

KRZYSZTOF KULKA, STANISŁAW GRZESIUK

Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie

BIAŁKA NASION ROŚLIN STRĄCZKOWYCH

Wspólną cechą roślin strączkowych jest obecność w ich nasionach dużej ilości białka o stosunkowo wysokiej wartości odżywczej [49, 75, 108]. Zawartość białka w nasionach tych roślin waha się jednak w szerokich granicach od 12 do 14% u niektórych odmian fasoli do 40% i więcej w nasionach soi i łubinu [49, 114, 169]. Skład chemiczny tych nasion podano w tabeli 1.

Tabela 1

Skład chemiczny dojrzałych nasion bobu [wg 169]

Sucha masa: 90,93% świeżej masy	
Masa zarodka z liścieniami w nasieniu: 86,28%	
Masa okrywy nasiennej w nasieniu: 13,72%	
Skład chemiczny suchej masy nasion	
Węglowodany	56,67%
heksozy	0,16
sacharoza	4,02
skrobia	42,48
pektyny	1,69
hemicelulozy	6,66
celuloza	1,66
Związki azotowe	35,80%
nierozpuszczalne	31,69
kwasorozpuszczalne	4,11
Tłuszcze	2,03%
Kwasy organiczne	1,00%
Popiół	4,29%
K ₂ O	1,84
P ₂ O ₅	1,95
MgO	0,23
CaO	0,07
nieokreślone składniki	0,20

W kompleksie białkowym omawianych nasion zdecydowanie dominują globuliny. W nasionach grochu, soi i łubinu stanowią one około 60—75% białka ogólnego oraz w nasionach fasoli i bobiku 80—90% [114]. Na białka rozpuszczalne w rozcieńczonych roztworach zasad przypada kilka lub kilkanaście procent białka ogólnego [68]. Niektórzy autorzy,

zgodnie z klasyfikacją Osborne'a białka te nazywają błędnie glutaminami. Białka te (tj. rozpuszczające się w zasadach) należą według innych badaczy [69, 149] również do typowych globulin wicilinopodobnych oraz częściowo albumin. W komórkach liścieni są one trwale związane z polisacharydami, dlatego też nie mogą być w pełni wyekstrahowane jak typowe globuliny z rozdrobnionych próbek nasion za pomocą rozcieńczonych roztworów soli obojętnych przy pH 7,0. Na globulinowy jednak charakter tych białek wskazują badania immunoelektroforetyczne [43] oraz analizy składu aminokwasowego [68, 69].

Pozostałe białka nasion roślin strączkowych zaliczamy do albumin. Ich zawartość w nasionach różnych gatunków jest bardzo zmienna i waha się w granicach od 10 do 25% białka ogólnego [14, 49, 98, 99]. Białka te zlokalizowane są głównie w osiach zarodkowych oraz w mniejszej mierze w liścieniach.

Albuminy

Dokładne określenie terminu „albuminy” nasion strączkowych napotyka na znaczne trudności. Jedni autorzy [105] sądzą, że są to białka ekstrahujące się z mączki nasion za pomocą wody destylowanej. Inni zaś badacze oddzielają albuminy od globulin z ekstraktu solnego drogą dializy tego ekstraktu wobec wody destylowanej, nie zwracając uwagi na odczyn środowiska w którym zachodzi dializa.

Wspomniane metody wydzielenia albumin nie są w pełni zadowalające, ponieważ za pomocą ekstrakcji wodnej można z liścieni przeprowadzić do roztworu od 65 do 97% ich białka, wśród których zdecydowanie przeważają globuliny [68, 129]. Również proces dializy ekstraktu solnego przeprowadzony w pH 6,0—7,0 nie daje całkowicie gwarancji, że w takich warunkach analizy wszystkie komponenty globulin wytrącają się w postaci osadu. Znaczna ich część zwłaszcza białka wicilinowe pozostaną wówczas w roztworze znajdującym się nad osadem. W celu więc dokładnego oddzielenia białek albuminowych od globulinowych dializę białek rozpuszczonych w roztworze soli należy przeprowadzać wobec wody destylowanej zakwaszonej do takich wartości pH, które odpowiadają punktom izoelektrycznym komponentów globulinowych [131]. Po dializie przeprowadzonej w wymienionych warunkach można mieć pewność, że dializat (płyn znad osadu) zawiera albuminy zanieczyszczone minimalnymi ilościami niskocząsteczkowych globulin [128].

Otrzymane z liścieni w omówiony wyżej sposób preparaty albumin badano różnymi metodami, stosując m.in. ich chromatografię na hydroksyloapatycie i DEAE-celulozie, sączenie molekularne na sefadeksie G-100 oraz elektroforetycznie [49, 68, 69, 150, 171].

Całość albumin nasion różnych gatunków roślin strączkowych (groch, fasola, łubin, soja) wykazuje dużą heterogeniczność i daje się rozdzielić w toku elektroforezy na kilkanaście komponentów [14, 49, 98, 99, 183, 171]. Poszczególne gatunki roślin różnią się jednak między sobą zarówno obrazem elektroforetycznym, jak i ruchliwością elektroforetyczną komponentów albuminowych. Liczba komponentów albumin zależy również od dojrzałości nasion. W młodych nasionach grochu frakcja albuminowa składa się np. z ośmiu komponentów, a w dojrzałych z szesnastu [49].

Metodą chromatografii kolumnowej na DEAE-celulozie i hydroksyloapatycie albuminy ogólne liścieni grochu rozdzielono na 7—8 frakcji [68]. Frakcje te nie są homogeniczne pod względem elektroforetycznym, składają się one jeszcze zwykle z kilku komponentów. Charakterystyczną właściwością chromatograficznych frakcji oraz elektroforetycznych komponentów jest obecność w nich znacznych ilości węglowodanów i kwasów nukleinowych. Największe ilości wymienionych substancji niebiałkowych zawierają zasadowe, nieadsorbujące się na DEAE-celulozie albuminy [68].

Badania chromatograficzne w połączeniu z analizą elektroforetyczną wskazują na wyjątkową złożoność ogólnych albumin liścieni nie tylko grochu, lecz także innych gatunków rodziny motylkowatych [51, 67, 132, 133]. Stosunkowo trwałe wiązanie się komponentów albumin z hydrofilnymi węglowodanami i kwasami nukleinowymi sprawia, że białka te są dobrze rozpuszczalne w wodzie nawet w punkcie izoelektrycznym. W tej sytuacji poddaje się czasem w wątpliwość istnienie albumin jako oddzielnej grupy białek liścieni nasion strączkowych, sugerując że są to różnorodne globuliny, których rozpuszczalność w wodzie uwarunkowana jest tworzeniem połączeń kompleksowych z węglowodanami i kwasami nukleinowymi [68, 69]. Wiadomo jednak, że wiele komponentów albumin zwierzęcych oraz ziarniaków również ma charakter glikoproteidowy, toteż ich istnienie jest chyba realne.

W dostępnej literaturze naukowej brak jest bliższych danych dotyczących mas cząsteczkowych i struktury molekularnej białek albuminowych nasion strączkowych. Sumaryczne albuminy nasion łubinu żółtego rozdzielono metodą sączenia molekularnego na sefadesie na osiem komponentów o różnych masach cząsteczkowych: 16000, 25000, 35000, 46000, 98000, 139000, 290000 i 483000 [98]. Białka 16000—139000 stanowią 85% ilości albumin nasion łubinu. W liścieniach fasoli albuminy reprezentowane są przez białka o m.c. od 10000 do 60000 daltonów [98].

Albuminy pełnią w nasionach funkcje enzymatyczne i strukturalne dlatego też zapewne stanowią one dominującą frakcję białkową młodych rozwijających się nasion [61].

Ekstrakty wodne i solne (zawierają albuminy i globuliny) wielu ga-

tunków nasion strączkowych (i innych dwuliściennych) zawierają duże ilości substancji o aktywności hemaglutynacyjnej. Związki te zwane lektynami (lub aglutyninami) cechuje zdolność do aglutynacji erytrocytów i komórek nowotworowych. Lektyny wykryto m.in. w nasionach grochu, soi, fasoli i in. [91, 182]. Większość lektyn z rodziny *Papilionaceae* ma charakter glikoproteidów. Stanowią one 1—3% białka ogólnego nasion.

Fracja albuminowa nasion strączkowych zawiera również znaczne ilości inhibitorów białkowych hamujących czynność katalityczną wielu hydrolaz różnego pochodzenia [95, 124, 125]. Nie wyklucza się również możliwości występowania inhibitorów białkowych w niektórych komponentach globulin.

W ostatnich latach obserwuje się duży wzrost zainteresowania naturalnymi inhibitorami enzymów hydrolitycznych (zwłaszcza proteaz), które są wytwarzane przez organizmy roślinne i zwierzęce oraz drobnoustroje [127, 172]. Wśród inhibitorów proteaz największe zainteresowanie budzi białkowy inhibitor trypsyny oraz w mniejszej mierze chymotrypsyny.

Naturalne inhibitory proteaz zlokalizowane są głównie w nasionach, bulwach, a rzadko w organach wegetatywnych roślin. Są one rozpowszechnione u *Papilionaceae*, *Gramineae* i *Solanaceae* [115, 120, 127]. W nasionach zawartość tych inhibitorów jest szczególnie duża. Inhibitory o działaniu antyproteolitycznym stanowią około 6% całości białek soi [118] i 8—10% rozpuszczalnych w wodzie białek jęczmienia [63]. Obecność inhibitorów białkowych stwierdzono także w nasionach innych gatunków roślin motylkowatych, a mianowicie: w bobiku i bobie [106, 167], fasoli zwyczajnej [116, 170], limeńskiej [89], złocistej [103], grochu zwyczajnym [54], orzeszku ziemnym [55] i in.

W nasionach strączkowych omawiane inhibitory zlokalizowane są głównie w peryferyjnych częściach liścieni oraz w znacznie mniejszej ilości w osiach zarodkowych [19, 179]. Na przykładzie nasion grochu stwierdzono, że aktywność antyproteolityczną wykazuje cytoplazma podstawowa komórek (54). Wspomniani badacze nie wykryli inhibitora w tzw. ciałach białkowych.

Pod względem budowy chemicznej inhibitory proteaz stanowią niskocząsteczkowe białka lub polipeptydy o masie cząsteczkowej wynoszącej od 8000 do 30000 daltonów [103, 120, 126, 167]. Cząsteczki niektórych inhibitorów trypsynowych składają się z kilku (zwykle z dwóch lub czterech) podjednostek o masie cząsteczkowej 8000—10000 [120].

Większość inhibitorów proteaz nasion łatwo rozpuszcza się w wodzie lub rozcieńczonych kwasach. Prawie wszystkie inhibitory są odporne na działanie czynników denaturacyjnych. Są one odporne na działanie pod-

wyższej temperatury, wytrzymując nawet krótkotrwałe gotowanie w roztworze wodnym bez utraty aktywności. Ważną ich właściwością jest także wysoka odporność na hydrolizę enzymatyczną. Wyjątkowa stabilność inhibitorów białkowych jest spowodowana stosunkowo sztywną strukturą przestrzenną cząsteczki, utrzymywaną przez mostki dwusiarczkowe. Inhibitory te zawierają duże ilości cystyny, której poziom w niektórych przypadkach może osiągnąć wartość 17—20% [103]. Zniszczenie wiązań dwusiarczkowych powoduje inaktywację inhibitora.

Najlepiej dotychczas poznano inhibitory proteaz nasion soi. Spośród nich dokładnie scharakteryzowano dwa: inhibitor wyodrębniony przez Kunitza [90] oraz inhibitor Bowmana-Birka [18, 19, 25].

Inhibitor Kunitza jest białkiem globularnym (m.c. 22000; 181 aminokwasów), składającym się z jednego łańcucha polipeptydowego utrzymywanego w przestrzeni tylko za pomocą dwóch wiązań dwusiarczkowych [72—74]. Omawiany inhibitor ma dwa niezależne centra reaktywne antytrypsynowe (Arg-Ileu) oraz antychymotrypsynowe (Met-Ileu). Inhibitor ten nie wykazuje struktury helikalnej.

Inhibitor Bowmana-Birka zbudowany jest również z pojedynczego łańcucha polipeptydowanego o masie cząsteczkowej wynoszącej 8000 [109—111]. Jego strukturę trzeciorzędową stabilizują liczne wiązania dwusiarczkowe co sprawia, że białka te charakteryzują się zwartością struktury, sztywnością i są wyjątkowo odporne na działanie czynników denaturujących i enzymów proteolitycznych. W obrębie cząsteczki tego inhibitora wykryto dwa centra reaktywne. Za pomocą jednego z nich (Lys-Ser) inhibitor wiąże się z trypsyną, natomiast za pomocą drugiego tworzy kompleksowe połączenie z chymotrypsyną.

Obecnie ustalono również strukturę pierwszorzędową inhibitorów występujących w nasionach fasoli limeńskiej [154], orzeszka ziemnego [55] i ziarnie kukurydzy [55]. Inhibitory białkowe o wysokiej zawartości cysteiny otrzymane z nasion różnych gatunków nasion strączkowych wykazują analogie w ich strukturze pierwszorzędowej.

Inhibitor IV wydzielony z fasoli limeńskiej ma zbliżoną budowę do sojowego inhibitora Bowmana-Birka [154]. Dane o inhibitorach enzymów proteolitycznych sugerują istnienie ogólnego ich modelu mające często charakter poliwalentny, tzn. że określony inhibitor może hamować czynność proteolityczną wielu różnych proteaz. Na przykład inhibitory białkowe wyodrębnione z nasion bobu (oznaczone symbolami BBPI-1 i 2) wykazują małą specyficzność wobec licznych proteaz [167]. Inaktywują one aktywność proteolityczną: trypsyny, chymotrypsyny, pronazy, papainy i trombiny.

Ekstrakty białkowe otrzymane z nasion określonego gatunku zawierają zwykle dość liczne inhibitory proteaz różniące się masami cząstecz-

kowymi, wartościami punktów izoelektrycznych, składem aminokwasowym, strukturą pierwszorzędową, budową centrów reaktywnych itp. [120]. Mogą to być izoinhibitory, co wykazano np. w nasionach fasoli złocistej [170] i bobu [167]. Dużą heterogeniczność inhibitorów nasion fasoli zwyczajnej określono metodą ogniskowania izoelektrycznego [116]. Warto podkreślić, że skład inhibitorów białkowych zależy w pewnej mierze od stanu fizjologicznego nasienia. Pusztai [116] na przykład obserwował w czasie kiełkowania nasion fasoli zanikanie „starych” inhibitorów trypsynowych i syntezę nowych.

Działanie inhibicyjne białkowych inhibitorów z nasion polega na tworzeniu nieaktywnych kompleksów z proteazami zwierzęcymi (trypsyną, chymotrypsyną) bakteryjnymi oraz prawdopodobnie z własnymi, endogennymi proteazami. W formowaniu kompleksu enzym-inhibitor bierze bezpośrednio udział centrum aktywne enzymu oraz centrum reaktywne inhibitora. Przy wyższych stężeniach inhibitora reaguje on także z innym obszarem cząsteczki enzymu. Najważniejszym składnikiem centrum reaktywnego inhibitora trypsynowego jest arginina lub lizyna. Zakłada się, że podczas tworzenia omawianego kompleksu jedna z wymienionych reszt aminokwasowych inhibitora wiąże się estrowo z resztą seryny, znajdującej się w centrum katalitycznym enzymu. Bliższe dane dotyczące mechanizmu działania inhibitorów białkowych można znaleźć w wielu pracach przeglądowych [103, 120, 126, 172].

Od wielu lat w badaniach nad naturalnymi inhibitorami białkowymi proteaz nasion ograniczono się prawie wyłącznie do określenia ich struktury chemicznej i wyjaśnienia mechanizmu działania. Powszechność występowania tych związków w nasionach, ziarniakach i bulwach skierowała zainteresowania niektórych badaczy w stronę badań ich funkcji biologicznych [115, 116, 126, 136, 180].

Funkcja biologiczna inhibitorów białkowych została dotychczas najslabiej poznana, a próby jej wyjaśnienia napotykają często na duże trudności, ponieważ wyniki eksperymentów dotyczących tego zagadnienia są niejednokrotnie sprzeczne z sobą. Nie mniej coraz śmieiej wysuwana jest koncepcja, zgodnie z którą głównym zadaniem inhibitorów białkowych jest udział w regulacji aktywności enzymów znajdujących się w tych samych tkankach i organach roślin.

Biosynteza inhibitorów białkowych dokonuje się podczas rozwoju nasion [19, 62, 115] i zawsze wyprzedza ona nagromadzenie się w tych organach białek zapasowych. Można więc przypuszczać, że główną funkcją tych inhibitorów jest ochrona białek zapasowych odkładających się w nasionach przed proteolizą. Podczas kiełkowania nasion i ziarna obserwowano natomiast w wielu przypadkach szybkie zanikanie aktywności inhibitorów, czemu towarzyszył wzrost aktywności enzymów proteoli-

tycznych [115, 126, 136, 180]. Należy więc sądzić, że część proteaz uwalnia się spod wpływu inhibitora, który w procesie kiełkowania ulega degradacji [136, 180].

Nie zawsze jednak wzrost aktywności enzymów proteolitycznych w kiełkujących nasionach związany jest z zanikaniem w nich inhibitorów białkowych [103, 116, 136]. Podczas kiełkowania na przykład nasion soi obserwuje się w nich ponowny wzrost ilości inhibitorów trypsyny (z 2 mg/g do 3,6 mg/g nasion) [116]. Można przypuszczać, że w tym przypadku niektóre komponenty inhibitora były syntetyzowane, inne zaś ulegały degradacji; w sumie jednak synteza przeważała nad ich zanikaniem. Innym zjawiskiem trudnym do wyjaśnienia jest fakt, że proteoliza białek zapasowych zachodzi w ciałach białkowych, zaś inhibitor występuje w plazmie podstawowej [54].

Do obecnej chwili wykryto bardzo mało inhibitorów wykazujących zdolność do hamowania aktywności endogennych proteaz [103, 115, 120, 180]. W albuminach nasion *Vigna unguiculata* wykryto obecność inhibitora o aktywności antytrypsynowej, który ponadto miał zdolność hamowania aktywności kazeolitycznej endogennej proteazy [124, 125]. Zdecydowana większość białkowych inhibitorów roślin hamuje silnie aktywność trypsyny i chymotrypsyny, a także aktywność innych inhibitorów trypsyno- i chymotrypsynopodobnych pochodzenia zwierzęcego i bakteryjnego, w małym zaś stopniu i znacznie rzadziej hamuje działalność endogennych proteaz.

Występowanie znacznych ilości inhibitorów trypsynowych i chymotrypsynowych w nasionach może wywierać ujemny wpływ na ich wartość pokarmową, co wykazano na przykładzie nasion soi. Przypuszcza się, że toksyczność inhibitorów nasion strączkowych (zwłaszcza przy długim, jednostronnym skarmianiu) polega na częściowej inaktywacji enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego.

Podsumowując powyższe rozważania można przyjąć, że inhibitory o aktywności antyproteolitycznej pełnią następujące funkcje biologiczne: a) regulują natężenie proteolizy w tkankach nasienia, b) stanowią białka zapasowe, c) chronią częściowo nasienie przed ujemnym wpływem proteaz pochodzenia mikrobiologicznego i zwierzęcego [120, 126, 136, 168, 180].

Globuliny

Ekstrakcja i frakcjonowanie

Do badań globulin należy używać świeżo zebrane, dojrzałe morfologicznie, powietrznie suche nasiona. Stanowią one próbę odniesienia

w analizie innych materiałów, np. nasion przechowywanych, kiełkujących, dojrzewających itp. Przed ekstrakcją białek należy z nasion usunąć okrywy nasienne ponieważ zlokalizowane w nich barwniki i fenole utrudniają wyodrębnianie substancji białkowych. Ekstrakcji białek z powietrznie suchych nasion dokonuje się dopiero po ich dokładnym zmieleniu i często po odtłuszczeniu. W niektórych przypadkach pomija się proces odtłuszczenia rozdrobnionego materiału [53].

Dość często białka nasion roślin strączkowych frakcjonuje się metodą Danielssona [34] w licznych modyfikacjach. Basha i Beevers (14) opierając się na wspomnianej metodzie izolowali i frakcjonowali białka liścieni nasion grochu w niżej opisany sposób. Liścienie homogenizowano w zimnym 1M NaCl, 20mM buforze fosforanowym (sodowym) o pH 7. Proces ekstrakcji białek powtarzano trzykrotnie. Z połączonych supernatantów (nadsączów) białka wytrącano siarczanem amonowym doprowadzając jego stężenie do 70—80%. Następnie osad białek po rozpuszczeniu go w 0,2M NaCl, 5mM buforze fosforanowym (sodowym) o pH 7 poddano dializie wobec wody destylowanej. W toku dializy białka globulinowe wytrącają się, natomiast albuminy pozostają w stanie rozpuszczonym (w nadsączu).

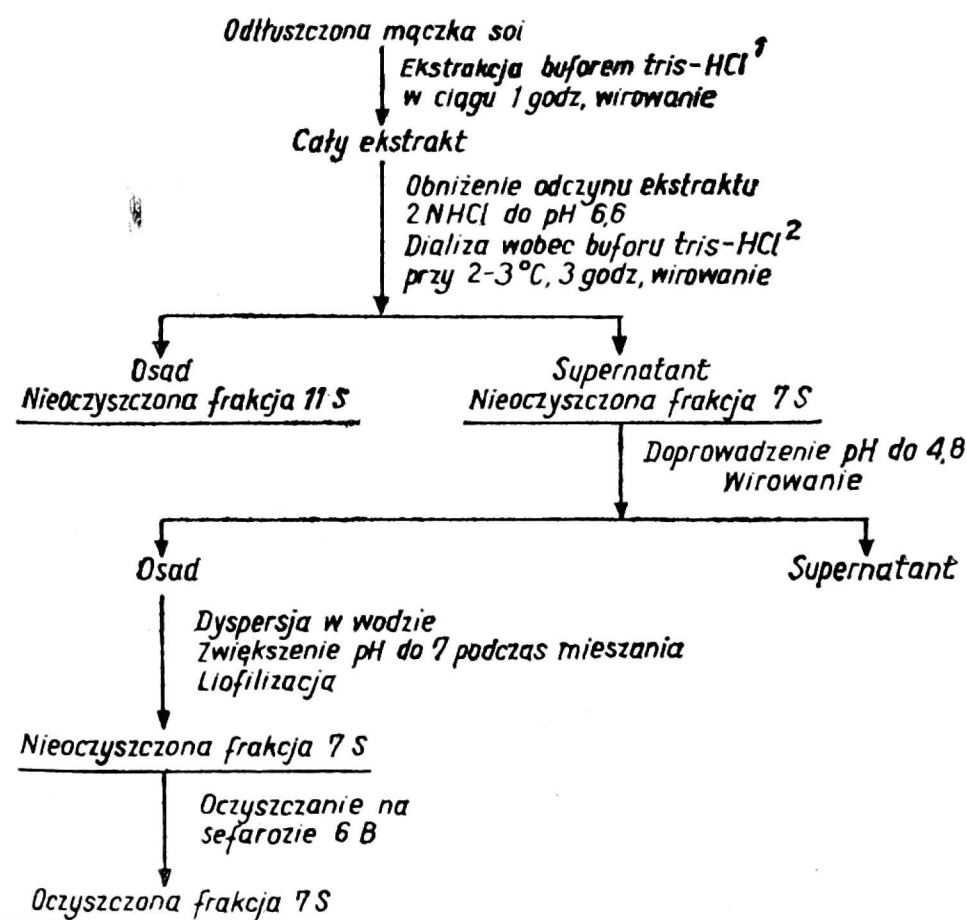
Oddzielony od albumin osad globulin traktuje się z kolei 0,2M NaCl w 5mM buforze fosforanowym o pH 4,5 celem ich dalszego frakcjonowania (14). W tym przypadku rozpuszczeniu ulegają tylko wiciliny, zaś leguminy pozostają w osadzie. Nierozpuszczalność legumin wynika z faktu, że punkt izoelektryczny tych białek przypada na pH 4,5—4,7.

Rozpuszczalność komponentów białek globulinowych nasion niektórych gatunków roślin (fasola, groch, soja) w znacznym stopniu zależy od temperatury [34, 45]. Właściwość tę wykorzystano jako podstawę dla opracowania metody ich frakcjonowania [129]. Przy obniżeniu temperatury roztworu globulin do 0—2°C część białek wytrąca się. Komponenty globulin nie rozpuszczające się w zimnym roztworze nazywamy krioglobulinami. W opisany sposób wydzielono z nasion soi komponent 11S oraz globulinę 7S z nasion fasoli [129]. Warto dodać, że za pomocą wody destylowanej o określonym pH (dla nasion fasoli 6,55) można z niektórych nasion strączkowych wyekstrahować 95% białek [129].

Białka globulinowe można również frakcjonować na zasadzie ich rozpuszczalności w roztworach soli o różnej koncentracji [143]. Wprowadzając np. do ekstraktu globulin otrzymanego (w wyniku traktowania rozdrobnionych nasion roztworem: 0,5M NaCl-0,25M kwas askorbinowy, pH 2,3) z nasion fasoli, określoną ilość wody, spowodujemy wytrącenie się części białek, które określamy jako tzw. frakcje G1 [144, 183]. Globuliny pozostające wówczas w stanie rozpuszczonym reprezentują frakcję G2. Wśród badaczy tego zagadnienia nie ma jednak zgodności poglą-

dów, do jakiego typu globulin (7S czy 11S) zaliczyć frakcję G1. Zdaniem Derbyshire'a i in. [37] obie frakcje globulin (G1 i G2) są białkami typu 7S. Z przeprowadzonych przez Przybylską i in. [183] badań nad białkami nasion różnych form grochu wynika, że obrazy elektroforetyczne frakcji białkowej G2 ściśle odpowiadają obrazom elektroforetycznym frakcji albuminowej.

Opisane wyżej metody frakcjonowania globulin nie prowadzą do całkowitego oddzielenia legumin od wicilin. Zwykle leguminy zanieczyszczone są wicilinami. Dlatego też stosuje się różne dodatkowe metody oczyszczania wspomnianych typów globulin [64, 66, 77—84]. Główne globuliny (7 i 11S) nasion soi można rozfrakcjonować za pomocą prostej metody, opartej na odmiennej rozpuszczalności tych białek w rozcieńczonym tris buforze o pH 6,6 [155]. Opracowanie tej metody stanowi znaczny postęp w badaniach globulin soi, ponieważ uzyskane w ten sposób globuliny 7S są pozbawione domieszek globulin 11S. Szczegóły omawianej metody przedstawia rys. 1.



Rys. 1. Schemat przedstawiający w zarysie procedurę izolowania globulin 7S z nasion soi. 1:63 mM bufor tris-HCl zawierający 10 mM β -merkaptotanol, pH 7,8; 2:63 mM bufor tris-HCl zawierający 10 mM β -merkaptotanol, pH 6, temp. 2—3°C (wg 155)

Sączenie molekularne na sefadesie jest mało przydatną metodą do rozdzielania legumin od wicilin [84]. Procedura ta natomiast może być stosowana do usuwania z ekstraktu globulin białek o niskich masach cząsteczkowych oraz zanieczyszczeń niebiałkowych. Sączenie molekularne na żelach sefadesowych i agarozowych może być również przydatne

do oczyszczania globulin rozdzielonych uprzednio inną metodą [37, 155]. Bardziej efektywną metodą rozdziału białek 7S i 11S jest ich chromatografia na hydroksyloapatycie [68, 69, 80, 130].

Od niedawna czynione są próby nad wprowadzeniem chromatografii powinowactwa do frakcjonowania i oczyszczania globulin nasion roślin strączkowych. W tym przypadku rozdział białek zachodzi na zasadzie różnego powinowactwa między tymi białkami a określonymi substancjami (zwanymi afinantami), unieruchomionymi w fazie stałej czyli nośniku. Afinantem może być substancja wysokocząsteczkowa (np. białko lub kwasy nukleinowe) lub niskocząsteczkowa (substrat enzymu) wykazująca wysokie powinowactwo do izolowanego białka. Funkcję wysokocząsteczkowego nośnika wiążącego kowalencyjnie afinant pełni zwykle agaroz (preparat firmy Pharmacia pod nazwą Sepharose). Za pomocą tej metody udało się oddzielić β -konglycininę od konglycininy γ (komponenty globuliny 7S nasion soi; 37) oraz wyizolować globulinę G1 z nasion fasoli [142].

Do preparacji i frakcjonowania globulin stosuje się dość często metodę chromatografii jonowymiennej, używając do tego celu DEAE-celulozy i DEAE-sefadeksów [31, 40, 68, 69, 130, 155]. Metoda ta daje najlepsze rezultaty, jeśli jest stosowana w końcowej fazie oczyszczania globulin [37]. Chromatografia jonowymienna jest również wykorzystywana do ustalenia budowy podjednostkowej komponentów globulin [38].

Ultrawierowanie w gradiencie stężeń sacharozy jest cennym sposobem otrzymywania małych ilości względnie czystych preparatów globulin 11S [40, 53, 97]. Homogeniczność preparatów globuliny otrzymywanych różnymi metodami sprawdza się zwykle elektroforetycznie (w tym często immunoelektroforetycznie), ultrawierowaniem oraz przez oznaczenie N-końcowych aminokwasów. W tym ostatnim przypadku należy brać pod uwagę strukturę czwartorzędową globulin.

Zasady charakterystyki globulin

Jednym z podstawowych kryteriów oceny globulin jest wyznaczenie współczynników (czyli stałych) sedymentacji. Podczas ultrawierowania (przy 100000—200000 g) białek o różnych masach cząsteczkowych, rozdzielają się one na podfrakcje określane tzw. stałą sedymentacji wyrażaną w jednostkach Svedberga (S). Ogólne globuliny nasion strączkowych poddane ultrawierowaniu rozdzielają się zwykle na trzy główne podfrakcje (czyli grupy białek o zbliżonych masach cząsteczkowych), których stałe sedymentacji przyjmują wartości zbliżone do 2S, 7S i 11S. Omawianą metodą sprawdza się również stopień oczyszczenia preparatów globulinowych [86, 87].

Dalsza charakterystyka globulin obejmuje wyznaczenie punktów izoelektrycznych, badanie składu podjednostkowego (np. drogą elektroforezy w obecności SDS), określenie składu chemicznego (np. składu aminokwasowego, zawartości węglowodanów itp.) oraz próby oznaczenia struktury pierwszo- drugo- i trzeciorzędowej. W badaniach białek globulinowych szczególnie dużą uwagę przywiązuje się obecnie do określenia ich składu podjednostkowego. Bliższej charakterystyce poddaje się również same podjednostki.

Wstępnym etapem prowadzącym do ustalenia struktury czwartorzędowej jest wywołanie dysocjacji natywnych globulin. Cel ten osiąga się często (lecz nie zawsze) przez zmianę [37, 38, 80, 81, 143] pH. Ponadto dysocjację globulin wywołują tzw. czynniki dysocjujące jak np.: mocznik, formamid, chlorek guanidyny, detergenty, merkaptoetanol oraz dwutiotreitol. Dwa ostatnie związki chemiczne powodują rozrywanie kowalencyjnych wiązań dwusiarczkowych, zaś pozostałe działają destrukcyjnie na wiązania wodorowe. Wiązania dwusiarczkowe nie zawsze są umieszczone na powierzchni cząsteczki białka, dlatego też przeprowadzając dysocjację białka należy najpierw do tego roztworu wprowadzić czynnik rozrywający wiązania wodorowe. Całkowite rozerwanie wiązań wodorowych osiąga się przy stosunkowo dużym stężeniu czynników dysocjujących; dla mocznika wynosi ono 6M, dla chlorku guanidyny 4M. Innym czynnikiem dysocjującym jest siarczan dodecyłu sodowego (SDS). Detergent ten łącząc się z białkiem formuje dwa rodzaje kompleksów różniących się stabilnością [119]. Ważną czynnością zabezpieczającą podjednostki przed reasocjacją jest blokowanie wolnych grup SH, np. poprzez karboksymetylację. Tego rodzaju modyfikacja może jednak utrudniać badanie fizycznych i biologicznych właściwości białek.

Zdysocjowane na podjednostki globuliny (11S i 7S) można z kolei frakcjonować za pomocą różnych metod: chromatografii jonowymiennej na DEAE- i CM-celulozie [161, 175], sączenia molekularnego na sefadesie [45], elektroforezy żelowej [175] oraz ogniskowania izoelektrycznego [27]. Należy jednak pamiętać, że elektroforeza podjednostek białkowych przeprowadzana zwłaszcza w obecności mocznika może dawać błędne wyniki. Jest to spowodowane dwojakim działaniem czynników dysocjujących a szczególnie mocznika na globuliny (np. 11S).

Pierwszym, zachodzącym z dużą szybkością procesem jest dysocjacja białka na podjednostki. Drugim zjawiskiem wywołanym przez wspomniane substancje są zmiany konformacyjne podjednostek białkowych związane z rozfałdowywaniem się łańcuchów polipeptydowych. Ten ostatni proces zachodzi prawdopodobnie z niejednakową szybkością u różnych globulin (11S). Różnice w denaturacji podjednostek można obserwować także na przykładzie tych samych białek, lecz otrzymanych od-

miennymi metodami. W rezultacie tych zmian mogą formować się tzw. „izomery konformacyjne” podjednostek różniące się ruchliwością elektroforetyczną.

Ogólna charakterystyka globulin roślin strączkowych

Jak już zaznaczono, globuliny nasion strączkowych poddane ultrawrowaniu rozdzielają się na trzy grupy białek, których stałe sedymentacji przyjmują wartości zbliżone do 2S, 7S i 11S. Wśród wymienionych typów białek pod względem ilościowym dominują zwykle globuliny 11S, przewyższając często dwu- lub trzykrotnie zawartość w nasionach globulin 7S. Globuliny typu 2S występują w nasionach strączkowych w niewielkiej ilości. Oprócz wymienionych typów białek w ekstraktach białkowych stwierdza się obecność minimalnych ilości innych rodzajów (3S, 9S i 15S, 18S) globulin [37]. Są to prawdopodobnie produkty asocjacji bądź dysocjacji części głównych globulin nasion.

Tabela 2

Występowanie białek spokrewnionych immunologicznie z legumina i wiciliną *Pisum sativum* lub *Vicia faba*

Plemię	Gatunek	Literatura
<i>Astragaleae</i>	<i>Swainsonia stipularis</i>	39
<i>Fabeae</i> *	<i>Cicer arietinum</i>	39,71
	<i>Lathyrus odoratus</i>	71
	<i>Lathyrus sativus</i>	39,71
	<i>Pisum sativum</i>	39,71
	<i>Vicia sativa</i>	71
	<i>Vicia faba</i>	39,71
<i>Ononideae</i>	<i>Ononis pubescens</i>	39
	<i>Ononis serrata</i>	39
<i>Podalyrieae</i>	<i>Daviesia mimosoides</i>	39
<i>Trifolieae</i> *	<i>Medicago sativa</i>	39
	<i>Melilotus alba</i>	39
	<i>Trifolium hirtum</i>	39
	<i>Trifolium incarnatum</i>	39,71

* wiciliny wykryto tylko w nasionach *Fabeae* i *Trifolieae*.

Tabela 3

Występowanie globulin wicilino- i leguminopodobnych (wg 37)

Gatunki	Globuliny leguminopodobne		Globuliny wicilinopodobne	
	masy cząsteczkowe (daltony)	współczynniki sedymentacji (S ₂₀)	masy cząsteczkowe (daltony)	współczynniki sedymentacji (S ₂₀)
Motylkowate				
<i>Arachis hypogea</i>	330000—396000	12,0—14,7	142000—190000	7,8—8,7
<i>Dolichos lablab</i>	—	11,6—12,7	—	7,3
<i>Genista tinctoria</i>	—	13,3	—	8,5
<i>Glycine max</i>	309000—380000	11,8—14,0	193000	7,9
<i>Lathyrus odoratus</i>	—	12,0	—	7,6
<i>L. sativus</i>	—	13,0	—	7,5
<i>L. silvestris</i>	—	13,0	—	7,5
<i>Lupinus albus</i>	393000	12,3—12,6	204000	8,3
<i>L. angustifolius</i>	336000	11,6—13,0	181000	7,8
<i>L. luteus</i>	—	11,5	—	7,4
<i>L. polyphyllus</i>	—	12,2	—	8,7
<i>Phaseolus aureus</i>	—	11,3	—	8,0
<i>P. coccineus</i>	—	12,1	—	7,4
<i>P. nanus</i>	—	10,1	—	6,6
<i>P. vulgaris</i>	340000	11,0—11,6	151000	6,8
<i>Pisum sativum</i>	330000—410000	12,1—13,7	—	8,1
<i>Trifolium pratense</i>	—	11,2	—	7,7
<i>Vicia faba</i>	328000	11,5	150000	7,1
<i>V. sativa</i>	360000	12,9	190000	7,5
<i>Vigna unguiculata</i>	320000	11,2	—	7,3
Inne dwuliścienne				
<i>Beta vulgaris</i>	250000	13,9		
<i>Brassica napus</i>	—	12,0		
<i>B. nigra</i>	—	11,8		
<i>Cannabis sativa</i>	334000	13,2		
<i>Cucurbita maxima</i>	340000	12,1		
<i>Gossypium barbadense</i>	—	13,0		
<i>Helianthus annuus</i>	343000	11,9		
<i>Prunus cerasus</i>	300000	—		
<i>P. domestica</i>	300000	—		
<i>Ricinus communis</i>	332000	12,9		
<i>Sinapis alba</i>	—	12,7		

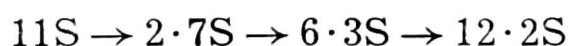
Białka zapasowe nasion roślin strączkowych należą do dwóch zasadniczych typów i są to globuliny 11S i 7S. Danielsson [34] nazwał takie globuliny (11S i 7S) z liścieni grochu leguminą i wiciliną. Nazwy wicilina i legumina są dość często bezkrytycznie używane w publikacjach naukowych. Badania immunochemiczne wskazują, że terminy te należy stosować głównie w odniesieniu do rodzajów roślin należących do ple-mion *Fabeae* (*Vicieae*) i *Trifolieae* (39, 71, tab. 2). Natomiast analogiczne białka nasion strączkowych nie wykazujące pokrewieństw immunologicznych z leguminą i wiciliną nasion grochu lub wyki należy nazywać globulinami wicilino- i leguminopodobnymi (tab. 3).

Białka 11S (leguminy i leguminopodobne).

Masy cząsteczkowe globulin 11S przyjmują wartości od 300000 do 400000 daltonów (tab. 3) a ich współczynniki sedymentacji wahają się często w granicach 10-12S.

Białka typu 11S występują nie tylko w nasionach roślin strączkowych (motylkowatych) lecz także w nasionach wielu innych gatunków roślin dwuliściennych (tab. 3). W toku elektroforezy żelowej globuliny te zachowują się na ogół jako pojedyncze pasmo. Cechuje je więc znaczna homogeniczność. Globuliny 11S pochodzące z różnych źródeł mają zbliżony skład aminokwasowy (tab. 4). Z przytoczonej tabeli wynika, że wszystkie globuliny leguminopodobne zawierają duże ilości amidów (glutaminy i asparaginy). Wskazuje to na ich funkcję zapasową. W wielu przypadkach stwierdzono glikoproteidową naturę globulin 11S [11, 37, 40, 88, 96, 137]. Zawartość węglowodanów jest na ogół mniejsza niż 1%. Są to przeważnie cukry obojętne [37, 96], chociaż w kilku przypadkach wykryto glukozo- i galaktozoaminę.

Wszystkie dotychczas wyodrębnione globuliny 11S cechuje złożona czwartorzędowa struktura. W obecności substancji dysocjujących (mocz-nika, chlorku guanidyny) lub przy ekstremalnych wartościach pH (np. poniżej 3), a niekiedy i przy obniżonej sile jonowej roztworu globuliny ulegają dysocjacji zgodnie ze schematem:



Przytoczony schemat wskazuje, że jedna cząsteczka białka może składać się z dwunastu podjednostek 2S; są to pojedyncze polipeptydy o średniej masie cząsteczkowej wynoszącej około 30000 daltonów. Niektóre dane eksperymentalne zdają się potwierdzać taką koncepcję budowy globulin [37, 161]. Istnieją również dowody na to, że struktura czwartorzędowa globulin 11S jest bardziej złożona niż to wyżej przedstawiono [32, 37].

Tabela 4

Skład aminokwasowy niektórych globulin 11S (w % mol.)

Aminokwasy	Gatunki								
	<i>Arachis hypogaea</i> (139)	<i>Glycine max</i> (138)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (37)	<i>Pisum sativum</i> (58)	<i>Vicia faba</i>		<i>Brassica napus</i> (48)	<i>Cucurbita maxima</i> (26)	<i>Helianthus annuus</i> (135)
					(97)	(58)			
Kwas asparaginowy (Asp)	13,3	12,0	9,5	12,7	12,3	10,6	10,0	10,1	10,8
Treonina (Thr)	2,8	5,0	4,9	3,2	3,7	4,3	4,9	2,9	3,6
Seryna (Ser)	6,0	8,5	7,3	5,9	7,4	6,5	5,5	7,1	4,9
Kwas glutaminowy (Glu)	19,4	19,2	13,1	16,5	19,9	16,4	18,0	16,1	20,1
Prolina (Pro)	5,5	5,7	5,1	—	5,4	—	6,2	4,0	5,1
Glicyna (Gly)	7,4	7,2	8,0	6,2	7,7	7,4	9,6	7,5	7,5
Alanina (Ala)	6,2	5,4	6,9	5,8	6,3	6,1	6,8	6,9	6,5
Walina (Val)	5,1	4,9	7,0	4,8	5,1	4,9	6,2	6,4	6,2
1/2 cystyna (1/2 Cys)	0,7	1,5	0,6	0,7	0,0	0,8	0,6	0,7	2,2
Metioniana (Met)	ślady	1,1	1,5	0,5	0,3	0,6	1,5	2,1	2,0
Izoleucyna (Ile)	3,9	5,1	4,9	4,1	4,3	3,4	4,7	5,1	4,9
Leucyna (Leu)	7,1	6,3	8,7	8,0	8,5	7,8	8,4	8,2	6,9
Tyrozyna (Tyr)	3,3	2,7	2,9	2,6	2,1	3,7	2,2	2,8	2,2
Fenylalanina (Phe)	4,9	3,8	3,6	4,2	3,2	3,8	3,9	4,7	4,9
Lizyna (Lys)	2,1	3,8	7,8	4,4	4,2	4,5	3,8	2,9	1,9
Histydyna (His)	2,0	1,9	3,0	2,4	2,4	2,6	1,8	1,9	2,3
Arginina (Arg)	10,2	5,1	4,8	7,5	8,0	7,6	5,0	10,7	6,9
Tryptofan (Trp)	—	0,8	0,7	—	—	0,8	0,7	—	1,0

Podjednostki (2S) budujące globuliny leguminopodobne różnią się między sobą własnościami chemicznymi i fizycznymi. Ogólnie podzielono je na dwie grupy: kwaśne i zasadowe. Występują one w omawianych globulinach raczej w równoważnych ilościach. Na przykład leguminy nasion wyki składają się z sześciu podjednostek zasadowych i sześciu kwaśnych [161]. Masy cząsteczkowe podjednostek kwaśnych (27000—37000) są większe niż zasadowych (20000—24000) [31, 38, 65]. Glicyna jest N-końcowym aminokwasem podjednostek zasadowych wszystkich badanych globulin, natomiast leucyna stanowi N-końcowy aminokwas podjednostek kwaśnych.

Tabela 5

Skład aminokwasowy (w % mol) podjednostek kwaśnych i zasadowych niektórych globulin 11S.

Aminokwasy	Gatunki					
	<i>Glycine max</i> (30)		<i>Vicia faba</i> (175)		<i>Vicia sativa</i> (163)	
	kwaśne	zasadowe	kwaśne	zasadowe	kwaśne	zasadowe
Asp	12,6	13,8	13,0	11,6	12,1	12,6
Thr	3,4	4,3	3,1	4,2	2,8	4,4
Ser	5,9	7,0	6,5	6,9	6,5	6,5
Glu	24,5	15,4	22,1	10,2	20,9	9,5
Pro	7,0	5,5	5,5	4,7	5,4	5,1
Gly	7,7	6,6	7,8	6,0	7,6	6,2
Ala	3,8	7,4	3,8	9,8	4,9	9,2
1/2 Cys	—	—	—	—	1,0	0,9
Val	3,9	6,1	3,4	9,6	3,6	8,7
Met	0,5	0,9	0,7	0,5	0,7	0,5
Ile	4,1	4,4	4,5	3,5	5,0	4,0
Leu	5,7	9,0	6,5	10,9	6,3	10,2
Tyr	2,2	2,8	2,4	3,1	2,6	3,1
Phe	3,4	4,6	2,9	3,3	3,6	3,5
His	2,6	1,7	2,6	1,4	2,7	1,6
Lys	6,3	4,8	4,9	6,0	3,9	4,2
Arg	6,4	5,6	10,3	8,4	9,2	8,3

Tryptofanu nie oznaczono

Omówione wyżej oba typy podjednostek różnią się między sobą składem aminokwasowym. Podjednostki kwaśne zawierają więcej kwasu glutaminowego (glutaminy) niż zasadowe, zaś zasadowe są zasobniejsze w alaninę, walinę i leucynę (tab. 5). Znaczne różnice występują również w składzie aminokwasowym w obrębie jednego rodzaju podjednostek, występujących w globulinach nasion różnych gatunków. W jakim stop-

niu różnice w składzie podjednostek białkowych związane są z ich heterogenicznością pokażą dopiero dalsze badania, obejmujące ustalenie sekwencji aminokwasów itp.

Pod wpływem czynników dysocjujących (mocznika, chlorku guanidyny) globuliny 11S ulegają stosunkowo łatwo degradacji. Wskazuje to, że ich struktura czwartorzędowa stabilizowana jest przez międzycząsteczkowe wiązania wodorowe [37]. Nie wyklucza się jednak możliwości udziału mostków dwusiarczkowych w wiązaniu podjednostek (polipeptydów) kwaśnych z zasadowymi w obrębie cząsteczki 11S. W rezultacie wiązania dwusiarczkowe odpowiedzialne byłyby za formowanie podjednostek pośrednich (3S) stanowiących integralne składniki strukturalne natywnych legumin [175]. Obecność międzyłańcuchowych wiązań dwusiarczkowych stwierdzono w leguminie bobu [175], glicynie soi [30], arachinie orzeszka ziemnego [139, 158]. Problem udziału wiązań dwusiarczkowych w formowaniu czwartorzędowej struktury białek 11S pozostaje jednak nadal nierozstrzygnięty. Istnieje bowiem możliwość powstawania artefaktów, ponieważ czynniki dysocjujące (mocznik i guanidyna) powodują zarówno rozpad natywnych globulin, jak i rozfałdowywanie łańcuchów polipeptydowych odsłaniając ukryte w głębi cząsteczki reaktywne grupy SH, zdolne do tworzenia sztucznych agregatów białkowych [173].

Białka typu wiciliny (7S)

Globuliny zapasowe typu 7S są znacznie słabiej poznane niż białka 11S. Ta grupa białek reprezentowana jest zwykle przez kilka komponentów (96) o zbliżonych właściwościach chemicznych.

Wiciliny za pomocą metody immunologicznej wykryto w nasionach roślin *Fabeae* (*Vicieae*) i *Trifolieae* (tab. 2). Obecność globulin typu wicilin stwierdzono również w nasionach roślin należących do plemienia *Ononideae*, *Podalyrieae* i *Loteae*. Natomiast globuliny wicilinopodobne wykryto u znacznej liczby gatunków nasion roślin motylkowatych (tab. 3).

Preparaty omawianych globulin (*Vicia faba*, *Phaseolus aureus*, *Glycine max*) zawierają znaczne ilości (2—4,8%) cukrów obojętnych oraz heksozamiiny (0,2—1,2%). Dane zamieszczone w tabeli 6, informują, że globuliny 7S różnego pochodzenia zawierają duże ilości aminokwasów dwukarboksylowych (i ich amidów) oraz w większości przypadków minimalne ilości cysteiny i metioniny. W białkach wicilinopodobnych łubinu nie stwierdzono obecności metioniny, zaś u wicilin wyki nie wykryto cysteiny.

Jak już nadmieniono białka 7S nasion strączkowych cechuje większa heterogeniczność niż globuliny 11S. Jednym z pośrednich dowodów po-

Skład aminokwasowy globulin 7S w g/16gN

Aminokwasy	Gatunki						
	<i>Arachis hypogea</i> (36)	<i>Glycine max</i> (80)	<i>Lupinus luteus*</i> (44)	<i>Phaseolus vulgaris*</i> (117)	<i>Pisum sativum</i> (22)	<i>Vicia faba</i> (58)	<i>Vicia sativa*</i> (140)
Asp	11,6	14,1	12,2	12,4	12,0	11,9	11,2
Thr	2,4	2,8	2,2	3,4	3,4	2,9	2,7
Ser	4,8	6,8	3,6	6,7	5,8	5,1	7,1
Glu	11,9	20,5	21,2	15,1	19,3	17,6	18,0
Pro	4,1	4,3	3,6	2,9	3,5	—	3,9
Gly	5,5	2,9	1,3	2,7	3,1	2,5	2,9
Ala	3,6	3,7	1,5	3,0	3,0	3,1	3,0
1/2 Cys	2,1	0,3	1,4	0,3	0,4	0,3	0
Val	4,5	5,1	2,9	5,2	4,6	4,3	3,7
Met	1,4	0,3	0	0,7	0,2	0,4	0,6
Ile	3,3	6,4	4,7	5,6	5,1	5,2	5,7
Leu	6,3	10,3	7,6	9,1	9,2	9,3	9,3
Tyr	3,6	3,6	6,2	3,5	3,0	3,8	4,0
Phe	4,6	7,4	5,6	6,6	6,2	6,8	5,8
His	2,4	1,7	1,7	2,6	2,1	2,4	2,7
Lys	3,7	7,0	3,5	5,6	7,9	8,1	8,1
Arg	11,6	8,8	13,5	5,0	7,3	7,8	10,7
Trp	—	0,3	0	0,8	0,1	—	0
NH ₃	2,3	1,7	2,5	1,8	—	—	—

* w g/100 g białka

twierdzających niejednorodność globulin 7S jest analiza N-końcowych aminokwasów. W określonym preparacie wiciliny (lub globuliny wicilinopodobnej) wykrywa się niekiedy do dziewięciu N-końcowych różnych aminokwasów. U większości badanych białek 7S łańcuchy polipeptydowe są zakończone resztami seryny, kwasu glutaminowego i asparaginowego. Bardziej bezpośrednim dowodem świadczącym o heterogeniczności omawianych globulin jest rozdział elektroforetyczny lub frakcjonowanie na jonitach celulozowych oczyszczonych białek 7S. W wyniku tej operacji np. białka wicilinopodobne soi rozdzielono na 3—5 komponentów [53, 155].

Białka 7S podobnie jak globuliny 11S cechuje złożona struktura czwartorzędowa. W środowisku kwaśnym, w roztworach mocznika, chlorku guanidyny i detergentów ulegają one dysocjacji na podjednostki. Końcowym produktem dysocjacji tych białek są zwykle podjednostki 2S (m.cz.ok. 30000) zaś pośrednim podjednostki 4S [161]. Biorąc pod uwagę masę cząsteczkową wiciliny (180000—200000) wyliczono, że cząsteczka

tego białka składa się z sześciu podjednostek [165]. Przytoczone dane dotyczące liczby podjednostek w globulinach soi, nie zostały jeszcze ostatecznie ustalone dla globulin 7S zawartych w nasionach innych gatunków roślin [37, 38, 96].

Podjednostki 2S stanowiące podstawowe elementy strukturalne białek 7S nie są identyczne. Świadczy o tym obecność w preparatach tych białek wielu różnych N-końcowych aminokwasów [12, 58, 80, 81]. Ponadto zdysocjowane na podjednostki globuliny 7S rozdzielają się w wyniku elektroforezy na kilka frakcji różniących się ruchliwością elektroforetyczną oraz masami cząsteczkowymi [37, 38, 58, 96].

Obecność globulin o współczynniku sedymentacji zbliżonym do 7S stwierdzono w nasionach niektórych gatunków roślin dwuliściennych nie należących do rodziny motylkowatych. Są to: *Helianthus annuus* [57], *Cucurbita maxima* [104], *Gossypium barbadense* [122], *Beta vulgaris* [35] i in. (tab. 7). Globuliny te (z wyjątkiem *Gossypium*) stanowią niewielką ilość globulin wymienionych gatunków nasion których podstawowymi białkami zapasowymi są globuliny 12S [37]. Oba typy globulin wykazują złożoną strukturę podjednostkową analogiczną do globulin występujących w nasionach motylkowatych [16, 57].

Tabela 7

Występowanie i współczynniki sedymentacji globulin 2S (wg 37)

Gatunki	Współczynniki sedymentacji (S_{20})
Motylkowate	
<i>Arachis hypogaea</i>	2,0
<i>Lupinus albus</i>	2,7
<i>Lupinus luteus</i>	2,0
<i>Glycine max</i>	2,8
<i>Phaseolus coccineus</i>	4,3
<i>P. vulgaris</i>	4,9
Inne dwuliścienne	
<i>Beta vulgaris</i>	1,2
<i>Brassica hirta</i>	1,8
<i>B. nigra</i>	1,8
<i>Helianthus annuus</i>	1,7
<i>Ricinus communis</i>	1,6
Jednoliścienne	
<i>Avena sativa</i>	2,6
<i>Festuca rubra</i>	2,4
<i>Hordeum vulgare</i>	2,5
<i>Oryza sativa</i>	1,6
<i>Secale cereale</i>	2,6
<i>Triticum aestivum</i>	2,5
<i>Zea mays</i>	2,6

Globulina 8S (γ -globulina) stanowi główną globulinę zarodków *Hordeum vulgare* oraz *Oryza sativa* [24, 101]. Podobne białka wykryto w ziarniakach wielu innych gatunków należących do *Gramineae* natomiast globulin 12S nie wykryto w ziarnie tych roślin. Wyjątek pod tym względem stanowią ziarniaki jęczmienia, pszenicy i ryżu, u których białka te występują w niewielkiej ilości [37].

Pozostałe globuliny nasion roślin strączkowych

Do podstawowych globulin nasion roślin strączkowych należą niewątpliwie białka 7S i 11S. Często jednak leguminom towarzyszą niewielkie ilości białek o współczynnikach sedymentacji 15S i 18S. Są to prawdopodobnie produkty asocjacji białek o mniejszych masach cząsteczkowych, tworzące się podczas ekstrakcji i oczyszczania głównych globulin nasion.

Tabela 8

Skład aminokwasowy (% mol.) globulina 2S

Aminokwasy	Gatunki			
	<i>Brassica nigra</i> (93)	<i>Glycine max</i> (164)	<i>Lupinus luteus</i> (44)	<i>Oryza sativa</i> (56)
Asp	2,1	15,4	10,0	3,2
Thr	3,1	4,4	1,4	1,9
Ser	4,6	5,9	6,2	10,8
Glu	17,1	9,7	35,5	22,6
Pro	19,5	6,2	2,9	4,9
Gly	6,6	9,1	3,8	8,5
Ala	6,2	4,7	1,9	5,6
Val	6,5	7,1	1,9	3,8
1/2 Cys	ślady	1,0	8,1	4,5
Met	ślady	0,6	0,5	4,6
Ile	4,5	9,4	3,8	1,3
Leu	9,4	7,1	11,5	6,0
Tyr	0,7	1,8	0,5	5,4
Phe	2,7	5,9	3,4	2,4
Lys	5,8	5,7	0,9	0,1
His	5,6	0,6	0,5	ślady
Arg	4,8	5,5	7,2	13,7
Trp	—	1,7	—	0,6
NH ₃	16,8	13,2	31,2	12,8

Na przykład w nasionach fasoli monomer (7,1S) w środowisku o pH powyżej 6,5 stanowi główny pod względem ilościowym komponent glo-

bulin [143]. Obniżenie natomiast pH do wartości poniżej 6,5 prowadzi do wytworzenia tetramerycznej formy globuliny 7, 1S. W takim środowisku dominuje wysokocząsteczkowa globulina 18, 2S [142, 143].

Globuliny o małych masach cząsteczkowych (2S-4S) wykryto w nasionach wielu gatunków roślin strączkowych [29, 37, 46, 86 i 161] oraz innych dwuliściennych [15, 93] i jednoliściennych [56, 166] (tab. 7). Białka te występują w nasionach w minimalnych ilościach, stanowiąc zaledwie kilka (niekiedy kilkanaście) procent ogólnej ilości globulin.

Globuliny 2S pochodzące z różnych źródeł znacznie się różnią między sobą składem aminokwasowym (tab. 8). Ponadto zawierają one duże ilości amidów i arganiny, co wskazuje między innymi na ich funkcje zapasowe. Niskocząsteczkowe globuliny zostały poznane znacznie słabiej niż globuliny 7S i 11S [37, 96].

- Globuliny nasion niektórych gatunków roślin strączkowych

Dotychczas dość dokładnie zbadano białka zapasowe nasion soi (*Glycine max*). W wyniku ultrawierowania ekstraktu globulin (siła jonowa roztworu 0,5 pH 7) otrzyma cztery grupy białek o stałych sedymentacji: 2,2S, 7,5S, 11,8S i 15S [53, 86, 87, 156]. Globuliny 7,5 i 11,8S stanowią ponad 70% ogólnej ilości białek nasion, przy czym dominującą globuliną jest glicynina (11,8S) [53, 61].

Glicynina w toku elektroforezy na żelu poliakryloamidowym, chromatografii na DEAE-sefadesie zachowuje się jako jednorodne białko [31, 53]. Badania immunologiczne również potwierdzają homogeniczność glicyniny. Poddając następnie omawianą globulinę dysocjacji w obecności mocznika lub chlorku guanidyny otrzymano mieszaninę podjednostek typu 2S, które za pomocą elektroforezy rozdzielono na 6 komponentów [53]. W wyniku chromatografii jonowymiennej (DEAE-celuloza, Dowex AG1(x2)) zdysocjowaną glicyninę rozdzielono na dwie grupy podjednostek (typu 2S), tj. kwaśne i zasadowe [27, 38, 161]. Bliższe badania wykazały, że podjednostki kwaśne reprezentowane są zasadniczo przez trzy rodzaje polipeptydów różniących się masami cząsteczkowymi (34800, 37000 i 42000—45000) [9, 32, 38, 65]. Masy cząsteczkowe podjednostek zasadowych wynoszą: 19600, 22300 i 22500. Prawdopodobnie cząsteczka glicyniny (m.cz.ok. 360000) składa się z sześciu podjednostek kwaśnych i sześciu zasadowych [161].

Drugim głównym komponentem białek zapasowych nasion soi są globuliny 7S zwane także β -konglicyninami [86]. Przy obniżonej do 0,1 sile jonowej buforu o pH 7 formują one dimery-9S [156]. Białka te w wyniku elektroforezy lub chromatografii jonowymiennej rozdzielają się

na pięć wyraźnych komponentów, wykazując znaczną heterogeniczność [155].

Preparaty β -konglycinin cechuje złożona budowa podjednostkowa. Białka te pod wpływem mocznika lub chlorku guanidyny ulegają dysocjacji (podobnie jak leguminy), której końcowymi produktami są polipeptydy o stałej sedymentacji — 2S. Wśród badaczy tego problemu istnieją duże rozbieżności dotyczące mas cząsteczkowych podjednostek zdysocjowanych globulin 7S (tab. 9). Podjednostki te nie są zapewne jednorodne o czym świadczą wyniki badań elektroforetycznych [12, 58] oraz obecność wielu N-końcowych aminokwasów [12, 82].

Tabela 9

Skład podjednostkowy globulin 7S

Gatunki	Masy cząsteczkowe (x 10 ⁻³)	Literatura
<i>Glycine max</i>	23, 51, 81	94
<i>Lupinus angustifolius</i>	20, 32, 56	20
<i>Phaseolus vulgaris</i>	23, 43, 47, 50, 56	37
<i>Pisum sativum</i>	23, 43, 56	37
<i>Vicia faba</i>	31, 33, 46, 56	173

Waintraub i Szutow [165] metodą ultrawierowania określili średnią masę cząsteczkową podjednostek 2S nasion soi, która wynosi 330000 daltonów. Biorąc pod uwagę masy cząsteczkowe białek 7S można przyjąć, że pojedyncze cząsteczki białek wicilinopodobnych nasion soi zbudowane są z sześciu podjednostek [161].

Z badań Koshiyama i Fukushima [85] wynika ponadto, że łańcuchy polipeptydowe natywnych białek soi (7,5S i 11,8S) formują w około 35% strukturę fałdową oraz zaledwie w kilku procentach strukturę helisy α . Pozostałe fragmenty łańcuchów polipeptydowych nie wykazują regularności konformacyjnych, dzięki czemu całe polipeptydy mogą przybrać postać nieregularnych „kłębków”, tworząc typowe białka globularne.

Białka zapasowe soi (glycinina oraz konglycininy β i γ) mają charakter glikoproteidowy [86, 88, 176]. Wśród komponentów węglowodanowych β -glycininy zidentyfikowano: D-mannoze i N-ecytylo-D-glukozaaminę. Występowanie znacznych ilości węglowodanów (do 5%) w białkach 7S soi, sprawia że mogą one być ekstrahowane z próbek nasion wodą destylowaną lub rozcieńczonymi buforami [37, 156]. Oczyszczona globulina 11S (glycinina) zawiera mniej substancji węglowodanowych, które zbudowane są z glukozy (i glukozaaminy), ksylozy, arabinozy, mannozy, galaktozy i niezidentyfikowanych wielu polisacharydów [88].

W nasionach fasoli złocistej i zwyczajnej (*Phaseolus aureus* i *Ph. vulgaris*) dominującą globuliną jest białko wicilinopodobne, które stanowi około 80% całkowitej ilości globulin (70). Globuliny typu 7S u zbadanych kilku gatunków rodzaju *Phaseolus* składają się z 2—4 komponentów [130, 133].

W nasionach fasoli zwyczajnej (*Ph. vulgaris*) globuliny wicilinopodobne reprezentowane są przez dwie frakcje białek (G1, G2). Globulina G1 zwana także glikoproteidem II jest białkiem homogenicznym [117, 130]. Białko to jako główny komponent globulin wicilinopodobnych fasoli zwyczajnej (75%) (o masie cząsteczkowej 140000; $S_{20,w}^{\circ} = 7,6$) wykazuje zdolność do odwracalnej dysocjacji przy zmniejszających się wartościach pH [143, 144]. Omawiane białko występuje w formie monometrycznej przy pH powyżej 6,5; obniżenie odczynu środowiska powoduje przejście większej części tej globuliny wicilinopodobnej w postać tetrameryczną (18,2S-19S) [117, 143]. Glikoproteid II zawiera 5,5% węglowodanów, jego punkt izoelektryczny przypada na pH 5,4. Globulina ta zbudowana jest z trzech różnych, stwierdzonych elektroforetycznie podjednostek — 53000, 47000 i 43000 [121, 142].

Druga frakcja białek wicilinopodobnych (stanowiąca około 25% globulin typu 7S) nasion *Ph. vulgaris* o współczynniku sedymentacji 6,6S składa się z kilku komponentów, wśród których wykryto wiele substancji białkowych będących inhibitorami wzrostu. Wiele komponentów tej frakcji (G2) zawiera duże ilości węglowodanów, a główny jej komponent tzw. glikoproteid I wykazuje silną aktywność hemaglutynacyjną [37]. Substancja ta należy do lektyn.

Białka leguminopodobne *Ph. vulgaris* zostały dotychczas słabo poznane [37]. Występują one w omawianych nasionach w niewielkiej ilości. Niektóre dane dotyczące ich właściwości fizykochemicznych i składu aminokwasowego zawierają tabele 3 i 4.

Białka 8S i 11,3S fasoli złocistej mają również budowę czwartorzędową [40]. Białko wicilinopodobne składa się z trzech typów podjednostek różniących się masami cząsteczkowymi (56000, 40000 i 16500), natomiast globulina leguminopodobna (11,3S) daje w warunkach dysocjacji cztery różne podjednostki (63500, 50000, 29500 i 24000). Omawiane dwa typy globulin są również glikoproteidami, prawie całkowicie zlokalizowanymi w ciałach białkowych liścieni [40]. Warto nadmienić, że w niektórych gatunkach nasion *Phaseolus* preparaty globulin typu 11S nie są homogeniczne i składają się zwykle z dwu komponentów [70, 130].

Wyekstrahowane z nasion łubinu (*Lupinus angustifolius*) globuliny rozdzielono metodą elektroforezy na paskach octanu celulozy na trzy frakcje α -, β i γ -konglutyny [20, 46, 47]. Sumaryczne globuliny stanowiące 80—90% białek nasion łubinu (*L. angustifolius*) składają się w

około 40% z alfa, 50% z beta i 10% z gamma konglutyny [47]. Analogiczne frakcje globulin występują w innych gatunkach nasion łubinu [44, 59, 60, 98].

Wszystkie wymienione rodzaje konglutyn rozdzielono elektroforetycznie w obecności SDS [20, 46, 47]. Konglutyna alfa (11,6S) składa się z 3-4 typów podjednostek (o masach cząsteczkowych 55000—89000) niekonwalencyjnie powiązanych ze sobą. Każda taka podjednostka w obecności merkaptetanolu rozpada się na komponenty (\approx 20000) będące prawdopodobnie pojedynczymi polipeptydami. Są one powiązane ze sobą mostkami dwusiarczkowymi. Konglutyna beta (7,8S) nie jest białkiem jednorodnym, składając się z wielu komponentów różniących się między sobą składem podjednostkowym [96]. Globulina ta zbudowana jest z czterech typów podjednostek, których masy cząsteczkowe wynoszą od 30000—60000.

Konglutyna gamma (10S) reprezentuje 10—25% ogólnych globulin nasion różnych gatunków łubinu [37]. Globulinę tę cechuje znaczna heterogeniczność [20]. Konglutyna γ w obecności nieredukujących czynników dysocjujących rozpada się na podjednostki o m.c. 40000, natomiast pod wpływem merkaptetanolu na dwa typy polipeptydów (30000 i 17000). Globulina 10S różni się wyraźnie składem aminokwasowym od pozostałych typów globulin (7,8S i 11,6S). Zawiera ona wielokrotnie więcej metioniny i cysteiny oraz prawie dwukrotnie więcej waliny i treoniny niż globuliny wicilino- i leguminopodobne [47], (tab. 10). Oprócz wymienionych podfrakcji globulin (7,8S, 10S i 11,6S) w nasionach łubinu stwierdzono niewielką ilość kilku typów białek globulinowych o innych masach cząsteczkowych (98).

Tabela 10

Zawartość aminokwasów egzogennych w % mol. w trzech typach globulin nasion łubinu wąskolistnego (wg 47)

Aminokwas	Konglutyna α	Konglutyna β	Konglutyna γ
Lys	2,81	3,96	4,10
Trp	0,73	0,08	0,70
Thr	3,86	3,10	6,32
1/2 Cys	0,59	0,30	2,91
Met	0,15	ślady	1,02
Val	4,43	3,68	6,83
Ile	4,31	5,23	3,98
Phe	3,34	4,20	4,48

Białka nasion bobu — *Vicia faba* składają się niemal wyłącznie z globulin, przy czym dominującą podfrakcją jest legumina [97]. Podczas elektroforezy na żelu poliakryloamidowym legumina zachowuje się jako komponent homogeniczny zawierający duże ilości kwasu glutaminowego i asparaginowego, głównie w formie amidów [11, 96]. Według wspomnianych autorów legumina bobu składa się z trzech różnych podjednostek (polipeptydów): 20000—23000 (A), 42000 (B) i 56000 (C). W natywnej leguminie (320000) wspomniane łańcuchy polipeptydowe mają występować w następującym stosunku molowym 6:3:1. Zgodnie z danymi Bailey'a i Boultera [11] strukturę czwartorzędową omawianej globuliny przedstawia wzór: A_6B_3C . Przytoczone wywody mają jednak szczupłe udokumentowanie eksperymentalne, ponieważ zostały oparte wyłącznie na badaniach elektroforetycznych (161).

Późniejsze badania Wrighta [173] oraz Wrighta i Boultera [175] dowiodły, że cząsteczka leguminy bobu składa się z sześciu podjednostek zasadowych (20100, 20900 i 23800) i takiej samej liczby podjednostek kwaśnych (36200). N-końcowymi aminokwasami podjednostek kwaśnych są: leucyna i treonina, zaś zasadowych tylko glicyna. Obydwa typy podjednostek tj. kwaśne i zasadowe połączone są ze sobą prawdopodobnie za pomocą mostków dwusiarczkowych, tworząc tzw. podjednostki pośrednie (3S). Podjednostki 3S łącząc się wzajemnie wiązaniami wodorowymi (a być może i jonowymi) formują tzw. półcząsteczki 7S, a następnie cząsteczkę 11S [37, 161], będące właściwą leguminą.

Substrukturę leguminy bobu badano również techniką map peptydowych [11]. Globulina ta składa się ze 140 sekwencji zawierających lizynę i argininę, 14 sekwencji zawierających cystynę i 3 sekwencji z obecnością metioniny. Problem występowania cysteiny (cystyny) w leguminach bobu jest kwestią dyskusyjną i być może świadczy o niedoskonałości stosowanych metod [37]. Tak np. Millerd i in. [9, 6, 97] nie wykryli tego aminokwasu w białku leguminowym bobu.

Wicilina nasion *Vicia faba* nie jest białkiem jednorodnym [12]. Zredukowana vicilina rozdziela się elektroforetycznie, w obecności SDS na cztery główne komponenty (66000, 60000, 56000 i 36000). W białku tym wspomniani badacze wykryli cztery N-końcowe aminokwasy (leucynę, treoninę, serynę i lizynę) występujące w największym stężeniu.

Badania Wrighta i Boultera [174] oraz Wrighta [173] wskazują, że wicilina bobu składa się przynajmniej z dwóch zasadniczych komponentów. Pierwszy w obecności czynnika dysocjującego rozpada się na dwie główne podjednostki: 55000 i 46000, zaś drugi komponent w wyniku dysocjacji degraduje się do podjednostek o wspólnej masie cząsteczkowej wynoszącej 43400 daltonów.

Porównanie aktywności enzymów hydrolitycznych (w jednostkach umownych) ciał białkowych i cytoplazmy nasion *Phaseolus aureus* (wg 52)

Enzym	Aktywność enzymatyczna		Aktywność enzymatyczna przypadająca na ciała białkowe w %
	ciała białkowe	cytoplazma	
Aktywność kazeolityczna	2,90	0,80	86
Karboksypeptydaza	3,90	0,60	95
α -Mannozydaza	21,60	3,80	94
N-acetylo- β -glukozaminidaza	28,80	7,60	87
BAPNAaza*	0,01	0,37	2,5
Aminopeptydaza leucynowa	0,03	9,20	0,3
Endopeptydaza	0,13	—	—
Globuliny	8,06 mg	0,73 mg	—

* BAPNAaza — enzym o aktywności trypsynopodobnej, katalizujący proces hydrolizy p-nitroanilidu benzoilargininy (BAPNA)

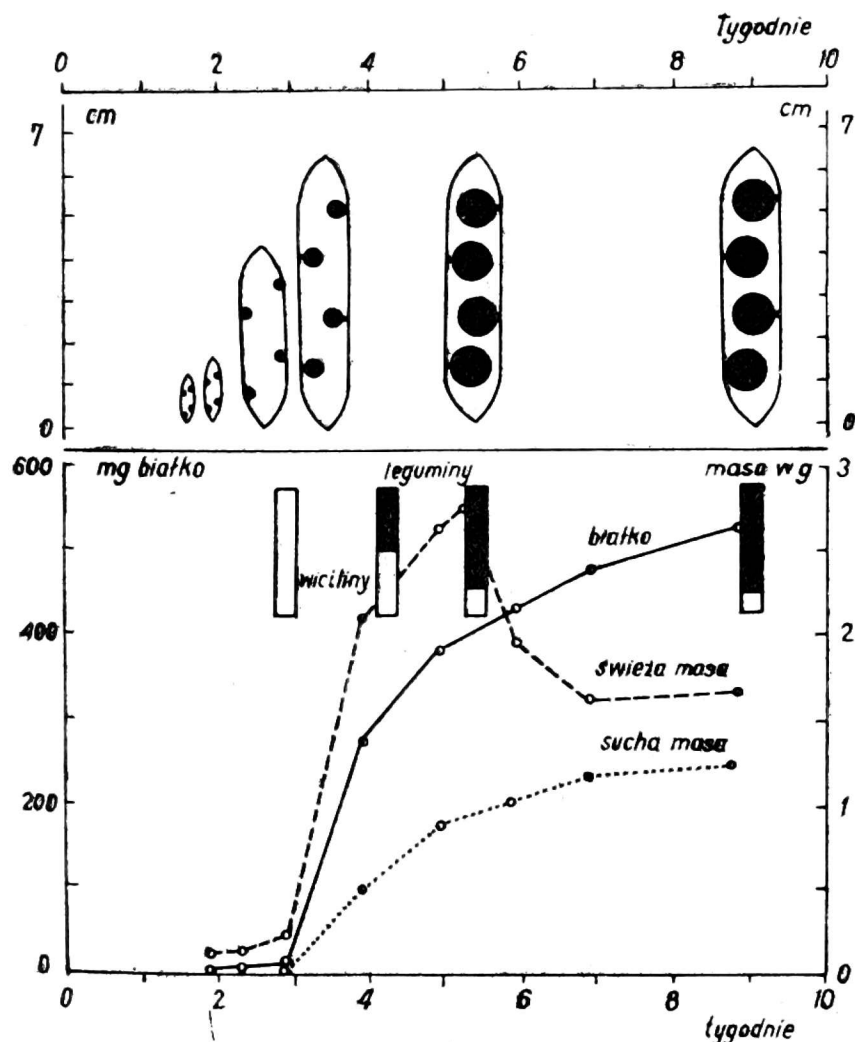
Wright i Boulter [174] stwierdzili ponadto, że podczas rozwoju nasion *V. faba* zmienia się skład podjednostkowy wiciliny. Obserwacja ta jest dalszym dowodem potwierdzającym heterogeniczność globulin 7S nasion bobu, a ponadto wskazuje, że natężenie biosyntezy różnych komponentów wicilin przebiega z niejednakową szybkością w okresie rozwoju i dojrzewania nasion. Skład podjednostkowy leguminy nie zmienia się natomiast podczas rozwoju nasion, co świadczy m.in. o homogeniczności tej globuliny [174]. W okresie rozwoju nasion bobu intensywność syntezy leguminy jest znacznie wyższa niż wiciliny, dlatego też w dojrziałych nasionach stosunek leguminy do wiciliny wynosi 4:1 (por. rys. 2; [174])

Obie omawiane podfrakcje globulinowe nasion bobu tj. legumina i wicilina zawierają odpowiednio 0,1% i 0,5% węglowodanów.

W kompleksie białkowym nasion grochu *Pisum sativum* zdecydowanie dominują globuliny, na które przypada ok. 85% sumy białek [13]. Resztę stanowią albuminy. Stosunek legumin do wicilin wynosi 3:1 [13]. Omawiane typy globulin różnią się wartością punktu izoelektrycznego, który dla legumin przypada na pH ok. 4,5, zaś dla wicilin wynosi 5,5 [37]. Właściwość tę wykorzystuje się przy frakcjonowaniu globulin na wicilinę i leguminę.

Wyizolowane z liścieni *Pisum sativum* leguminy zawierają 1,25% cukrów obojętnych (glukozy i mannozy) i 0,1% glukozaminy [13]. Globu-

linę tę w obecności dwutiotreitolu i SDS rozdzielono elektroforetycznie na żelu akryloamidowym na trzy główne i dwie śladowe podjednostki.



Rys. 2. Schemat rozwoju strąka bobiku (*Vicia faba*). W górze fazy morfologicznego rozwoju, na dole odpowiadające im fazy biochemicznego rozwoju; gromadzenie białek i ich skład (biały kolor — wiciliny, czarny — leguminy) przedstawiono za pomocą diagramu. Wyniki przeliczono na nasiona jednego strąka [wg 105]

Wiciliny grochu rozdzielono metodą chromatografii jonowymiennej na DEAE-celulozie na dwa różne komponenty [37, 45]. Nieadsorbująca się na DEAE-celulozie wicilina ma mniejszą masę cząsteczkową (15000) oraz słabiej rozpuszcza się w obniżonej temperaturze niż wicilina wiążąca się z jonitem celulozowym (190000). Wicilina 190000 przy obniżonej sile jonowej roztworu o pH 7 i 6,2 jest zdolna do asocjacji tworząc globulinę 11S [37]. Właściwości tej nie wykazuje wicilina o masie 150000. W sumarycznej wicilinie liścieni grochu wykryto trzy zasadnicze podjednostki (56000, 43000 i 23000).

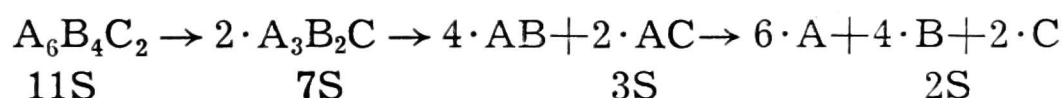
Podczas rozwoju i dojrzewania nasion grochu zmienia się w pewnym zakresie skład podjednostkowy zarówno wicilin, jak i leguminy [13, 96].

Obszerne badania przeprowadzono nad leguminą nasion *Vicia sativa* [161]. Białko to w obecności 4M mocznika lub chlorku guanidyny rozpada się na mieszaninę podjednostek. Podjednostki białkowe leguminy wyki rozdzielona za pomocą chromatografii na DEAE-celulozie na trzy frakcje odpowiadające trzem frakcjom elektroforetycznym [162, 163].

W wyniku rozdziału chromatograficznego otrzymano jedną frakcję zasadową A (nieadsorbującą się na kolumnie celulozowej) i dwie frakcje kwaśne — B i C. Właściwości wyizolowanych podjednostek przedstawiono niżej:

	A	B	C
$S_{20, w}$	1,40	2,28	2,25
Masy cząsteczkowe	24300	37600	32600
N-końcowe aminokwasy	Glicyna	Leucyna	Treonina

Z przytoczonych danych wynika, że legumina nasion wyki składa się z trzech typów podjednostek różniących się stałymi sedymentacji, masami cząsteczkowymi, N-końcowymi aminokwasami, właściwościami elektroforetycznymi i chromatograficznymi. Omawiane grupy podjednostek różnią się także wyraźnie składem aminokwasowym [161]. Na podstawie tych badań proponowany model czwartorzędowej struktury leguminy nasion wyki można określić wzorem $A_6B_4C_2$. Dysocjacja globuliny 11S wyki na podjednostki kwaśne i zasadowe (2S) przebiega w następujący sposób [161].



Podsumowując obszernie badania obejmujące globuliny nasion roślin strączkowych należy stwierdzić, że białka te w przeciwieństwie do albumin wykazują na ogół małą heterogeniczność. Globulina 11S wydaje się być białkiem jednorodnym, aczkolwiek znane są nieliczne przypadki (np. arachina orzeszka ziemnego) wskazujące na jej niewielką heterogeniczność [37]. Natomiast białka 7S cechuje mała heterogeniczność, a ich struktura czwartorzędowa stabilizowana jest zwykle przez niekowalencyjne (wodorowe, jonowe) wiązania chemiczne.

Omówione wyżej globuliny (7 i 11S) nasion strączkowych pełnią głównie funkcje zapasowe. Można zatem oczekiwać, że złożoność struktury wtórnej globulin wiąże się w pełnej mierze z ich rozpadem podczas kiełkowania nasion. Prawdopodobnie hydrolizę białek zapasowych poprzedza ich rozpad na podjednostki. Obecność podjednostek globulin 11S stwierdzono w kiełkujących nasionach soi [28] i gryki [17]. Jedną z przyczyn dysocjacji globulin zachodzącej podczas kiełkowania nasion jest proces dezamidacji [151]. Dezamidacja globulin może prowadzić w wyniku zwiększenia się wolnych grup karboksylowych do osłabienia ich czwartorzędowej struktury [161]. Przytoczone dane zdają się wskazywać na istotne znaczenie struktury czwartorzędowej globulin w regulacji procesów hydrolizy białek zapasowych nasion podczas kiełkowania.

Innym zagadnieniem wymagającym wyjaśnienia jest niejednorodność podjednostek występujących w globulinach. Współdziałanie kwaśnych i zasadowych podjednostek w białkach 11S sprzyja zapewne stabilizacji ich czwartorzędowej struktury. Trudniej natomiast zrozumieć celowość istnienia w obrębie jednej cząsteczki globuliny kilku typów podjednostek kwaśnych lub zasadowych. Zdaniem Bailey'a i Boultera [12] istnienie różnorodności podjednostek w globulinach 11S może być pożyteczne dla rośliny, ponieważ równoległy udział kilku genów w biosyntezie białek zapasowych może przyspieszać rozwój nasienia.

Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie białek

Białka zapasowe w odróżnieniu od białek cytoplazmatycznych odkładają się w sferycznych strukturach (organellach) komórkowych zwanych ciałami białkowymi („protein bodies”) lub ziarnami aleuronowymi [1—8, 102]. Niektórzy autorzy termin „ziarna aleuronowe” stosują jedynie w odniesieniu do drobnych struktur zlokalizowanych w zewnętrznej części bielma, czyli w warstwie aleuronowej ziarniaków [113], natomiast ciałami białkowymi nazywa się drobne twory występujące głównie wewnątrz liścieni i bielma. Obecność tych ciał wykryto również w zarodkach ziarniaków i osiach zarodkowych nasion [1, 5, 96, 123]. Większość jednak autorów por. [76, 105] utożsamia lub łączy w jedną grupę obydwu rodzaje utworów.

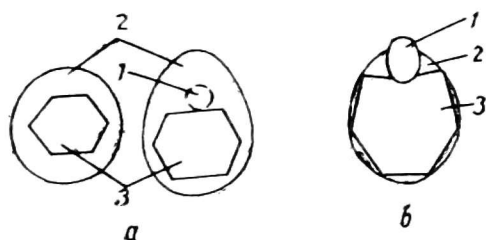
Omawiane struktury cechuje znaczny polimorfizm, co przejawia się w różnorodności form i rozmiarów ciał białkowych. W zależności od gatunku (a nawet tkanki) nasienia ich rozmiary wahają się od 1—20 μm . Największe ciała białkowe wykryto w nasionach roślin oleistych.

Prawie wszystkie badane ciała białkowe otoczone są pojedynczą błoną lipidowo-białkową. Ich wnętrze wypełnia nieprzezroczysta, bezpostaciowa substancja białkowa (tzw. „matriks”), w której mogą być połączony różne inkluzje: globoidy, krystaloidy i inne drobne struktury [3, 7, 10, 178].

Podstawowym składnikiem ciał białkowych są substancje białkowe, których zawartość stanowi 70—97% ich suchej masy [98, 102, 141, 157]. Organelle te zawierają ponadto: wolne aminokwasy, fitynę, węglowodany (głównie w formie sacharozy), fosfolipidy, fosforany, różne kationy i inne substancje.

W ciałach białkowych nasion roślin dwuliściennych substancje białkowe reprezentowane są głównie przez globuliny oraz niewielkie ilości albumin. We frakcji albuminowej tych organelli zlokalizowane są niektóre enzymy hydrolityczne [14, 33, 52, 141].

Na podstawie obrazu z mikroskopu świetlnego i elektronowego można ciała białkowe orientacyjnie podzielić na kilka typów. Do najbardziej rozpowszechnionych należą tzw. „złożone” ciała białkowe. Zawierają one dwa typy inkluzji: globoidy i krystaloidy. W pojedynczej organelli występuje zwykle jeden duży krystaloid i kilka globoidów (rys. 3). Głównym składnikiem globoidów jest fityna występująca w formie soli wapniowo-magnezowej, stanowiąc 70—80% ich suchej masy [145]. Przypuszcza się, że część fityny wiąże się z białkami formując kompleksy białkowo-fitynowe [146].



Rys. 3. Schemat budowy ciał białkowych nasion arbuza: a — osiowa część zarodka, b — liścienie; 1-globoid, 2-strefa amorficzna, 3-krystaloid (wg 5)

Drugim rodzajem inkluzji występujących w matriks złożonych ciał białkowych są krystaloidy. Wyraźnie sformowane krystaloidy białkowe (obok globoidów) obserwowano w ciałach białkowych nasion rącznika, dyni, konopi i arbuza. Analiza chemiczna wyizolowanych z ciał białkowych krystaloidów wykazała, że są one zbudowane wyłącznie z globulin typu 11S. Na przykład krystaloidy ciał białkowych konopi zbudowane są z głównego białka zapasowego nasion-edystyny (m.cz. 334000; 13, 2S) [7]. Również krystaloidy nasion rącznika [159, 178] oraz dyni [141] mają charakter globulinowy, wykazując złożoną strukturę podjednostkową. Derbyshire i in. [37] zaliczają je do białek leguminopodobnych. Globulina krystaloidu rącznika (332000; 12,9S) w obecności SDS rozpada się na podjednostki o masie cząsteczkowej 50000—65000 [159, 178]. Dalsze traktowanie merkaptoetanołem powoduje rozpad tego białka (65000) na mniejsze podjednostki: 15800 i 32000 [159]. Tak więc w krystaloidach złożonych ciał białkowych zlokalizowane są białka zapasowe nasion dyni, konopi rącznika i arbuza.

Amorficzna część złożonych ciał białkowych reprezentowana jest przez białka rozpuszczalne w wodzie — albuminy. Składają się one z dużej liczby komponentów [5, 141]. Szczegółowym badaniom poddano albuminy ciał białkowych nasion rącznika. Głównymi ich komponentami są białka niskocząsteczkowe: 12500 i 10300 [159]. Ponadto albuminy matriks zawierają niewielkie ilości glikoproteidów, wśród których zidentyfikowano dwie lektyny: fitohemaglutyninę (12000) oraz rycynę (65000) [178].

W zasobnych w białka liścieniach wielu gatunków *Leguminosae* występują zwykle homogeniczne, pozbawione inkluzji ciała białkowe. Jed-

nak w liścieniach grochu, łubinu i kilku innych gatunkach roślin motylkowatych wykryto obok prostych, złożone ciała białkowe zawierające globoidy [6, 42, 98].

Fitynę wykryto w ciałach białkowych soi [157], łubinu [98, 146], bobu [100].

Białka jako główny składnik ciał białkowych stanowią w liścieniach wielu gatunków roślin strączkowych 80—90% suchej masy tych organelli [76, 96, 141]. Obecnie wiadomo, że 60—80% białek nasiona zlokalizowana jest w ciałach białkowych w tym większość lub prawie wszystkie białka zapasowe [141, 177].

Zdecydowana większość białek zawartych w omawianych strukturach nasion roślin strączkowych i innych dwuliściennych ma charakter globulin [37, 76, 92, 160]. Na przykład substancje białkowe ciał białkowych nasion łubinu żółtego w 71% składają się z globulin, 23% albumin i innych nierozpuszczalnych białek [96].

Globuliny 7 i 11S wykryto w ciałach białkowych soi [29, 83], orzeszka ziemnego [37], łubinu [96], bobu [100] i fasoli [40, 50].

Frakcja albuminowa ciał białkowych (nasion strączkowych i innych dwuliściennych) zawiera wiele enzymów hydrolitycznych (tab. 11). Są to enzymy proteolityczne: proteinazy, amino- i karboksypeptydazy oraz fosfatazy i niektóre glikozydazy [8, 52, 54, 76, 98, 100, 112, 141, 147, 176].

W związku z występowaniem w ciałach białkowych enzymów hydrolitycznych, niektórzy autorzy sądzą, że organelle te, oprócz gromadzenia białek zapasowych, spełniają również aktywną rolę w trawieniu wewnątrzkomórkowym przypominając tym lizosomy zwierzęce. Pogląd ten nie ma jednak obecnie dostatecznego uzasadnienia eksperymentalnego. Izolowane np. ciała białkowe z suchych nasion fasoli (*Ph. vulgaris*) i innych gatunków przeprowadzają hydrolizę własnych białek w ograniczonym zakresie [2, 4, 52, 141, 146, 147]. Aktywną hydrolizę białek zapasowych zgromadzonych w ciałach białkowych obserwuje się dopiero podczas kiełkowania [52]. Interpretacja tego faktu może być dwojaka: niektóre enzymy proteolityczne w okresie kiełkowania przenikają z cytoplazmy do ciał białkowych lub też aktywowane są one wówczas w obrębie samych organelli.

Wartość odżywcza nasion

Nasiona roślin strączkowych grubonasiennych są znacznie bardziej zasobne w białka niż ziarno zbóż. Przy sprzyjających warunkach klimatyczno-glebowych dają one prawie dwukrotnie wyższy plon białka w porównaniu z roślinami zbożowymi [21, 152, 153]. Duża na ogół war-

tość pokarmowa nasion roślin strączkowych spowodowana jest znacznym udziałem w ich białkach albumin o zrównoważonym składzie aminokwasów egzogennych.

Przy wartości odżywczej białek mleka przyjętej za 100 wartość białek nasion większości omawianych roślin osiąga 75—85 [114]. Wartość odżywcza białek nasion grochu [107] i łubinu [98] jest prawie taka sama jak nasion soi i zbliża się do 100 [114, 134]. Według Szczygła i Wysokińskiej [148] wartość biologiczna białek nasion strączkowych jest niższa od przytoczonej wyżej.

W białkach nasion roślin strączkowych znajdują się prawie wszystkie aminokwasy egzogenne w ilości zbliżonej do ich zawartości w pełnowartościowych produktach zwierzęcych. Rozpatrując skład aminokwasowy omawianych białek należy stwierdzić, że zawierają one prawie dwa razy więcej lizyny niż ziarniaki zbóż, natomiast mniej metioniny. Warto nadmienić, że pod względem zawartości lizyny i metioniny białka grochu nie ustępują soi (tab. 12).

Tabela 12

Zawartość egzogennych aminokwasów w białku nasion i ziarna
(w g na 100 g białka) wg (184)

Amino- kwas	Psze- nica	Ku- kury- dza	Żyto	Faso- la	Soja	Groch	Mleko	Zalecana norma dobową dla człowieka w g (148)
Lys	2,8	2,3	4,1	6,3	6,8	6,3	8,1	1,6
Leu	6,4	15,0	6,1	8,0	6,6	7,0	11,8	2,2
Ile	3,4	6,4	3,4	3,6	6,0	5,5	6,5	1,4
Val	4,2	5,3	1,5	4,4	5,3	5,5	6,2	1,6
Met	1,5	3,1	1,8	0,6	1,6	1,4	2,2	2,2
Thr	2,6	3,7	3,2	3,6	3,9	3,9	4,8	1,0
Phe	3,9	5,0	3,2	4,2	5,3	5,0	4,6	2,2
Trp	1,1	0,6	1,0	—	1,4	0,8	1,4	0,5

Najbardziej zrównoważony skład aminokwasów egzogennych mają albuminy [107]. Należy więc przyjąć, że im więcej tych substancji zawierają nasiona, tym większą mają wartość pokarmową. Na przykład nasiona grochu (*P. sativum*) mogą zawierać do 25% albumin [49, 181].

U wielu gatunków nasion roślin strączkowych do tzw. aminokwasów „deficytowych” należy przede wszystkim metionina, a następnie cysteina oraz niekiedy walina, leucyna i tryptofan [23, 24, 41, 75]. Warto jednak dodać, że oznaczenia ilościowe niektórych aminokwasów egzogennych (metionina, cysteina i tryptofan) występujących w białkach w

minimalnych ilościach są często mało dokładne [37], dlatego też dane dotyczące ich zawartości w białkach nasion są sprzeczne. Prowadzone są obecnie prace eksperymentalne mające na celu udoskonalenie metod oznaczenia aminokwasów siarkowych w białkach nasion roślin strączkowych [24].

Poszczególne rodzaje białek globulinowych nasion strączkowych różnią się często znacznie składem aminokwasowym (tab. 4 i 6). Białka globulinowe typu 7S występujące w nasionach grochu, soi, bobu, fasoli są znacznie uboższe w aminokwasy siarkowe niż globuliny 11S [22, 24, 31, 80, 117, 138].

Wyraźne różnice w składzie aminokwasowym trzech typów globulin obserwuje się również na przykładzie nasion łubinu (tab. 10). Najuboższa w aminokwasy siarkowe i tryptofan jest konglutyna beta, najkorzystniejszy natomiast skład aminokwasów egzogennych (w tym siarkowych) ma konglutyna gamma (tab. 10). Ta ostatnia globulina stanowi jednak zaledwie 10—25% całości globulin nasion łubinu [47]. W pracach hodowlanych nad łubinem dąży się więc do otrzymania odmian o nasionach, w których dominowały by konglutyna alfa i gamma [47].

Zawartość metioniny i cysteiny w nasionach łubinu, bobu, fasoli oraz soi może być w pewnym zakresie regulowana poziomem nawożenia związkami siarki [20, 47]. Innym (chyba lepszym) sposobem poprawienia jakości białek nasion strączkowych jest prowadzenie prac hodowlanych mających na celu wyselekcjonowanie linii o korzystnym składzie frakcji globulin w nasionach [24]. Wiadomo, że wartość stosunku globulin 11S do 7S w nasionach zależy bowiem nie tylko od gatunku lecz także od odmiany roślin.

LITERATURA

1. Abdul-Baki A.A., Baker J.E.: *Seed Sci. and Technol.* 1, 89, 1973.
2. Adams C.A., Novellie L.: *Plant Physiol.* 55, 7, 1975.
3. Adams C.A., Novellie L., Liebenberg N.W.: *Cereal Chem.* 53, 1, 1976.
4. Adams C.A., Watson T.G., Novellie L.: *Phytochemistry* 14, 953, 1975.
5. Aleksiejewa M.W.: *Fizjoł. Biochim. Kult. Rast.* 7, 63, 1975.
6. Altschul A.M., Yatasu L.Y., Ory R.L.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17, 113, 1966.
7. Angelo St.A.J., Yatasu L.Y., Ory R.L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 199, 1968.
8. Angelo St.A.J., Ory L.Y., Hansen H.J.: *Phytochemistry* 8, 1135, 1969.
9. Badley R.A., Atkinson D., Hauser H., Odani D., Green J.P., Stubbs J.M.: *Biochim. Biophys. Acta* 412, 214, 1975.
10. Bailey C.J., Cobb A., Boulter D.: *Planta (Berl)* 95, 103, 1970.
11. Bailey C.J., Boulter D.: *Eur. J. Biochem.* 17, 460, 1970.

12. Bailey C.J., Boulter D.: *Phytochemistry* 11, 59, 1972.
13. Basha S.M.M.: Protein metabolism in the cotyledons of *Pisum sativum* L. during seed development and germination. PhD thesis. Grad. Coll. Univ. Oklahoma. Norman., s. 79, 1974.
14. Basha S.M.M., Beevers L.: *Planta* 124, 77, 1975.
15. Bhaty R.S., Mackenzie S.L., Finlayson A.J.: *Can. J. Biochem.* 46, 1191, 1968.
16. Biełozierskij M.A.: W „Rastitelnyje bielki i ich biosyntezy” (Kretowicz W.L. red.) s. 152, 1975.
17. Biełozierskij M.A.: *Dokł. ANSSSR* 199, 468, 1971.
18. Birk Y.: *Biochim. Biophys. Acta* 54, 378, 1961.
19. Birk Y.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 146, 388, 1968.
20. Blagrove R.J., Gillespie J.M.: *Aust. J. Plant Physiol.* 2, 13, 1975.
21. Bochniarz M., Bochniarz J.: *Post. Nauk Roln.* 2, 71, 1971.
22. Boulter D., Derbyshire E.: In „Chemotaxonomy of the Leguminosae” (Harborne J.B., Boulter D., Turner B.L., eds), Academic Press, London and New York, s. 285, 1971.
23. Boulter D., Evans I.M., Thomson A.: *Proceedings First II TA Grain Legume Improvement Workshop, 29 Oct. — 2 NOV.*, s. 239, 1973.
24. Boulter D., Evans I.M.: In „Evaluation of seed Protein Alterations by Mutation Breeding”. IAEA, Viena, s. 147, 1976.
25. Bowman D.E.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 57, 139, 1944.
26. Campenio S., Barbe J., Lanet J., Lasry S., Savary J.: *Ann. Pharm. Fr.* 28, 165, 1970.
27. Castimpoalas N.: *FEBS Letters*, 4, 259, 1969.
28. Castimpoalas N., Campbell T.G., Mayer E.W.: *Plant Physiol.* 43, 799, 1968.
29. Catsimpoalas N., Ekenstam C.: *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 490, 1969.
30. Catsimpoalas N., Kenney J.A., Meyer E.W., Szuhaj B.F.: *J. Sci. Fd. Agric.* 22, 448, 1971.
31. Catsimpoalas N., Rogers D.A., Circle S.J., Meyer E.W.: *Cereal Chem.* 44, 631, 1967.
32. Catsimpoalas N., Wang J.: *Anatyl. Biochem.* 44, 436, 1971.
33. Chrispeels M.J., Boulter D.: *Plant Physiol.* 55, 1031, 1975.
34. Danielsson C.E.: *Biochem. J.* 44, 387, 1949.
35. Danielsson C.E., Ingelman B.: *Svensk Kem. Tid.* 59, 162, 1947.
36. Dawson R.: *Analyt. Biochem.* 41, 305, 1971.
37. Derbyshire E., Wright D.J., Boulter D.: *Phytochemistry* 15, 3, 1976.
38. Draper M., Catsimpoalas N.: *Phytochemistry*, 16, 25, 1977.
39. Dudman W.F., Millerd A.: *Biochem. Systematics Ecol.* 3, 25, 1975.
40. Ericson M.C., Chrispeels M.J.: *Plant Physiol.* 52, 98, 1973.
41. Evans I.M., Boulter D.: *Qual. Plant. — Pl. Foods Hum. Nutr.* 24, 257, 1975.
42. Gabara B., Konopska L.: *Acta Soc. Bot. Pol.* 43, 281, 1974.
43. Gawriljuk I.P.: *Immunochimiczeskije issledowania bielkow gorocho.* Kand. diss., Ufa, 1966.
44. Gerritsen T.: *Biochem. Biophys. Acta* 22, 269, 1956.
45. Ghetie V., Buzila L.: *Rev. Roum. Biochim.* 5, 271, 1968.
46. Gillespie J.M., Blagrove R.J.: *Aust. J. Plant Physiol.* 2, 29, 1975.

47. Gillespie J.M., Blagrove R.J., Randal P.J.: In „Evaluation of Seed Protein Alternations by Mutation Breeding”, IAEA, Wiena, s. 151, 1976.
48. Goding L.A., Bhatti R.S., Finlayson A.J.: Can. J. Biochem. 48, 1096, 1970.
49. Gottschalk W., Miller H.P., Wolff G.: In „Evaluation of Seed Protein Alternations by Mutation Breeding”, IAEA, Wiena, s. 157, 1976.
50. Graham T.A., Gunning B.E.S.: Nature 228, 81, 1970.
51. Grigorcza P.D., Klimienko W.G.: Izw. An Mołd. SSR, ser. biol. i chim. nauk, 4, 24, 1971.
52. Harris N., Chrispeels M.J.: Plant Physiol. 56, 292, 1975.
53. Hill J.E., Breidenbach R.W.: Plant Physiol. 53, 742 i 747, 1974.
54. Hobday S.M., Thruman D.A., Barber D.J.: Phytochemistry 12, 1041, 1973.
55. Hochstrasser K., Illchman K., Werle E.: Z. Physiol. Chem. 351, 1503, 1970.
56. Houston D.F., Mohammad A.: Cereal Chem. 47, 5, 1970.
57. Ibragimow A.P., Tuicziew A.W., Tursunbajew P., Junuschanow Sz.: W „Rastitielnyje biełki ich biosintez” (Kretowicz W.L., red.), s. 156, 1975.
58. Jackson P., Boulter D., Thruman D.A.: New Phytol. 68, 25, 1969.
59. Joubert F.J.: Biochim. Biophys. Acta 17, 3, 1955.
60. Joubert F.J.: Biochim. Biophys. Acta 19, 1, 1956.
61. Kapoor A.C., Gupta V.P.: J. Sci. Fd. Agric. 28, 113, 1977.
62. Kirsi M.: Physiol. Plant 29, 141, 1973.
63. Kirsi M., Mikola J.: Planta (Berl.) 96, 281, 1971.
64. Kitamura K., Okubo K., Shibasaki K.: Agric. Biol. Chem. 38, 1083, 1974.
65. Kitamura K., Shibasaki K.: Agric. Biol. Chem. 39, 945, 1975.
66. Kloz J.: In „Chemotaxonomy of the Leguminosae” (Harborne J.B., Boulter D and Turner B.L., eds.), Academic Press, London, s. 309—365, 1971.
67. Klimienko W.G.: Izw. An Mołd. SSR, ser. biol. i chim. nauk, 6, 34, 1971.
68. Klimienko W.G.: Rastitielnyje biełki i ich biosintez, Izd. „Nauka”, Moskwa, s. 97, 1975.
69. Klimienko W.G.: Biełki sozriewajuszczich siemjan bobowych rastienij, Izd. „Sztinca”, Kisziniew, 1975.
70. Kliwanskaja W.W., Sajanova W.W.: W „Biełki siemjan kulturnych Rastienij”, Izd „Sztinca”, Kisziniew, s. 48, 1973.
71. Kloz J., Turkowa V.: Biol. Plant. 5, 29, 1963.
72. Koide T., Ikenaka T.: Eur. J. Biochem. 32, 401, 1973.
73. Koide T., Ikenaka T.: Eur. J. Biochem. 32, 417, 1973.
74. Koide T., Tsunasowa S., Ikenaka T.: Eur. J. Biochem. 32, 408, 1973.
75. Konariew W.G.: W „Rastitielnyje biełki i ich biosintez” (Kretowicz W.L., red.), Izd. „Nauka”, Moskwa, s. 5, 1975.
76. Konopska L.: Badania ziaren aleuronowych bielma *Iris pseudoacorus* L. i liścieni *Pisum sativum* L. Acta Universitatis Lodziensis, 1975 (praca habilitacyjna).
77. Koshiyama I.: Agric. Biol. Chem. 29, 855, 1965.
78. Koshiyama I.: Agric. Biol. Chem. 30, 646, 1966.
79. Koshiyama I.: Agric. Biol. Chem. 31, 874, 1967.
80. Koshiyama I.: Cereal Chem. 45, 394 i 405, 1968.

81. Koshiyama I.: *Agric. Biol. Chem.* 32, 879, 1968.
82. Koshiyama I.: *Agric. Biol. Chem.* 35, 385, 1971.
83. Koshiyama I.: *Agric. Biol. Chem.* 36, 62, 1972.
84. Koshiyama I.: *Int. J. Peptide proteins Res.* 4, 167, 1972.
85. Koshiyama I., Fukushima D.: *Cereal Chem.* 50, 114, 1973.
86. Koshiyama I., Fukushima D.: *Phytochemistry* 15, 157, 1976.
87. Koshiyama I., Fukushima D.: *Agric. Biol. Chem.* 15, 161, 1976.
88. Koshiyama I., Fukushima D.: *Cereal Chem.* 53, 768, 1976.
89. Krahn J., Stevens F.C.: *Biochemistry* 11, 1804, 1972.
90. Kunitz M.: *Science* 101, 668, 1945.
91. Lis H., Sharon N.: *Ann. Rev. Biochem.* 42, 541, 1973.
92. Lott J.N.A.: *Plant Physiol.* 55, 913, 1975.
93. Mackenzie S.L., Blakely J.A.: *Can. J. Botany* 50, 1825, 1972.
94. Masaki T., Soejima M.: *Science Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ.* 20, 35, 1972.
95. Miege M.N., Mascherpa J.M., Royer-Spieer A., Grange A., Miegge J.: *Planta (Berl.)* 131, 81, 1976.
96. Millerd A.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 53, 1975.
97. Millerd A., Simon M., Stern H.: *Plant Physiol* 48, 419, 1971.
98. Mironienko A.W.: *Biochimia Ijupina. Izd. „Nauka i technika”, Mińsk,* 1975.
99. Mironienko A.W., Domasz W.I.: *AN BSSR, Ser. Biól. Nauk* 2, 1971.
100. Morris G.F.I., Thruman D.A., Boulter D.: *Phytochemistry* 9, 1707, 1970.
101. Morita Y., Yoshida C.: *Agr. Biol. Chem.* 32, 664, 1968.
102. Morton R.K., Palk B.A., Raison J.K.: *Biochem. J.* 91, 522, 1964.
103. Mosołow W.W.: W „*Rastitielnyje białki i ich biosintez*” (Kretowicz W.L. red.), *Izd. „Nauka”, Moskwa*, s. 172, 1975.
104. Mourgue M., Baret R., Renai J., Savary J.: *C.R. Soc. Biol.* 162, 1128, 1968.
105. Müntz K., Scholz G.: *Biol. Rundschau*, 12, 225, 1974.
106. Nitsan Z.: *J. Sci. Fd. Agric.* 22, 252, 1971.
107. Nowacki E.: *Biul. Branż. Hod. Rośl. i Nasienn.* 5, 5, 1974.
108. Nowacki E.: *Post. Nauk Roln.* 1(144), 45, 1974.
109. Odani S., Ikenaka T.: *J. Biochem.* 71, 839, 1972.
110. Odani S., Ikenaka T.: *J. Biochem.* 74, 697, 1973.
111. Odani S., Koide T., Ikenaka T.: *J. Biochem.* 71, 831, 1972.
112. Palczewska I.: *Post. Biol, Komór.* 1, 221, 1974.
113. Pawłow A.N.: *Fizjoł. Biochim. Kult. Rast.* 4, 464, 1972.
114. Pleszkow B.P.: *Biochimia sielskochozajstwiennych rasteienij* *Izd. „Kołos”, Moskwa*, 1975.
115. Polanowski A.: *Preparacja oraz charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna inhibitorów trypsyny z ziarników żyta (Secale cereale L.)*, PWN, Warszawa-Wrocław, 1976 (praca habilitacyjna).
116. Pusztai A.: *Planta (Berl.)* 107, 121, 1972.
117. Pusztai A., Watt W.B.: *Biochim. Biophys. Acta* 207, 413, 1970.
118. Rackis J.J., Anderson R.L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 230, 1964.
119. Reynolds J.A., Tanford C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 1002, 1970.

120. Richardson M.: *Phytochemistry* 16, 159, 1977.
121. Romero L.J., Sun S.M., McLeester R.C., Bliss F.A., Hall T.C.: *Plant Physiol.* 56, 776, 1975.
122. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Brunori M., Bruzese M., Caputo A., Satriani F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 110, 1964.
123. Rost T.L.: *Amer. J. Bot.* 59, 607, 1972.
124. Royer A.: *Phytochemistry* 14, 915, 1975.
125. Royer A., Miege M.N., Grange A., Miege J., Mascherpa J.M.: *Planta (Berl.)* 119, 1, 1974.
126. Ryan C.A.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24, 173, 1973.
127. Rzeszotarska B., Wiejak S.: *Post. Biochem.* 22, 123, 1976.
128. Sajanowa W.W.: *Fizjoł. Biochim. Kult. Rast.* 3, 202, 1971.
129. Sajanowa W.W.: *Biochimija* 37, 1215, 1972.
130. Sajanowa W.W.: W „*Rastitielnyje bielki i ich biosintez*” (Kretowicz W.L., red.), *Izd. „Nauka”, Moskwa*, s. 117, 1975.
131. Sajanowa W.W., Gofman Ju.Ja.: *Biochimija* 30, 209, 1965.
132. Sajanowa W.W., Sumienkowa W.W., Sławna T.S.: *Izw An Mold. SSR, Ser. Biol. i Chim. Nauk* 3, 34, 1972.
133. Sajanowa W.W., Sumienkowa W.W., Sławna T.S.: *Biol. Nauki* 1, 81, 1973.
134. Sarvar G., Sosulski F.W.: *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.* 8, 109, 1975.
135. Schwenke K.D., Schultz M., Linow H.J., Uhlig J., Franzke C.: *Nahrung* 18, 709, 1974.
136. Shain Y., Mayer A.M.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 167, 1974.
137. Shetty K.J., Rao M.S.N.: *Analyt. Biochem.* 62, 108, 1974.
138. Shvarts V.S., Vaintraub I.A.: *Biochimija* 32, 162, 1967.
139. Singh J., Dickert J.W.: *Prep. Biochem.* 3, 73, 1973.
140. Shvarts V.S.: *Trudy po Khimii Prirodnykh Soedinenii* 7, 134, 1968.
141. Sobolew A.M., Suworow W.I.: W „*Rastitielnyje bielki i ich biosintez*” (Kretowicz W.L., red.), *Izd. „Nauka”, Moskwa*, s. 126, 1975.
142. Stockman D.R., Hall T.C., Ryan D.S.: *Plant Physiol.* 58, 272, 1976.
143. Sun S.M., McLeester R.C., Bliss F.A., Hall T.C.: *J. Biol. Chem.* 249, 2118, 1974.
144. Sun S.M., Hall T.C.: *J. Agr. Fd. Chem.* 23, 184, 1975.
145. Suworow W.I., Buzulukowa N.P., Sobolew A.M., Swiesznikowa I.N.: *Fizjoł. Rast.* 17, 1223, 1970.
146. Suworow W.I., Sobolew A.M.: *Fizjoł. Rast.* 19, 578, 1972.
147. Szczerbakow W.G., Iwanowa D.I., Fiedorowa S.A.: *Fizjoł. Rast.* 21, 756, 1974.
148. Szczygieł A., Wysokińska Z.: *Zarys nauki o żywieniu*, PZWL Warszawa, 1974.
149. Sztefyrce M.A., Klimienko W.G.: W „*Bielki Siemjan Kulturnych Rastienij*” (Klimienko W.G., red.), *Izd. „Sztinca”, Kisziniew* 1973.
150. Szutow A.D., Waintraub I.A.: *Biochimija* 31, 726, 1966.
151. Szutow A.D., Waintraub I.A.: *Fizjoł. Rast.* 20, 504, 1973.
152. Święcicki W.: *Biul. Branż. Hod. Rośl. i Nasienn.* 5, 10, 1974.
153. Święcicki W.: *Post. Nauk Roln.* 3, 27, 1975.
154. Tan C.G.L., Stevens F.C.: *Eur. J. Biochem.* 18, 503, 515, 1971.
155. Thanh V.H.K., Okubo K., Shibasaki K.: *Plant Physiol.* 56, 19, 1975.

156. Thanh V.H.K., Shibasaki K.: *J. Agric. Fd. Chem.* 24, 1117, 1976.
157. Tombs M.P.: *Plant Physiol.* 42, 797, 1967.
158. Tombs M.P., Lowe M.: *Biochem. J.* 105, 181, 1967.
159. Tully R.E., Beewers H.: *Plant Physiol.* 58, 710, 1976.
160. Varner J.E., Schidlovsky G.: *Plant Physiol.* 38, 139, 1963.
161. Waintraub I.A.: W „Rastitielnyje bielki i ich biosintez” (Kretowicz W.L., red.), *Izd. „Nauka”, Moskwa*, s. 152, 1975.
162. Waintraub I.A., Nyguen - Thanh - Thien.: *Dokl. AN SSSR* 180, 1239, 1968.
163. Waintraub I.A., Nyguen - Thanh - Thien.: *Molek. Biol.* 5, 59, 1971.
164. Waintraub I.A., Szutow A.D.: *Biochimija* 34, 984, 1969.
165. Waintraub I.A., Szutow A.D.: *Dokl. AN SSSR* 203, 1200, 1972.
166. Wall J.S.: *Proteins and Their Reactions* (H.W. Schultz and A.F. Anglemier, eds.), *Symposium on Foods*, Avi Westport, Connecticut, s. 315, 1964.
167. Warsy A.S., Norton G., Stein M.: *Phytochemistry* 13, 2481, 1974.
168. Weiel J., Hapner K.D.: *Phytochemistry* 15, 1885, 1976.
169. White H.L.: *J. Exp. Bot.*, 17, 195, 1966.
170. Wilson K.A., Laskowski M.: *J. Biol. Chem.*, 248, 756, 1973.
171. Wołodin B.I., Grinowicz O.I.: W „Rastitielnyje bielki i ich biosintez” (Kretowicz W.L., red.), *Izd. „Nauka”, Moskwa*, s. 122, 1975.
172. Worowski K.: *Post. Biol. Kom.*, 3, 51, 1976.
173. Wright D.J.: *Ph. D. Thesis*, University of Durham, 1973.
174. Wright D.J., Boulter D.: *Planta* 105, 60, 1972.
175. Wright D.J., Boulter D.: *Biochem. J.* 141, 413, 1974.
176. Yamauchi F., Kawase M., Kanbe M., Shibasaki K.: *Agric. Biol. Chem.*, 39, 873, 1975.
177. Yatsu L.Y., Jacks T.J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 466, 1976.
178. Youle R.J., Huang A.H.C.: *Plant Physiol.* 58, 703, 1976.
179. Zimmerman G., Weissmann S., Yannai S.: *J. Fd. Sci.* 32, 129, 1967.
180. Baumgartner B., Chrispeels M.J.: *Plant Physiol.* 58, 1—6, 1976.
181. Johnston J.W.B., Brewster V., Davies D.R.: *Ann. Bot.* 41, 381—385, 1977.
182. Moreira R.A., Perrone J.C.: *Plant Physiol.* 59, 783—787, 1977.
183. Przybylska J., Blixt, Hurich J., Zimniak - Przybylska Z.: *Genetica Polonica* 18, 27—38, 1977.
184. Pawłow A.N., 1967. *Nakoplenije bielka w ziernie pszenicy i kukuryzy*. *Izd. Nauka, Moskwa*.