Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 6

БИОХИМИЯ

Академик А. И. ОПАРИН, М. С. БАРДИНСКАЯ и К. Б. ПЯТИКРЕСТОВСКАЯ

СИНТЕЗ β-АЛКИЛФРУКТОЗИДОВ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ТКАНЯМИ

В ряде исследований было установлено, что препараты инвертазы дрожжей и плесеней ([1–7]) обладают способностью к синтезу различных β-алкилфруктофуранозидов при действии на раствор сахарозы в присутствии различных спиртов. Было установлено, что дрожжевая инвертаза, весьма тщательно очищенная от сопутствующих веществ, как с помощью адсорбентов, так и электрофоретически, способна при действии на растворы сахарозы в водной среде синтезировать олигосахариды ([4]); в водноспиртовой — β-алкилфруктозиды ([5]). Было также обнаружено, что в некоторых случаях может наблюдаться при действии дрожжевой инвертазы на сахарозу в водноспиртовой среде одновременное образование олигосахаридов и алкилфруктозидов. Такое явление наблюдалось, в частности, при исследовании энзимагической активности у препаратов из Penicillum spinulosum ([3]). Необходимо отметить, что вопрос о механизме действия инвертазы еще не может считаться полностью решенным. Еще мало изучен, в частности, вопрос о механизме действия инвертазы высших растений.

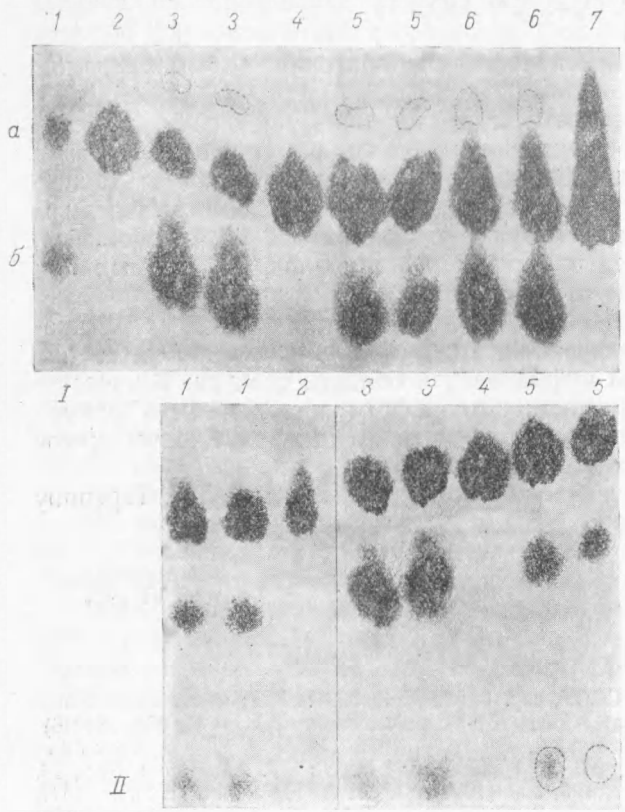


Рис. 1. *I* — гидролиз сахарозы в водной среде (pH 4,7 $t = 30°$) суспензиями листовых почек. *1* — смесь сахаров: сахароза + фруктоза, *2*, *4*, *7* — фермент инактивирован кипячением, *3* — рябина, *5* — черная смородина, *6* — береза. *а* — сахароза; *б* — фруктоза. *II* — синтез β-метилфруктозида суспензиями листовых почек. *1* — береза, *3* — рябина, *5* — черная смородина, *2—4* — кипяченая суспензия. *а* — сахароза; *б* — фруктоза; *в* — β-метилфруктозид

В настоящем сообщении мы приводим некоторые экспериментальные данные о синтезе β-алкилфруктофуранозидов суспензиями растительных тканей и препаратами дрожжевой инвертазы. В одном из предыдущих сообщений ([7]) было показано, что при действии экстракта из

листьев георгины на водноспиртовый раствор сахарозы удалось наряду с продуктами гидролиза фруктозой и глюкозой наблюдать образование β-этилфруктофуранозида. Местоположение этого вещества на хроматограмме отвечало местоположению β-этилфруктозида, полученного при действии инвертазы дрожжей.

В данном исследовании в качестве источника фермента служили листовые почки различных растений (березы, черной смородины, бузины, рябины, сирени), собранные в период март—май.

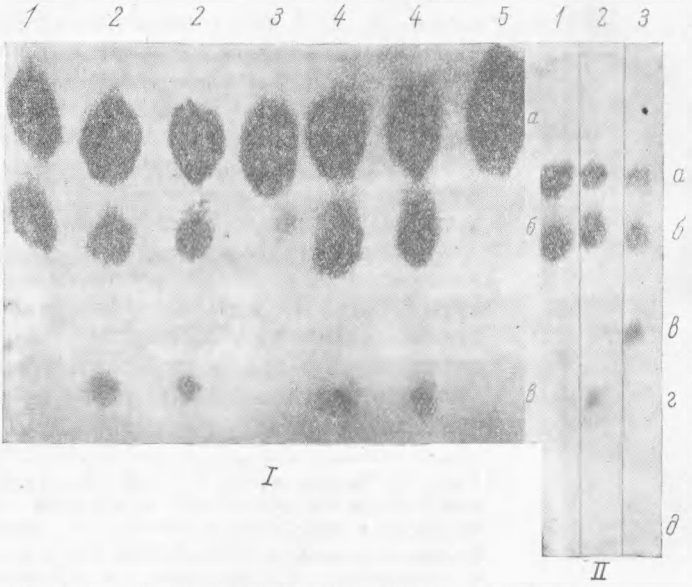


Рис. 2. *I* — энзиматический синтез β-метилфруктозида суспензиями растительных тканей. *1* — смесь сахаров: сахароза + фруктоза, *2* — почки березы (май), *4* — молодые побеги березы (май), *3,5*— контроль с кипяченой суспензией. *II* — энзиматический синтез β-алкилфруктозидов дрожжевой инвертазой. *1* — *n*-бутиловый спирт, *2* — этиловый спирт, *3* — метиловый спирт. *а* — сахароза; *б* — фруктоза; *в* — β-метилфруктозид; *г* — β-этилфруктозид; *д* — β-бутилфруктозид

Как известно, в почках в период развертывания листочков резко возрастает активность различных ферментов ([8]). Навеска (0,5—1 г) свежесобранного материала растиралась на холоду, в ступке с 7 мл дважды перегнанной воды. К полученной суспензии прибавлялось 2 г сахарозы, 2 мл метилового спирта и 0,6 мл ацетатного буфера (pH 4,7). Контролем служила смесь с кипяченым ферментом.

Пробы инкубировались при 30° в присутствии толуола в течение 2—4 час. Продукты реакции исследовались хроматографически ([3]). Исследования показали, что в почках инвертаза весьма активна; в водном растворе идет интенсивно распад сахарозы; в водоспиртовом наблюдается синтез β-метилфруктозида, соответствующего по величине R_f β-метилфруктозиду, синтезированному при действии дрожжевой инвертазы. Интенсивно идет синтез β-алкилфруктозидов распускающимися почками (см. рис. 1, *II*).

Особенно активен фермент в почках березы и рябины; в почках черной смородины активность инвертазы значительно слабее. Активная инвертаза обнаружена нами и в молодой древесине березы. Растертая ткань молодых побегов березы также синтезирует β-метилфруктозид (см. рис. 2, *I*). Проведенные исследования показали, что в почках указанных растений содержится инвертаза, способная, как у дрожжей и плесней, к синтезу β-алкилфруктозидов из сахарозы.

В 1952 г. Бейкон сообщил, что ему удалось при помощи дрожжевой инвертазы получить ряд β-алкилфруктозидов и в том числе с бензиловым спиртом. Так как в данном им предварительном сообщении не указывалось величин R_f и не было приведено хроматограмм, нами был проведен синтез некоторых β-алкилфруктозидов при действии дрожжевой инвертазы (0,1%) на сахарозу (10%) в присутствии различных спиртов (15—20% по объему). Опыты проводились при pH 4,7 и температуре 18—20°. Смесь в течение инкубирования (1, 2, 4 часа) непрерывно перемешивалась для равномерного эмульгирования спиртов, не смешивающихся с водой.

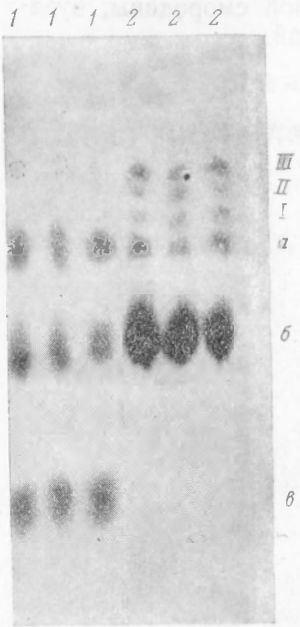


Рис. 3. Энзиматический синтез β-алкилфруктозида и олигосахаридов дрожжевой инвертазой. *1* — гидролиз сахарозы в присутствии метилового спирта, *2* — гидролиз сахарозы в присутствии *н*-октилового спирта. *а* — сахароза; *б* — фруктоза; *в* — β-метилфруктозид. *I, II, III* — олигосахариды

На рис. 2 представлено расположение на хроматограммах продуктов реакции, при инкубировании проб, содержащих дрожжевую инвертазу, сахарозу и некоторые спирты в течение 2 час. в указанных выше условиях.

Необходимо отметить, что в присутствии амилового спирта образуются за указанное время только следы β-фруктозида; в присутствии *н*-октилового спирта образование фруктозидов за данный промежуток времени наблюдать не удалось, хотя гидролиз проходит и наряду с фруктозой и глюкозой продукты реакции содержат олигосахариды (рис. 3). По данным Билинга ([2]) при действии инвертазы плесеней на сахарозу, в присутствии *н*-амилового спирта образование β-алкилфруктозидов не наблюдалось; это положение (трудность образования фруктозидов, с высшими спиртами), повидимому, справедливо и для инвертазы дрожжей. Сравнительные количественные определения β-метилфруктозида, β-этилфруктозида и β-бутилфруктозида, проведенные нами путем элюции пятен с хроматограмм и последующего фотометрирования продуктов реакции с дифениламином, резорцином или антроном показали, что наибольшее количество фруктозида образуется в присутствии метилового спирта (15% по объему).

Таблица 1

Спирты	R_f
Метиловый	0,4
Этиловый	0,51
н-Бутиловый . . .	0,78
н-Амиловый	0,81 (следы)
Бензиловый	0,79

Образование β-бензилфруктозида происходит аналогично β-бутилфруктозиду, и их величины R_f, как видно из табл. 1, близки.

Обращает внимание присутствие в реакционной смеси, содержащей спирты, наряду с соответствующими β-алкилфруктозидом, и небольшого количества олигосахарида, соответствующего по положению на хроматограмме олигосахариду *III* (рис. 3).

В тех же условиях опыта в пробах, содержащих водный раствор сахарозы, образуются три олигосахарида.

Как указано выше, при гидролизе сахарозы в присутствии *н*-октилового спирта нам не удалось обнаружить алкилфруктозид; вместе с тем в реакционной смеси содержатся все три олигосахарида (компоненты *I, II, III*, рис. 3, *2*).

Известно, что олигосахариды, образующиеся при действии дрожжевой инвертазы, могут быть разделены при определенных условиях на большее число компонентов ([9]). Поэтому вопрос о строении образующихся олигосахаридов требует дальнейшего изучения.

Таким образом, в настоящее время установлено, что в определенных условиях может быть осуществлен энзиматический синтез β-алкилфруктозидов ферментными препаратами из разных объектов.

Данные из литературы ([1], [2]) и полученные нами, суммированы в табл. 2.

Таблица 2

Энзиматический синтез β-алкилфруктозидов различными ферментными препаратами

Объект исследования	Спирты	β-алкилфруктозиды
Дрожжи	Метиловый	+
	Этиловый	+
	н-Пропиловый	+
	н-Бутиловый	+
	н-Амиловый	следы
	н-Октиловый	—
	Бензиловый	+
Плесени	Метиловый	+
	Этиловый	+
	н-Пропиловый	+
	н-Бутиловый	+
	Изопропиловый	—
	Бутиловый (вторичный)	—
	Бутиловый (третичный)	—
	Бензиловый	—
	н-Амиловый	—
Высшие растения	Метиловый	+
	Этиловый	+

Заключение

Изучался энзиматический синтез β-алкилфруктозидов препаратом дрожжевой инвертазы и суспензиями листовых почек некоторых древесных растений.

Установлено, что при действии суспензии растительных тканей на водноспиртовый раствор сахарозы образуются β-алкилфруктозиды, аналогично тому, как это происходит при действии дрожжевой инвертазы.

Поступило
18 VII 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Y. S. D. Bacon, Biochem. J., 50, № 3 (1952). [2] Y. Bealing, Biochem. J., 50, № 1 (1953). [3] А. И. Опарин, М. С. Бардинская, ДАН, 89, № 3 (1953). [4] H. Fischer, L. Kohtés, Helv. Chim. Acta, 34, 4, 1132 (1951). [5] А. И. Опарин, М. С. Бардинская, Изв. АН СССР, сер. биол., № 2 (1955). [6] А. И. Опарин, М. С. Бардинская, И. Е. Эльпинер, ДАН, 99, № 3 (1954). [7] А. И. Опарин, М. С. Бардинская, ДАН, 96, № 2 (1954). [8] А. Л. Курсанов, Planta, H. 1, 75 (1930). [9] Y. S. D. Bacon, Biochem. J., 57, No. 3 (1955).