

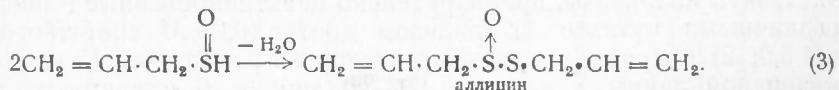
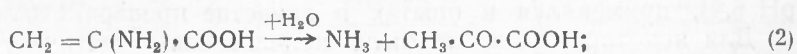
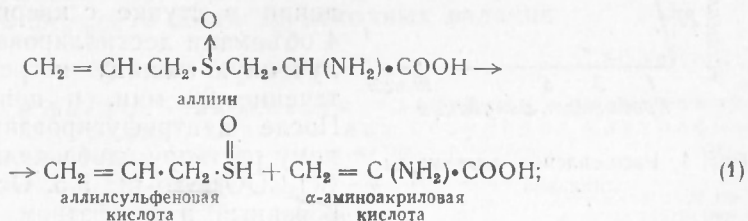
Е. В. ГОРЯЧЕНКОВА

**ФЕРМЕНТ ЧЕСНОКА, ОБРАЗУЮЩИЙ АЛЛИЦИН (АЛЛИИНАЗА) —
ПРОТЕИД ФОСФОПИРИДОКСАЛЯ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 IX 1952)

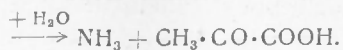
Б. П. Токину ⁽¹⁾ принадлежит заслуга открытия в кашицах из лукович чеснока летучего антибактериального вещества (фитонцида) и внедрения его в клиническую практику. Кавалито и сотр. ⁽²⁾ выделили антибактериальное действующее начало чеснока в чистом виде и назвали его аллицином. Они установили, что это вещество (с характерным запахом чеснока) представляет собой окись диаллилдисульфида и образуется ферментативным путем из более сложной молекулы при повреждении лукович чеснока.

Механизм образования аллицина и природа его предшественника были выяснены Штоллем и Зеебеком ⁽³⁾. Эти авторы выделили из чеснока своеобразную серусодержащую аминокислоту, (+) *S*-аллил-*L*-цистеинсульфоксид, которую они назвали аллином. Под влиянием особого фермента, аллииназы, при растирании лукович чеснока происходит быстрое расщепление аллиина с образованием аллицина, аммиака и пировиноградной кислоты; превращение протекает следующим путем ⁽³⁾:



Аллииназа катализирует реакцию (1); превращения (2) и (3) протекают самопроизвольно с большой скоростью.

Аллиин является β-замещенной α-аминокислотой с резко полярным заместителем в β-положении. Известен ряд ферментативных реакций, при которых α-аминокислоты с менее резко полярными заместителями в β-положении, а именно, триптофан, цистеин, различные тиоэфиры цистеина, серин и треонин, подвергаются расщеплению по общей схеме (4), соответствующей вышеприведенным реакциям (1 + 2) ⁽⁴⁾:



(4)

В последние годы установлено, что ферменты, осуществляющие указанные превращения, а именно, триптофаназа (7), цистеиндесульфгидраза (8), β-тионаза (9, 10), дезаминазы серина (11, 12) и треонина (12), являются протеидами фосфопиридоксаля.

А. Е. Браунштейн и М. М. Шемякин (6), разработавшие общую теорию превращений аминокислот, катализируемых пиридоксальевыми энзимами, указали на вероятную пиридоксаль-протеидную природу аллииназы.

В настоящем исследовании мы приводим экспериментальные доказательства, подтверждающие это предположение. Представляется вероятным, что аллиин образуется в растении посредством окисления *S*-аллил-*L*-цистеина (дезоксипалиина) и что последний синтезируется путем конденсации аллилсульфида с серином (или, возможно, цистеином) при участии фосфопиридоксалевого энзима (ср. механизм биосинтеза цистатионина (9) и других β-замещенных α-аминокислот (8)).

Экспериментальная часть

Для опытов служил синтетический препарат аллиина, содержащий наряду с природным (+) *S*-аллил-*L*-цистеинсульфоксидом его (−) *S*-диастереоизомер; препарат был синтезирован нами путем окисления перекисью водорода *L*-дезоксипалиина, полученного из аллилбромида и *L*-цистеина (4); оба диастереоизомера расщепляются аллииназой, причем расщепление (+) *S*-изомера протекает с большей скоростью.

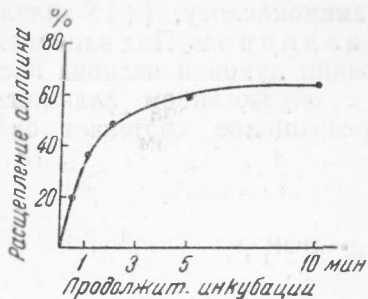


Рис. 1. Расщепление аллиина аллииназой

Для приготовления раствора частично очищенной аллииназы (5) луковицы чеснока быстро растирали при охлаждении в ступке с кварцевым песком и 4 объемами дистиллированной воды. Полученную кашку нагревали при 37° в течение 20 мин. и центрифугировали. После центрифугирования к прозрачному раствору добавляли 10% раствор CH_3COOH до pH 5,5. Осадок, суспензированный в фосфатном буфере (M/15,

pH 6,4), применялся в опытах в качестве препарата аллииназы.

Для некоторых опытов были использованы частично очищенные экстракты аллииназы, предварительно инактивированные («апофермент») различными путями: 1) диализом против 0,01 M ацетатного буфера pH 5,0; 2) облучением ультрафиолетом на расстоянии 15 см от ртутно-кварцевой лампы в течение 60—90 мин. и 3) «старением» фермента путем хранения при 1—3° под толуолом (до 14 суток).

Активность аллииназы испытывалась следующим образом. Опытные пробы, содержащие 0,5 мл ферментного экстракта, 10 мг аллиина и 2 мл фосфатного буфера (M/15, pH 6,4) в общем объеме 5 мл, инкубировали 10 мин. при 37°. В трихлоруксусных фильтратах опытных проб определяли прирост аммиака по методу Конвей-Бирна и, в некоторых опытах, образование пировиноградной кислоты путем прямого колориметрического определения 2,4-динитрофенилгидразонов кетокислот (13).

Фосфопиридоксаль (ФП) добавлялся в виде чистой Mg-соли (14), синтезированной из пиридоксина А. Е. Браунштейном и Р. М. Азарх. Активность его на единицу веса примерно в $2\frac{1}{2}$ — 3 раза выше активности препарата Ва-соли ФП, применявшейся в прежних работах нашей лаборатории.

На рис. 1 графически изображены данные по расщеплению полученного нами препарата аллиина аллииназой во времени. Приведенные результаты показывают, что процесс расщепления аллиина протекает очень быстро; за 10 мин. инкубации убыль субстрата достигает 60—70%. Исходя из этого, все опытные пробы инкубировали 10 мин.

Таблица 1

Влияние химических агентов на активность аллииназы

Молярная концентрация яда	Гидроксиламин		Фенилгидразин		Семикарбазид	
	образование N—NH ₂ в мг/г	торможение в %	образование N—NH ₂ в мг/г	торможение в %	образование N—NH ₂ в мг/г	торможение в %
Контроль	3,39	—	3,39	—	3,39	—
$2 \cdot 10^{-3}$	0	100	0,10	97,2	0,42	87,6
10^{-3}	0,16	95,2	0,19	94,4	0,42	87,6
10^{-4}	0,16	95,2	2,42	28,7	2,06	39,3

Как видно из табл. 1, химические агенты, блокирующие карбонильную группу (гидроксиламин, фенилгидразин и семикарбазид), в концентрации 10^{-3} M почти полностью тормозят действие аллииназы, причем наибольшее торможение вызывает гидроксиламин.

В частично очищенных экстрактах аллииназы прирост азота аммиака за счет расщепления аллиина составляет в среднем 4,5 мг на 1 г исходных луковиц чеснока (табл. 2). Из цифр, приведенных в табл. 2, видно, что активность аллииназы постепенно снижается по мере хранения при 1—3° (например, на 35—40% за 9 дней и на 73% за 12 дней), а также при диализе против кислого буферного раствора (на 42% за 20 час. и 75% за 48 час.). Добавление к таким экстрактам аллииназы («апоферменту») фосфопиридоксала в количестве 20 γ / 5 мл восстанавливает активность фермента почти до исходных величин.

Таблица 2

Активирование фосфопиридоксалем аллииназы, инактивированной путем „старения“, диализа или облучения ультрафиолетом (образование N—NH₂ в мг на 1 г чеснока)

Начальн. активность	Активность после хранения			Начальн. активность	Активность после диализа			Начальн. активность	Активность после облучения ультрафиолетом		
	продолж. хранения в дн.	без добавок	с ФП (20 γ)		продолж. диализа в час.	без добавок	с ФП (20 γ)		продолж. облучения в час.	без добавок	с ФП (20 γ)
4,20	7	3,06	4,40	4,20	8	4,07	—	4,60	1	0,37	1,27
4,65	8	2,79	4,65	4,20	20	2,44	3,84	4,70	1	1,08	2,39
4,40	9	3,46	4,40	3,60	26	1,34	3,19	4,70	1,5	0,30	1,21
4,10	9	2,65	4,07	4,68	48	1,28	2,25				
4,65	12	1,24	3,12								

Облучение свежечищенного раствора аллииназы ультрафиолетовыми лучами в течение 60—90 мин. приводит к значительному сни-

жению расщепления аллиина (на 70—90%). При добавлении к таким экстрактам ФП активность аллииназы частично восстанавливается, не достигая исходных величин. Аналогичное явление наблюдается в опытах, в которых применяли экстракт аллииназы, диализованный 48 час. или хранившийся 12 дней, что объясняется, очевидно, частичным разрушением белковой части фермента.

На рис. 2 приведена кривая, показывающая зависимость расщепления аллиина от количества ФП, добавленного к экстракту аллииназы,

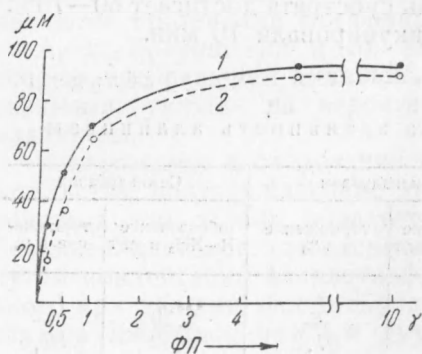


Рис. 2. Расщепление аллиина аллииназой (хранившейся 9 дней) в зависимости от количества добавленного ФП. 1 — $N-NH_3$; 2 — кетокислоты (ФП — в γ на пробу объемом 5 мл; $N-NH_3$ и кетокислоты — в μM на 1 г чеснока)

имеющему низкую активность (на 9-й день хранения при 1—3°). Величины расщепления аллиина приведены в микромолях $N-NH_3$ (1) и пировиноградной кислоты (2) в пробе; при концентрации ФП 5 γ /5 мл достигается максимальная активность.

Выводы. Аллииназа чеснока обладает высокой чувствительностью к ферментным ядам, блокирующим карбонильную группу. Активность «апофермента» аллииназы, полученного путем диализа, «старения» или облучения ультрафиолетом, восстанавливается при добавлении синтетического ФП. Эти данные показывают, что фермент чеснока, образующий аллицин, является протеидом фосфопиридоксала.

Поступило
6 IX 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. П. Токин, Фитониды, М., 1948. ² C. Cavallito et al., J. Am. Chem. Soc., **66**, 1952 (1844); **67**, 1032 (1945). ³ A. Stoll, E. Seebeck, Adv. Enzymol., **11**, 377 (1951). ⁴ A. Stoll, E. Seebeck, Helv. Chim. Acta, **31**, 189 (1948); **34**, 481 (1951). ⁵ A. Stoll, E. Seebeck, *ibid.*, **32**, 197 (1949). ⁶ А. Браунштейн, М. Шемякин, ДАН, **85**, № 5 (1952). ⁷ W. Wood et al., J. Biol. Chem., **170**, 313 (1947). ⁸ А. Браунштейн, Р. Азарх, ДАН, **71**, 93 (1950); Р. Азарх, В. Гладкова, ДАН, **85**, № 1 (1952). ⁹ А. Браунштейн, Е. Горяченкова, ДАН, **74**, 429 (1950); Е. Горяченкова, ДАН, **85**, № 3 (1952). ¹⁰ F. Binkley et al., J. Biol. Chem., **194**, 109 (1952). ¹¹ C. Yanofsky, *ibid.*, **194**, 279 (1952). ¹² J. Reissig, Arch. Biochem. Biophys., **36**, 234 (1952). ¹³ А. Браунштейн, Р. Азарх, ДАН, **85**, № 2 (1952). ¹⁴ M. Viscontini et al., Helv. Chim. Acta, **34**, 1834, 2198 (1951).