

УДК 577.150

БИОХИМИЯ

М. С. УЛЬЯНОВА, Г. А. СОВОЛЕВА, М. А. БОКУЧАВА

О ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЕ КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ, ОБЕСЦВЕЧИВАЮЩЕЙ БЕТАНИН

(Представлено академиком А. И. Опариным 18 XII 1970)

Бетанин относится к группе красных азотсодержащих растительных пигментов пирроловой природы — бетацианинов⁽¹⁻³⁾. Физиологическая роль бетацианинов в настоящее время мало изучена. Не изучены также ферментные механизмы, участвующие в метаболизме этих соединений.

Нами была предпринята попытка обнаружить ферментную систему, атакующую бетацианины. Для исследования такого рода целесообразно было использовать растение, богатое бетацианинами. В связи с этим в качестве объекта нами была взята столовая свекла *Beta vulgaris* сорта «Бордо», корнеплоды которой содержат значительное количество бетанина.

Ферментный препарат получали из сока корнеплодов. Для этого вымытые и очищенные корнеплоды измельчали и из полученной массы отжимали сок. Сок в количестве 15 мл вносили в колонку из сефадекса Г-50 (грубый). Размеры колонки 260 × 21 мм. Элюцию проводили 0,0006 М фосфатным буфером при pH 6,98. В результате гельфильтрации было получено 20 мл белкового раствора, полностью освобожденного от бетанина. 1 мл белкового раствора содержал 1,3 мг белка. Полученная белковая фракция служила в работе ферментным препаратом. Субстратом при определении ферментативной активности служил лиофильно высушенный концентрат бетанина, который был выделен из корнеплодов свеклы⁽⁴⁾.

Для определения ферментативной активности необходимо было выбрать тест. В качестве теста использовали явление обесцвечивания растворов бетанина. В связи с этим о ферментативной активности судили по исчезновению характерной для бетанина красно-фиолетовой окраски в реакционной смеси. Так как бетанин поглощает в видимой области спектра при 538 мμ, интенсивность окраски растворов измеряли на фотоколориметре ФЭК-Н-57 со светофильтром №5 ($\lambda_{\max}$ 536 мμ) при толщине измеряемого слоя 3 мм и на спектрофотометре СФ-4 при $\lambda_{\max}$ 538 мμ.

Изучение ферментативных свойств свекольного сока проводили в смеси, состоящей из 1 мл белкового раствора (0,3 мг белка) и 1 мл 1-процентного раствора бетанина в 0,1 М цитратном буфере с pH 3,35. Контролем служила смесь из 1 мл такого же белкового раствора, предварительно выдержанного в кипящей водяной бане в течение 10 мин., и 1 мл 1-процентного раствора бетанина в 0,1 М цитратном буфере с pH 3,35.

Опытные и контрольные смеси инкубировали при 40°. Реакцию прекращали добавлением к смеси 0,5 мл 50-процентного раствора трихлоруксусной кислоты. Смесь выдерживали 30 мин. при +5°, выпавший при стоянии осадок отделяли центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин. В супернатанте определяли интенсивность окраски.

Результаты одного из опытов по ферментативному обесцвечиванию бетанина приведены ниже.

Вариант	Опыт	Контроль
<i>E</i> в начале опыта	0,19	0,19
<i>E</i> после 15 мин. инкубации	0,05	0,19

На основании полученных нами данных показано, что при добавлении ферментного препарата, выделенного из свекольного сока, к раствору бетанина интенсивность окраски раствора резко падает, в то время как интенсивность окраски контрольных растворов не изменяется. При полном исчезновении красной окраски в опытной смеси пропадает характерный для бетацианинов максимум поглощения про 538—545 м μ . Таким образом в корнеплодах столовой свеклы обнаружена ферментная система, обесцвечивающая бетанин.

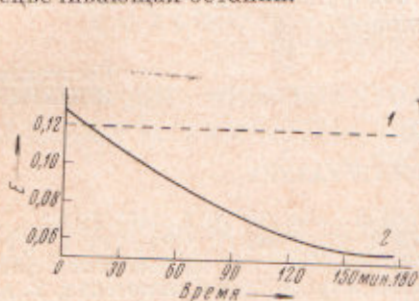


Рис. 1

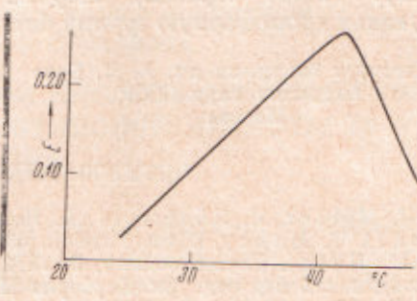


Рис. 2

Рис. 1. Протекание ферментативной реакции во времени. 1 — контроль, 2 — опыт

Рис. 2. Влияние температуры на ферментативную активность

Рис. 3. Влияние pH на ферментативную активность

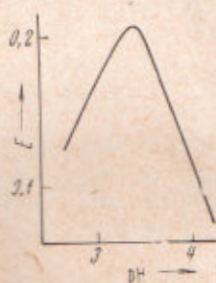


Рис. 3

В ходе исследований была определена зависимость активности этой ферментной системы от времени и температуры инкубации, а также от значения pH в реакционной среде.

При определении зависимости ферментативной активности от времени смесь, состоящую из белкового раствора и 0,5-процентного раствора бетанина, взятых в соотношении 1:1, инкубировали при 35°. В начале опыта и через каждые 30 мин. отбирали пробы по 2 мл, в которых после прекращения реакции и удаления осадка колориметрически определяли интенсивность окраски. На рис. 1 представлена кривая, характеризующая зависимость ферментативной активности от времени.

Для выяснения температурного оптимума ферментативной активности к 1 мл белкового раствора (0,25 мг белка) прибавляли 1 мл 1% раствора бетанина, приготовленного на 0,1 М цитратном буфере с pH 3,35. Растворы инкубировали в течение 15 мин. при разных температурах (от +20° до +55°). Установлено, что оптимум данной ферментативной активности находится при +42°. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Исследуя зависимость ферментативной активности от концентрации водородных ионов, к 1 мл белкового раствора (1,3 мг белка) прибавляли по 1 мл 1-процентных растворов бетанина, приготовленных на цитратных и фосфатных буферах со значениями pH от 2,4 до 9,18. Растворы инкубировали в течение 15 мин. Установлено, что максимум ферментативной активности лежит при pH 3,35—3,45. Полученные результаты приведены на рис. 3.

Проведенное исследование свидетельствует о том, что корнеплоды столовой свеклы содержат ферментную систему, обесцвечивающую бетанин. Оптимальными условиями для проявления ферментативной активности являются температура $+42^{\circ}$ и pH среды 3,35. На основании результатов спектрального анализа выяснено, что обнаруженная ферментативная активность не сводится к гликозидазному действию и оказывает влияние на ту часть молекулы бетанина, которая ответственна за его окраску. Таким образом, впервые обнаружена ферментная система, атакующая хромофорную группу бетанина.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
18 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ U. Miller, H. Rösler et al., *Helv. chim. acta*, **51**, № 6, 1470 (1968). ² A. Wolpart, T. Mabry, *Plant Physiol.*, **43**, № 3, 457 (1968). ³ Piatelli Mario, Minall Huigi, *Phytochemistry*, **3**, № 2, 307 (1964). ⁴ В кн. Биохимия фенольных соединений под ред. Дж. Харборна М. 1968, стр. 101. ⁵ S. Aronoff, E. Aronoff, *Food Res.*, **13**, № 1, 59 (1948).