

Н. И. ПРОСКУРЯКОВ, В. Я. ВОРОНКОВА и Е. С. МИХАЙЛОВА

АКТИВНЫЕ ГРУППЫ В ПРЕПАРАТАХ β -АМИЛАЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 16 I 1948)

Существенным условием каталитического действия ферментов является наличие в них группировок, обуславливающих ту или иную активность. Незначительные изменения в пространственной конфигурации белка-фермента или блокировка некоторых группировок могут вести к полной или частичной потере в его активности. Поэтому установление химической природы этих групп представляет несомненный интерес.

Среди химических группировок, входящих в состав белковой молекулы ферментов, важное место занимают сульфгидрильные группы. По современным представлениям ⁽¹⁾, большинство реакций, связанных с обменом белков, углеводов и жиров в живом организме, катализируются сульфгидрильными ферментами. Основным свойством этих ферментов является их лабильность по отношению к окислительным агентам. Сульфгидрильные ферменты, потерявшие свою активность в результате окисления, могут быть регенерированы путем восстановления почти до первоначальной активности. Основными агентами, выполняющими функции восстановления в живой клетке, могут являться глутатион, цистеин и аскорбиновая кислота, а также SH-группы самих белков. Те же соединения, но в окисленном состоянии, обладают способностью выполнять, наоборот, роль окислителей.

Изучение активных групп в ферментах ведется путем воздействия специфических веществ, являющихся ингибиторами, и выяснения последующего влияния этих реагентов на ферментативную активность.

Недавно показано ⁽²⁾, что для активности панкреатической амилазы требуется в основном присутствие аминных групп и частично тирозиновой группировки. Наоборот, β -амилаза ячменя является ⁽³⁾ типичным сульфгидрильным ферментом.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы, во-первых, испытать влияние некоторых ферментативных ингибиторов на активность препаратов β -амилазы из соевых бобов и пшеницы, и во-вторых, попытаться установить, существует ли в действительности какая-либо зависимость между активностью данных препаратов и наличием в них SH-групп. Поскольку результаты, полученные с обоими препаратами, оказались довольно близкими, приводятся данные по β -амилазе из соевых бобов.

Препарат β -амилазы из соевых бобов был получен по Ньютону и Нейлору ⁽⁴⁾. В качестве ферментативных ингибиторов были испытаны иод, иодацетат и нитрит натрия, взятые в различных концентрациях. Опыты с иодом ставились следующим образом. К 10 мл раствора, содержащего 10 мг воздушно-сухого препарата, прибавлялось по 3 мл

раствора иода и иодистого калия в требуемых концентрациях, смесь ставилась в рефрижератор и через 30 минут свободный иод связывался добавлением одной капли 0,01 N раствора гипосульфита. После этого производилось осаждение фермента путем добавления сульфата аммония в количестве до $\frac{5}{6}$ от полного насыщения. После центрифугирования осадок растворялся в 10 мл воды, смешивался с такими же количествами 2% растворимого крахмала и фосфатного буфера с pH=5,56. Полученная смесь выдерживалась при 40° в течение 30 мин., после чего образовавшаяся мальтоза определялась по Бертрину. Параллельно ставилось определение активности исходного, необработанного препарата в аналогичных условиях, но без добавления иода. Предварительные опыты показали, что при удлинении срока реакции свыше 30 мин. не наблюдалось усиления степени инактивации. Осаждение препарата сульфатом аммония являлось количественным, без потери в активности.

Данные по влиянию различных концентраций иода на активность β -амилазы приведены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние различных концентраций иода на активность β -амилазы соевых бобов и содержание в ней SH-групп

Концентрация окислителя в молях		Активность β -амилазы в % от первоначальной активности	Содержание SH-групп в препаратах в % от первоначального
J ₂	KJ		
$5,0 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	100	100
$2,5 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	81,7	64,5
$3,1 \cdot 10^{-5}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$	24 0	58,1
$6,2 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	18,3	45,1
$1,2 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	8,7	38,7
$2,5 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	5,8	22,5

Данные табл. 1 показывают, что β -амилаза инактивировалась разбавленными растворами иода в различной степени, в зависимости от его концентрации. Прямые иодометрические определения тиоловых групп в препаратах, растворенных предварительно в мочеvine, показали, что существует известный параллелизм между активностью β -амилазы и количеством содержащихся в ней SH-групп. Нитропруссидная реакция на свободные SH-группы в препаратах была положительной в случае их активности и, наоборот, отрицательной после окисления.

О необходимости SH-групп для активности β -амилазы свидетельствовали также опыты по реактивации окисленных иодом препаратов с помощью сероводорода, пропущавшегося в течение 45 мин. и затем удалявшегося нацело углекислотой.

На основании данных табл. 2 следует, что восстановление активности действительно происходит, но при применении более значительных концентраций иода получить полную реактивацию не удается. Возможно, что окисление SH-групп происходит при этом далее, нежели до дисульфидной стадии, а может быть, одновременно имеет место иодирование тирозинной группировки.

При полной реактивации фермента наблюдается то же количество SH-групп, как и в исходном препарате. В случае же частичной реактивации содержание SH-групп значительно меньше первоначального.

Таблица 2
Влияние обработки H_2S на окисленную β -амилазу и содержание в ней SH-групп

Концентрация окислителя в молях		Активность β -амилазы в % от первоначальной активности	Содержание SH-групп в препаратах после реактивации в % от первоначального
J_2	KJ		
$5,0 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	100	100
$2,5 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	100	100
$3,1 \cdot 10^{-5}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$	74,5	93,1
$2,5 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	29,5	71,4

Оказалось далее, что влияние иода на активность амилазы зависело от pH среды, причем наиболее резко это влияние проявлялось при более кислой реакции. Так, при концентрации иода $3,1 \cdot 10^{-5}$ при pH=5 за 1 час воздействия активность окисленного фермента составляла 20,8% от первоначальной, при pH=5,9 47,9% и при pH=8,3 79,1%.

Опыты с применением иодцетата показали, что в зависимости от взятой концентрации активность амилазы соответственно менялась: при концентрации иодцетата в 0,01 M активность фермента оставалась без изменения, но по мере увеличения концентрации до 0,1 M активность снижалась до 19,2% от первоначальной.

С целью дезаминирования аминокрупп была испытана азотистая кислота по методике, примененной Литтль и Колдуэлл. Оказалось, что при концентрации нитрита натрия в 1,0 M активность препарата снижалась незначительно и весьма медленно. Так, за 1 час воздействия активность составляла 96,5%, и за 24 часа — 89,5% от контроля. Из последних опытов можно заключить, что блокировка аминокрупп не приводит к сколько-нибудь резкому снижению в активности β -амилазы.

Интересно отметить, что соевые бобы содержат значительные количества веществ тиоловой природы в свободном состоянии. Этим обстоятельством, может быть, и объясняется нахождение в соевых бобах таких типичных сульфгидрильных ферментов, как уреазы и, согласно данным настоящей работы, β -амилазы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 I 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. Barron and T. Singer, Science, 97, 356 (1943); J. Biol. Chem., 157, 221 (1945) *ibid.*, 157, 241 (1945). ² J. Little and M. Caldwell, J. Biol. Chem., 142, 585 (1942); 147, 229 (1943). ³ C. Weill and M. Caldwell, J. Am. Chem. Soc., 67, 212 (1945); 67, 214 (1945). ⁴ J. Newton and N. Naylor, Cereal Chemistry, 16, 71 (1939).