. Aso, M. Yamashita, S. Arai, J. Suzuki, M. Fujimaki, *J. Agr. Food Chem.*, 25, 1138 (1977).
71. M. Yamashita, S. Arai, S.-J. Tsai, M. Fujimaki, Там же, 19, 1151 (1971).
72. M. Yamashita, S. Arai, M. Gonda, H. Kato, M. Fujimaki, *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1333 (1970).
73. M. Yamashita, S. Arai, J. Matsuyama, H. Kato, M. Fujimaki, Там же, 34, 1492 (1970).
74. M. Fujimaki, K. Utaka, M. Yamashita, S. Arai, Там же, 37, 2303 (1973).
75. P. A. Levene, D. D. Van-Slyke, *Biochem. Z.*, 13, 458 (1908).
76. P. A. Levene, D. D. Van-Slyke, Там же, 23, 203 (1909).
77. A. I. Virtanen, H. K. Kerkkonen, *Nature*, 161, 888 (1948).
78. S. Tanimoto, M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, *Agr. Biol. Chem.*, 39, 1207 (1975).
79. Y. Hatefi, W. G. Hanstein, *Methods Enzymol.*, 31, 770 (1974).
80. C. Tanford, *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 4240 (1962).
81. К. С. Макаров, *Уч. зап. Яросл. госуд. пед. ин-та*, 122, 63 (1973).
82. H. Scheraga, *Protein Structure*, Acad. Press, N. Y.—London, 1961.
83. В. Н. Измайлова, П. А. Ребиндер, *Структурообразование в белковых системах*, «Наука», М., 1974, стр. 13.
84. W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, 14, 1 (1959).
85. П. А. Ребиндер, *Физико-химическая механика*, «Знание», М., 1958, стр. 64.
86. E. Heyman, *Trans. Faraday Soc.*, 31, 846 (1935).
87. M. A. Lauffer, *Entropy Driven Processes in Biology*, Springer Verlag, N. Y., 1975.
88. R. Hamm, *Adv. Food Res.*, 10, 365 (1960).
89. J. S. Fruton, S. Simmonds, *General Biochemistry*, John Wiley, N. Y., 1958, p. 711.
90. F. H. Carpenter, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 1111 (1960).
91. A. Dobry, J. S. Fruton, J. M. Sturtevant, *J. Biol. Chem.*, 195, 149 (1952).
92. Е. Д. Дьяченко, Л. В. Козлов, В. К. Антонов, *Биохимия*, 36, 981 (1971).
93. Л. В. Козлов, Л. М. Гинопдман, В. Н. Орехович, Т. А. Валуева, Там же, 31, 315 (1966).

94. A. R. Fersht, Y. Requena, J. Am. Chem. Soc., 93, 3499 (1971).
95. J. Fastrez, A. R. Fersht, Biochemistry, 12, 2025 (1973).
96. O. Gawron, A. J. Glaid, R. E. Boyle, G. Odstrchel, Arch. Biochem. Biophys., 95, 203 (1961).
97. M. Fujimaki, M. Yamashita, S. Arai, H. Kato, Agr. Biol. Chem., 34, 1325 (1970).
98. А. П. Конников, Арх. биол. наук, 50, 107 (1938).
99. S. Arai, M. Yamashita, K. Aso, M. Fujimaki, J. Food Sci., 40, 342 (1975).
100. Е. Н. Левитова, А. С. Конинова, М. Г. Крицман, Биохимия, 26, 961 (1961).
101. J. A. V. Butler, D. M. Dodds, D. M. P. Phillips, J. M. C. Stephen, Biochem. J., 42, 122 (1948).
102. H. Determann, T. Wieland, O. Zipp, Chimia (Aarau), 14, 374 (1960).
103. T. Wieland, H. Determann, E. Albrecht, Ann. Chem., 633, 185 (1960).
104. H. Determann, O. Zipp, Там же, 649, 203 (1961).
105. H. Determann, R. Kohler, Там же, 690, 197 (1965).
106. H. Determann, J. Heuer, D. Jaworek, Там же, 690, 89 (1965).
107. S. Blackburn, Enzyme Structure and Function, Marcel Dekker, N. Y.—Basel, 1976, p. 22.
108. S. Blackburn, см. ¹⁰⁷, p. 229.
109. S. Blackburn, см. ¹⁰⁷, p. 249.
110. S. Blackburn, см. ¹⁰⁷, p. 270.
111. S. Blackburn, см. ¹⁰⁷, p. 315.
112. А. А. Зинченко, Л. Д. Румш, В. К. Антонов, Биоорг. химия, 2, 803 (1976).
113. S. Blackburn, см. ¹⁰⁷, p. 107.
114. M. Yamashita, S.-J. Tsai, S. Arai, H. Kato, M. Fujimaki, Agr. Biol. Chem., 35, 86 (1971).
115. D. M. Lawrow, Z. Physiol. Chem., 51, 1 (1907).
116. H. K. Kerkkonen, Acta Chem. Scand., 2, 518 (1948).
117. S. Tanimoto, M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, Agr. Biol. Chem., 36, 1595 (1972).
118. H. Wasteneys, H. Borsook, J. Biol. Chem., 62, 633 (1924—1925).
119. A. E. Teylor, J. Biol. Chem., 5, 381 (1908—1909).
120. S. Arai, K. Aso, M. Yamashita, M. Fujimaki, Cereal Chem., 51, 143 (1974).
121. F. Haurowitz, J. Horowitz, J. Am. Chem. Soc., 77, 3138 (1955).
122. M. Yamashita, S. Arai, S.-J. Tsai, M. Fujimaki, Agr. Biol. Chem., 34, 1593 (1970).
123. M. Fujimaki, S. Arai, M. Watanabe, Яп. заявка 75123889 (1975); C. A., 84, 29457 (1976).
124. M. Fujimaki, S. Arai, M. Watanabe, Яп. заявка 7682791 (1976); C. A., 85, 191103 (1976).
125. S. Blackburn, см. ¹⁰⁷, p. 290.
126. J. Schechter, A. Berger, Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, 157 (1967).
127. J. Schechter, A. Berger, Там же, 32, 898 (1968).
128. G. Lowe, Y. Yuthavong, Biochem. J., 124, 107 (1971).
129. M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, J. Food Sci., 41, 1029 (1976).
130. M. Noguchi, M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, Там же, 40, 367 (1975).
131. V. Onoue, V. H. Riddle, J. Fish Res. Board Can., 30, 1775 (1975).
132. M. Fujimaki, S. Arai, M. Yamashita, Ann. Nutr. Aliment., 32, 233 (1978).
133. G. Lalasidis, L.-B. Sjöberg, J. Agr. Food Chem., 26, 742 (1978).
134. E. Ichishima, F. Yoshida, Biochim. Biophys. Acta, 99, 360 (1965).
135. M. Fujimaki, H. Kato, S. Arai, E. Tamaki, Food Technol., 22, 889 (1968).
136. M. Fujimaki, S. Arai, M. Yamashita, H. Kato, N. Noguchi, Agr. Biol. Chem., 37, 2891 (1973).
137. M. Yamashita, S. Arai, M. Fujimaki, Там же, 33, 321 (1969).
138. S. Arai, M. Yamashita, H. Kato, M. Fujimaki, Там же, 34, 729 (1970).
139. M. Fujimaki, M. Yamashita, Y. Okazawa, S. Arai, J. Food Sci., 35, 215 (1970).
140. T. Matoba, C. Nagayasu, R. Hayashi, T. Hata, Agr. Biol. Chem., 33, 1662 (1969).
141. M. Fujimaki, M. Yamashita, I. Okazawa, S. Arai, Там же, 33, 794 (1968).
142. T. K. Murray, B. E. Baker, J. Sci. Food Agr., 3, 470 (1952).
143. M. Fujimaki, M. Yamashita, S. Arai, H. Kato, Agr. Biol. Chem., 34, 483 (1970).