

Н. И. ПРОСКУРЯКОВ и А. А. ПОЛЯНСКАЯ

**АКТИВНЫЕ ГРУППЫ В ПРЕПАРАТАХ  $\alpha$ -АМИЛАЗЫ**

*(Представлено академиком А. И. Опариным 20 V 1948)*

В предыдущей работе (1) было показано, что препараты  $\beta$ -амилазы соевых бобов и пшеницы принадлежат к типу сульфгидрильных ферментов. Естественно, что следующей задачей являлось проведение аналогичных испытаний с препаратами  $\alpha$ -амилазы высших растений. Особенно интересным нам казалось то обстоятельство, что причисление  $\alpha$ -амилазы к сульфгидрильным ферментам ставило бы появление данного фермента при прорастании семян в прямую связь с одновременно идущим приростом свободных тиоловых соединений. Подобная зависимость являлась бы очевидным доказательством того, что мобилизация ферментов в процессе прорастания непосредственно обусловливается накоплением специфических веществ, оказывающих активирующее влияние на ферменты. К естественным активаторам сульфгидрильных ферментов принадлежат, как известно, некоторые продукты протеолитического расщепления белков, например цистеин и близкий к нему по действию глутатион. Усиление протеолиза при прорастании с образованием указанных веществ может являться, таким образом, возможной причиной активизации ряда ферментов.

Источником  $\alpha$ -амилазы служили вытяжки из 4-дневного пшеничного солода (пшеница Московская 2411), которые получались кратковременным настаиванием при 30°С с 5% раствором NaCl, затем центрифугировались и осаждались твердым  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  при концентрации в 50% от полного насыщения. После центрифугирования осадки растворялись в воде и нагревались 15 мин. при 70° в присутствии незначительного количества ацетата кальция для усиления „стойкости“  $\alpha$ -амилазы (2). После удаления выпадающего при этом осадка ферментативный раствор сохранялся в рефрижераторе без изменения активности в течение по меньшей мере 2—3 недель.

Действие примененных нами ферментных ингибиторов на активность полученного препарата учитывалось как по осаживающей, так и по декстринирующей способности. Декстринирующая функция определялась по методике Ниин, Сандштедта и Холленбека (3), основанной на применении в качестве субстрата не обычного крахмала, а  $\alpha$ -амилодекстрина. Для получения  $\alpha$ -амилодекстрина, в отличие от указанных авторов, бралась  $\beta$ -амилаза из соевых бобов, совершенно не содержащая  $\alpha$ -амилазы.

Ингибиторами амилолиза служили следующие растворы: иода различной концентрации (с KJ), иодата калия, нитрита натрия и некоторых ртутно-органических соединений.

При действии иода растворы  $\alpha$ -амилазы выдерживались при 0° в течение 30 мин. при слабокислой реакции, после чего бралось соот-

ветствующее количество смеси и определялась осахаривающая способность по способу, описанному в предыдущей работе (1). Для оценки декстринирующей функции часть окисленной смеси обрабатывалась твердым  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  для полного осаждения фермента, после чего производилось непосредственное определение с  $\alpha$ -амилодекстрином. Во всех случаях ставились контрольные опыты при тех же условиях и соотношениях. Часть смеси после воздействия иода обрабатывалась  $\text{H}_2\text{S}$  в течение 45—60 мин., после чего он удалялся продуванием.

Результаты опытов по влиянию иода на осахаривающую способность даны в табл. 1, откуда видно, что активность  $\alpha$ -амилазы постепенно снижалась по мере увеличения концентрации иода. Окисленные иодом препараты после обработки  $\text{H}_2\text{S}$  реактивировались во всех случаях, однако в различной степени, в зависимости от взятой концентрации иода: чем выше бралась концентрация иода, тем слабее реактивировался фермент.

Обратимое инактивирование иодом свидетельствует о несомненном значении SH-группы для осахаривающей способности пшеничной  $\alpha$ -амилазы.

Таблица 1

Влияние различных концентраций иода на осахаривающую способность  $\alpha$ -амилазы и ее реактивация сероводородом

Концентрация иода в молях	Активность окисленного препарата в % от контроля	Активность восстановленного препарата в % от контроля
0 (контроль) . . . . .	100	100
$1,0 \cdot 10^{-4}$ . . . . .	89,7	100
$2,0 \cdot 10^{-4}$ . . . . .	60,7	94,1
$4,0 \cdot 10^{-4}$ . . . . .	44,3	77,2
$1,0 \cdot 10^{-3}$ . . . . .	29,2	43,8
$2,0 \cdot 10^{-3}$ . . . . .	16,8	39,3
$4,0 \cdot 10^{-3}$ . . . . .	7,8	16,7

Близкие данные были получены и при действии иода на декстринирующую способность препарата.

Согласно данным табл. 2, при обработке иодом ферментативного препарата наблюдалось такое же постепенное падение активности декстринирующей функции в зависимости от количества окислителя. Опыты с восстановлением окисленного фермента  $\text{H}_2\text{S}$  также обнаружили полную или частичную реактивацию декстринирующего действия.

Полученные результаты с достаточной очевидностью говорят о большом значении SH-групп для декстринирующей функции данного препарата.

В качестве следующего ингибитора был взят иодат калия, влияние которого испытывалось во времени при ацетатном буфере  $\text{pH}=4,6$ . Концентрация  $\text{KJO}_3$  составляла в общей смеси 0,025 и 0,0125 М. Обработка иодатом проводилась при  $0^\circ$  в течение различных сроков. Оказалось, что при концентрации 0,025 М  $\text{KJO}_3$  осахаривающая способность снижалась довольно заметно, составляя за 1 час воздействия 88,6% от контроля, за  $2\frac{1}{2}$  часа 39,8% и за 5 час. 22,1%. При уменьшении  $\text{KJO}_3$  до 0,0125 М падение активности было меньше.

Изменения декстринирующей способности при обработке  $\text{KJO}_3$  (с переосаждением раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) в тех же концентрациях и условиях в основном были близки к предыдущим, однако имелись и различия. Так, декстринирующая функция более резко снижалась, нежели осахаривающая, в особенности в первые периоды воздействия. Например, при получасовой обработке активность составляла 40% от контроля, а за 4 часа — всего лишь 3,3%.

Из опытов с применением  $\text{KJO}_3$  можно заключить, что ингибирование амилолиза было связано с частичной блокировкой способных окисляться, по всей вероятности, сульфгидрильных групп.

Наконец, в качестве особо специфического реактива на SH-группы были использованы некоторые ртутно-органические соединения, в

частности хлористая *p*-диметиламинофенил-ртуть. Это вещество полностью ингибировало как осахаривающее, так и декстринирующее действие нашего препарата. При последующей обработке инактивированного фермента сероводородом восстанавливалось около 50% осахаривающей функции.

С целью дезаминирования аминных групп была применена азотистая кислота, согласно методике Литтля и Колдуэлл (4). В противоположность результатам, полученным нами с препаратами соевой  $\beta$ -амилазы, обе фракции  $\alpha$ -амилазы весьма резко ингибировались нитритом натрия. Концентрация  $\text{NaNO}_2$  в смеси была 1 при ацетатном буфере с  $\text{pH}=4,6$ , причем действие сказывалось особенно сильно за первые 15—30 мин., после чего ослаблялось. Контроли показали полную сохраняемость фермента в неизменном состоянии.

Было проведено непосредственное определение по ван-Слэйку (5-минутная реакция) свободных  $\text{NH}_2$ -групп в исходном и инактивированном препаратах. В результате 3-часовой обработки препарата  $\text{NaNO}_2$  количество свободного аминокислота снизилось от 0,4810 мг N в 1 мл первоначального препарата до 0,1224 мг N после инактивации. Следовательно, за означенный период азотистая кислота действительно блокировала около 70% свободных аминокислот. Это является фактическим подтверждением того, что свободные  $\text{NH}_2$ -группы имеют существенное значение для активности  $\alpha$ -амилазы, хотя и не все в одинаковой степени, а в зависимости от их доступности.

Таким образом, можно заключить, что активность препаратов  $\alpha$ -амилазы из пшеничного солода зависит от наличия сульфгидрильных и первичных аминных групп.

Полученные результаты позволяют считать высказанное нами предположение о возможной связи между активностью  $\alpha$ -амилазы и наличием в ней SH-групп в известной степени экспериментально обоснованным. Тем самым подтверждается представление о существовании зависимости между активизацией ферментов при прорастании и одновременным накоплением свободных тиоловых соединений, являющихся активаторами сульфгидрильных ферментов.

И, наконец, настоящая работа может служить теоретическим обоснованием при постановке опытов по снижению высокой активности  $\alpha$ -амилазы в зерне и муке, что имеет весьма важное значение в практике мукомолья и хлебопечения.

За предоставление ртутно-органических соединений приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Несмеянову и О. А. Реутову.

Таблица 2

Влияние различных концентраций иода на декстринирующую способность  $\alpha$ -амилазы и ее реактивация сероводородом

Концентрация иода в молях	Активность окисленного препарата		Активность восстановленного препарата	
	достижение стандартной окраски в мин.	активность в условных единицах	достижение стандартной окраски в мин.	активность в условных единицах
0 (контроль) . . . . .	3	100	3	100
$4,0 \cdot 10^{-4}$ . . . . .	6	50	3	100
$1,0 \cdot 10^{-3}$ . . . . .	8	37,5	5	60
$2,0 \cdot 10^{-3}$ . . . . .	17	17,7	9	33,3
$3,0 \cdot 10^{-3}$ . . . . .	45	6,6	35	8,5

Институт ботаники  
Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
20 V 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> Н. И. Проскураков, В. Я. Воронкова и Е. С. Михайлова, ДАН, 59, 1465 (1948). <sup>2</sup> Е. Кнеен, R. Sandstedt and C. Hollenbeck, Cereal Chemistry, 20, 399 (1943). <sup>3</sup> W. Olson, R. Evans and A. Dickson, *ibid.*, 21, 533 (1944). <sup>4</sup> J. Little and M. Caldwell, J. Biol. Chem., 142, 585 (1942); 147, 229 (1943).