

В. В. ЮРКЕВИЧ, Н. С. КОВАЛЕВА

О САХАРОЗНОЙ И ИНУЛИНАЗНОЙ ФУНКЦИЯХ
АКТИВНОГО ЦЕНТРА β -ФРУКТОЗИДАЗЫ
ИЗ *KLUYVEROMYCES (SACCHAROMYCES) FRAGILIS*

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 30 III 1972)

Еще в 30 годы было высказано предположение ⁽¹⁾, что у дрожжевых организмов ферментом, участвующим в гидролизе инулина, является широко известная инвертаза (3.2.1.26) ⁽²⁾. Позднее был сделан вывод о том, что дрожжи могут иметь особый фермент гидролиза инулина — инулазу (3.2.1.7) ^(3, 4), что нашло отражение в классификации ферментов ⁽⁵⁾. К ферментам этого типа была отнесена β -фруктозидаза из *S. fragilis* ⁽⁶⁾.

Мы получили высокоочищенные препараты β -фруктозидаз из *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* и нашли, что каждый из изученных видов имеет только

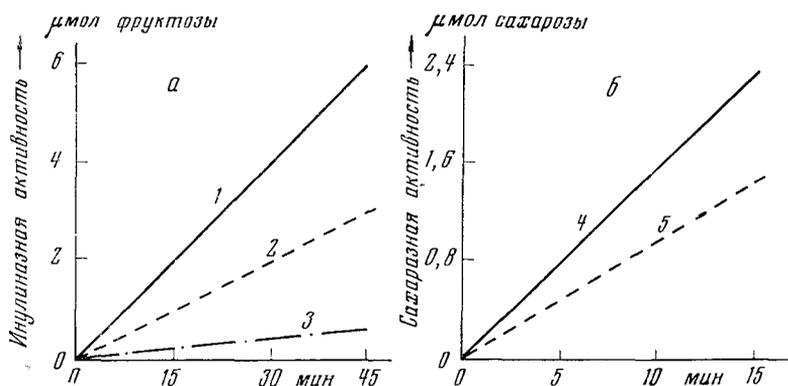


Рис. 1. Влияние сахарозы на гидролиз инулина (а) и инулина на гидролиз сахарозы (б) β -фруктозидазой. 1 — без сахарозы, 2 — с сахарозой (2,5%), 3 — с сахарозой (5%), 4 — без инулина, 5 — с инулином (3%)

одну β -фруктозидазу, обладающую способностью гидролизовать как сахарозу, так и инулин. На основании изучения свойств этих ферментов мы не считаем возможным выделять из β -фруктозидаз (3.2.1.26) дрожжевых организмов инулазу в качестве особого фермента ⁽⁷⁾.

Способность гидролизовать любой субстрат с β -фруктозидной связью не является очевидной особенностью каждой β -фруктозидазы. Описаны, например, сахараза из артишоков, неспособная гидролизовать инулин, и инулиназа из того же вида, не действующая на сахарозу ⁽⁸⁾. В настоящее время нет еще полного представления о структуре дрожжевых β -фруктозидаз, уровнях этой структуры и природе активных центров. Неизвестно также, с какими особенностями в молекулах этих ферментов связаны их сахарозная и инулиназная активности.

Настоящая работа посвящена выявлению сахарозной и инулиновой функций активного центра β -фруктозидазы из *Kluyveromyces fragilis*.

Работа проводилась с гомогенным препаратом β -фруктозидазы из *K. fragilis*. Препарат был получен по методу, сочетавшему ранее описанные методики (⁹, ¹⁰) и внесенные в ходе фракционирования модификации. Гомогенность препарата была доказана характером элюции β -фруктозидазной активности с колонки с ДЕАЕ-сефадексом, аналитическим ультрацентрифугированием и электрофорезом в полиакриламидном геле при

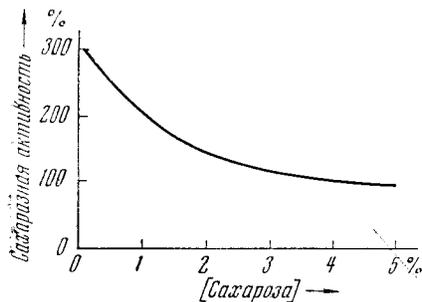


Рис. 2. Влияние различных концентраций сахаразы на активацию сахарозной реакции пиридоксином

различных значениях pH. Определение ферментативной активности проводилось при 30° в инкубационной среде следующего состава: 0,2 мл раствора сахаразы в 0,25 M ацетатном буфере, 0,2 мл раствора инулина в том же буфере и 0,1 мл раствора фермента. В опытах с одним субстратом брали 0,4 мл раствора субстрата и 0,1 мл раствора фермента. Ранее нами было показано, что оптимальная концентрация сахаразы для β -фруктозидазы из *K. fragilis* составляет 5%, а оптимальная концентрация инулина не достигается из-за плохой растворимости этого субстрата (максимально возможная концентрация инулина равняется 6,2%) (⁷). В разных опытах мы создавали различные концентрации как сахаразы, так и инулина. Оптимальные значения pH для гидролиза сахаразы и инулина этим ферментом составляют 4,1 и 5,0 соответственно (⁷). В опытах с одним субстратом создавалось оптимальное значение pH, а в опытах с двумя субстратами значение pH составляло 4,5. При измерении активности обеспечивалась оптимальная

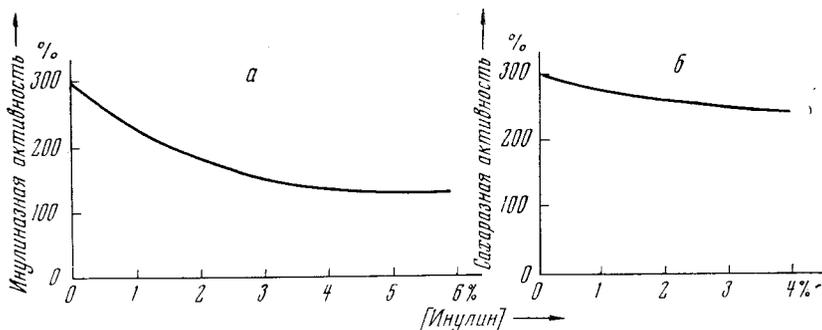


Рис. 3. Влияние различных концентраций инулина на активацию инулиновой (а) и сахарозной (б) пиридоксином

скорость реакции. Об активности фермента судили по нарастанию редуцирующей способности раствора, которая учитывалась двумя методами: для определения общей редуцирующей способности — методом с динитросалициловым реагентом (¹¹), а для отдельного определения продуктов гидролиза сахаразы и инулина в опытах с двумя субстратами проводилось определение количества образовавшейся глюкозы по методу с глюкозооксидазой (¹²). Белок определяли по Лоури (¹³).

Для выяснения вопроса о возможном совпадении центров инулиновой и сахарозной активности β -фруктозидазы были поставлены опыты по изучению кинетики гидролиза одного субстрата в присутствии другого. Результаты опытов показали, что при оптимальной концентрации сахаразы, обеспечивающей полное насыщение фермента субстратом, гидролиз инулина практически не идет. При неполном насыщении фермента саха-

розой гидролиз инулина протекает со скоростью более низкой, чем при отсутствии сахарозы в инкубационной смеси (рис. 1а). Наличие инулина в реакционной смеси снижает скорость гидролиза сахарозы (рис. 1б).

Далее были поставлены опыты с активированием β -фруктозидазной реакции. Мы нашли, что пиридоксин и пиридоксаль являются активаторами β -фруктозидаз из всех изученных нами 4 видов дрожжей. Однако по имеющимся литературным данным пиридоксаль и его аналоги ингибируют β -фруктозидазы из растений и не действуют на дрожжевые β -фруктозидазы (¹⁴).

Для выяснения характера активации инулиназной и сахарозной реакций пиридоксин изучался гидролиз инулина и сахарозы при их одновременном присутствии в инкубационной смеси с изменением концентрации одного из субстратов, а также гидролиз каждого субстрата при различных его концентрациях. Концентрация активатора во всех опытах была постоянной и составляла 10^{-3} мол/л. Во всех экспериментах проводилась предварительная инкубация фермента с активатором в течение 20–30 мин.

Показано, что пиридоксин и пиридоксаль одинаково повышают инулиназную и сахарозную активности фермента. Процент активации снижается при увеличении концентрации субстрата (рис. 2, 3а). Эффект активации сахарозной реакции при достижении насыщающей фермент концентрации сахарозы может быть полностью снят (рис. 2). Полное снятие эффекта активации инулиназной реакции не наблюдается, так как насыщающая фермент концентрация инулина достигнута не была (рис. 3а). При использовании двух субстратов повышение концентрации одного из них снижает активацию действия фермента на другой (рис. 3б, 4).

Приведенные данные показывают конкурентные отношения сахарозы и инулина при взаимодействии с β -фруктозидазой. Это указывает на участие одного и того же центра в молекуле фермента в превращении обоих субстратов и говорит о той или иной степени совпадения участков, связывающих эти субстраты. Предположение о разных активных центрах для превращения сахарозы и инулина, когда функционирование одного из центров ингибирует функцию другого, следует считать невероятным из-за явной биологической нецелесообразности такого строения фермента. Данные, полученные с использованием пиридоксина в качестве активатора β -фруктозидазы, показали, что это соединение является активатором сахарозной и инулиназной реакций и не меняет соотношения скоростей этих реакций, что еще раз подтверждает сделанный нами вывод. Вероятно, и каталитические группы, участвующие в гидролизе одной из β -фруктозидной связи в обоих субстратах, являются одними и теми же.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
16 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Weidenhagen, Fermentenforschung, **11**, 155 (1930). ² Номенклатура ферментов, Изд. АН СССР, 1966. ³ M. Adams, N. K. Richtmayer, C. S. Puddison, J. Am. Chem. Soc., **65**, 1369 (1943). ⁴ H. H. Schlubach, M. Grehn, J. Liebig's, Ann. Chem., **647**, 51 (1961). ⁵ Классификация и номенклатура ферментов, ИЛ, 1962. ⁶ H. E. Snyder, H. J. Phaff, Ant. Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol., **26**, 433 (1960). ⁷ В. В. Юркевич, Н. С. Ковалева, Научн. докл. высш. школы, № 6 (1972). ⁸ J. Edelmann, T. G. Jefford, Biochem. J., **93**, 148 (1964). ⁹ N. P. Neumann, J. O. Lampen, Biochem., **6**, 468 (1967). ¹⁰ B. Andersen. O. S. Jorgensen, Acta chem. scand., **23**, 7 (1969). ¹¹ A. D. Jamieson, Kenneth M. Pruitt, R. C. Caldwell, J. Dent. Res., **48**, 483 (1969). ¹² A. S. Keston. Abstr. Am. Chem. Soc. Meeting, Dallas, Apr., 1956, p. 310. ¹³ C. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). ¹⁴ R. Pressey, Biochim. et biophys. acta, **159**, 414 (1968).

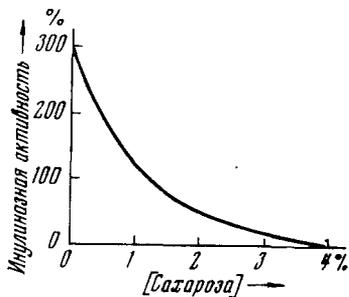


Рис. 4. Влияние различных концентраций сахарозы на активацию инулиназной реакции пиридоксинем