

Т. Н. ЕВРЕИНОВА и В. Г. НИКОЛАЕВА

## ИССЛЕДОВАНИЕ АМИЛАЗНОГО КОМПЛЕКСА ЖОЛУДЕЙ

(Представлено академиком А. И. Опариным 22 VI 1950)

Хранение жолудей неразрывно связано с обменом веществ, в котором одна из главных ролей должна быть отведена ферментам. Основным питательным запасным веществом жолудей является крахмал, содержание которого составляет до 37% (<sup>1</sup>, <sup>7</sup>). При превращениях крахмала в растении большое значение имеет амилаза. Данная работа посвящена исследованию амилаз жолудей дуба. Работа является одной из частей, проводимой в Московском государственном университете под руководством акад. А. И. Опарина, комплексной работы по изучению химического состава и ферментов жолудей в процессе хранения.

В жолудях содержится до 7% дубильных веществ (<sup>7</sup>), которые являются инактиваторами целого ряда ферментов. В частности на инактивацию ферментов типа амилаз указывают А. И. Опарин и А. Л. Курсанов (<sup>6</sup>). При выработке метода определения активности амилазы необходимо было принять во внимание вышеуказанные соображения. Непосредственно, в растертых жолудях определить деятельность амилазы не удастся, так как дубильные вещества препятствуют этому. При внесении в кашу из растертых жолудей соевой  $\beta$ -амилазы происходит ее инактивирование. Однако, при добавлении пептона удастся полностью вернуть исходную активность соевой  $\beta$ -амилазы. Таким образом дубильные вещества семян жолудей инактивируют не только собственную амилазу, но и амилазу соевых бобов, вносимую в активном состоянии. На основании этого модельного опыта при определении активности амилазы в семенах жолудей был применен пептон, который снимает инактивирующее действие дубильных веществ на амилазу. Метод определения амилазы заключается в следующем: навеска 1 г семян жолудей (в данной работе *Quercus robur*) растирается с кварцевым песком, добавляется 0,5 г пептона и смесь настаивается с водой в течение 30 минут при комнатной температуре. Каша фильтруется, фильтрат доводится до объема 25 мл. Из этого объема берется 1 мл для определения активности фермента. Смесь, в которой определялась активность амилазы, состояла из 1 мл вытяжки, 3—5 мл растворимого крахмала 2%, 2 мл фосфатного буфера  $1/15$  M pH 6,0—6,5. Все это ставилось на 1 час в термостат при +32—33°. Параллельно ставился контрольный опыт с прокипяченной вытяжкой. Инактивирование фермента после инкубирования производилось добавлением уксуснокислого свинца, одновременно служившего для очистки раствора. Избыток свинца удалялся сернокислым натрием и в фильтрате определялось количество восстанавливающего сахара методом микро-Бертрана — Бьерри.

Извлечение амилазы из одной и той же навески повторялось несколько раз, в зависимости от активности фермента. Таким способом

определялась суммарная активность растворимой амилазы. После полного извлечения растворимой амилазы остаток ставился на автолиз на 6 часов при  $+33^{\circ}$  и далее так же как и для растворимой амилазы определялась активность нерастворимой амилазы.

Описанным выше методом определялась активность амилолитического комплекса в процессе хранения жолудей, а также была взята для сравнения одна проба из проросших жолудей. Данные об активности фермента приводятся в табл. 1 и на рис. 1. Мальтаза в семядолях жолудей не была обнаружена, поэтому предполагать дальнейший распад мальтозы до глюкозы нет оснований.

Таблица 1

Время взятия пробы	Активность амилазы в мг мальтозы на 1 г сух. веса			Отношение активности растворимой амилазы к нерастворимой амилазе
	растворимая амилаза	нерастворимая амилаза	суммарная активность	
7 XII 1949	2222,04	1116,88	3338,99	1,99
10 II 1950	2204,46	1149,32	3353,78	1,92
31 III 1950 (0,5 г пептона)	999,76	620,89	1620,65	1,61
31 III 1950 (1 г пептона)	2171,33	1197,58	3368,91	1,81
20 IV 1950 (проросшие)	3681,85	383,32	4065,17	9,55

В табл. 1 и на рис. 1 приведены данные для партии жолудей, хранившейся при  $3^{\circ}$ . Аналогичные результаты получены и для жолудей, находившихся при  $0^{\circ}\text{C}$ .

31 марта наблюдалось снижение активности фермента. Утраченную активность удается восстановить при добавлении пептона, 1:1 по отношению к взятой навеске жолудей;

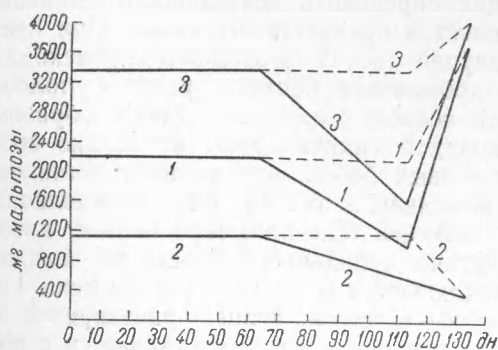


Рис. 1. Активность амилазы в мг мальтозы на 1 г сух. веса. 1 — растворимой, 2 — нерастворимой, 3 — суммарная

дальнейшее увеличение количества пептона не приводит к усилению активности амилаз. Проращивание жолудей производилось в апреле в термостате, при температуре  $16-18^{\circ}$ , во влажном песке. Кроме определения амилазы в семядолях жолудей она была обнаружена также в семенных ростках, но активность ее не-73,84 мг мальтозы на грамм сухого веса при применении той же методики, как и для семядолей жолудя). Амилаза семенных ростков находится

вся в растворимой форме, после автолиза фермент в них не был обнаружен.

Амилазный комплекс непроросших семядолей жолудей, по характеру своего действия, состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы, что было доказано на основании применения методов Вийсмана в модификации Клинка-мберга (5), Вольгемута (2), Ольсона (4), и определения  $\alpha$ -амилазы по количеству  $\alpha$ -амилазы, которая присутствовала только в растворимой форме.

На основании вышесказанного можно сделать следующее заключение:

1. В семядолях жолудей содержатся  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы, деятельность которых обуславливает мобилизацию крахмала, основного запасного питательного вещества жолудя, в процессе прорастания.

2. Обнаружить амилалитические ферменты в автолитических смесях, приготовленных из растертых жолудей, удается только при снятии инактивирующего действия дубильных веществ пептоном.

3. Главная масса амилаз сосредоточена в семядолях жолудей и лишь незначительная ее часть имеется в семенных ростках.

4. Амилазный комплекс в семядолях жолудей находится как в растворимой форме, так и в нерастворимой, обнаруживаемой только после 6-часового автолиза при  $+33^{\circ}$ .

5. В семенных ростках содержится только растворимая форма амилаз.

6. В процессе хранения суммарная активность ферментов остается без существенных изменений, так как снижение активности в марте месяце удается восстановить добавлением увеличенного количества пептона.

7. В процессе прорастания происходит увеличение активности растворимой амилазы, главным образом за счет нерастворимой <sup>(3)</sup>, при незначительном повышении суммарной активности.

Авторы приносят благодарность акад. А. И. Опарину за ценные указания, а также С. Б. Каден за помощь при исследовании ферментативной активности семенных ростков жолудей дуба.

Поступило  
20 VI 1950

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Г. Х. Бутанян и Г. Д. Ярошенко, Сов. бот., № 5, 50 (1943).  
<sup>2</sup> А. Р. Кизель, Практическое руководство по биохимии растений, 1934.  
<sup>3</sup> А. И. Опарин и С. Б. Каден, Биохимия, 10, 25 (1945). <sup>4</sup> В. И. Радзевич, Ферментативный гидролиз крахмала амилазами различного происхождения, Диссертация, МГУ, 1947. <sup>5</sup> G. A. Klinkenberg, Zs. physiol. Chem., 219, 253 (1932). <sup>6</sup> А. И. Опарин и А. Л. Курсанов, Biochem. Zs., 209, 181 (1929).  
<sup>7</sup> C. Wehmer, Die Pflanzenstoffe, 1911.