

Б. Н. СТЕПАНЕНКО и Е. М. АФАНАСЬЕВА

## К ИЗУЧЕНИЮ ПРОДУКТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ГЛИКОГЕНА

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 7 X 1948)

В работе (1) нами изучались спектры абсорбции продуктов взаимодействия с иодом гликогенов, полученных из различных органов и от различных животных, причем в ряде случаев были обнаружены различия спектров как по расположению абсорбционных максимумов, так и по их высоте.

Единственными существенными данными о связи окраски подполисахаридов с их строением являются исследования К. Майера (2, 3), который показал, что тон окрашивания полисахарида с иодом зависит от «степени ветвления» данного полисахарида.

В настоящей работе мы при помощи фермента  $\beta$ -амилазы произвели известные изменения в молекулах гликогена с целью изучения влияния произведенных изменений на иодную реакцию. Действие  $\beta$ -амилазы состоит, как известно (4, 5), в отщеплении молекул мальтозы от «неальдегидных» периферических цепей глюкозных остатков молекулы гликогена, начиная с их концов.

В качестве исходных гликогенов применялись печеночные гликогены кролика и лягушки, очень сильно отличающиеся по спектрам их соединений с иодом (1), полученные по Остерну (6).  $\beta$ -амилазу мы получили по Бурн и Пит (7). Промежуточные продукты ферментативного расщепления — «апогликогены» (Я. О. Парнас (8)) нами выделялись, тщательно очищались путем многократного переосаждения спиртом, анализировались и характеризовались (табл. 1).

Апогликогены наиболее высокой степени расщепления представляли собой препараты, практически устойчивые к  $\beta$ -амилазе в оптимальных условиях ее действия. Удельное вращение апогликогенов было, как правило, несколько ниже, чем у исходных препаратов. Однако какой-либо зависимости от степени расщепления заметить не удается (табл. 1).

При сравнении абсорбционных кривых соединений с иодом исходного гликогена и ряда апогликогенов (рис. 1, А и Б) (снятие кривых производилось в условиях, разработанных нами ранее (1)) отмечается следующее.

Уже на первой стадии расщепления печеночного гликогена кроликов (рис. 1, А) происходит изменение положения адсорбционного максимума — с 5500 на 4300 Å. Такой же характер имеет абсорбционная кривая печеночного иодгликогена лягушки (см. (1) и рис. 1, Б). Кривые иодгликогенов, полученных при дальнейшем расщеплении (на 28,6—50,9%), имеют тот же максимум (при 4300 Å), но лежат все более и более низко.

Таблица 1  
Характеристика исходных гликогенов и апогликогенов

| Препарат   | Влажность | % расщепления | Сахар в % (после гидролиза) | $[\alpha]_D$ | Экстинкция при 4300 Å |
|--|-----------|---------------|-----------------------------|--------------|-----------------------|
| Гликоген кроличий исходный печеночный . . . . .  | 7,94      | —             | 92,4                        | +192,7°      | 0,55 *                |
| Апогликоген кроличий печеночный                  | 1,42      | 16,8          | 93,4                        | +180,49      | 0,48                  |
| » » »  | 3,57      | 28,6          | —                           | +194         | 0,48                  |
| » » »  | 12,5      | 30,9          | 100,1                       | +182,4       | 0,38                  |
| » » »  | 2,43      | 31,9          | 92,4                        | +167         | 0,315                 |
| » » »  | 11,33     | 48,7          | 93,5                        | +158,3       | 0,27                  |
| » » »  | 5,9       | 49,2          | 103,0                       | +186,3       | 0,265                 |
| » » »  | 6,2       | 50,9          | 100,4                       | +182,5       | 0,24                  |
| Гликоген лягушачий исходный печеночный . . . . . | 9,85      | —             | 96,3                        | +194,3       | 0,4                   |
| Апогликоген лягушачий печеночный                 | 10,09     | 11,8          | 95,7                        | —            | 0,24                  |
| » » »  | 12,56     | 20,6          | 96,7                        | —            | 0,22                  |
| » » »  | 10,04     | 34,0          | 95,91                       | +188,85      | 0,2                   |
| » » »  | 6,85      | 47,5          | 92,1                        | +180,3       | 0,18                  |
| » » »  | 6,36      | 48,4          | 95,1                        | +187,6       | 0,14                  |

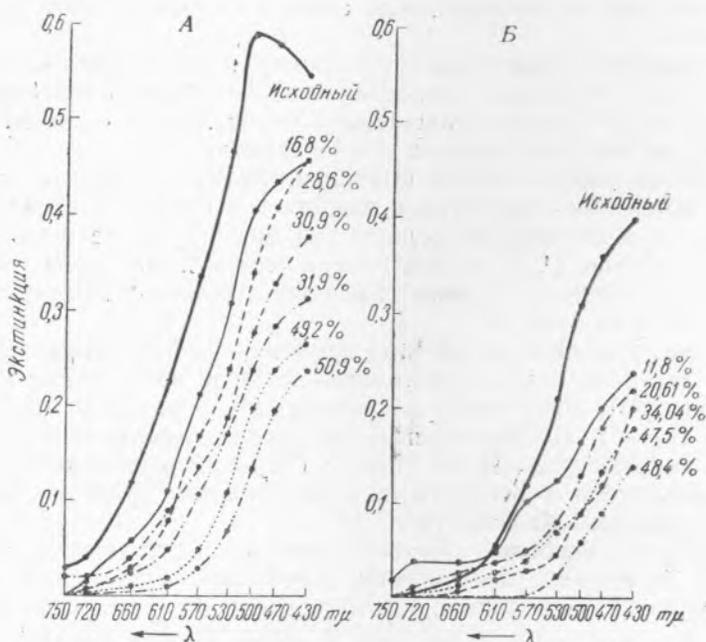


Рис. 1. Абсорбционные кривые соединений с иодом исходного печеночного гликогена и апогликогенов различной степени расщепления, снятые в одинаковых условиях: А — кролика, Б — лягушки. Цифры около кривых обозначают степень расщепления

При расщеплении печеночного гликогена лягушки (рис. 1, Б) положение абсорбционного максимума остается прежним (при 4300 Å), но абсорбционные кривые и, в частности, абсорбционные максимумы по мере расщепления располагаются все более и более низко.

Сложный характер имеют кривые зависимости величины экстинкции в точке абсорбционного максимума от степени расщепления (рис. 2). Кривая, характерная для гликогена кролика, имеет две ступеньки (рис. 2, 1), для гликогена лягушки (2) — одну ступеньку.

Наши апогликогены имели то же число точек ветвления, что и исходный гликоген. Однако оттенок окрашивания кроличьего гликогена с иодом быстро изменился с превращением его в апогликоген ранней стадии расщепления. Таким образом, в наших опытах оттенок окраски с иодом определялся непосредственно длиной боковых неразветвленных цепей.

Для дальнейшей иллюстрации зависимости положения абсорбционного максимума от длины боковых цепей мы сняли абсорбционные кривые соединений иода с амилозой картофеля, имеющей очень длинные неразветвленные цепи с амилопектином картофеля, с гликогеном и апогликогеном печени кролика при совершенно идентичных условиях. Абсорбционный максимум амилозы оказался при 6100 Å, амилопектина при 5600 Å, гликогена кролика при 5000 Å и апогликогена кролика при 4300 Å.

Создается впечатление, что для абсорбции света в длинноволновых и средних областях видимого спектра необходимо наличие длинных цепей глюкозных остатков, что, как известно (2), обеспечивает возможность образования спиралей, заключающих молекулы иода. Уменьшение ряда молекул иода при укорочении спиралей приводит к смещению абсорбционного максимума в коротковолновой части видимого спектра.

Специальный интерес представляет понижение интенсивности окрашивания — снижение абсорбционных максимумов без изменения их положения — при расщеплении гликогена лягушки и при дальнейшем расщеплении гликогена кролика.

Полученные нами абсорбционные кривые амилозы, амилопектина, гликогена и апогликогена имели, помимо разного расположения максимумов, и различия их высоты, зависящие от длины боковых цепей. Очевидно, укорочение боковых цепей в известных пределах ведет за собой лишь уменьшение экстинкции, а затем вызывает уже смещение положения максимума.

Представляется возможным высказать некоторые предположения в отношении максимального числа молекул иода, обуславливающих абсорбцию в коротковолновой области видимого спектра, характерную для гликогена. У молекул гликогена моллюсков длина боковых цепей равна 6—7 глюкозным остаткам, а у молекул амилопектина 15—18 остаткам (3). Нет сомнений в том, что эти величины в связи с разнородностью гликогенов (9) являются средними, и вполне вероятно, что в препаратах гликогена есть фракции, молекулы которых имеют боковые цепи по 10, 12—13 глюкозных остатков, а быть может, и более.

Так как для образования комплекса с иодом необходимо около 6 глюкозных остатков, мы можем полагать, что длина боковых цепей молекул гликогена вполне достаточна для того, чтобы образовать вокруг молекул иода 1, 1½, 2 оборота, а может быть, и более, т. е. это число приближается к 3, если учесть, что остатки глюкозных цепей от точек ветвления по направлению к центру молекул могут иметь форму вогнутых образований.

Судя по расположению абсорбционного максимума гликогена кролика, наиболее близкого к таковому амилопектина, можно думать, что средняя длина его боковых цепей больше длины боковых цепей глико-

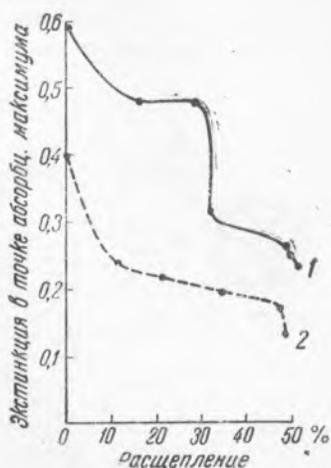


Рис. 2. Падение экстинкции в точке абсорбционного максимума соединений с иодом гликогенов печени кролика (1) и лягушки (2) по мере расщепления β-амилазой

гена лягушки. Это представление подтверждается и тем, что гликоген кролика под влиянием  $\beta$ -амилазы доходит до более высокой степени расщепления (50,9%), чем гликоген лягушки (48,5%) (табл. 1). Очевидно, при первых стадиях расщепления гликогена кролика, когда 2—3 молекулы иода уже не могут удерживаться в его спиральных, происходит сдвиг максимума абсорбции в коротковолновую область; в дальнейшем происходит понижение экстинкции.

При расщеплении гликогена лягушки, в более коротких боковых цепях которого вряд ли содержится в среднем более одной молекулы иода, происходит сразу лишь понижение экстинкции.

Таким образом для абсорбции света при 5000 А, повидимому, в спиральных из 7—13 остатков должны быть 2 или 3 молекулы иода, как это показано на рис. 3.

При рассмотрении молекулярных моделей комплексов с иодом боковых глюкозных цепей различной длины видно следующее. Если, например, в спирали до расщепления имелось 13 (или 7) глюкозных остатков, то отщепление мальтозы может привести к потере периферически расположенной (третьей или второй) молекулы иода и падению экстинкции. Если в спирали первоначально имелось 12—9 единиц, то отщепление одного и даже двух мальтозных остатков не отражается на числе помещенных в спирали молекул иода, и следовательно, изменения экстинкции может и не произойти. При одновременном расщеплении разнообразных фракций с разной длиной боковых цепей эти явления должны суммироваться. Однако совершенно невероятно, чтобы при этом получилась плавно опускающаяся кривая. Отсюда делаются понятными полученные нами ступенчатые кривые (рис. 2). Интересно, что двухступенчатый ход кривой для гликогена кролика хорошо соответствует выдвинутым нами положениям о максимальном числе молекул иода, удержанным в боковых цепях, равном 3. При более коротких боковых ветвях гликогена лягушки кривая падения его экстинкции имеет более простой характер — 1 ступеньку.

Лаборатория физиологической химии  
Академии наук СССР

Поступило  
18 IX 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Б. Н. Степаненко и Е. М. Афанасьева, Биохимия, 12, 111 (1947).  
<sup>2</sup> Б. Н. Степаненко, Усп. химии, 16, 708 (1947). <sup>3</sup> К. Meyer, Adv. in Enzymol., 3, 122, N. Y. (1933). <sup>4</sup> E. Ohlsson, Z. physiol. Chem., 189, 17 (1930).  
<sup>5</sup> R. H. Hopkins, Adv. in Enzymol., 6, 389, N. Y. (1946). <sup>6</sup> P. Ostern u. Hübl, Acta biol. Exper., 13, No. 3, 69 (1939); Chem. Abstr., 36, 5844 (1942). <sup>7</sup> E. J. Bourne and S. Peat, J. Chem. Soc., 877, 1945. <sup>8</sup> Я. О. Парнас, Усп. совр. биол., 12, 402 (1940). <sup>9</sup> В. В. Ковальский, ДАН, 58, 1083 (1947).