Доклады Академии наук СССР
1955. Том 100, № 4

*БИОХИМИЯ*

С. И. ПРОНИН

# ОСОБЕННОСТИ, НАБЛЮДАЕМЫЕ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОМ ИНАКТИВИРОВАНИИ АМИЛАЗЫ НЕПРОРОСШЕЙ РЖИ

*(Представлено академиком А. Л. Курсановым 30 XI 1954)*

При термическом инактивировании зерновых амилаз в тесте и в растворе наблюдается различие в скорости инактивирования начальной и последующей стадий осахаривания ([1], [2]). Начальная стадия гидролиза, характеризующаяся значительным осахаривающим эффектом, инактивируется быстрее по сравнению с инактивированием, наблюдаемым для более продолжительных сроков гидролиза. Эти наблюдения, сделанные для амилаз пшеницы и ржи, носили только качественный характер. В настоящей работе указанное явление изучено с количественной стороны для β-амилазы ржи. Опыты проводились следующим образом. 10 г муки экстрагировались 500 мл дестиллированной воды при комнатной температуре в течение получаса. Затем полученная вытяжка фильтровалась через складчатый фильтр.

В серию колбочек вносилось по 50 мл вытяжки, и колбочки помещались в термостат для инактивирования. Инактивирование производилось при 50, 55 и 60°. Сроки инактивирования для первых двух температур составляли 1, 2, 3 и 4 часа, для 60° их пришлось сильно сократить. При коротких экспозициях имело значение также время подогревания и остывания, которое сводилось к возможному минимуму. Для этого колбочка вносилась в стакан с горячей водой (88—90°) и содержимое подогревалось до нужной температуры, после чего колбочка помещалась в водяной термостат. По истечении времени экспозиции колбочка переносилась в холодную воду, где быстро охлаждалась до 40° (1,5—2 мин.). Одна колбочка прогреванию не подвергалась и служила контролем. Для определения степени инактивирования амилаз служило осахаривание растворимого крахмала при 40° как испытуемыми, так и контрольной вытяжками.

Концентрация растворимого крахмала была принята 1%. Проводилось две серии осахаривания; кратковременное (1-минутное), которое определяло собой начальную фазу процесса, и более длительное (15-минутное), которое давало представление об установившемся процессе. Каждая серия осахаривания проводилась отдельно. Для этого в колбочку вносилось 75 мл крахмального раствора, который доводился до 40°, затем приливалось 25 мл испытуемой вытяжки (той же температуры). По истечении намеченного срока (1 мин. или 15 мин.) реакция осахаривания останавливалась прибавлением 2 мл 10% серной кислоты. После этого отбиралась проба в 5 мл и в ней определялись редуцирующие вещества (на мальтозу) по Блишу и Санстедту ([3]). При этом учитывались редуцирующие вещества крахмального раствора и вытяжки, для чего ставились соответствующие поправочные определения (75 мл крахмального раствора + 25 мл воды и 25 мл вытяжки + 75 мл воды).

Инактивирование β-амилазы ржи в растворе

| Т-ра инактивирования в °С | Время прогревания к мин. | Активность в % к первоначальной | Константа инактивирования $K$ * | $\frac{K_1}{K_{15}}$ |
|---|---|---|---|---|
| 50 | | | | |
| 1-минутный гидролиз | 0 | 100,0 | | |
| | 60 | 95,0 | 0,02228 | |
| | 120 | 90,5 | 0,02167 | |
| | 180 | 86,6 | 0,02081 | |
| | 240 | 81,9 | 0,02168 | |
| | | | Средн. 0,02161 | |
| 15-минутный гидролиз | 0 | 100,0 | | |
| | 60 | 94,3 | 0,02549 | $\frac{0,02161}{0,01734} = 1,25$ |
| | 120 | 92,4 | 0,01717 | |
| | 180 | 88,5 | 0,01769 | |
| | 240 | 85,4 | 0,01716 | |
| | | | Средн. 0,01734 | |
| 55 | | | | |
| 1-минутный гидролиз | 0 | 100,0 | | |
| | 60 | 42,9 | 0,03675 | |
| | 120 | 38,1 | 0,2095 | |
| | 180 | 22,9 | 0,2100 | |
| | 240 | 14,3 | 0,2112 | |
| | | | Средн. 0,2102 | |
| 15-минутный гидролиз | 0 | 100,0 | | |
| | 60 | 65,0 | 0,1871 | $\frac{0,2102}{0,1007} = 2,08$ |
| | 120 | 56,6 | 0,1236 | |
| | 180 | 49,9 | 0,1006 | |
| | 240 | 39,5 | 0,1008 | |
| | | | Средн. 0,1007 | |
| 60 | | | | |
| 1-минутный гидролиз | 0 | 80,9** | | |
| | 2 | 50,0 | 0,1044 | |
| | 5 | 23,8 | 0,1063 | |
| | 8 | 11,4 | 0,1064 | |
| | | | Средн. 0,1057 | |
| 15-минутный гидролиз | 0 | 80,9** | | |
| | 10 | 17,2 | 0,06724 | |
| | 20 | 14,6 | 0,03718 | $\frac{0,1057}{0,02753} = 3,80$ |
| | 30 | 9,6 | 0,03086 | |
| | 40 | 6,4 | 0,02754 | |
| | 50 | 3,4 | 0,02753 | |
| | | | Средн. 0,02753 | |

* Константа инактивирования вычислялась по формуле $K = \frac{1}{t} \log \frac{A_0}{A_t}$.

** Здесь дано значение активности в нулевой момент с учетом инактивирования при предварительном подогревании вытяжки. Для этого вытяжка была быстро прогрета до 60° и затем немедленно охлаждена. Оказалось, что ее активность при этом составила 80,9% от активности ненагревавшейся вытяжки.

Результаты опытов приведены в табл. 1. Здесь активность вытяжек, определявшаяся по производимому ими осахариванию, выражена в процентах от активности контрольной, не прогревавшейся вытяжки.

Из табл. 1 видно, что инактивирование амилазы достаточно хорошо следовало закону мономолекулярной реакции или на всем исследуемом интервале или на определенном его отрезке. Обычно наблюдалось более быстрое инактивирование в начальной стадии процесса, а после некоторого промежутка времени течение инактивирования подчинялось мономолекулярному уравнению. В таблице эти стадии процесса разделены пунктиром. Для дальнейших сопоставлений и вычислений мы будем пользоваться лишь данными мономолекулярного течения реакции (под пунктирной чертой), применяя средние величины, вычисленные из этих данных.

Более быстрое инактивирование начальной стадии, отмеченное ранее ([1], [2]), характеризуется отношением $K_1/K_{15}$; это отношение, как видно из табл. 1, растет с повышением температуры инактивирования.

Данные табл. 1 дают возможность вычислить энергию активации $E$ (в калориях) для процесса инактивирования по формуле:

$$E = R\frac{T_1 T_2}{T_2 - T_1} 2{,}303 \log \frac{K_2}{K_1}.$$

Значения величины $E$, вычисленной таким путем, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Значения энергии активации $E$ при термическом инактивировании β-амилазы ржи

| Температурные интервалы | $E$ для 1-мин. гидролиза | $E$ для 15-мин. гидролиза |
|---|---|---|
| 50—55° | 95 750 | 83 730 |
| 55—60° | 147 800 | 121 400 |

Данные табл. 1 показывают, что термическое инактивирование β-амилазы ржи протекает во времени в сравнительно узком температурном интервале 50—60°. Как показали наши опыты, инактивирование при 40° протекает крайне медленно. Напротив, при температуре выше 60° оно протекает столь быстро, что его становится трудно наблюдать.

Обращают на себя внимание высокие температурные коэффициенты, наблюдаемые при инактивировании, и связанные с ними большие величины энергии активации. Это явление установлено для многих ферментов и связано с высокими температурными коэффициентами термической денатурации белков ([4]). Следует также упомянуть, что при термической денатурации белков энергетические отношения складываются иначе, чем при обычной ферментативной реакции гидролитического характера. Здесь нет энергетического барьера, преодоление которого обусловлено энергией активации процесса, и энергетическая кривая представляет собою поднимающуюся кверху прямую ([5]). Это хорошо согласуется с фактом, что термическая денатурация белков является эндотермической реакцией. Поглощаемая теплота идет на расшатывание и разрыв определенных связей в белковой молекуле, что термодинамически выражается в росте энтропии белка. В связи с этим величины энергии активации, определяемые по Аррениусу, при инактивации ферментов было бы правильнее назвать энергиями ферментной дезактивации; такое название непосредственно связано с природой протекающего процесса.

Различия в скорости инактивирования и соответствующих энергий дезактивации для начального и последующего действия приводят к представлению о неравноценности активных центров в молекуле амилазы. Следует, повидимому, выделить в ферментной молекуле группу активных центров, отличающихся большой активностью и в то же время повышенной термолабильностью. Возможно, что существует целая система таких групп, различающихся как по своей активности, так и по термостабильности.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
хлебопекарной промышленности

Поступило
3 VIII 1954

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] С. И. Пронин, Б. М. Дах, ДАН, **79**, № 5, 8377 (1951). [2] С. И. Пронин, Б. М. Дах, Биохимия, **17**, № 5, 557 (1952). [3] M. J. Blish, R. M. Sandstedt, Cer. Chem., **10**, 189 (1933). [4] Дж. Б. С. Холден, Энзимы, М., 1934. [5] Ф. Гауровитц, Химия и биохимия белков, 1953.