

Академик А. И. ОПАРИН, М. С. БАРДИНСКАЯ и И. Е. ЭЛЬПИНЕР

ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЛН НА ДРОЖЖЕВУЮ ИНВЕРТАЗУ

В настоящее время установлено (¹⁻⁶), что в процессе ферментатического распада сахарозы в определенных условиях образуется, кроме фруктозы и глюкозы, ряд различных соединений, содержащих фруктозный остаток (β -алкилфруктозиды, олигосахариды). Изучение образования подобных соединений позволило некоторым исследователям высказать предположение о трансфруктозидазной функции инвертазы. В настоящем сообщении приводятся данные о действии ультразвуковых волн на ферментативную активность дрожжевой инвертазы, что дает возможность дальнейшего изучения механизма ее действия.

Полученные нами данные указывают, что действие ультразвуковых волн на инвертазу, по видимому, обусловлено в первую очередь взаимодействием фермента с продуктами расщепления молекул воды, образующимися в так называемых кавитационных полостях (⁷).

Мы изучали изменение активности фермента после озвучивания по гидролизу сахарозы 10%, как в водной среде, так и в присутствии метилового спирта (20—30% по объему). Инкубирование проводилось в термостате от 2 до 30 час. при 30° при pH 4,7 (ацетатный буфер). Распад сахарозы и образование в растворе олигосахаридов и β -алкилфруктозидов (при гидролизе в водно-спиртовой среде) изучались нами хроматографически. Для хроматографирования употреблялась бумага № 2; в качестве растворителя — смесь бутанол — этанол — вода (40 : 11 : 19).

Проявление пятен производилось мочевиной (⁵). На бумагу наносилось 3 μ л реакционной смеси. Для инактивации фермента употреблялся раствор HgCl_2 (³). Контролем служили пробы с ферментом, не подвергавшимся озвучиванию.

Препарат фермента был получен и очищен с применением в качестве адсорбента трикальцийфосфата (⁸). Инвертаза содержала 4,1% азота и имела максимум поглощения в ультрафиолетовых лучах около 280 м μ . Озвучиванию подвергались водные растворы фермента (0,01—0,001%). Озвучивание проводилось в стеклянных колбах, которые погружались в ультразвуковой фонтан. Источником излучения служила вогнутая пьезокварцевая пластинка диаметром в 5 см; подводимое к кварцу переменное напряжение составляло 3000 в. Частота колебания 740 000 гц.

Опыты показали, что дрожжевая инвертаза довольно устойчива к действию ультразвуковых волн. При экспозициях в 10—30 мин. 0,01% растворы инвертазы инактивируются слабо. Более сильная инактивация фермента наблюдается при увеличении времени озвучивания и уменьшении концентрации фермента.

На рис. 1 приводится хроматографическая картина гидролиза сахарозы в водно-спиртовом растворе (содержание сахарозы 10%, метилового спирта 20% по объему) и в водном растворе препаратами инвертазы, озву-

ченной и неозвученной (время озвучивания 50 мин.). Как видно из рис. 1, в пробах с озвученной инвертазой активность фермента значительно уменьшилась. Если в опыте с неозвученной инвертазой гидролиз сахарозы в водном растворе прошел полностью, то с озвученным препаратом он резко замедлен, особенно в разбавленном растворе инвертазы.

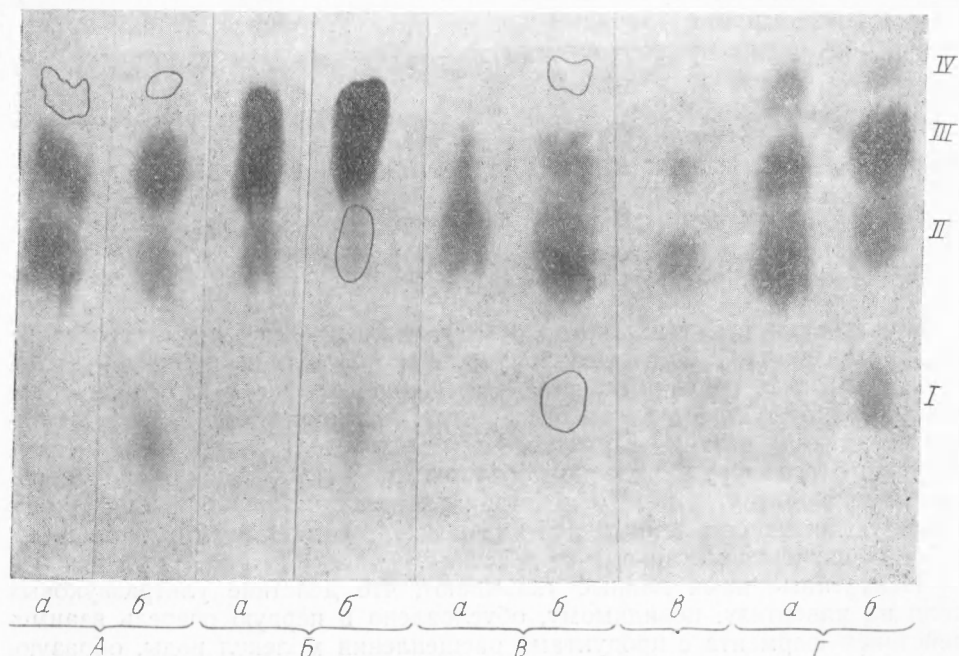


Рис. 1. Действие на сахарозу озвученной и неозвученной инвертазы. Время инкубирования 24 часа, $t = 30^\circ$, pH 4,7. А — неозвученная (0,001%); Б — озвученная (0,001%); В — неозвученная (0,01%); Г — озвученная (0,01%). а — гидролиз в водной среде, б — гидролиз в присутствии метилового спирта, в — фруктоза + сахароза. I — β -метилфруктозид, II — фруктоза, III — сахароза, IV — олигосахариды

Если ввести в озвучиваемый раствор вещества, обладающие большей упругостью паров, чем вода, то эти вещества, проникая в кавитационные полости, тормозят расщепление молекул воды и этим препятствуют возникновению химических процессов⁽¹⁰⁾. Действительно, в присутствии 0,3 мл этилового эфира на 10 мл раствора фермента инвертаза заметно не инактивировалась, даже при продолжительном озвучивании. Химические процессы угнетаются и в присутствии веществ, легко разрушающихся в поле ультразвуковых волн, т. е. обладающих большим химическим сродством к продуктам расщепления молекул воды в озвучиваемых водных растворах. Такие вещества вошли в литературу под названием защитных или конкурирующих веществ⁽⁹⁾. В нашем исследовании выявилось, что роль защитных или конкурирующих веществ играют сывороточный альбумин и некоторые другие вещества.

В присутствии подобных веществ при озвучивании раствора инаktivация фермента уменьшается. На рис. 2 приведена картина постепенного гидролиза сахарозы инвертазой неозвученной, озвученной и озвученной в присутствии 1% раствора сывороточного альбумина. Время озвучивания 50 мин. Продолжительность инкубирования от 2 до 30 час. Через 4 часа в контрольных пробах, содержащих неозвученную инвертазу, гидролиз сахарозы в водной среде полностью закончен, в то время как в пробе с озвученным ферментом гидролиз прошел приблизительно на 50%. В опыте с озвученной в присутствии альбумина инвертазой гидролиз заканчивается; при этом в растворе наблюдается небольшое количество

сахарозы и следы олигосахаридов. Аналогичная картина наблюдается в опыте с озвученной инвертазой без альбумина только через 30 час.

Легко представить, что продукты распада вводимых в раствор посторонних веществ могут стать источником атомов или ионов, характеризующихся в свою очередь большей реакционной способностью. Так например, наличие в растворе четыреххлористого углерода, легко отщепляющего под влиянием ультразвука атомарный хлор, приводит к резкому усилению окислительных процессов в озвучиваемой среде ⁽¹⁰⁾. Это нашло подтверж-

Продолжительность инкубации в часах

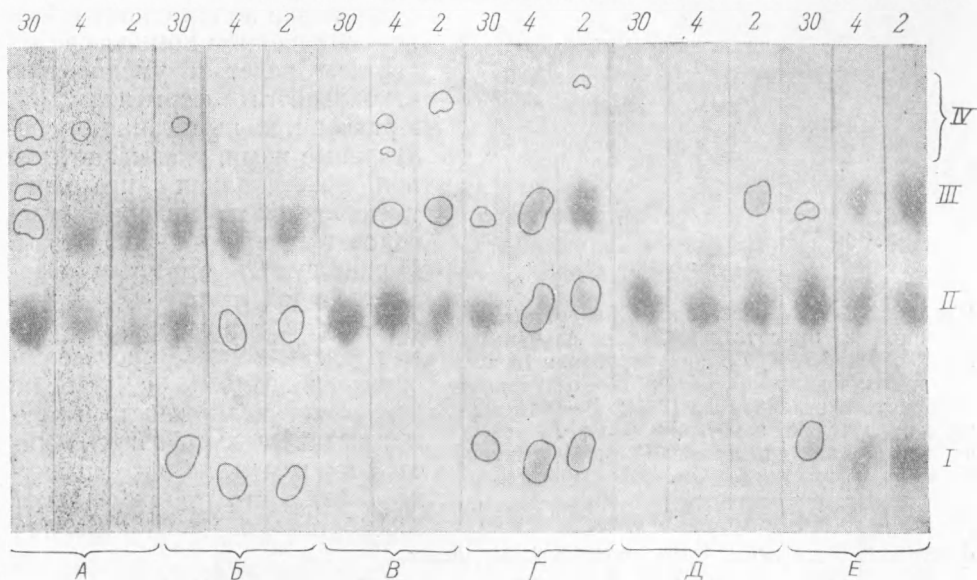


Рис. 2. Действие на сахарозу инвертазы, озвученной в присутствии сывороточного альбумина, $t = 30^\circ$, pH 4,7. А, В — озвученная (0,01%); В, Г — озвученная в присутствии альбумина (1%); Д, Е — незвученная (0,01%). А, В, Д — гидролиз сахарозы в водной среде; Б, Г, Е — гидролиз сахарозы в присутствии метилового спирта. I — IV — как на рис. 1

дение и в данном исследовании. Как видно из рис. 3, озвучивание инвертазы (15 мин.) в присутствии 0,08 мл CCl_4 (на 10 мл раствора) инактивировало фермент полностью, присутствие 0,1% раствора альбумина оказалось недостаточным для защиты фермента, а 1% раствор альбумина защитил инвертазу при озвучивании даже в присутствии CCl_4 .

В присутствии KJ в озвучиваемом растворе инвертазы также наблюдается усиление инактивации фермента. При концентрации фермента 0,001 и продолжительности озвучивания 50 мин. инактивация полная. Озвучивание при этом сопровождается появлением желтой окраски раствора, что свидетельствует об образовании молекулярного иода, регистрируемого аналитически. Вместе с тем присутствие даже значительных количеств J_2 в реакционной смеси из сахарозы и незвученного фермента (гидролиз сахарозы в присутствии 1% KJ и 0,1% J_2) не инактивирует инвертазу полностью. Повидимому, инактивация фермента осуществляется атомарным иодом, возникающим в растворе вследствие окисления ионов иода под воздействием ультразвуковых волн.

Полученные результаты позволяют предполагать, что инактивация инвертазы при озвучивании обусловлена, повидимому, взаимодействием фермента с продуктами расщепления молекул воды, обладающих большим окисляющим действием (OH , HO_2 и др.). Аналогичным действием обладают Cl и J в атомарном состоянии.

Интересно отметить, что в проведенных нами опытах мы наблюдали подавление, полное или частичное, ферментативной активности в озвучен-

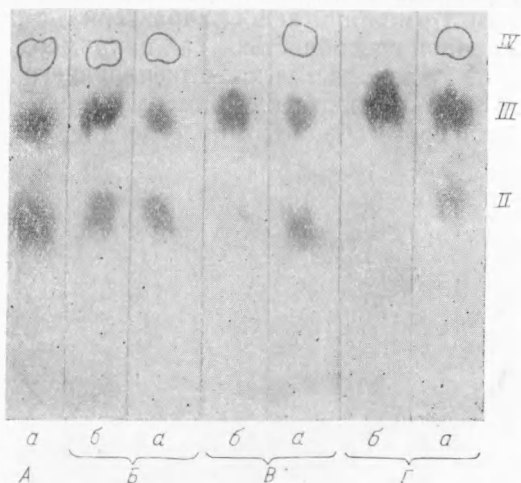


Рис. 3. Действие на сахарозу инвертазы, озвученной в присутствии CCl_4 и альбумина. $t = 30^\circ$, pH 4,7. Время инкубирования 19 час. А — неозвученная (0,001%); Б — озвученная в присутствии альбумина (1%); В — озвученная в присутствии альбумина (0,1); Г — озвученная. а — озвучивание без CCl_4 , б — озвучивание в присутствии CCl_4 . II — IV — как на рис. 1

фермента в поле ультразвуковых волн.

В экспериментальной работе принимала участие И. Г. Жукова.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
и Институт биологической физики АН СССР

Поступило
22 VI 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Fischer, L. Kohles, J. Feilg, *Helv. Chim. Acta*, **134**, 1132 (1951).
- ² J. S. D. Vason, *Biochem. J.*, **50**, № 3, 1950. ³ F. J. Bealing, J. S. D. Vason, *Biochem. J.*, **53**, № 2 (1953). ⁴ F. J. Bealing, *ibid.*, **55**, № 1 (1953). ⁵ А. И. Опарин, М. С. Бардинская, *ДАН*, **89**, № 3 (1953). ⁶ А. И. Опарин, М. С. Бардинская, *ДАН*, **94**, № 2 (1954). ⁷ И. Е. Эльпинер, *Журн. общ. биол.*, **15**, № 1 (1954). ⁸ А. Н. Белозерский, Н. И. Проскуряков, *Практич. руководство по биохимии растений*, 1951. ⁹ И. Е. Эльпинер, У. Б. Кац, *ДАН*, **82**, 611 (1952). ¹⁰ И. Е. Эльпинер, М. Д. Сурова, *ДАН*, **90**, № 6, 1083 (1953).