

Академик А. И. ОПАРИН и М. С. БАРДИНСКАЯ

К ВОПРОСУ ОБ ЭНЗИМАТИЧЕСКОМ СИНТЕЗЕ ФРУКТОЗИДОВ (β -АЛКИЛФРУКТОФУРАНОЗИДОВ)

Ферментативные процессы, лежащие в основе разнообразных превращений углеводов в живых организмах, их синтеза и распада, всегда привлекали внимание исследователей. В последние годы исследования, главным образом, были направлены на выяснение роли фосфорных соединений в этих процессах (1, 2).

Наибольшее число работ, посвященных выяснению процессов ферментативных превращений углеводов, относится к моно- ди- и полисахаридам. Вместе с тем, лишь единичные работы затрагивают вопросы энзиматического синтеза и распада такого класса соединений, как глюкозиды, которые широко распространены в растительном мире и весьма разнообразны по характеру своего несахарного компонента — аглюкона.

Работами Буркло и других (3) было установлено, что при действии препарата β -глюкозидазы (эмульсина) на спиртовые растворы монозудается осуществить как энзиматический синтез различных β -глюкозидов, так и их гидролиз. Таким методом был синтезирован целый ряд различных β -алкилглюкозидов (β -этилглюкозид, β -метилглюкозид, β -пропилглюкозид, β -бензилглюкозид и др.). Для некоторых из алкилглюкозидов исследовалась скорость энзиматического синтеза в зависимости от различных условий (температуры, концентрации и др.) (4). Однако детального биохимического исследования механизма энзиматического синтеза β -алкилглюкозидов не проводилось.

Еще меньше изучен энзиматический синтез таких соединений, как фруктозиды, отдельные представители которых также найдены в различных растительных организмах (5-7). Алкилфруктозиды, особенно β -алкилфруктофуранозиды, изучены весьма мало. В настоящее время в литературе известны лишь отдельные представители алкилфруктозидов, полученные химическим путем при действии на фруктозу или сахарозу соляной кислоты и спирта в определенных условиях. При этом синтезируется смесь $\alpha + \beta$ -форм (8).

Химические исследования установили, что алкилфруктозиды — соединения лабильные и легко гидролизуются минеральными кислотами. Было также установлено, что β -метилфруктофуранозид может быть гидролизован и энзиматически, при действии препарата дрожжевой инвертазы (9). Известно, что инвертаза дрожжей действует на соединения, содержащие фуранозную форму фруктозы (10). До настоящего времени алкилфруктофуранозиды не были получены энзиматически, и возможный механизм их синтеза и распада не изучался.

Целью настоящей работы, предпринятой нами, являлось изучение возможных путей синтеза β -алкилфруктофуранозидов, так как, по некоторым данным, эти соединения могут играть определенную роль в обмене веществ растительного организма (11). Мы предполагали осуществить биохимический синтез фруктозидов в модельных системах, действуя

очищенным препаратом дрожжевой инвертазы на водно-спиртовой раствор веществ, содержащих фуранозную форму фруктозы.

В 1952 г. одновременно с начатыми нами исследованиями появилась в печати в виде предварительного сообщения работа Бекон⁽¹²⁾, в которой автор сообщил о ферментативном образовании β -метилфруктозида (фруктофуранозида) при действии препарата дрожжевой инвертазы на раствор сахарозы в присутствии метилового спирта. Применяв метод распределительной хроматографии на бумаге, Бекон показал возможность образования в аналогичных условиях β -пропилфруктозида, β -бензилфруктозида и β -этилфруктозида. β -метилфруктозид был им выделен из реакционной смеси и были исследованы его свойства.

На основании экспериментальных данных Бекон сделал вывод, что в данном случае синтез β -фруктозидов осуществлялся благодаря энзиматическому переносу фруктозного остатка из сахарозы на соответствующий спирт и что инвертаза по характеру действия является трансфруктозидазой. К сожалению, в опубликованной им работе не указывается продолжительность реакции и не приводятся хроматограммы полученных им фруктозидов.

Возможность энзиматического переноса фруктозных остатков посредством дрожжевой инвертазы отмечали и другие авторы, которые, исследуя хроматографически ход энзиматического гидролиза сахарозы, наблюдали появление в реакционной смеси олигосахаридов, образующихся, по их представлениям, в результате переноса остатка фруктозы на сахарозу⁽¹³⁾. Эти работы, появившиеся в печати, главным образом, в 1950—1952 гг., так же как и предыдущая работа, носят в основном характер предварительных сообщений.

В настоящей работе нами была сделана попытка изучить ход энзиматического синтеза β -этилфруктозида при действии на сахарозу очищенного препарата дрожжевой инвертазы в присутствии этилового спирта. Дрожжевая инвертаза была нами получена в виде хорошо очищенного препарата с применением в качестве адсорбента для очистки трехкальциевого фосфата⁽¹⁴⁾.

Общий метод исследования процесса образования фруктозида заключался в следующем. Раствор, содержащий 10—15% сахарозы и 25—30% (по объему) этилового спирта, разделялся на две порции, к одной из которых прибавлялось 1—2 мл раствора фермента (0,1—0,05%), а к другой — то же количество раствора фермента, инактивированного кипячением. Эта проба служила контролем. Опыты велись как при рН 7,0, так и при рН 4,7 (в ацетатном буфере). После приливания ферментных растворов колбы (как опытная, так и контрольная) помещались в термостат при 30°, и из них через определенные промежутки времени отбирались пробы и наносились на бумагу для хроматографического исследования.

В качестве растворителя мы употребляли смеси: бутанол — уксусная кислота — вода (5 : 4 : 1) и особенно часто бутанол — этанол — вода (4,0 : 1,1 : 1,9), применение которой обеспечивало хорошее разделение фруктозида, фруктозы и сахарозы. Проявителем хроматограмм служил раствор мочевины в спирте и соляной кислоте (5 г мочевины + 20 мл 2 N HCl + 100 мл этилового спирта). Указанный реактив хорошо проявляет фруктозу и олигосахариды, содержащие фруктозу.

По данным Дедонде⁽⁷⁾, применение смеси бутанол — этанол — вода (4,0 : 1,1 : 1,9) и мочевины в качестве проявителя дало хорошие результаты при хроматографическом исследовании процесса синтеза инулина. Проведенные нами исследования также показали, что этот реактив весьма удобен и дает четкие результаты при определении фруктозных компонентов.

Для хроматографирования мы применяли разные сорта фильтровальной бумаги (хроматографическая № 2, фильтровальная бумага выпуска

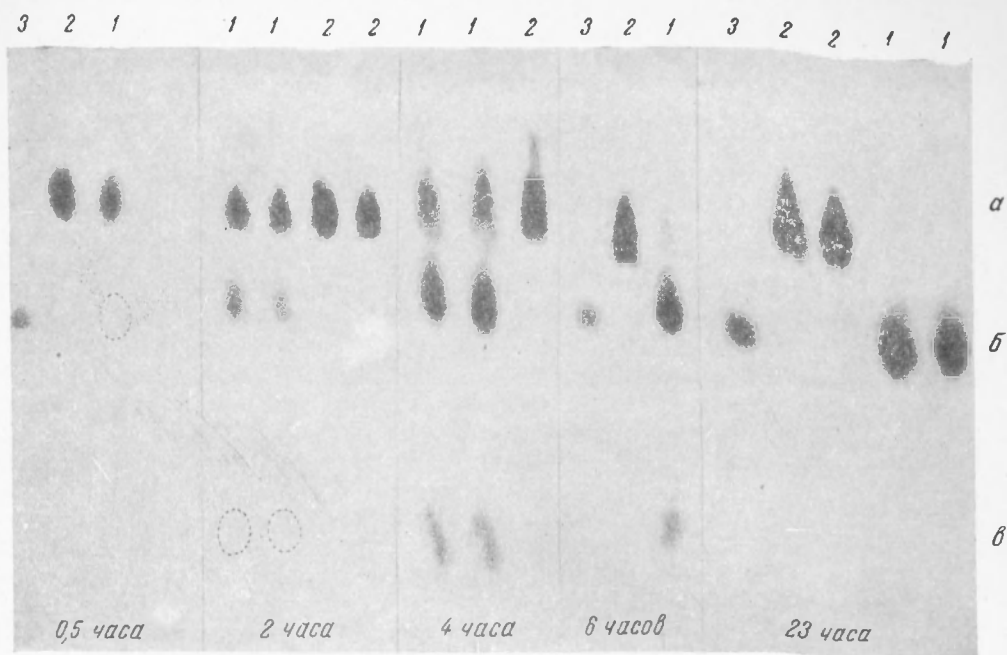


Рис. 1. Энзиматический синтез β -этилфруктозида. 1 — опытный раствор (сахароза + спирт + фермент), 2 — контрольный раствор (сахароза + спирт + фермент, инактивированный кипячением), 3 — раствор чистой фруктозы. а — сахароза, б — фруктоза, в — фруктозит. Слабо окрашенные пятна на хроматограмме обведены пунктиром

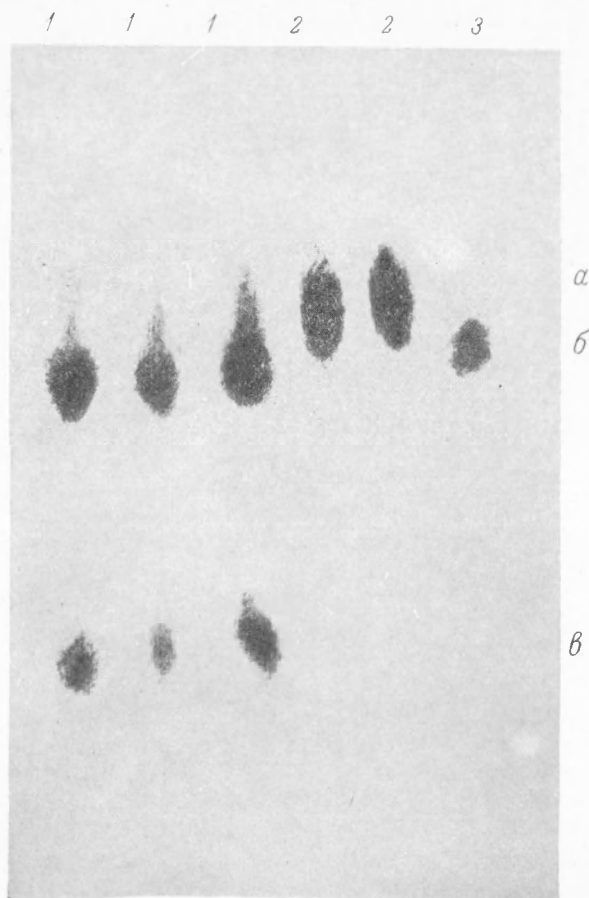


Рис. 2. То же при других условиях опыта (см. в тексте). Обозначения те же

Бумажной фабрики № 2, «Синяя лента» МХТИ и др.). Наиболее хорошие результаты получены с бумагой выпуска Бумажной фабрики № 2.

Отбираемые в процессе реакции пробы наносились на бумагу в количестве 0,002—0,003 мл, прогревались сухим нагретым воздухом для инактивирования фермента и помещались в камеры для хроматографирования. По окончании хроматографирования бумажные полоски высушивались, опрыскивались раствором мочевины, подсушивались на воздухе и затем в сушильном шкафу при 95—100° (10 мин.). При нагревании возникают ярко окрашенные пятна фруктозы, фруктозида, сахарозы и трисахаридов, содержащих в составе фруктозу, например рафинозы.

Нами было отмечено, что проявление при температуре около 100° дает яркую синюю и сине-фиолетовую окраску, тогда как более высокая температура (105°) способствует развитию более коричневой (сине-коричневой окраски). При длительном хранении окраска пятен переходит из синей и сине-фиолетовой в серо-коричневую.

Исследование продуктов реакции энзиматического гидролиза сахарозы дрожжевой инвертазой в присутствии этилового спирта, проведенное нами хроматографически через определенные промежутки времени, показало, что в опытном растворе одновременно с распадом сахарозы наблюдается появление свободной фруктозы и нового компонента, отве-

Таблица 1

Энзиматический синтез β-этилфруктозида при действии дрожжевой инвертазы на сахарозу (рН 4,7, температура 30°)

Компоненты смеси	Продолжит. реакции	Обнаружено хроматографически	
		опыт	контроль
Сахароза 10% + + спирт этиловый (30 объемн. %) + + инвертаза	10 мин.	Сахароза, фруктоза	Сахароза
	30 "	То же	"
	60 "	Сахароза, фруктоза, следы фруктозида	"
	2 час.	Сахароза, фруктоза, фруктозид	"
	4 "	То же	"
	6 "	Сахароза (следы), фруктоза, фруктозид	"
	8 "	То же	"
23 "	Фруктоза	"	

чающего β-этилфруктозиду. Количество фруктозида сначала увеличивается, а затем уменьшается. Количество свободной фруктозы все время возрастает. В контрольной колбе с инактивированным ферментом исходное вещество — сахароза — не претерпевает изменения. Ход энзиматического синтеза β-этилфруктозида из сахарозы и этилового спирта в ацетатном буфере (рН 4,7) при температуре 30° представлен на рис. 1 и в табл. 1.

Из приведенных данных видно, что образование β-этилфруктофуранозида протекает одновременно с распадом сахарозы и появлением в растворе свободной фруктозы. В данных условиях опыта максимально количество этилфруктофуранозида соответствовало 6—8 часам; через 23 часа фруктозид полностью гидролизуетея и исчезает из раствора. При других условиях опыта (более низкая температура, рН 7,0) максимальное количество фруктозида наблюдалось через больший промежуток времени — 25—30 час. (рис. 2).

Таблица 2

Продолжит. реакции	Колич. фруктозы в %	Колич. фруктозида в %
10 мин.	5—10	0
60 "	15—20	5
2 час.	30—40	10—15
6—8 "	60—70	25—30
23 "	100	0

Количество образующейся фруктозы и фруктозида мы смогли приблизительно оценить визуально, приняв за стандартную окраску окраску пятен, даваемую растворами фруктозы различной концентрации, которые наносились в том же количестве и хроматографировались в том же растворителе, что и исследуемые растворы. Такой метод рекомендовал В. В. Рачинским и Е. И. Князевой для приблизительной оценки количества сахаров⁽¹⁵⁾. Полученная приблизительная количественная оценка образующихся фруктозы и фруктозида для одного из опытов помещена в табл. 2.

Некоторые полученные нами данные указывают на то, что энзиматический синтез β -этилфруктозида из сахарозы при других условиях (более низкая температура опыта, нейтральная реакция среды) протекает более медленно, но подчиняется тем же закономерностям.

Было установлено, что R_f этилфруктозида значительно больше, чем R_f фруктозы и сахарозы. Для бумаги фабрики № 2, растворителя бутанол — этанол — вода (4,0 : 1,1 : 1,9) и продолжительности хроматографирования 7 час. величины R_f для сахарозы, фруктозы и фруктозида следующие: β -этилфруктозид 0,565, фруктоза 0,272, сахароза 0,174. Положение на хроматограмме β -этилфруктозида, полученного энзиматически из сахарозы, отвечает положению этилфруктозида, синтезированного нами по методу Альпресса и др.⁽⁸⁾.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что при действии препарата дрожжевой инвертазы на водно-спиртовой раствор сахарозы наблюдается, одновременно с распадом сахарозы и накоплением в растворе свободной фруктозы, появление нового компонента — β -этилфруктозида (этилфруктофуранозид). Количество фруктозида в опытном растворе сначала увеличивается, а затем уменьшается и, наконец, как сахароза, так и фруктозид полностью гидролизуются, исчезают, и через некоторое время (в зависимости от условий реакции) в растворе можно обнаружить только одну фруктозу (образующаяся глюкоза не проявляется в данных условиях). В контрольном растворе, где фермент был инактивирован кипячением, сахароза остается без изменения. Полученные нами предварительные данные указывают на возможность использования в качестве субстрата для энзиматического синтеза фруктозидов также и рафинозы.

Дальнейшее изучение механизма реакции ферментативного образования β -алкилфруктозидов нами продолжается.

Поступило
26 I 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. Н. Степаненко, Активные формы простых сахаров и их отношение к обмену углеводов, 1945. ² А. Л. Курсанов, О. А. Павлинова, Биохимия, 15, в. 1 (1950). ³ E. Bourquelot, M. Bridel, Ann. Chim. Phys., 29, 145 (1913). ⁴ С. К. Шипицина, Биохимия, 7, 1 (1942). ⁵ В. Л. Кретович, Сборн. Биохимия и микроб. пшеницы ВНИИЗ, в. 13, 1934. ⁶ Н. М. Сисакян, Биохимия, 3, 94 (1938). ⁷ R. Dedonder, Bull. Chim. Biol., 34, No. 1—2 (1952). ⁸ C. F. Allpress, M. N. Haworth, Y. Ynstern, J. Chem. Soc., 1233 (1927). ⁹ H. Schulbach, G. Rauchalles, Ber., 58, 1842 (1925). ¹⁰ А. И. Опарин, Сборн. Ферменты, 1940. ¹¹ Д. И. Лисицын, Биохимия, 17, 320 (1952). ¹² В. S. D. Bason, Biochem. J., No. 3 (1952). ¹³ J. W. White, Arch. Bioch. Biophys., 29, 238 (1952). ¹⁴ А. Н. Белозерский, В. П. Проскуряков, Практикум по биохимии растений, 1951. ¹⁵ В. В. Рачинский, Е. И. Князева, ДАН, 85, 1119 (1952).