

А. В. БЛАГОВЕЩЕНСКИЙ и И. И. ЧИКАЛО

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ ФЕРМЕНТ ИЗ РОСТКОВ ХЛОПЧАТНИКА

(Представлено академиком Н. В. Цициным 28 VII 1949)

Наличие большого количества запасных белков в семенах хлопчатника (в ядрах семян хлопчатника 36,1%) позволило предположить, что в прорастающих семенах обнаружатся активные протеолитические ферменты.

4-дневные проростки хлопчатника после удаления наружной твердой оболочки высушивались при температуре 35° и достаточной вентиляции, затем растирались и обезжиривались эфиром. Полученная мука смешивалась с фосфатной буферной смесью (рН = 6,0) и в присутствии толуола оставлялась на автолиз при температуре 37°. Степень протеолиза определялась титрометрически по методу Вильштеттера (табл. 1).

Таблица 1

Протеолитическая активность проростков хлопчатника

Исходное титрование	N/20 КОН в мл на 5 мл опытной смеси через					
	1 сутки	2 суток	3 суток	4 суток	6 суток	7 суток
28,2	39,4	45,0	50,5	53,3	55,5	57,2

Заметное нарастание титруемых карбоксильных групп действительно дало указание на присутствие в проростках хлопчатника протеолитических ферментов.

Для получения препарата протеиназы брались 4-дневные проростки семян хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.). После удаления твердой наружной оболочки проростки тщательно растирались с равным по весу количеством 4% раствора серноокислого аммония и при температуре 25—30° оставлялись на автолиз в течение 3 дней. Автолиз проходил в присутствии Na₂S. Антисептиком служил толуол. Через 3 дня автолизовавшаяся масса отжималась через марлю, остаток еще раз растирался с таким же количеством 4% серноокислого аммония и повторно отжимался. Полученная жидкость отфильтровывалась через бумажный фильтр.

Фильтрат представлял собой прозрачную с легкой опалесценцией окрашенную в светложелтый цвет жидкость.

Действие этой вытяжки на глобулин хлопчатника привело к увеличению аминного азота за 1 сутки на 111,3 мг%. Такой прирост свобод-

ных аминных групп говорил о присутствии в вытяжке сильного фермента.

Для очищения ферментов полученная солевая вытяжка постепенно насыщалась сернокислым аммонием. Полное насыщение наступало при внесении 59 г соли на 100 мл вытяжки.

При внесении	51,0%	соли от полного насыщения	выпадал	1-й осадок
»	»	55,8%	»	»
»	»	60,3%	»	»
»	»	67,8%	»	»

Все осадки собирались последовательно и отдельно.

Первый однородный осадок обрабатывался ацетоном, затем смесью ацетона с эфиром и высушен в эксикаторе над серной кислотой. Обработка 3 следующих осадков показала, что каждый из них неоднороден; при незначительном прибавлении воды осадок переходил в раствор. При дальнейшем прибавлении ее часть растворившегося осадка вновь выделялась, а оставшаяся в растворе могла быть выделена ацетоном или спиртом.

Расфракционированные таким образом осадки, так же как и первый, были обработаны ацетоном, затем смесью ацетона с эфиром и высушены в эксикаторе над серной кислотой.

Всего было получено 7 фракций сухих препаратов.

Испытание активности их проводилось следующим образом. 375 мг препарата фермента растворялись в 25 мл фосфатной буферной смеси $M/5$, $pH = 5,8$, и смешивались с 25 мл 3,5% раствора глобулина семян хлопчатника в такой же буферной смеси. Для того чтобы определить действие чистого фермента, параллельно, в виде контроля, ставились колбочки с препаратом фермента и отдельно с белком; препарат фермента в количестве 375 мг растворялся в 50 мл фосфатной буферной смеси и оставлялся без субстрата, с другой стороны, 50 мг 1,75% раствора белка в такой же буферной смеси находились без фермента. В качестве антисептика прибавлялся толуол. Гидролиз проходил при температуре 35° . Скорость реакции определялась учетом освобожденных карбоксилов по методу Вильштеттера.

Активность чистого фермента, выраженная с учетом поправки на изменения в контрольных сосудах и за вычетом щелочи, пошедшей на нейтрализацию буферной смеси, показана в табл. 2.

Таблица 2

За время в сутках	N/20 NaOH в мл на 5 мл опытной смеси			
	1-й осадок	2-й осадок		3-й осадок
		фракция, выделен. разведением	фракция, выделен. ацетоном	фракция, выделен. ацетоном
1		0,79	0,76	0,73
2	1,44	1,06	1,06	0,93
3		1,06	1,08	1,00
4	2,18	1,05	1,08	1,09

Из 7 препаратов наиболее активным оказался препарат из 1-го осадка. Менее активным обе фракции 2-го осадка и та фракция 3-го, которая была выделена из водного раствора ацетоном. Остальные были неактивны.

Препараты эти представляют аморфный тонкий светлосерый порошок. Дают биуретовую реакцию. Реакция Молиша отрицательна. Хорошо растворимы в растворах нейтральных солей.

С течением времени в условиях комнатной температуры активность их утрачивается, но и через 3 мес. она еще имеет место.

Из 1 кг семян получается 5 г активных препаратов фермента.

При определении оптимального рН среды для действия фермента 1-го осадка установлено, что действие фермента имеет место в широком интервале рН среды: от 2,2 до 9,18, но в этом интервале оказалось два максимума: при 5,8 и 9,2. Наиболее слабое действие фермента отмечено при рН = 2,2, 6,8 и 7,9 (табл. 3).

Таблица 3

Прирост азота свободных аминогрупп в мг на 2 мл пробы

рН	Опыт 1		Опыт 2	
	за 20 час.	за 44 часа	за 50 час.	за 44 часа
2,2	0,1685	0,2272	0,2291	0,2072
5,0	0,2453	0,4643	0,4625	0,4664
5,8	0,3514	—	0,5012	0,6025
6,8	0,1589	—	0,1614	0,5526
7,9	0,0497	—	0,0998	0,0916
9,2	0,1474	—	0,3657	0,7880

Несмотря на то, что автолиз проростков проходил в присутствии сероводорода, препарат фермента, полученный из этого автолизата, опять активировался сероводородом и цистеином. Активирование проводилось при рН = 5,8. Скорость реакции в присутствии сероводорода в этом случае была выше на 22,1% и в присутствии цистеина — на 16,5%.

Наличие оптимума действия фермента при рН = 5,8 и активирование его сероводородом и цистеином позволяет отнести этот фермент к группе известных уже растительных протеиназ — папаиназ, и в соответствии с существующей в литературе номенклатурой (папаин из *Carica Papaya*, асклепайн из *Asclepias* и др.) препарат протеиназы, полученный из проростков *Gossypium hirsutum*, следует называть госсипаин. Однако, благодаря тому что при рН = 9 обнаруживается второй максимум действия фермента, можно думать, что в полученном препарате находится второй фермент. Больше того, в результате изменения описанной выше методики выделения препаратов протеиназ нам удалось получить еще одну протеиназу, действующую только при рН = 2,2.

3-дневные проростки хлопчатника растирались и без предварительного автолиза (что имело место в первом случае) извлекались 2% раствором хлористого натрия (по объему, равному весу проростков). К 5 мл вытяжки прибавлялось по 5 мл фосфатной буферной смеси различной рН (рН = 2,2 создавалась буферной смесью Мак-Ильвейна) и затем в присутствии толуола оставлялись на автолиз при температуре 35°. Результаты видны из табл. 4.

Таблица 4

Прирост азота свободных аминогрупп в мг на 1 мл пробы

рН	За 17 час.	За 23 часа	За 44 часа
2,2	0,1968	0,2373	0,3221
5,0	0,1105	0,1524	0,1524
5,8	0	0	0

Наращение азота освобождающихся при гидролизе белка аминокрупп продолжается до конца наблюдения при $pH = 2,2$. Менее интенсивно и всего до 23 час. азот прибывает и при $pH = 5,0$. При $pH = 5,8, 6,8, 7,9$ и $9,18$ прирост азота не имеет места в течение всего времени наблюдения. Эти наблюдения позволяют утверждать, что в проростках хлопчатника присутствует и третья протеиназа, которая проявляет себя в условиях высокой концентрации водородных ионов.

При сопоставлении прироста азота свободных аминокрупп в условиях $pH = 2,2$ во всех опытах оказывается, что он примерно везде одинаков. Это обстоятельство указывает на то, что третий фермент выделяется из проростков хлопчатника при любом примененном нами способе выделения.

Вместе с этим третьим протеолитическим ферментом выделяется в описанных условиях и некоторое количество госсипаина, обнаруживаемого при действии цистеина при $pH = 5,8$: прирост азота свободных аминокрупп при этом через 23 часа равен $0,0353$ мг на 1 мл пробы и через 44 часа $0,0403$ мг.

Полученный сухой препарат продолжительное время сохраняет свою активность, что имеет значение для практического его применения.

Дело в том, что активность госсипаина, даже без повторной очистки, приближалась к активности продажного препарата папаина, а именно, если 15 мг нашего препарата госсипаина при 35° за 20 час. освобождали из 35 мг белка (глобулин хлопчатника) $0,35$ мг аминного азота, то за то же время и при той же температуре 15 мг папаина освобождали из 35 мг белка (глобулин гороха) $1,19$ мг аминного азота, т. е. только в 3 с небольшим раза больше. Нет сомнения, что дальнейшая очистка позволит получить препараты еще большей активности.

Поступило
27 VII 1949