

УДК 577.154

ХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР Ю. А. ЖДАНОВ, Р. М. КЕССЛЕР

ИНГИБИРОВАНИЕ β -ГЛИКОЗИДАЗ МИНДАЛЯ СИНТЕТИЧЕСКИМИ С-ГЛИКОЗИДАМИ

Эмульсин, активный препарат миндаля, — известный источник различных гликозидазных активностей (¹). Исследователи (^{2, 3}) считают, что β -глюкозидаза и β -галактозидаза из этого источника являются одним и тем же ферментом. Было показано, что эмульсин расщепляет β -фукозиды (⁴), β -ксилозиды (⁵) и α -L-арабинозиды (^{6, 7}). Тем самым налицо отсутствие специфичности к конфигурации у C₄, C₅ для пентозидов и C₄, C₆ для гексозидов. Все перечисленные активности относят к одному и тому же ферменту на основании данных, полученных при использовании 1,4- и 1,5-лактонов соответствующих альдоновых кислот, температурной инактивации и различных методов очистки.

В настоящей работе исследовали β -галактозидазную, β -глюкозидазную, α -L-арабинозидазную и β -ксилозидазную активности сладкого миндаля с применением нового типа ингибиторов — синтетических С-гликозидов.

Материалы и методы. Источником фермента служил частично очищенный препарат зерен сладкого миндаля. Очистка включала получение ацетоновых порошков и высаливание белков экстракта (NH₄)₂SO₄ 35—70% насыщения. Осадок белка растворяли в 0,1 М фосфат-цитратном буфере pH 4,6 и освобождали от соли диализом. Полученный препарат содержал 28 мг на 1 мл белка. Количество белка определяли по методу Лоури с сотрудниками (⁸). Для изучения β -галактозидазной, β -ксилозидазной и α -L-арабинозидазной активностей исходный раствор белка разбавляли в отношении 1 : 70, для исследования β -глюкозидазной активности — 1 : 560. Исходная концентрация субстратов 10⁻² мол/л, ингибиторов — 4 · 10⁻² мол/л. Проба для определения ферментативной активности содержала 0,25 мл раствора белка, 0,1—0,75 мл субстрата, 0,5 мл ингибитора, 1 мл 0,1 М фосфат-цитратного буфера, pH 4,6 в конечном объеме 2,25 мл. Пробы инкубировали 20 мин. при 37°. Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл 0,2 М Na₂CO₃. Об активности судили по количеству *o*-нитрофенола, который определяли колориметрически при длине волны 440 мμ. Специфическая активность β -глюкозидазы, β -галактозидазы, β -ксилозидазы и α -L-арабинозидазы составляла соответственно 1,69; 0,206; 0,227; 0,229 μмол/мин на 1 мг белка (см. табл. 1).

Таблица 1
Специфичность β -гликозидаз сладкого миндаля

Энзиматические активности	Соотношение активностей	Оптималн. pH	K _M · 10 ⁻³ , мол/л	v _m , μмол/мин на 1 мг белка	K _i · (10 ⁻³ мол/л)			
					а	б	в	г
β -Глюкозидаза	8,1	5,0—5,5	4,93	10,0	2,75	5,02	21,3	59,2
α -L-арабинозидаза	1,1	4,4—4,7	5,06	1,25	4,73	5,92	11,8	17,8
β -Галактозидаза	1,0	4,4—4,7	8,9	2,0	5,55	6,84	8,9	14,8
β -Ксилозидаза	1,1	4,5—4,9	1,66	0,55	8,9	10,0	25,0	111,1

Примечание. Ингибиторы: а — С-п-НФ-D-глюкозид, б — С-п-НФ-L-арабинозид, в — С-п-НФ-галактозид, г — С-п-НФ-D-ксилозид. Концентрация ингибиторов 8,88 · 10⁻³ мол/л.

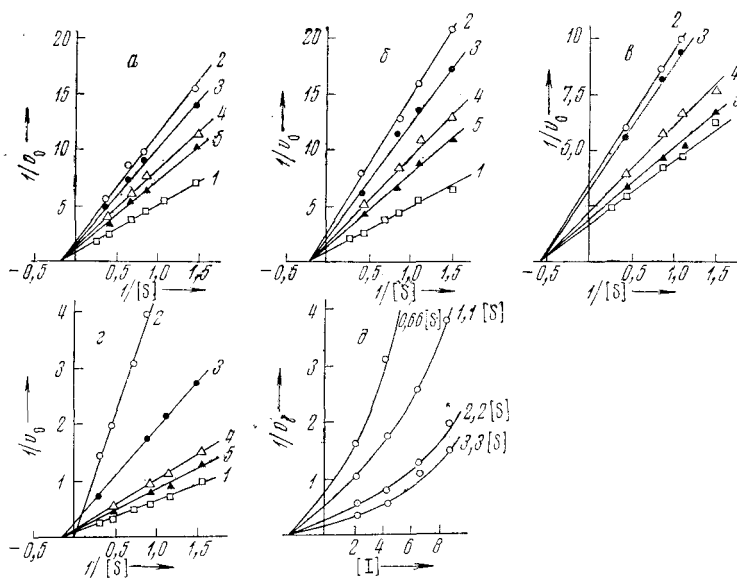


Рис. 1. С-*n*-НФ-гликозиды — ингибиторы β -D-галактозидазной (а), α -L-арабинозидазной (б), β -D-ксилозидазной (в), β -D-глюкозидазной (г, д) активностей. Концентрация субстратов *S*: 0,44; 0,66; 0,88; 1,1; 1,33; 2,22; 3,33 мол/л $\cdot 10^{-3}$. 1 — активность в отсутствие ингибиторов, 2 — в присутствии С-*n*-НФ-D-глюкопиранозида, 3 — С-*n*-НФ-L-арабинопиранозида, 4 — С-*n*-НФ-D-галактопиранозида, 5 — С-*n*-НФ-D-ксилопиранозида. Концентрация ингибиторов *I* для графиков (а, б, в, г) 8,88 мол/л $\cdot 10^{-3}$, для графика (д) 2,22; 4,44; 6,66; 8,88 мол/л $\cdot 10^{-3}$. *v* (μмол/мин на 1 мг белка) — скорость реакции

В качестве субстратов использовались синтезированные нами *o*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид, *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид⁽⁹⁾, *o*-нитрофенил- β -D-ксилопиранозид⁽¹⁰⁾, *o*-нитрофенил- α -L-арабинопиранозид⁽¹¹⁾, константы которых соответственно равны: т. пл. 145—147°, $[\alpha]_D^{25}$ —87° (*C* 1, 2, вода); 192—193°, $[\alpha]_D^{18}$ —50,3° (*C* 1, 0, вода); 168—170°, $[\alpha]_D^{22}$ —79,5° (*C* 1, 0, MeOH); 139—140°, $[\alpha]_D^{25}$ —48,7° (*C* 0,27, вода), — что согласуется с литературными данными.

Ингибиторы С-*n*-нитрофенил-D-глюкопиранозид, С-*n*-нитрофенил-L-арабинопиранозид, С-*n*-нитрофенил-D-галактопиранозид, С-*n*-нитрофенил-D-ксилопиранозид, синтезированы через соответствующие ацетогалогенозы сахаров^[12–16]. Два последних были получены впервые. После проведения Mg-органического синтеза и введения нитрогруппы в *n*-положение были получены: *n*-нитро-(2,3,4-три-*o*-ацетил-D-ксилопиранозил)-бензол, дающий после перекристаллизации из изопропанола бледно-желтые кристаллы с т. пл. 145—147° (выход 71%), и *n*-нитро-(2,3,4-три-*o*-ацетил-L-арабинопиранозил)-бензол, который представляет собой бледно-желтый сироп (выход 67%). Дезацетилирование проводилось в присутствии каталитических количеств *n*-толуолсульфокислоты⁽¹⁷⁾. После освобождения от катализатора переосаждением эфиром и очистки активированным углем продукты были получены в виде светло-желтых сиропов (выход 85—87%). Строение С-гликозидов доказано данными элементного анализа и деструктивным окислением щелочным перманганатом калия до *n*-нитробензойной кислоты. Хроматография на гипсе с растворителями этилацетат — хлороформ (4:1) показала однородность полученных продуктов.

Результаты. Использование синтетических С-*n*-НФ-гликозидов в качестве ингибиторов показало, что β -галактозидазная, α -L-арабинозидазная и β -ксилозидазная активности ингибируются ими по некооперентному

типу (рис. 1а, б, в), что позволяет сделать вывод о локализации ингибитора в фермент-ингибиторном комплексе вне активного центра. В случае β -глюкозидазной активности график зависимости $1/v_0$ от $1/S$ для всех испытанных С-гликозидов (за исключением С-глюкозида) также указывает на неконкурентный характер ингибирования (рис. 1г), С-п-НФ-*D*-глюкозид, исходя из данных этого графика, ведет себя как конкурентный ингибитор. Однако неконкурентное ингибирование с полным эффектом торможения иногда может выглядеть как конкурентное. График зависимости $1/v_i$ от I с использованием различных концентраций ингибитора, показывает, что ингибирование β -глюкозидазной активности С-глюкозидом в действительности является неконкурентным (рис. 1д). Полученные факты свидетельствуют о том, что характер углерод — углеродной связи С-производных является основным стерическим препятствием к связыванию углеводного компонента С-гликозидов с активным центром фермента. По эффективности ингибирующего действия на все четыре активности С-гликозиды располагаются в следующем ряду: С-п-НФ-глюкозид, С-п-НФ-арабинозид, С-п-НФ-галактозид, С-п-НФ-ксилозид. Это совпадение, по-видимому, не случайно и наводит на мысль, что все исследованные С-гликозиды действуют на один и тот же фермент, который, судя по последним сообщениям (^{18, 19}), обнаруживается в нескольких изоферментных формах.

Ростовский государственный
университет

Поступило
9 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. Helferich, T. Kleinschmidt, Hoppe-Seiler's Zs. Physiol. Chem., **340**, 31 (1965). ² R. Heyworth, R. G. Walker, Biochem. J., **83**, 331 (1962). ³ M. V. Kelemen, W. J. Whelan, Arch. Biochem. Biophys., **117**, 423 (1966). ⁴ J. Conchie, A. L. Gelman, G. A. Levvy, Biochem. J., **103**, 609 (1967). ⁵ D. J. Manners, J. P. Mitchell, Biochem. J., **103**, 651 (1967). ⁶ J. Conchie, A. L. Gelman, G. A. Levvy, Biochem. J., **106**, 135 (1968). ⁷ D. J. Manners, D. C. Taylor, Carbohydr. Res., **7**, 497 (1968). ⁸ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). ⁹ M. Seidmann, K. P. Link, J. Am. Chem. Soc., **72**, 4324 (1950). ¹⁰ F. G. Loontjens, C. K. De Bruyne, Naturwiss., **51**, 15, 359 (1964). ¹¹ J. Snyder, K. P. Link, J. Am. Chem. Soc., **74**, 1883 (1952). ¹² C. D. Hurd, W. A. Bonner, J. Am. Chem. Soc., **67**, 1972 (1945). ¹³ J. M. Craig, W. A. Bonner, J. Am. Chem. Soc., **72**, 4808 (1950). ¹⁴ Ю. А. Жданов, Л. И. Щербакова, Т. Н. Егорова, ДАН, **82**, 403 (1952). ¹⁵ Ю. А. Жданов, Г. В. Богданова, А. П. Чувилева, ДАН, **128**, 953 (1959). ¹⁶ Ю. А. Жданов, Г. А. Корольченко, Л. А. Кубасская, ДАН, **128**, 1185 (1959). ¹⁷ Ю. А. Жданов, Г. А. Корольченко, З. К. Канитанас, ЖОХ, (в печати). ¹⁸ G. Haenisch, T. Kleinschmidt, Hoppe-Seiler's Zs. Physiol. Chem., **351**, 10, 1283 (1970). ¹⁹ J. Schwartz, J. Sloan, Y. C. Lee, Arch. Biochem. Biophys., **137**, 122 (1970).