

С. Е. БРЕСЛЕР

**О ПРИНЦИПЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА,
ОСУЩЕСТВЛЯЕМОГО ПОД ДАВЛЕНИЕМ**

(Представлено академиком А. Ф. Иоффе 20 XI 1946)

Ферменты, катализирующие распад высокомолекулярных соединений на простые мономеры, в принципе должны осуществлять и обратный процесс — синтез протеинов, озидов и т. д. Этого требует термодинамика, так как в противном случае ферменты смещали бы химическое равновесие. Это доказано также и экспериментальным путем.

Cori⁽¹⁾ осуществил синтез гликогена и крахмала под действием фермента фосфоролазы, который, как известно (Парнас), катализирует распад полиозидов. Таким образом, наблюдаемый обычно энзиматический распад свидетельствует лишь о том, что в этих случаях равновесие сдвинуто далеко в область образования мономеров.

Принцип, положенный в основу экспериментов Cori, заключается в том, что в качестве вещества, исходного для синтеза, применяется не глюкоза, а глюкозо-1-фосфорная кислота, вещество, находящееся на высоком уровне свободной энергии.

В области протеинов также известны попытки синтеза под действием фермента пепсина. Эффект достигался путем смещения реакции среды, и при этом как будто бы наблюдалось образование полимеров («пластеины»)⁽²⁾. Однако эти опыты не были полностью разъяснены с экспериментальной стороны, а затем и вовсе оставлены. Наконец, в опытах Bergmann⁽³⁾ на простых мономерах — аминокислотах и дипептидах — была показана принципиальная возможность синтеза пептидной связи растительной протеиназой — папаином. Возникает вопрос: может ли быть осуществлен энзиматический синтез высокомолекулярных соединений принципиально иным способом — путем смещения химического равновесия?

Излагаемые ниже опыты были поставлены, исходя из следующей гипотезы: ферменты распада способны вести синтез, если внешние условия в системе таковы, что химическое равновесие сдвинуто в сторону синтеза, а не распада. В живой клетке фактором, сдвигающим равновесие, может являться, в частности, адсорбция. Адсорбция создает как бы условия сжатия вещества в поверхности раздела, приводит к уменьшению молекулярного объема адсорбированных частиц.

Согласно второму началу термодинамики (принцип Ле-Шателье — Вант-Гоффа), уменьшение молекулярного объема должно смещать химические процессы в сторону полимеризации, что и наблюдается в опытах с обычными синтетическими полимерами. Для создания условий, в некоторой мере адекватных, можно воспользоваться сжатием вещества при высоких давлениях, при которых наблюдаются уже существенные изменения объема в конденсированной фазе.

1. Взята желатина (2,8 г в 50 мл воды), смешана с 8,6 мл боратного буфера (pH = 7,8). Ссудик с раствором белка помещен в термо-

стат (34°C), и через 20 мин. к нему прибавлен трипсин (кристаллический препарат Kahlbaum'a) в количестве 0,1 г в 10 мл H₂O.

В течение 2 часов производился гидролиз желатины трипсином, который регистрировался двумя методами: 1) определением аминоказота по Ван-Слайку; 2) измерением вязкости раствора при 15°C в вискозиметре Оствальда.

После 2 часов гидролиза желатина обнаружила шестикратное количество аминоказота, т. е. распад на 40% (отношение измеренного аминоказота к теоретически вычисленному на основании данных об аминокислотном составе желатины). Вязкость ее растворов снизилась вдвое. Затем тот же гидролизованный раствор был перенесен в стеклянную ампулу с тонким капиллярным горлом и помещен в бомбу высокого давления (в качестве жидкости, передающей давление, брался избыток той же гидролизованной желатины и заливался непосредственно в бомбу вне ампулы). В бомбе создавалось давление 6000 атм. температура 37°C, и в таком виде прибор выдерживался 8 час. Затем бомба охлаждалась до комнатной температуры, после чего давление снижалось, ампула извлекалась и производился анализ ее содержимого теми же методами.

Оказалось, что с большой точностью восстановилось состояние, имевшее место до гидролиза:

Т а б л и ц а 1

До гидролиза		После гидролиза		После синтеза под давлением	
1 мл (0,041 г белка) раствора 0,024 мг		1 мл раствора 0,112 мг		1 мл раствора 0,026 мг	

Разбавление	Вязкость *	Разбавление	Вязкость *	Разбавление	Вязкость *
1:1	1,63	1:1	0,88	1:1	1,60
1:2	1,50	1:2	0,77	1:2	1,25

* В условных единицах.

После ресинтеза вещество, постояв ночь, зажелатинировалось в студень.

Контрольный опыт был поставлен с ферментом, денатурированным после гидролиза 15-минутным нагреванием до 100°. В этом случае синтез под давлением не происходил.

2. Взята глобулиновая фракция белков сыворотки крови. Состав исходного раствора: 1,236 г глобулина + 0,6 г H₃BO₃ + 0,08 г NaOH + +21,1 мл H₂O.

В термостате прибавлено 0,025 г трипсина, и гидролиз производился 1,5 часа при 34°C. Раствор переведен в ампулу и поставлен на синтез под давлением в 6000 атм.

Сравнивать вязкости оказалось излишним, так как после ресинтеза раствор, первоначально жидкий, превратился в белое пластичное желатинированное вещество, которое удалось диспергировать до состояния опалесцирующего коллоидного раствора в концентрированной уксусной кислоте. Ампула оказалась целиком заполненной этим гелем, который отличался по всем своим свойствам от исходного глобулина.

Отметим, что при термической денатурации глобулина ничего сходного с полученным гелем не наблюдается. По всей вероятности, при

Т а б л и ц а 2

До гидролиза	После гидролиза	После синтеза под давлением
N_{NH_2}	N_{NH_2}	N_{NH_2}
1 мл (0,058 г глобулина)	1 мл раствора	1 мл раствора
0,47 мг	0,745 мг	0,07 мг

ресинтезе произошла пространственная поликонденсация, при которой были израсходованы почти все свободные аминокруппы.

3. Взят 1% раствор крахмала (5 мл), добавлен препарат амилазы, добытый из слюны по Wohlgenut'у (1 мл). Наблюдался распад крахмала при 34° в течение 1 часа. Опыт показал, что действие амилазы наступает столь быстро, что уже через 1—2 мин. крахмал перестает обнаруживаться по иодной реакции. Степень распада измерялась количественно определением альдегидных групп по методу Bertrand'a.

После распада на 1 мл 1% раствора крахмала (10 мг) количество альдегидных групп соответствовало 7,1 мг мальтозы, т. е. глубина распада достигала 70%. Затем система переносилась в ампулу и в бомбу высокого давления точно так же, как в опытах с белками. После 8 час. опыта при температуре 37° и давлении 6000 атм. бомба охлаждалась под давлением твердой углекислотой до температуры -10° С, измеренной по терморпаре. Затем давление снималось, и ампула извлекалась в замороженном виде.

К растаявшему раствору прибавлялся иодный реактив, вызывавший резко синее окрашивание раствора, которое исчезало по мере нагревания раствора, очевидно, вследствие того, что образовавшийся крахмал вновь подвергался распаду.

Определение альдегидных групп в этом случае давало заведомо слишком высокое значение, так как часть крахмала успевала распастись во время выполнения манипуляций. Количество альдегидных групп, найденное в конце опыта, соответствовало (на 1 мл раствора) 5,4—4,5 мг мальтозы (вместо 7,1 мг мальтозы после гидролиза).

Эти опыты показали, что при достаточно высоком давлении под действием трипсина и амилазы идет ферментативный синтез.

Детали экспериментов, а также строение продуктов и их отношение к нативным белкам и крахмалу будут опубликованы в подробных статьях совместно с нашими сотрудниками М. В. Гликиной и Н. А. Селезневой.

Ленинградский физико-технический институт
Академии Наук СССР

Поступило
20 XI 1946

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Cori, Symposia of quantitative Biology, 1939. ² Данилевский, Органо-пластические силы организма, 1886. ³ M. Bergmann and H. Fraenkel-Conrat, J. Biol., Chem., 119, 707, 720 (1937).