Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 4

БИОХИМИЯ

Академик А. И. ОПАРИН, Т. Н. ЕВРЕИНОВА, Т. А. ШУБЕРТ и М. Н. НЕСТЮК

КОАЦЕРВАТЫ И ФЕРМЕНТЫ

БЕЛКОВО-УГЛЕВОДНЫЕ КОАЦЕРВАТЫ И α-АМИЛАЗА

В работах ([3], [5]) были получены сложные коацерваты и изучены их свойства. В данной работе, наряду с получением и изучением сложных белково-углеводных коацерватов как таковых *, представлялось интересным включить в них ферменты ([3]). В литературе не найдено исследований по включению ферментов в коацерваты. В качестве фермента была взята α-амилаза, а коацерват был получен из сульфата протамина, желатины и растворимого крахмала.

α-амилаза была выделена из культуральной жидкости термофильного варианта Clostridium pasterianum, выращиваемого при температуре +60°. Оптимальными для действия данного препарата являются температура +60° и pH 5,5—5,9. Однако α-амилаза активна также при температурах от +45 до +90° и при pH от 5,0 до 9,0. Поэтому для изучения ее действия в коацервате были получены коацерватные капли, состоящие из растворимого крахмала, сульфата протамина и желатины. Такие капли образуются при pH от 5,6 до 8,4 и температуре +50°.

Методика изучения действия α-амилазы в таких коацерватах состояла в следующем:

К 0,4 мл 1% раствора растворимого крахмала добавлялось 0,4 мл 0,5% раствора сульфата протамина, 1,2 мл 0,67% раствора желатины ** и 0,1 мл раствора α-амилазы, содержащего 0,2 мг фермента. Все растворы предварительно подогревались до +50° и смешивались в указанной последовательности. Затем смесь подщелачивалась 0,01 *н* раствором NaOH до pH 7,0, при котором и образовывались коацерватные капли ***. pH 7,0 оказалось наиболее подходящим, так как в более кислой зоне образуются слишком мелкие коацерватные капли. Кроме того, при более щелочной реакции иод не дает характерного окрашивания с крахмалом и продуктами его распада — декстринами, а в данной работе о действии α_7-амилазы на крахмал в коацерватных каплях судилось по различной окраске этих капель с раствором иода. После образования коацерватных капель коацер-

* Под коацерватом подразумевается система из коацерватных капель или слоя, обогащенных коллоидными веществами, и окружающей их равновесной жидкости.

** Растворимый крахмал фирмы Kahlbaum. Сульфат протамина ([1], [2], [6], [8]) получен и очищен двукратным переосаждением по методу Косселя ([7]) из молок свежезамороженной горбуши дальневосточной (Onchorhynchus gorbusha). Препарат представляет собою белый аморфный порошок; найдено азота 18,71%, серы 5,71% или серной кислоты 17,49%. Изоэлектрическая точка его лежит при pH 8,3; измерение проводилось с каломельным и стеклянным электродами на потенциометре ЛП-4 в 0,25% растворе (к раствору в пробирках добавлялась 0,02 *н* NaOH до ясного помутнения — момент наибольшего помутнения и был взят как изоэлектрическая точка). 0,67% раствор желатины не поглощал уф-лучей в МУФ-2 при $\lambda = 250$—280 мμ и больше. Указанные вещества должны быть чистыми, особенно растворимый крахмал.

*** Во всех случаях, где идет речь о коацерватных каплях, проводился соответствующий контроль на их присутствие под микроскопом при увеличении 80 ×.

ват выдерживался при +50°, и через определенные промежутки времени, отмечаемые по секундомеру, брались пробы на предметные кварцевые стеклышки и окрашивались 0,02 *н* J_2 в KJ. В течение первых 10 мин. пробы брались через каждые 30 сек., а затем через 1 мин.

Такие окрашенные коацерватные капельки фотографировались при помощи МУФ-2 и хромоскопа на цветную пленку. На рис. 1 на первом

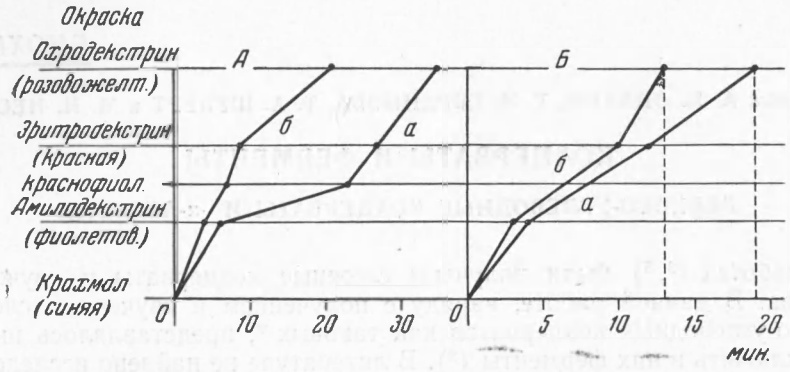


Рис. 2. Скорость распада крахмала под действием α-амилазы. *А*: *а* — α-амилаза + коацерват, pH 7,0; *б* — α-амилаза + растворимый крахмал и вода, pH 7,1. *Б*: *а* — α-амилаза + смесь (желатина + протамин + растворимый крахмал), pH 5,5; *б* — α-амалаза + растворимый крахмал и вода, pH 5,2

снимке представлены коацерваты, содержащие крахмал, на втором снимке — коацерваты, в которых крахмал распался до стадии амилодекстринов, на третьем — до эритродекстринов и на четвертом — до стадии, приближающейся к ахродекстринам.

Одновременно были проведены контрольные определения с инактивированной кипячением α-амилазой. Окраска коацерватных капель в этом случае была сине-фиолетовой и не менялась в течение всего времени опыта.

Параллельно было проверено действие α-амилазы на растворимый крахмал как таковой. При постановке этих опытов для сохранения объемных отношений, существующих в коацервате, вместо растворов желатины и протамина было взято соответствующее количество воды (см. рис. 2 *А*, кривая *б*).

Из сравнения кривых *а* и *б* на рис. 2 *А* следует, что в коацерватах крахмал распадается дольше, чем в обычном растворе.

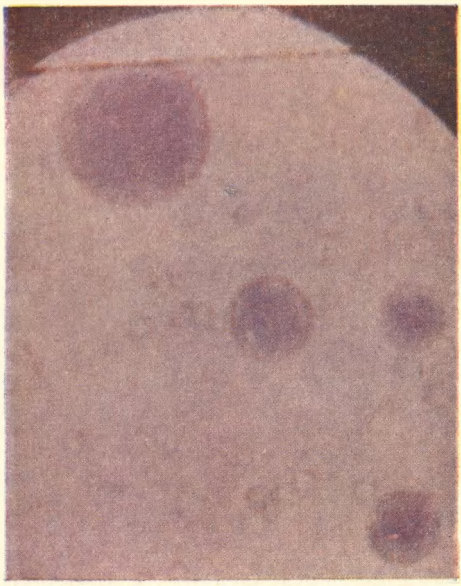
Возможно, что сами компоненты коацервата — желатина и протамин — снижают активность фермента. Проверить действие фермента на растворимый крахмал в присутствии растворов желатины и протамина при pH 7,0, к сожалению, невозможно, так как при этом pH наступает образование коацерватных капель. Поэтому количественно определить скорость распада растворимого крахмала при участии α-амилазы в коацерватах и в обычных растворах при одном и том же pH не удалось. Однако для проверки этого предположения была определена активность α-амилазы в смеси, состоящей из тех же растворов и в том же отношении, как при изучении активности α-амилазы в коацерватах, но при pH 5,2—5,5 и в чистом растворе растворимого крахмала. При указанном pH коацерваты не образуются, активность же препарата α-амилазы выше, чем при pH 7,0. Результаты опытов представлены на кривых *а* и *б* рис. 2 *Б*.

Из этих данных следует, что желатина и протамин замедляют распад крахмала при pH 5,2—5,5.

В коацерватных каплях желатина и протамин сконцентрированы. Вязкость таких капель гораздо выше, чем в простой смеси растворов желати-



1



2



3



4

Рис. 1

ны и протамина. Следовательно, вполне возможно в данном случае увеличение адсорбционной способности капель и уменьшение скорости передвижения в них веществ; и ферментативные процессы (в частности, распад крахмала) в коацерватных каплях также идут медленнее, чем в обычных растворах. Настоящая работа является первой попыткой усложнения коацерватов путем включения в них ферментов и изучения их действия в таких системах.

Поступило
17 V 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Н. С. Александровская, Тр. Лаб. по изучению белка. Сборн. под ред. С. С. Перова, М., Изд. АН СССР, 1940, стр. 30. [2] М. А. Лисицын, Н. С. Александровская, там же, стр. 97. [3] Т. Н. Евреинова, Усп. совр. биол., **37**, 177 (1954). [4] А. И. Опарин, Возникновение жизни на Земле, Изд. АН СССР, 1941. [5] А. И. Опарин, Журн. общ. биол., **12**, 6 (1951). [6] A. Kossel, Protamine u. Histone, 1929. [7] A. Kossel, Zs. f. physiol. Chem., **22**, 177 (1896). [8] A. Kossel, Biochem. Handlexikon, **4**, 164 (1911).