

Б. Н. СТЕПАНЕНКО и Е. М. АФАНАСЬЕВА

О СТРОЕНИИ АМИЛОЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

(Представлено академиком А. И. Опариным 14 VII 1952)

В предыдущей работе (1) мы показали принципиальную возможность обнаружить качественные изменения фракций крахмала при его созревании, а также различия в них, связанные с агрофоном и заключающиеся в различии иодной реакции и молекулярных весов.

В настоящей работе мы поставили своей задачей более глубоко изучить ранее обследованные фракции крахмалов (1), с целью выяснения основных черт химического строения составляющих их полисахаридов, в первую очередь — амилоз.

Крахмалы выделялись из клубней картофеля сорта «Лорх», отобранных 2 VIII и 10 IX 1950 г. с неудобренных участков и участков с высоким агрофоном (50—30 т навоза, N, P, K по 60 кг/га) (участки Института картофельного хозяйства Министерства сельского хозяйства, близ ст. Малаховка, Моск. обл.).

Фракционирование крахмалов на амилозу и амилопектин производилось по Ланской и сотр. (2) с заменой пентазола бутанолом. Такая замена приводит обычно к выделению преимущественно высокомолекулярных фракций амилозы. Амилозы выделялись в кристаллическом состоянии и дважды перекристаллизовывались.

Для выяснения основных черт строения выделенных препаратов в настоящей работе мы определяли единицу цепи, а также проводили расщепление при помощи β -амилазы.

Определение единицы цепи (т. е. числа глюкозных остатков, приходящихся на одну конечную неальдегидную группу) мы производили методом периодатного окисления, предложенным в последние годы. Как было показано (3), метод периодатного окисления в случае применения к полисахаридам известного строения дает результаты, весьма близкие к получаемым классическим методом метилирования, но требует гораздо меньшего количества препарата и времени. Принцип метода заключается в том, что при окислении NaJO_4 в определенных условиях из конечной альдегидной группы образуется 2 моля муравьиной кислоты, а из каждой конечной неальдегидной группы — 1 моль муравьиной кислоты; кислота определяется титрованием. Тогда единицу цепи N для амилозы (полисахарида неветвистой структуры) можно определить формулой

$$N = \frac{a}{162} : \frac{b}{3}, \quad (1)$$

где a — навеска амилозы, 162 — эквивалентный вес глюкозного остатка, b — число эквивалентов муравьиной кислоты, образовавшейся из альдегидной и неальдегидной концевых групп. Для амилопектина (полисахарида с сильно ветвистой структурой)

$$N = \frac{a}{162} : b \quad (2)$$

(число эквивалентов HCOOH считают равным числу многочисленных концевых неальдегидных групп, пренебрегая той кислотой, которая образуется из единственной в молекуле альдегидной группы).

Периодатное окисление было проведено нами в условиях, описанных в работе (4). Полученные результаты приведены в табл. 1; цифры, выражающие единицу цепи в этой таблице, вычислены из цифр титрования HCOOH для амилозы по формуле (1).

Таблица 1

Виды амилоз	Средн. мол. вес	Коефф. полимеризации	Един. цепи, вычисл. по ф-ле (1)	Средн. число неальд. концев. групп в молекуле	Средн. число точек ветвл. в молекуле	Расщепл. β-амилазой в %
БУ, VIII*	68 900	425	320	1,3	0,3	97,7
БУ, IX	71 100	438	370	1,2	0,2	94,2
BA ⁵⁰ VIII	77 900	481	273	1,8	0,8	95,4
BA ⁵⁰ , IX	82 600	510	332	1,5	0,5	96,6
BA ³⁰ , VIII	72 900	450	—	—	—	96,7
BA ³⁰ , IX	75 800	476	265	1,8	0,8	95,4

* БУ — с участка без удобрений; BA⁵⁰ — с участка с высоким агрофоном с 50 т навоза; BA³⁰ — высокий агрофон с 30 т навоза; VIII клубни взяты в августе 1950 г.; IX — в сентябре 1950 г.

Изучение расщепления β-амилазой проводилось в условиях большого избытка фермента, а также методики, обеспечивающей полное расщепление полисахаридов (5) — до 100% в случае неветвистой амилозы и до мест ветвлений в случае амилопектинов. Степень расщепления наших препаратов, определяемая по редукции, была высокой, но ни в одном случае не достигала 100%, хотя для каждого раза определялась повторно (см. табл. 1).

Приведенные в таблице молекулярные веса определены нами ранее (1) спектрофотометрическим методом на основании окисления динитросалициловой кислотой; из этих данных вычислены соответствующие им средние коэффициенты полимеризации.

Строение амилоз. Как видно из табл. 1, вычисленные по ф-ле (1) единицы цепи молекул амилоз во всех случаях меньше степени полимеризации. Этот факт свидетельствует о том, что выделенные нами амилозы не являются строго линейными, а в слабой степени разветвлены. Если с известным приближением принять для амилоз ф-лу (1), то в каждой молекуле должно быть в среднем 1,2—1,8 неальдегидных концевых группы.

Так как при дихотомическом ветвлении число конечных неальдегидных групп на единицу больше числа точек ветвления, то из приведенных данных следует, что выделенные амилозы имеют в молекуле в среднем 0,2—0,8 точки ветвления, т. е. в среднем из каждых 5 молекул в разных образцах амилозы от 1 до 4 молекул имеют точку ветвления.

Фактически число точек ветвления несколько больше, так как ф-ла (1) применима лишь к абсолютно неразветвленным структурам. Более общей формулой для определения единицы цепи периодатным методом нужно считать:

$$N = \frac{a}{162} : \frac{bn}{n+2}, \quad (3)$$

где n — число конечных неальдегидных групп (остальные обозначения см. выше). В двух крайних случаях эта общая формула упрощается, превращаясь при неразветвленной цепи ($n = 1$) в ф-лу (1), а при сильно разветвленной ($n \gg 2$) в ф-лу (2).

Так как периодатный метод не дает возможности прямого определения числа n , в случае слабо разветвленных полисахаридов один этот метод не может дать точных значений единицы цепи. Ф-ла (1), применяемая в этих случаях, дает величины единицы цепи, которые могут рассматриваться лишь как верхний предел.

Некоторое приближенное представление о нижнем пределе единицы цепи, помимо значений, вычисленных по ф-ле (2), могут дать также расчеты, построенные на изучении расщепляемости полисахаридов β -амилазой (если известен коэффициент полимеризации).

Если расщепляемость полисахарида равна q %, то количество глюкозных единиц в нерасщепленном остатке равно коэффициенту полимеризации $(100 - q)/100$.

Так как в химии крахмала неизвестно более частое ветвление, чем через 8—9 глюкозных остатков, то, очевидно, что минимальное число точек ветвления в молекуле = $\frac{\text{коэфф. полимер.} (100 - q)}{9 \cdot 100}$ = число концевых групп.

Такие приближенные расчеты, проведенные, например, для амилозы БУ VIII дают среднее число точек ветвления в молекуле 1, число неальдегидных концевых групп — приблизительно 2, величину единицы цепи (по ф-ле (3)) 203, тогда как соответствующие величины, полученные при применении ф-лы (1) равны соответственно 0,2, 1,2 и 320.

Нельзя, однако, забывать, что определение нижнего предела единицы цепи, исходя из расщепляемости β -амилазой, имеет лишь весьма ориентировочный характер, поскольку само расщепление β -амилазой вряд ли может считаться количественной методикой; поэтому подобные расчеты можно производить лишь при уверенности в оптимальности условий при многочисленных контролях и совпадении повторных определений расщепляемости.

Таким образом, неравенство найденных по ф-ле (1) значений единиц цепи и коэффициентов полимеризации, а также неполное расщепление β -амилазой приводит к заключению о том, что высокомолекулярные картофельные амилозы, составляющие главную часть фракции амилозы, являются слабо разветвленными, т. е. в них, наряду с линейными молекулами, присутствуют молекулы с одной, а может быть в отдельных случаях и двумя точками ветвления (см. рис. 1).

Этот вывод хорошо согласуется с современными представлениями о механизме биосинтеза полисахаридов. Амилозы образуются путем наращивания при действии фосфорилазы цепей глюкозных остатков из глюкозо-1-фосфата, присоединяющихся к неальдегидным концевым группам, причем для начала синтеза необходимо присутствие в качестве затравки хотя бы коротких цепей глюкозных остатков. Эти цепи образуются под влиянием амилаз, причем при действии α -амилазы на амилпектины наряду с короткими неразветвленными участками всегда образуются и короткие слабо разветвленные участки. Эти последние должны дать начало образованию слабо разветвленных амилоз (рис. 1).

Выявление в крахмалах, наряду с неразветвленными амилозами, слабо разветвленных связано с большими трудностями, так как по своему физико-химическому поведению, в частности при избирательном оса-

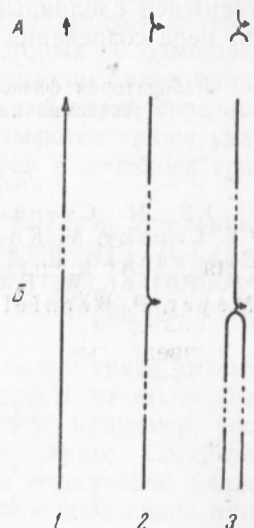


Рис. 1. Схема строения картофельных амилоз (Б) и полисахаридов, являющихся исходными при их синтезе (А). Стрелка обозначает «альдегидное» начало цепи; пунктиром обведены β -декстрины

дени, они должны вести себя практически одинаково; с другой стороны, высокая расщепляемость слабо разветвленных амилоз, близкая к 100%, повидимому, часто давала повод считать их неразветвленными.

Лишь сопоставление по меньшей мере: 1) коэффициента полимеризации, 2) величины единицы цепи и 3) степени расщепляемости β -амилазой (что и было сделано в настоящей работе) дают возможность сделать в этом отношении более достоверные выводы. Окончательное решение вопроса, однако, может быть сделано лишь после изучения строения тех ничтожных количеств β -декстринов, которые остаются после β -амилолиза амилоз. В связи со сказанным нам кажется, что некоторые данные в отношении строения амилоз, имеющиеся в литературе, требуют пересмотра.

Напомним, что некоторые зарубежные авторы (⁴), изучая недавно амилозы различного происхождения, обнаружили слабое ветвление амилоз пшеницы, тапиоки, саго, но цепь картофельной амилозы они считали неразветвленной.

При сравнении величин единицы цепи «молодых» и «зрелых» амилоз (см. табл. 1) оказывается, что по мере развития растения как на неудобренных участках, так и на участках с высоким агрофоном отмечается некоторое увеличение единицы цепи.

Таким образом, в настоящей работе совершенно другим методом подтвержден сделанный нами ранее (¹) вывод об удлинении цепей амилоз по мере созревания клубней.

Лаборатория физиологической химии
Академии наук СССР

Поступило
19 V 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. Н. Степаненко, Е. М. Афанасьева, ДАН, 86, № 3 (1952).
² S. Lansky, M. Kooi, T. Schoch, J. Am. Chem. Soc., 71, 4066 (1949). ³ Б. Н. Степаненко, Е. Л. Розенфельд и др., Усп. совр. биол., 32, 193 (1951).
⁴ A. Potter, W. Hassid, J. Am. Chem. Soc., 70, 3488, 3774 (1948). ⁵ К. Н. Meyer, P. Bernfeld et al., J. Phys. and Coll. Chem., 53, No. 3 (1949).