

Ю. Н. ИЛЬИНА

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ САХАРОЗЫ НА АКТИВНОСТЬ ИНВЕРТАЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 13 I 1950)

Ферменты ускоряют течение химических реакций, поэтому активность ферментов может измеряться ускорением реакции, которое они вызывают, т. е. производной скорости ферментативной реакции по концентрации фермента dv/dF . Это согласуется с размерностью применяемого в биохимии коэффициента активности ферментов $\frac{g \text{ субстрата}}{g \text{ фермента} \cdot \text{сек}}$. Из размерности активности фермента следует, что активность фермента должна зависеть от концентрации субстрата.

Целью нашей экспериментальной работы являлось изучение влияния концентрации сахарозы на активность инвертазы. В качестве фермента применялся препарат дрожжевой инвертазы. Активность исходного препарата оставалась неизменной в продолжение всего периода работы. Инверсия сахарозы проводилась при температуре 65° и pH 4,7 в ацетатном буфере по методу, описанному Михаэлисом и Менген (1). Буферная смесь проверялась электрометрически.

Представлялось интересным выяснить, сохраняется ли характер зависимости скорости гидролиза сахарозы инвертазой от концентрации фермента и концентрации субстрата, полученный при оптимальной температуре (4), также и при температурах выше оптимальной. Поэтому мы выбрали для работы температуру 65° .

Течение кинетики реакции наблюдалось по изменению угла вращения реагирующей смеси в поляриметре (длина трубки 20 см) при 35° после прибавления соды и прекращения мутаротации. Кинетика снималась в пределах 50 мин. — времени, достаточного для определения начальной скорости реакции.

В табл. 1 приведены данные по гидролизу сахарозы инвертазой при 5 концентрациях сахарозы с 3 различными концентрациями инвертазы. Графическим дифференцированием кинетических кривых, построенных по данным табл. 1, получены начальные скорости реакций.

Зависимость начальной скорости гидролиза сахарозы от концентрации инвертазы при 5 концентрациях субстрата графически представлена на рис. 1. Для каждого случая эта зависимость имеет вид прямой, пересекающей ось концентрации фермента. Таким образом, при данной концентрации сахарозы ферментативный гидролиз протекает при концентрациях инвертазы выше минимальной. С увеличением концентрации сахарозы возрастает численное значение минимальной концентрации инвертазы, выше которой начинается инверсия.

Таблица 1

Изменение угла вращения $\Delta\alpha$ во времени t при гидролизе сахарозы инвертазой

Время в мин.	Концентрация сахарозы в процентах											
	2		5		7,5		10		20			
	29·10 ⁻⁴	58·10 ⁻⁴	97·10 ⁻⁴	29·10 ⁻⁴	58·10 ⁻⁴	97·10 ⁻⁴	29·10 ⁻⁴	58·10 ⁻⁴	97·10 ⁻⁴	29·10 ⁻⁴	58·10 ⁻⁴	97·10 ⁻⁴
5	0,04	0,07	0,09	0,06	0,10	0,18	0,03	0,11	0,19	0,03	0,11	0,19
10	0,08	0,13	0,21	0,12	0,23	0,43	0,06	0,24	0,42	0,06	0,24	0,42
15	0,12	0,18	0,28	0,15	0,30	0,65	0,13	0,36	0,58	0,11	0,33	0,67
20	0,15	0,27	0,39	0,20	0,42	0,80	0,21	0,50	0,89	0,15	0,52	0,89
30	0,20	0,40	0,52	0,28	0,60	1,20	0,33	0,65	1,13	0,22	0,78	1,46
50	0,29	0,67	0,76	0,48	0,99	2,10	0,58	1,26	1,73	0,41	1,18	2,38

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента, полученная из наших экспериментальных данных, не описывается ни уравнением Михаэлиса и Ментен (1)

$$v = \frac{kS}{k_m + S} F, \quad (1)$$

ни уравнением Ю. Ф. Медведева (2)

$$v = g(1 - e^{-BS}) F, \quad (2)$$

где v — скорость ферментативной реакции, F — концентрация фермента, S — концентрация субстрата и k , k_m , g , B — константы.

Согласно этим уравнениям, зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента графически должна представляться прямой, проходящей через начало координат. Из этого следует, что скорость ферментативной реакции должна быть равна нулю только при концентрации фермента равной нулю.

Полученная нами зависимость согласуется с уравнением кинетики гидролиза сахарозы инвертазой, предложенным П.В. Афанасьевым(3):

$$v = \frac{k_3 S}{(k_3/k_1) + 2S} F - \frac{k_3 (k_1/k_2) S^2}{(k_3/k_1) + 2S}, \quad (3)$$

где k_1 , k_2 , k_3 — константы.

Графически это уравнение изображается прямой, пересекающей ось концентрации фермента, что указывает на необходимость существования нижнего предела концентрации фермента, выше которого только и должна наблюдаться ферментативная реакция.

Множитель перед концентрацией фермента в уравнении (3) показывает величину тангенса угла наклона прямой к оси концентрации фермента. С другой стороны, значение этого множителя также определяет активность фермента, получаемую дифференцированием (4):

$$\frac{dv}{dF} = \frac{k_3 S}{(k_3/k_1) + 2S}. \quad (4)$$

Следовательно, тангенс угла наклона прямой к оси концентрации фермента пропорционален активности фермента.

Из рис. 1 видно, что при малых концентрациях сахарозы активность инвертазы небольшая и сильно возрастает с увеличением концентрации субстрата. При больших концентрациях субстрата активность фермента стремится к предельному значению.

Уравнение (4) можно представить в следующем виде:

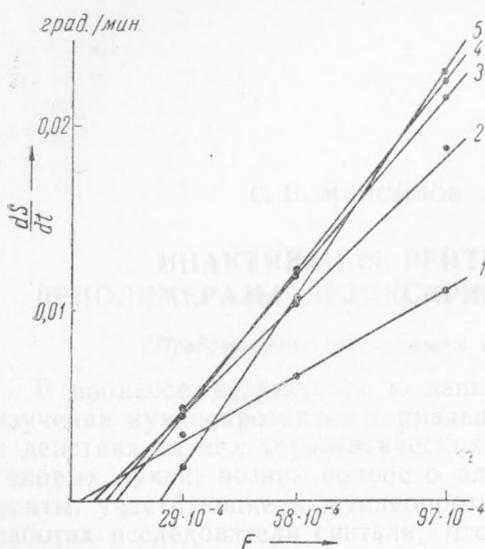


Рис. 1. Зависимость начальной скорости гидролиза сахарозы dS/dt от концентрации инвертазы F . 1 — $S=2\%$, 2 — $S=5\%$, 3 — $S=7,5\%$, 4 — $S=10\%$, 5 — $S=20\%$

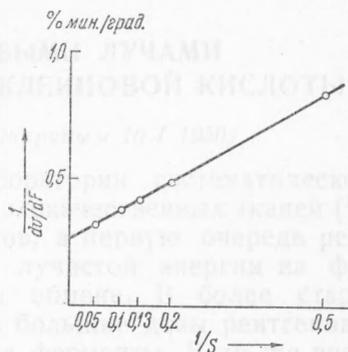


Рис. 2. Зависимость активности инвертазы dv/dF от концентрации сахарозы S в координатах

$$1/dF, 1/S$$

$$\frac{1}{dv/dF} = \frac{1}{k_1 S} + \frac{2}{k_3} \quad (5)$$

Из данного выражения следует, что величина, обратная активности фермента, является линейной функцией величины, обратной концентрации субстрата.

Справедливость уравнения (5) подтверждается нашими экспериментальными данными. На рис. 2 представлена зависимость активности инвертазы от концентрации сахарозы в координатах $\frac{1}{dv/dF}, \frac{1}{S}$. Действительно, зависимость имеет линейный характер. При значениях концентрации сахарозы, стремящихся к бесконечности, активность инвертазы стремится к предельному значению.

Выражаю глубокую благодарность П. В. Афанасьеву за ценные указания и внимание к работе.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
21 XII 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Michaelis u. M. Menten, Biochem. Zs., 49, 333 (1913). ² Ю. Ф. Медведев, Тр. Одесск. гос. ун-та, 3, 5 (1948). ³ П. В. Афанасьев, Биохимия, 14, 259 (1949). ⁴ П. В. Афанасьев и Ю. Н. Ильина, Изв. АН СССР, сер. биол., 4, 495 (1949).