

СОДЕРЖАНИЕ КРЕМНИЯ ВО ФРАКЦИЯХ РАСТИТЕЛЬНОГО БЕЛКА



CONTENT OF SILICON IN FRACTIONS OF PLANT PROTEIN

Гинс В.К.¹ - доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории лабораторией интродукции, физиологии и биохимии и биотехнологии функциональных продуктов
Гинс М.С.^{1,2} – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией интродукции, физиологии и биохимии и биотехнологии функциональных продуктов, профессор агробиотехнологического департамента
Колесников М.П.¹ – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории лабораторией интродукции, физиологии и биохимии и биотехнологии функциональных продуктов

Gins V.K.¹,
Gins M.S.^{1,2},
Kolesnikov M.P.¹

¹ Federal State Budgetary Scientific Research Institution 'All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production' 143080, Russia, Moscow region, Odintsovo district, p. VNISSOK, Selectionnaya St, 14
E-mail: anir@bk.ru

² Federal State Educational Institution 'People's Friendship University of Russia' (RUDN) 117198, Russia, Moscow, Miklukho-Maklaya St, 6

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур» (ФГБНУ ВНИИССОК) 143080, Россия, Московская область, Одинцовский район, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14
E-mail: anir@bk.ru

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6

Кремний относится к биологически важным элементам, необходимым не только растениям, но и всем живым организмам. Кремний обнаружен во всех органах растений, в большом количестве накапливается в клеточных стенках листьев, стеблей и корня, обеспечивая их механическую прочность, защиту от внешних абиотических и биотических факторов. Ранее предполагали, что кремний поглощается растениями в форме монокремниевой кислоты и потом откладывается в виде различных фитолитов или аккумулируется в эпидермальных клетках. Но кремний является не только основным «каркасным» элементом в тканях живых организмов, но и контролирует многие биологические и химические процессы. Водорастворимая монокремниевая кислота вступает в реакции с металлами, органическими соединениями, проявляя свойства слабой кислоты. Гели кремниевой кислоты могут быть катализатором и матрицей, на которой может происходить внутриклеточный синтез органических соединений. В настоящей работе предлагается методика определения в растении трех форм кремния: свободной, легко гидролизуемой и прочносвязанной. При этом в листьях амаранта часть кремния 0,5-0,7% обнаруживалась в препаратах белка. Белок разделен на две фракции путем осаждения сульфатом аммония, на фракцию альбуминов и глобулинов. Затем каждая из этих фракций белка была разделена на сефадексе на белок, выходящий во внутреннем объеме геля G-75 и во внешнем объеме геля. Распределение геля по фракциям имело однотипный характер. В высокомолекулярных фракциях «альбуминов» и «глобулинов» прочно связанный кремний отсутствовал. Наибольшее количество кремния обнаружено в высокомолекулярной фракции «глобулинов», причём на 80% этот элемент был представлен его легко гидролизуемой фракцией. Связанный в белках кремний, по-видимому, представлен ортокремниевыми эфирами оксиаминокислот, однако, нельзя исключать и образование Si-N связей со свободными аминогруппами. Биофильный кремний – это та часть растительного (органогенного) кремния, которая химически (в основном в форме ортокремниевых эфиров) связана с белком, фосфолипидами и пектинами, то есть, с теми компонентами растительной ткани, которые в первую очередь усваиваются организмом человека. Эту фракцию кремния (как микроэлемент) по нашему мнению необходимо учитывать в числе показателей, определяющих пищевую, кормовую и фармацевтическую ценность растительного сырья.

Summary

Silicon is biologically important element that is necessary not only for plant, but for all living organisms. Silicon was discovered in all plant organs, where its much quantity accumulates in plant cell walls of leaf and root, giving them a mechanical durability and resistance against abiotic and biotic stresses. Earlier, it was supposed that the silicon was absorbed by plants in form of monosilicic acid and then being deposited as phytoliths or accumulated in epidermal plant cells. Moreover the silicon is not only a basic structural element, but it controls many biological and chemical processes. Water soluble monosilicic acid enters into reaction with metals, organic compounds, showing properties of weak acid. Gels of silicic acid can be a catalyst and a matrix, on which the inner cellular synthesis of organic compounds occurs. In the present study the method to determinate three forms of silicon in plants, such as free, easily hydrolyzed and tightly combined is given. Thus, the part of silicon, 0.5-0.7% was observed in protein preparation of leaves of amaranth. Protein was divided into two fractions, albumins and globulins by precipitation with ammonium sulfate. After that each protein fraction was divided into two by Sephadex, where one of which come out in inner volume of gel, and second one come out in outer volume of gel (G-75). The gel distribution into fractions was of the same type characteristics. The tightly combined silicon was absent in high molecular fraction of albumins and globulins. Most of the silicon was discovered in high molecular fraction of globulins, where 80% of the element was represented by an easily hydrolyzed form. The silicon combined with proteins apparently is in a form of orthosilicic ester of hydroxy-amino acids; however it cannot be excluded that there is the formation of Si-N bonds with free amino groups. Biophile silicon is a part of plant silicon (organogenic), which is basically in the form of orthosilicic esters bonded with proteins, phospholipids and pectins that are the plant components being assimilated primarily by human's organism. In our opinion, this fraction of silicon as a microelement should be taken into account in evaluation of nutritional, forage and pharmaceutical values of plant raw material.

Ключевые слова: биофильный кремний, свободный кремний, прочно-связанный кремний, белок, монокремниевая кислота, фракции кремния, амарант, *Amaranthus tricolor*, кипрей, *Epilobium angustifolium*, капуста, *Brassica oleracea* L.

Keywords: biophile silicon, free silicon, tightly combined silicon, protein, monosilicic acid, fraction of silicon, amaranth, *Amaranthus tricolor*, rosebay, *Epilobium angustifolium*, cabbage, *Brassica oleracea* L.

Согласно многочисленным исследованиям, кремний, находящийся в живых тканях в связанном состоянии, выполняет функции, необходимые для нормального роста и развития организма растений, животных и человека [1]. В растительных тканях кремний входит в состав клеточных стенок, образуя комплексы с лигнином, клетчаткой и структурными протеинами [2, 3]. В организме животных и человека кремний также вносит существенный вклад в функционирование соединительных тканей, придаёт прочность стенкам кровеносных сосудов и препятствует проникновению липидов в плазму крови. Кремний способствует биосинтезу коллагена, образованию и кальцификации костных тканей, а в шерсти и рогах животных связывает поперечными мостиками молекулы кератина, обеспечивая им прочность и гидрофобные свойства. Кремний участвует в метаболизме липидов и фосфора и в поддержании своего равновесия с кальцием, которое связано с процессами старения организма. Введение в пищевой рацион растительного кремния способствует кальцификации и сращиванию повреждённых костных тканей [1].

Работа посвящена изучению фракций кремния, обнаруживаемых в препаратах растительного белка. В работе использованы образцы листьев амаранта (*Amaranthus tricolor*, сорт Валентина, листья второго яруса), кипрея (*Epilobium angustifolia*) и капусты брокколи (*Brassica oleracea*, суммарный образец из листьев 16-ти ярусов).

Препараты белка извлекали разрушением растительной ткани в гомогенизаторе и экстракцией боратным буфером, с последующим осаждением сульфатом аммония [4], диализом и леофилизацией. Полученные препараты разделяли на фракции по растворимости и с помощью гельфильтрации. Белок растворяли в 0,1 М фосфатном буфере и добавляли сухой сульфат аммония. Фракцию, подобную глобулинам, и осаждаемую при насыщении раствора белка $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 30% концентрации, разделяли далее на две части с помощью сефадекса G-75 (материал внешнего и внутреннего объёма геля). Каждую фракцию упаривали в вакууме, диализовали и подвергали леофилизации.

Фракцию белка, подобную альбуминам, и осаждаемую при насыщении раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до концентрации более 50%, диализовали и также разделяли на сефадексе G-75 на две части (как указано выше). В результате для каждого препарата белка было получено 4 фракции, которые подвергали ступенчатому гидролизу для определения содержания в них различных форм кремния.

Препараты белка обрабатывали 2М CF_3COOH [5-7], и переводили извлечённый Si в раствор 2 н. H_2SO_4 , в котором устанавливали суммарное количество Si модифицированным методом кремниевомолибденовой сини с применением рибофлавина в качестве фотосенсибилизатора для восстановления Mo(VI) [8]. Точность определения кремния составила $\pm 0,005\%$ [5]. Объединённые экстракты изоамилового спирта (содержащие кремниевомолибденовую кислоту) упаривали до объёма 5,0 мл и к аликвоте в 2,0 мл добавляли 0,5 мл 5×10^{-5} М рибофлавина и 0,5 мл 5×10^{-3} М $\text{Na}_2\text{-EDTA}$. Раствор освещали (10 мин) синим светом лампы накаливания через комбинацию светофильтров ЖС-12 и СЗС-22 (освещённость в фокусе конденсора составляла $1,5 \times 10^5$ эргхсм⁻²хс⁻¹). Облучённый раствор фотометрировали при 750 нм, а калибровочный график строили по стандартным растворам $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$. Холостой опыт на чистоту реактивов проводили точно так же, но без навески белка.

По нашим данным с белком связано более 50% органогенного кремния листьев [5]. Кремний в изученных препаратах неоднороден по прочности связи с органическим веществом. Практически во всех препаратах белка присутствует свободный (легко связанный) «молибдат-активный» кремний, извлекаемый 2 н. H_2SO_4 , а применением различных условий гидролиза (варьирование температуры, крепости кислоты и времени её воздействия) удаётся извлечь разные количества связанного кремния. Поэтому для сравнительных анализов мы предложили определять 3 формы кремния: свободную (экстракция 2 н. H_2SO_4), легко гидролизуемую (сумма фракций, извлекаемых 1М CF_3COOH за 10 мин. при 100° С, за вычетом свободного кремния) и прочно связанную (остаточный кремний, извле-

каемый только 2М CF_3COOH за 10 мин. при 120° С). В дальнейшем при оценке количества прочно связанного кремния мы используем разность между его общим содержанием в препарате и суммой свободного и легко гидролизуемого кремния. Полученные данные свидетельствуют о том, что на фракцию легко гидролизуемого Si во всех изученных препаратах белка приходится почти 50% от суммы трёх указанных выше форм кремния.

В листьях амаранта 0,5-0,7% содержащегося в них кремния обнаруживалось в препаратах белка. Доля этого кремния составляла 51,5% (*Amaranthus hypochondriacus*) – 56,5% (*A. tricolor*) от общего количества органогенного Si листьев [5]. При содержании белка в листьях от 15,4 до 19,9% в самом белке может присутствовать до 3,4% Si, причём доля прочно связанного Si составляет 9-17% от указанной величины. Например, в препарате белка из листьев *Amaranthus hypochondriacus* при общем содержании кремния 2,7% наблюдалось следующее распределение этого элемента по фракциям: 0,77% – свободный, 1,53% – легко гидролизуемый и 0,41% – прочно связанный.

В листьях *Amaranthus tricolor* (при общем содержании белка 16,7%) в самом препарате белка содержалось 3,2% кремния. Фракция белка, осаждаемая 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, составила 41,6% от суммарного препарата. В её составе материал, элюируемый во внешнем объёме геля G-75, составил 28,9%, а количество кремния в этой фракции белка достигало 9,0%. Кремний по фракциям распределялся следующим образом. Свободный (1,6%) и легко гидролизуемый (7,4%). Прочно связанный Si в этом препарате отсутствовал. Белок, выходящий во внутреннем объёме геля G-75, составил 71,1%, а Si присутствовал в этом материале в количестве 1,8%. Его распределение по фракциям имело следующий вид. Свободный (0,7%), легко гидролизуемый (0,9%) и прочно связанный (0,2%). Фракция белка, оставшаяся в растворе 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, составила 59,4% от препарата. В её составе белок, выходящий во внешнем объёме геля G-75, присутствовал в количестве 29,5%, а содержание Si в этой фракции белка составило 3,3%.

Распределение кремния по его фракциям имело следующий характер. Свободный Si – 0,6% и легко гидролизуемый – 2,7%. Прочно связанный Si в препарате отсутствовал. Материал, удерживаемый во внутреннем объёме геля G-75, составил 71,5%, а Si в нём содержался в количестве 2,4%. Все три фракции кремния обнаружены в этой фракции белка: свободный (0,8%), легко гидролизуемый (1,2%) и прочно связанный (0,4%). Распределение кремния по фракциям белка в листьях капусты брокколи и кипрея представлено в таблице.

Для всех трёх изученных видов растений общий характер распределения кремния во фракциях белка оказался

однотипным. В высокомолекулярных фракциях «альбуминов» и «глобулинов» прочно связанный кремний отсутствовал. Наибольшее количество Si обнаружено в высоко молекулярной фракции «глобулинов», причём на 80% этот элемент был представлен его легко гидролизуемой фракцией.

Связанный в белках Si, по-видимому, представлен ортокремниевыми эфирами оксиаминокислот, однако, нельзя исключать и образование Si-N связей со свободными аминогруппами. У бобовых, например, у *Trifolium pratense*, с общим белком связано в 4 раза меньше кремния (0,14% на сухую массу листа), хотя содержание белка лежит в тех же пределах, что и в листьях амарантов.

Отсюда следует, что листья амарантов одновременно богаты и белком, и кремнием, причём именно той формой кремния, которую мы предложили называть «биофильной» [9, 10].

Биофильный кремний – это та часть растительного (органогенного) кремния, которая химически (в основном в форме ортокремниевых эфиров) связана с белком, фосфолипидами и пектинами, то есть с теми компонентами растительной ткани, которые в первую очередь усваиваются организмом человека. Эту фракцию кремния (как микроэлемент) по нашему мнению необходимо учитывать в числе показателей, определяющих пищевую, кормовую и фармацевтическую ценность растительного сырья.

Содержание кремния во фракциях белка из листьев некоторых растений (% на абсолютно сухую массу)

Наименование	Фракции кремния	«Альбумины»		«Глобулины»	
		G-75 (Vo)	G-75 (Vi)	G-75 (Vo)	G-75 (Vi)
<i>Amaranthus tricolor</i> (II ярус) Общий Si в белке = 3,2% Белок = 16,7%	Свободный	0,6	0,8	1,6	0,7
	Легко гидро-лизуемый	2,7	1,2	7,4	0,9
	Прочно связанный	0,0	0,4	0,0	0,2
<i>Epilobium angustifolium</i> Общий Si в белке = 2,4% Белок = 12,7%	Свободный	0,4	0,7	1,2	0,5
	Легко гидро-лизуемый	1,9	1,0	5,1	0,9
	Прочно связанный	0,0	0,2	0,0	0,2
<i>Brassica oleracea</i> Общий Si в белке = 1,7% Белок = 14,5%	Свободный	0,6	0,5	0,9	0,3
	Легко гидро-лизуемый	1,1	0,7	4,1	0,5
	Прочно связанный	0,0	0,1	0,0	0,1

Литература

1. Воронков М.Г., Зелтан Г.И., Лукевич Э.Я. Кремний и жизнь. Рига: Зинатне. 1978. 587 с.
2. Harrison C.C. // Phytochemistry. 1996. Vol. 41. P. 37-42.
3. Ishii T., Matsunaga T. // JARQ. 2008. Vol.42, №3. P. 181-186.
4. Иконникова М.И., Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. Л.-. Колос. 1972. С. 263-318.
5. Колесников М.П. // Успехи Биологической Химии. 2001. Т. 41. С. 301-332.
6. Колесников М.П., Гинс В.К. // Прикладная биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. №5. С. 616-620.
7. Saito K. et al. // Soil Science Plant Nutrition. 2005. Vol. 51. P. 29-36.
8. Остроумов С.А., Колесников М.П. // Вестник Московского Университета, сер. 16. Биология. 2003. № 1. С. 15-24.
9. Гинс М.С., Гинс В.К. Физиолого-биохимические основы интродукции и селекции овощных культур. Москва, 2011.
10. Гинс М.С., Колесников М.П., Гинс В.К., Кононков П.Ф. Методика анализа органической и минеральных (растворимой и полимерной) форм кремния в овощных культурах. Москва, 2012.