

Н. И. ПРОСКУРЯКОВ и Н. В. ДМИТРИЕВСКАЯ

**О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ И АКТИВНЫХ ГРУППАХ
В ПРЕПАРАТАХ α -АМИЛАЗЫ ТЕРМОФИЛЬНЫХ АНАЭРОБОВ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 6 VI 1949)

Изучение бактериальных амилаз представляет в настоящее время, помимо теоретического, также и большой практический интерес, так как они находят все большее применение в промышленности, связанной с переработкой крахмалистого сырья.

Помимо обычных мезофильных бактерий типа *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus* и др., амилолитическое действие которых хорошо изучено, обнаружено значительное количество термофильных микроорганизмов, обладающих, по указанию ряда авторов (1), более высокой амилолитической активностью, чем мезофилы. По данным этих авторов, амилазы термофильных бактерий характеризуются исключительной термостабильностью, а также широким рН-оптимумом действия, что представляет большие практические преимущества.

Объектом настоящей работы являлся ферментный препарат, полученный при культивировании термофильного варианта анаэробной маслянокислой бактерии (по определению А. А. Имшенецкого), описанной Виноградским как *Clostridium Pasterianum*. Исследовалось влияние некоторых внешних факторов на активность препарата, частично его природа, а также характер активных группировок.

Сухой препарат был получен из профильтрованной культуральной жидкости путем осаждения спиртом после ее предварительного сгущения.

Активность препарата учитывалась по его разжижению, декстринированию и осахариванию крахмала. Разжижающая способность определялась вискозиметрическим путем, осахаривающая способность — методом Бертрана, и декстринирующая — по способу, основанному на применении в качестве субстрата α -амилодекстрина (2). Для работы использовался водный раствор препарата с концентрацией 176 мг%.

Было установлено, что ферментный препарат обладал очень высокой амилолитической активностью: 0,22 мг препарата полностью разжижали 2% крахмальную клейстер за 5 мин. при температуре 70°. Препарат отличался также исключительной термостабильностью и широкими границами рН-оптима, растянутыми для разжижающей функции в пределах рН = 5,0 ÷ 7,7. Декстринирующая способность вела себя почти аналогично с разжижающей функцией в отношении влияния рН и температуры. Осахаривающая способность при сравнительно невысоких температурах (50—60°) была значительно сильнее, чем при высоких, с оптимумом действия при 60°. Наиболее интенсивное осахаривание наблюдалось при рН около 6,0, с резким понижением к рН = 4,10.

Для выяснения возможной причины такой исключительной термостабильности была предпринята попытка исследования химической природы препарата. Общий азот составлял 0,95% от сухого веса препарата. Ступенчатый гидролиз с 2 и 5% HCl в течение 3 час. обнаружил постепенный прирост отщепляемых углеводов — от 25,4 до 45,8%, считая на глюкозу. В целях получения препарата более очищенного от сопутствующих веществ, в новой порции культуральной жидкости, предварительно сгущенной, был проведен 4-часовой автолиз при 50—55° для осахаривания веществ углеводного характера. Жидкость затем диализировалась 34 часа.

Контрольные гидролизы с HCl до и после диализа показали, что содержание углеводов в результате такой обработки весьма сильно снизилось. С помощью осаждения диализата спиртом был получен сухой препарат, азот которого возрос до 2%. Качественные реакции на белки были положительными; сульфат аммония давал заметный

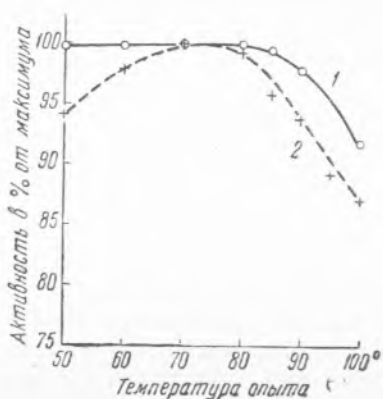


Рис. 1. Активность разжижающей способности исходного и очищенного препаратов в зависимости от температуры. 1 — препарат до очистки, 2 — после очистки

осадок. Однако гидролиз с 5% HCl обнаружил, что углеводы все еще составляли около 29% от сухого веса. Это с несомненностью свидетельствует о существовании в препарате чрезвычайно прочной связи между белком и компонентами углеводной природы.

Удалось показать, что примеси, удаленные диализом, защищали до известной степени белковую фракцию препарата от денатурации при воздействии высоких температур. Препарат, очищенный указанным способом, обладал ярко выраженным температурным оптимумом разжижения, лежащим около 70°. Дальнейшее повышение температуры среды снижало активность в большей степени, нежели у исходного, неочищенного препарата (рис. 1).

Определение активных групп в препарате амилазы методом ингибирования показало принадлежность ее к группе сульфгидрильных ферментов.

В качестве инактиватора был использован специфический реагент — органортутное соединение, хлористая *n*-диметиламинофенил ртуть в виде насыщенного раствора.

Как видно из рис. 2, резкое падение активности у всех трех функций имело место при концентрациях замедлителя (ингибитора) 0,05—0,10 мл насыщенного раствора. Дальнейшее повышение концентрации влияло лишь постепенно на снижение активности. Восстановление сероводородом осахаривающей функции было тем полнее, чем ниже бралась концентрация замедлителя.

Полученные данные свидетельствуют о значении для активности фермента сульфгидрильных групп как поверхностно-расположенных, блокирующихся незначительными количествами ингибитора, так и глу-

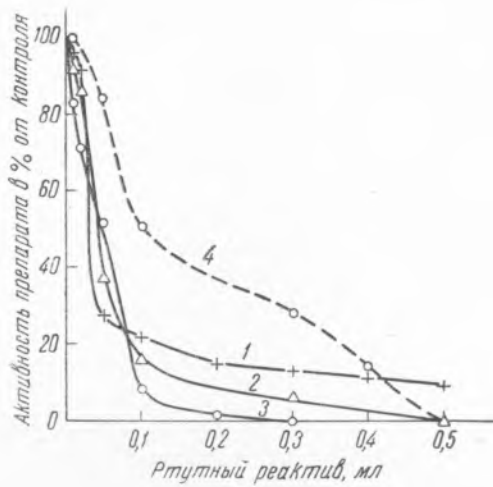


Рис. 2. Подавление активности препарата в зависимости от концентрации хлористой *p*-диметиламинофенил ртути. 1 — разжижающая способность, 2 — декстринирующая способность, 3 — осахаривающая способность, 4 — восстановление осахаривающей способности сероводородом

бинно-расположенных, доступных воздействию больших концентраций ртутного реактива и разрушающихся при этом необратимо.

Кроме того, функциональное значение SH-групп было также подтверждено инактивированием декстринирующей и разжижающей спо-

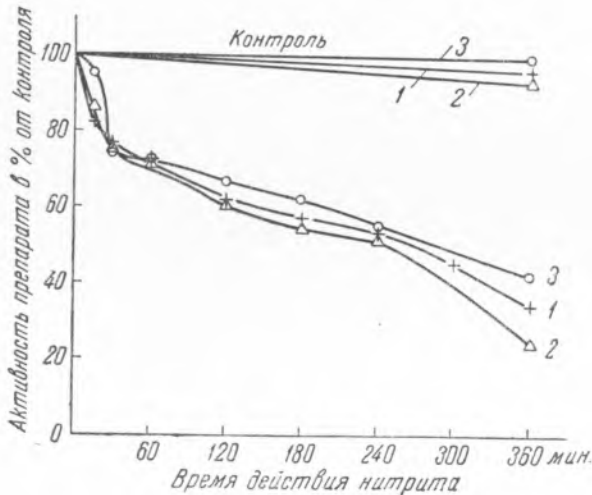


Рис. 3. Подавление активности препарата в зависимости от времени действия нитрита. 1 — разжижающая способность, 2 — декстринирующая способность, 3 — осахаривающая способность

собностей сильно разбавленными растворами иода при 0°, аналогично данным по ингибированию активности препаратов α - и β -амилаз пшеничного солода (3) и соевых бобов (4).

Опыты по инактивированию препарата нитритом натрия при $\text{pH}=5,0$ в течение различного времени показали снижение активности за первые 30 мин. действия азотистой кислоты и более медленный темп снижения в дальнейшем (рис. 3). Это говорит, повидимому, о значении первичных аминогрупп для активности препарата.

Таким образом, настоящей работой установлена высокая амилолитическая активность препарата α -амилазы (по разжижению, декстринированию и осахариванию) термофильного варианта *Clostridium Pasteianum*, зависимость термостабильности препарата от присутствия в нем компонентов углеводной природы и принадлежность к сульфгидрильному типу ферментов.

За предоставление штамма и культуральной жидкости выражаем признательность чл.-корр. АН СССР А. А. Имшенецкому и сотрудникам Всесоюзного института спиртовой промышленности Р. В. Фениксовой и Ф. М. Кинсбургской.

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

Поступило
27 V 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Имшенецкий, ДАН, 30, 667 (1941); Микробиология, 10, 385 (1941); А. А. Имшенецкий, Л. И. Солнцева и П. А. Кузюрина, там же, 11, 29 (1942). ² Е. Клееп, R. Sandstedt and C. Hollenbeck, Cereal Chemistry, 20, 399 (1943). ³ Н. И. Проскураков и А. А. Полянская, ДАН, 61, 487 (1948). ⁴ Н. И. Проскураков, В. Я. Воронкова и Е. С. Михайлова, ДАН, 59, 1465 (1948).