

БИОХИМИЯ

А. И. СМЕРНОВ, К. В. ПШЕННОВА и П. Г. АСМАЕВ

**ОТРАВЛЕНИЕ ТАБАЧНОЙ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ ЦИАНОМ
И ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА**

(Представлено академиком А. Н. Бахом 19 IV 1940)

Несмотря на довольно давнее указание на присутствие в табаке оксидаз⁽⁷⁾ и на все более вырисовывающуюся значимость проявления их действия в табачном производстве^(1,9), еще до сих пор мало исследована их природа и специфика.

Целью проводившихся нами работ являлось подойти, в первом пока приближении, не выделяя ферменты из табака, к решению вопроса о характере и особенностях его действия на основании прежде всего отношения к циану и окиси углерода, с выяснением возможности реактивирования отравленного цианом фермента солями, в частности медными, что позволяет отличать не только настоящие оксидазы от дегидраз, но и устанавливать различия в самой группе истинных оксидаз⁽⁸⁾.

Опытным материалом служили листья табака восточного типа после нормальной производственной «сушки», но не проходившие ферментации. Активность фермента определялась манометрическим способом по количеству поглощенного кислорода. Изменения в применявшейся нами аппаратуре, по сравнению с ранее описанной одним из нас⁽⁹⁾, сводились к тому, что манометрической жидкостью служили высококипящие (200—250°) фракции керосина, подкрашенные суданом (удельный вес 0,82); диаметры манометрических трубок имели размер 0,5—0,75 мм; это значительно повышало чувствительность прибора и увеличивало точность определений.

О т р а в л е н и е KCN. В работах последнего времени^(3,4,5) получена характеристика растительных полифенолоксидаз для ряда объектов, по отношению к цианидам и окиси углерода, как очищенных, так и сырых препаратов. Во всех этих случаях фермент оказался медным протеидом, активность которого резко подавлялась цианом.

Отравленный синильной кислотой фермент полностью может быть регенерирован солями меди⁽⁶⁾.

В качестве препарата полифенолоксидазы мы пользовались растертыми в порошок сухими листьями неферментированного табака. Окисляемым субстратом всегда был гидрохинон, реакция среды поддерживалась фосфатным буфером при pH=6,5—6,6. Реакционная смесь состояла из 0,25 г сухого табачного препарата, 0,1 г гидрохинона и 10 мл фосфатного буфера. Для поглощения углекислоты применялось 0,5 мл 20%-ного раствора калийной щелочи, вносившейся в центральный цилиндр манометрического сосуда. Продолжительность ферментного действия 60 мин. при темп. 20°.

Таблица 1
Инактивирование табачной полифенолоксидазы цианом

Концентрация KCN в мол.	Поглощенный кислород в мм ³	% инактивирования
0	795	0
$3,8 \times 10^{-4}$	710	10,66
$7,7 \times 10^{-4}$	553	30,44
$1,5 \times 10^{-3}$	238	70,12
$3,8 \times 10^{-3}$	33	95,9
$7,7 \times 10^{-3}$	21	97,37
$1,5 \times 10^{-2}$	16	97,95
$3,1 \times 10^{-2}$	14	98,28

Из приведенных в табл. 1 данных вполне ясно, что по своему отношению к синильной кислоте оксидаза табачных листьев ничем существенно не отличается от полифенолоксидаз из других растительных объектов (^{3, 5, 10}).

Прибавление к отравленному цианом ферментному препарату табака сернокислой меди восстанавливает утраченную активность. Размер регенерации активности фермента зависит от количества прибавляемой меди. В отличие от данных Кубовиц, с очищенным препаратом картофельной поли-

фенолоксидазы (⁶), оптимальная доза меди восстанавливала активность табачного препарата до величины, значительно большей, чем у исходного препарата до отравления цианом. Избыток прибавляемой соли меди снижает регенерацию активности (табл. 2).

Таблица 2
Регенерация отравленного KCN ($1,5 \times 10^{-2}$ мол.) фермента сернокислой медью

Количество прибавленной $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		Опыт I		Опыт II	
в мг на 40 мл	в молях	Объем поглощенного кислорода в мм ³	% восстановлен. активности	Объем поглощенного кислорода в мм ³	% восстановлен. активности
0	0	20	—	46	—
2	8×10^{-4}	390	50	—	—
4	$1,6 \times 10^{-3}$	630	82	—	—
5	2×10^{-3}	840	411	690	179
10	4×10^{-3}	790	104	510	129
20	8×10^{-3}	610	80	426	106
40	$1,6 \times 10^{-2}$	380	49	226	52
Активность до отравления цианом		740	—	360	—

Повышение активности оксидазы при реактивировании медью выше исходной ее величины, до отравления цианом, могло, повидимому, обусловливаться тем, что начальная активность автолитической смеси являлась сниженной благодаря недостатку меди в медном протеиде табачного препарата. В автолитической смеси часть меди могла быть вытеснена из протеида имеющимися в автолитической смеси веществами. Отнести избыточное нарастание активности за счет самостоятельного каталитического действия сернокислой меди не представляется возможным, так как KCN и CuSO_4 вносились не только в сосудики с табачным препаратом, но и в термобарометры. Снижение величины реактивирования при избыточном внесении медной соли обязано, несомненно, частичному осаждению или денатурированию протеида.

Прибавление сернокислой меди к исходной автолитической смеси (без отравления KCN) в возрастающих количествах подтверждает вероятность этих соображений:

Количество $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в мг на 10 мл	2	4	10	20	40
Изменение ферментной активности в %	+36	+21	0	-26	-63

Помимо сернокислой меди испытывалось действие на отравленный препарат сульфатов Fe, Mn, Zn, Ni и хлоридов Mn и Fe.

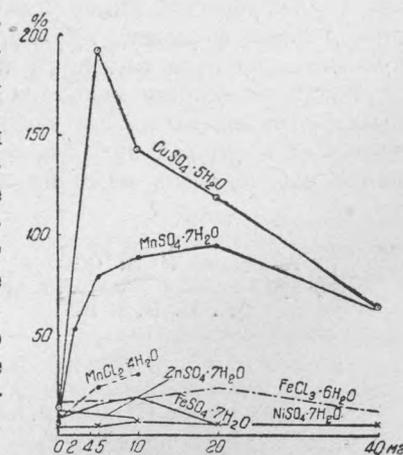
В отличие от данных Кубовиц с картофельной полифенолоксидазой мы имели возможность наблюдать на неочищенном табачном препарате реактивирующее действие и некоторых солей других тяжелых металлов, особенно Mn, но в меньшей степени (см. табл. 3 и фигуру).

Таблица 3

Регенерация солями тяжелых металлов отравленного KCN ($1,5 \times 10^{-2}$ мол.) табачного препарата. (Активность в мм^3 поглощенного кислорода)

Содержание соли в мг на 10 мл	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0	46	45	14	30	46	27	59
5	690	—	12	270	170	51	—
10	510	30	24	300	210	65	65
20	426	—	18	320	—	15	81
40	226	—	19	210	—	—	44
Активность до отравления	360	370	370	340	700	340	360

За исключением MnSO_4 все испытывавшиеся соли либо совершенно не регенерировали ферментной активности (Zn и Ni), либо в ничтожно малом размере. Реактивирование сернокислым марганцем было значительно более слабым, чем сернокислой медью. Частичное возвращение активности сернокислым марганцем отравленному цианом препарату табака может быть связано с наличием в этом препарате как солей кальция, так и оксикислот. Давно было известно из работ Эйлер и Болина, что марганцевые и кальциевые соли оксикислот обладают каталитическим действием полифенолоксидаз (2). Прибавление MnSO_4 к реакционной смеси, содержащей препарат табачных листьев, не подвергавшийся обработке цианом, повышает естественную активность этого препарата, когда количество добавляемого марганца равняется дозе, вызывающей максимальное реактивирование отравленного цианом препарата.



Относительные величины регенерации солями тяжелых металлов отравленного цианом препарата.

Количество $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в мг на 10 мл	5	10	20	40
Изменение ферментной активности в %	0	0	+14	-14

Отравление окисью углерода полифенолоксидаз в одних случаях проявляется вполне ясно (3, 5, 8), в других никакой задержки действия фермента в присутствии окиси углерода не наблюдается (4).

В противоположность дыхательному ферменту Варбурга отравление растительных полифенолоксидаз не снимается освещением⁽⁸⁾.

При действии окиси углерода на табачную полифенолоксидазу реакционная смесь состояла из 1 г препарата табачных листьев и 15 мл фосфатного буфера (рН=6,8). Субстратом, подвергавшимся окислению, служили собственные полифенолы табака. Температура опытов 18°, срок реакции 30 мин.

Таблица 4

Влияние дозировки окиси углерода на поглощение кислорода		Влияние света на действие СО				
% СО в воздухе	Относит. активность поглощения O ₂	Состав газовой смеси	Опыт I		Опыт II	
			Кислород в мм ³	% подавления	Кислород в мм ³	% подавления
0	100	80% N+20% возд., свет	370	—	340	—
45	84	80% СО+20% возд., свет	246	33,5	226	33,5
60	59	80% СО+20% возд., темнота	236	36,2	232	32,0
80	44					

На основании этих результатов (табл. 4) мы приходим к заключению, что по отношению к окиси углерода табачная полифенолоксидаза является аналогичной ферменту картофеля⁽⁵⁾ и шампиньона⁽³⁾ как в отношении чувствительности, так и по неспособности регенерироваться на свету.

Реактивирование фенолазной активности табачных листьев сернокислым марганцем мы не считаем пока за указание, что фермент табака отличается от картофельного фермента, поскольку активность табачного фермента наблюдалась нами на неочищенных препаратах.

Институт биохимии
Академии Наук СССР и
Кафедра сырьевой обработки табака
К. И. В. и В.

Поступило
21 IV 1940

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Barta, ZS. f. Unters. d. Lebensmitt., **75**, 437 (1938). ² Euler u. Bolin, ZS. f. physiol. Chem., **57**, 80 (1908); **61**, 1, 72 (1909). ³ Keilin a. Mann, Proc. Roy. Soc., B, **125**, 187 (1938). ⁴ Keilin a. Mann, Nature, **143**, 23 (1939). ⁵ Fr. Kubowitz, Bioch. ZS., **292**, 221 (1937). ⁶ Fr. Kubowitz, Bioch. ZS., **299**, 32 (1938). ⁷ O. Loew, Zbl. Bakt., Abt. II, 673 (1901). ⁸ Oppenheimer a. Stern, Biological Oxidation (1939). ⁹ Smirnow u. Moroz-Morozenko, ZS. f. Unters. d. Lebensmitt., **72**, 172 (1936); **74**, 396 (1937). ¹⁰ H. Sutter, Ergebn. d. Enzymforsch., **5**, 273 (1936).