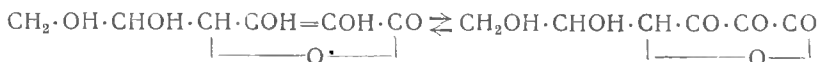


В. П. ЖИГАЛОВ

**ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ТИАМИНА
НА АКТИВНОСТЬ ПЕПСИНА**

(Представлено академиком А. И. Опариным 19 IX 1949)

Предположение о возможности влияния ряда витаминов на активность ферментов явилось вполне естественным после того, как была выяснена структура витаминов, которая обнаружила окислительно-восстановительные свойства некоторых из них и установила влияние витаминов на окислительно-восстановительный потенциал. Так, общеизвестно окислительно-восстановительное свойство аскорбиновой кислоты (витамина С), ее способность легко и обратимо окисляться в дегидросоединение:



Это свойство аскорбиновой кислоты позволило нам проверить действие препарата кристаллической аскорбиновой кислоты как отдельно, так и в комплексе с тиамин (витамином В₁) на активность протеолиза белка пепсином. Выяснение этого вопроса тем более интересно, что в литературе указаний по этому вопросу не встречается. Каррер и Цегендер⁽¹⁾ обнаружили, что аскорбиновая кислота активирует расщепление желатины катепсином, освобожденным от естественных активаторов глутатиона и других растворимых сульфгидрильных соединений. Э. Мартинсон⁽²⁾ установил, что аскорбиновая кислота активирует катепсин и инактивирует действие поджелудочного сока. Берзин⁽³⁾, Машман и Гельмерт⁽⁴⁾ и Н. И. Проскуряков⁽⁵⁾ исследовали влияние аскорбиновой кислоты на активность папаина. Об активации аскорбиновой кислотой аргиназы имеются работы Пурра⁽⁶⁾ и К. Страцицкого⁽⁷⁾.

В настоящей работе мы поставили своей задачей выяснить влияние аскорбиновой кислоты и тиамин, взятых как в отдельности, так и в комплексе (СВ₁), на активность протеолиза белка при действии пепсина. Для выяснения этого вопроса нами были поставлены серии опытов протеолиза белка казеина с готовым препаратом пепсина, с добавлением в протеолитическую смесь вышеуказанных витаминов. О степени протеолиза мы судили по отщеплению аминного азота, определяемого в аппарате Ван-Сляйка. Параллельно с учетом аминных групп, образующихся в процессе протеолиза белка, мы с целью выяснения влияния аскорбиновой кислоты и тиамин, а также их комплекса на протеолитическую функцию пепсина, провели ряд опытов по Метту. Концентрация пепсина в солянокислом растворе составляла 0,1% рН смеси 1,3—1,5; концентрация витаминов в растворе составляла 5—10 мг%. О переваривании куриного белка судили по длине переваренного столбика, выра-

женного в миллиметрах и в процентном отношении к контрольным пробам, принятым за 100%. (табл. 1).

Таблица 1

Переваривание куриного белка по Метту (*a* — длина переваренного столбика в мм, *b* — процент переваривания)

Условия опыта	I опыт		II опыт		III опыт		IV опыт		V опыт		Средн. % перевариваемости
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	
Белок + пепсин (контроль)	5,5	100	10,0	100	19,0	100	16,5	100	18,0	100	100
То же + аскорбиновая к-та	12,0	218	15,5	155	28,0	147	20,0	121	24,5	136	155
» » + аскорбиновая к-та + тиамин	—	—	19,0	190	29,0	153	24,5	149	27,0	150	160
» » + тиамин	5,5	100	7,6	76	17,0	90	18,5	112	—	—	95

Из данных табл. 1 видно, что аскорбиновая кислота повышает переваривающую способность куриного белка по Метту в среднем на 55,0%; прибавление к аскорбиновой кислоте тиамина еще более усиливает переваривание куриного белка. Один тиамин не оказывает существенно влияния на переваривание куриного белка по Метту.

Нами была принята следующая методика исследования протеолиза казеина пепсином с добавлением в качестве активаторов аскорбиновой кислоты и тиамина. В эрленмейеровскую колбочку емкостью 100 мл брали 10 мл 2% раствора казеина, приготовленного по Гаммерстону, 10 мл 1% раствора пепсина, растворенного в 0,1 *N* HCl, 10 мл ацетатного буфера (рН = 5,2—5,4) и несколько миллилитров солянокислого раствора аскорбиновой кислоты определенной концентрации. Общий объем протеолитической смеси в колбе был доведен дистиллированной водой до 50—60 мл. Определив рН пепсинового солянокислого раствора потенциометрически с хингидронным электродом (рН смеси равнялся 1,6—1,8), колбочки с опытными смесями ставили для протеолиза в термостат при 38—40° на 3 часа и на 24 часа.

По истечении указанных сроков протеолиза осаждали белки смеси растворов трихлоруксусной кислотой, отфильтровывали и в безбелковом фильтрате определяли в аппарате Ван-Сляйка аминный азот. Все определения аминного азота проводились с повторностью и сопровождалась контролем на реактивы. Результаты аминного азота выражали в мг%, активность протеолиза — в процентах по отношению к контрольным пробам (табл. 2).

Из данных наших опытов следует, что аскорбиновая кислота в течение 3-часового протеолиза активирует действие пепсина, расщепляя казеин с освобождением аминного азота на 32,0% больше по сравнению с контролем. При 24-часовом пепсинном протеолизе казеина наблюдается снижение активации пепсина аскорбиновой кислотой на 19% по отношению к контролю. Тиамин, введенный один в протеолитическую смесь, не дает заметного эффекта в течение 3-часового протеолиза казеина пепсином. При 24-часовом протеолизе наблюдается некоторое снижение активности пепсина тиамином. При комплексном воздействии аскорбиновой кислоты и тиамина наблюдается более усиленная активация пепсина, превышающая действие одной аскорбиновой кислоты в течение 3-часового протеолиза на 23,0% и составляющая к контролю 155%. Некоторое увеличение (на 12%) активности пепсина при комп-

Протеолиз казеина пепсином (аминный азот в мг %)

№ опытов	3 часа				24 часа			
	Пепсин+ + казеин (конт- роль)	То же + ас- кор- биновая к-та	То же +аскор- биновая к-та+ +тиамин	То же +тиа- мин	Пепсин+ +казеин (конт- роль)	То же +ас- кор- бино- вая к-та	То же +аскор- биновая к-та+ +тиамин	То же +тиа- мин
1	2,82	3,53	4,24	2,82	—	—	—	—
2	5,75	7,19	8,62	6,47	9,0	6,50	8,85	6,55
3	4,18	7,66	8,36	4,18	8,50	7,75	8,50	4,90
4	8,47	9,89	11,30	8,50	9,89	9,85	11,30	9,47
5	9,15	10,80	12,75	9,25	11,55	10,10	12,90	10,40
6	3,64	4,34	6,89	3,50	5,50	4,40	7,00	4,65
7	5,60	6,97	8,40	5,60	—	—	—	—
8	4,30	7,10	7,90	4,60	7,00	4,20	—	—
9	4,24	5,66	6,58	4,90	8,10	5,40	—	—
10	5,57	7,67	8,10	6,00	—	—	—	—
Средн.	5,37	7,08	8,31	5,58	8,51	6,90	9,53	7,20
Средн. в % к исходному . .	100,0	132	155	104	100,0	81	112	85

лексном воздействии аскорбиновой кислоты и тиамин наблюдается также при 24-часовом протеолизе казеина пепсином.

Желая выяснить причину активирующего действия аскорбиновой кислоты на пепсин в течение 3-часового протеолиза и угнетающего действия в течение 24-часового, а также выявить значение тиамин в комплексе с аскорбиновой кислотой, мы решили проследить за устойчивостью аскорбиновой кислоты в процессе протеолиза казеина пепсином. Для этого мы через определенные промежутки времени отбирали из протеолитической смеси пробы (по 1 мл) и путем титрования в кислой среде 2,6-дихлорфенолиндофенолом определяли содержание неокисленной аскорбиновой кислоты, выраженное в мг% и в процентах к исходному содержанию аскорбиновой кислоты (табл. 3).

Данные по устойчивости аскорбиновой кислоты позволяют проследить за динамикой окисления аскорбиновой кислоты: через 2—4 часа аскорбиновая кислота в солянокислом пепсинном растворе на $\frac{2}{3}$ сохраняет свою восстановленную форму, а через 24 часа наступает почти полное окисление аскорбиновой кислоты. Аскорбиновая кислота в комплексе с тиамин сохраняется в восстановленной форме на $\frac{1}{3}$ через 24 часа и около 10% через 96 час. Отсюда следует, что окисление одной аскорбиновой кислоты протекает гораздо быстрее и глубже, чем в комплексе ее с тиамин.

Сопоставляя данные устойчивости аскорбиновой кислоты с результатами (табл. 2) протеолиза казеина пепсином, нетрудно усмотреть, что пока аскорбиновая кислота находится в восстановленной форме, она действует активно на пепсин, предохраняя от окисления активные сульфгидрильные группы (SH) пепсина, а также SH-группы белка, ко-

Таблица 3

Устойчивость аскорбиновой кислоты отдельно и в комплексе с тиамином

№ опыта		Через часов															
		0		1		2		4		24		48		72		96	
		мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%
1	Аскорбиновая к-та	22,0	100	18,5	84	15,84	72	13,20	60	0,44	2	0	0	0	0	0	0
	+ тиамин	22,0	100	21,56	98	21,12	96	19,36	88	7,40	34	6,60	30	4,84	22	3,52	16,0
2	Аскорбиновая к-та	17,6	100	15,40	88	13,47	77	9,68	55	0	0	0	0	0	0	0	0
	+ тиамин	17,6	100	16,72	95	15,23	87	11,88	68	2,64	15	2,20	13	1,10	6	0	0
3	Аскорбиновая к-та	18,91	100	15,40	81	12,76	67	10,22	54	0,43	2,3	0	0	0	0	0	0
	+ тиамин	18,9	100	18,50	98	18,04	95	16,30	86	7,48	40	5,28	28	3,52	19	2,20	12

торые, согласно данным А. Сутулова⁽⁸⁾ и данным, полученным А.К. Москалевой⁽¹⁰⁾ в лаборатории проф. Кретовича, образуются при протеолизе растительных белков пепсином и папаином. По мере окисления аскорбиновой кислоты и перехода ее в дегидросоединение активность пепсина падает, почему мы в наших опытах и имеем при сохранении восстановленной формы аскорбиновой кислоты активность пепсина, а при окислении аскорбиновой кислоты — угнетение активности пепсина по сравнению с контролем. Что касается комплексного действия аскорбиновой кислоты и тиамин на протеолиз, то здесь наблюдается более усиленная активация пепсина за счет, повидимому, тиамин, который, согласно нашим данным, а также данным А. Титаева⁽⁹⁾, в значительной степени замедляет окисление аскорбиновой кислоты.

Работы Вальдшмидта — Лейтца и Грассмана установили активирующее действие SH-соединений на протеолитические энзимы катепсина и папаина. Данные нашей работы позволяют выявить активирующее действие SH-соединений на пепсин.

Московский областной научно-исследовательский
клинический институт

Поступило
30 IX 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. Karrer u. F. Zehender, Helvet. Chim. Acta, 6, 701 (1933). ² Э. Э. Мартинсон, Биохимия, 11, в. 6 (1937). ³ Th. Bersin, Zs. physiol. Chem., 222, 177 (1933). ⁴ E. Maschman u. E. Helmerl, Zs. physiol. Chem., 223, 127; 224, 56 (1934). ⁵ Н. И. Проскуряков и О. А. Павлинова, Биохимия, 5, № 4 (1940). ⁶ A. Rigg, Biochem. Zs., 27, 1703 (1933). ⁷ К. И. Страцицкий и Б. А. Рубин, Биохимия, 1, 642 (1936). ⁸ А. Н. Сутулов, ДАН, 53, № 4 (1946). ⁹ А. А. Титаев, Биохимия, 13, в. 3 (1948). ¹⁰ В. Л. Кретович, А. А. Бундель и Т. В. Дроздова, Биохимия, 13, в. 4 (1948).