Доклады Академии наук СССР
1955. Том 102, № 5

*БИОХИМИЯ*

Н. И. ПРОСКУРЯКОВ и С. А. НИКИФОРОВСКАЯ

# ОБ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗ В ПРОЦЕССАХ СОЗРЕВАНИЯ И ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ

*(Представлено академиком А. И. Опариным 1 III 1955)*

В процессе прорастания зерна многие ферменты, в том числе и амилолитические, становятся более активными (1), однако истинная причина этого явления остается неполностью выясненной. Неизвестно, например, заново ли образуется α-амилаза при прорастании семян или она превращается из недеятельного зимогенного состояния в активное под влиянием каких-то невыясненных факторов. То же можно сказать и в отношении усиления осахаривающего действия β-амилазы в процессе прорастания. Все еще отсутствуют работы по изучению аминокислотного состава высокоочищенных препаратов амилаз, и желательно более полное выявление тех специфических группировок, с которыми связана ферментативная активность амилаз.

Задачей настоящей работы являлось выделение очищенных препаратов α- и β-амилаз при созревании и прорастании семян пшеницы и отыскание возможных связей между активностью этих препаратов и содержанием в них реакционноспособных групп. Известно, что система SH- и SS-групп цистеина и цистина в белковой молекуле считается весьма подвижной и легко вступающей в различные реакции. Ранее было показано (2), что в препаратах амилаз зернового происхождения присутствуют сульфгидрильные группы, с наличием которых в молекулах этих ферментов может быть связана их активность.

В живой клетке ферменты присутствуют в виде сложных комплексов с другими существенно важными соединениями, в первую очередь с липоидами и углеводами. Возможно, что максимальная активность ферментов создается при образовании какого-то определенного комплекса (3). Однако для поставленной нами задачи целесообразнее было испытывать выделенные и очищенные при помощи современных методов препараты амилаз, а не только простые вытяжки, с которыми и ранее ставились многочисленные исследования.

В качестве исходного материала была взята яровая пшеница Москвка урожая 1953 г. Зерно собиралось в различных стадиях зрелости, начиная с молочной, при влажности 51,2%. Из срезанных колосьев, быстро помещенных в холодильник, выбирались семена, которые сначала высушивались феном, затем при 36—38° в термостате. С тех же делянок в сентябре были получены созревшие семена с влажностью 12,0%, подвергавшиеся затем проращиванию в темноте и аналогичному высушиванию.

Для получения препаратов α- и β-амилаз обработка тонко измельченного материала каждой стадии созревания и прорастания велась следующим образом. Мука экстрагировалась дестиллированной водой при соотношении 1 : 5 в течение 1 часа при 30° и смесь центрифугировалась. Прозрачный раствор делился на 2 части, каждая из которых служила для выделения препаратов α- и β-амилаз. Разделение ферментов велось по методике Мейера, Фишера и Пиге (4) с применением фракционированного осаждения вытяжек ацетоном различной концентрации на холоду,

с небольшими изменениями. Всего было получено 4 препарата α-амилазы и 8 препаратов β-амилазы. Препараты представляли собой легкие, слабо окрашенные порошки, весьма стойкие при хранении. Они были частично загрязнены сульфатом аммония, количество которого было установлено по методу Конвей. Содержание белкового азота в препаратах β-амилазы было довольно постоянным, в среднем около 9%, и α-амилазы около 8%.

Во всех препаратах была определена обычным путем осахаривающая активность, а в препаратах α-амилазы — декстринирующая способность по Бернфельд и Фульду ([5]) и по методу Пронина ([6]). Осахаривание проводилось на 2% растворимом крахмале при pH 5,6 в течение 15 мин. при 40° в присутствии 0,04 мг препарата β-амилазы и 0,32 мг препарата α-амилазы. Опыты и контроль ставились в двойной или тройной повторности.

Таблица 1

Осахаривающая активность ферментативных препаратов в мл 0,1 *н* $KMnO_4$ за 15 мин. при 40°

| Стадии | Препарат α-амилазы | Препарат β-амилазы |
|---|---|---|
| Молочная спелость . . . . . | 2,1 | 4,3 |
| Средняя восковая спелость . . . | — | 3,8 |
| Поздняя „ „ . . . | — | 4,3 |
| Нормальное зерно . . . . . | — | 4,55 |
| 1-й день прорастания . . . | — | 4,05 |
| 2-й „ „ . . . . | 2,6 | 3,6 |
| 3-й „ „ . . . . | 4,6 | 4,7 |
| 4-й „ „ . . . . | 4,9 | 5,8 |

Из табл. 1 видно, что осахаривающая активность препаратов β-амилазы при созревании и прорастании не оставалась неизменной, снижаясь в первые дни прорастания и увеличиваясь в дальнейшем, что согласуется с данными Люэрса ([7]), полученными им при определении действия вытяжек из ячменного солода. Осахаривающая активность препаратов α-амилазы неизменно увеличивалась по мере прорастания. Декстринирующая активность в препаратах α-амилазы учитывалась в большинстве случаев по Бернфильду и Фульду. Опыты ставились с 5 мл 1% растворимого крахмала при pH 5,3 в течение 180 сек, при 40° с различными количествами препарата — от 0,05 до 2,00 мг, причем отмечалось количество фермента в миллиграммах, вызывавшее появление явно фиолетового оттенка при добавлении иода.

Табл. 2 показывает, что декстринирующая активность препаратов α-амилазы чрезвычайно возрастала по мере прорастания зерна. Примерно та же картина наблюдалась и при применении методики Пронина.

Таблица 2

Декстринирующая активность препаратов α-амилазы

| Стадии | Колич. препарата в мг, дающее фиолетовую окраску |
|---|---|
| Молочная спелость . . . | 1,0—2,0 |
| 2-й день прорастания | 0,825—1,65 |
| 3-й „ „ | 0,125—0,25 |
| 4-й „ „ | 0,05—0,10 |

Кроме того, были поставлены определения суммарной осахаривающей активности вытяжек из того же зерна, которые приготовлялись путем настаивания с водой (1 : 50) при 30° в течение 1 часа. Полученные при этом данные свидетельствовали о закономерном возрастании осахаривания в процессе прорастания; при созревании же в изменении активности амилаз наблюдались колебания, что отмечалось в свое время в работах А. Н. Баха и А. И. Опарина ([1]).

В связи с тем, что в препаратах обоих ферментов присутствовали SH-группы ([2]), представлялось интересным проследить за изменением в препаратах этих групп для сопоставления полученных результатов с данными о непосредственном амилолитическом действии.

Методика, применявшаяся для определения «фиксированных» SH-групп в препаратах, основана на восстановлении цистина в цистеин и на определении последнего фотоколориметрическим путем ([8]).

Данные по содержанию SH-групп в препаратах амилаз приведены в табл. 3 в пересчете на цистеин, причем для определения бралось по 50 мг препарата и по 100 мг цистина, проверенного на чистоту. Эти данные показывают, что содержание SH-групп в процессе прорастания семян у обоих препаратов амилаз резко возрастало, причем в препарате α-амилазы более интенсивно.

Таблица 3

Содержание цистеина в препаратах α- и β-амилаз в %

| Стадии | Препарат α-амилазы | Препарат β-амилазы |
|---|---|---|
| Молочная спелость . . . . . | 0,58 | 0,57 |
| Средняя восковая спелость . . . | — | 0,47 |
| Поздняя „ „ . . . | — | 0,45 |
| Нормальное зерно . . . . . | — | 0,41 |
| 1-й день прорастания . . . . | — | 0,57 |
| 2-й „ „ . . . . | 0,73 | 0,68 |
| 3-й „ „ . . . . | 1,04 | 0,72 |
| 4-й „ „ . . . . | 1,30 | 0,87 |

Между активностью обоих амилолитических препаратов, выделенных из прорастающего зерна, и содержанием в них SH-групп наблюдалась довольно близкая корреляция. Это является подтверждением взгляда о том, что при прорастании семян могут активироваться соответствующие ферменты сульфгидрильного типа, в данном случае амилолитические, за счет образующихся свободных и, по всей вероятности, также и связанных тиоловых соединений.

Данные аналогичного характера, но несколько менее четкие, были получены и по иодометрическому титрованию SH-групп в препаратах амилаз, растворенных в концентрированном растворе мочевины при подкислении. Иодометрическая методика определения SH-групп не является такой специфичной, как предыдущая, что и сказалось, естественно, на результатах титрования.

Основываясь на полученных данных, можно считать, что одной из главных причин колебаний активности амилаз, выделенных из зерна пшеницы различных стадий созревания и прорастания, является изменение содержания в этих препаратах SH-групп, определяющих собой ту или иную степень активации указанных ферментов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
21 II 1955

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. Н. Бах, А. И. Опарин, Р. А. Венер, Тр. Хим. инст. им. Л. Карпова, **5**, 62 (1926). [2] Н. И. Проскуряков, В. Я. Воронкова, Е. С. Михайлова, ДАН, **59**, 1465 (1948); Н. И. Проскуряков, А. А. Полянская, ДАН, **61**, 487 (1948). [3] А. И. Опарин, Усп. хим., **3**, 200 (1934). [4] K. Meyer, E. Fischer, A. Piguet, Helv. Chim. Acta, **34**, 316 (1951). [5] P. Bernfeld, M. Fuld, Helv. Chim. Acta, **31**, 1420 (1948). [6] С. И. Пронин, Биохимия зерна, сборн. 1, Изд. АН СССР, 1951, стр. 125. [7] H. A. Lüers, Wochenschr. f. Brauerei, **32**, 249 (1935). [8] E. Bamann, K. Myrbäck, Die Methoden d. Fermentforschung, **1**, 1941, S. 429.