

Г. Т. АДУНЦ, Р. Р. НЕРСЕСЯН

ОБ АМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЖЕЛЧИ

В нашей предыдущей работе [1] отмечалось, что желчь куриного эмбриона является активатором амилазы слюны. Одновременно выяснилось, что желчь взрослых кур также обладает этим свойством. Изучая активирующее действие желчи у ряда животных на амилазу слюны, мы выяснили, что желчь кроликов, собак, коров, коз, уток и индеек не обладает свойством активировать амилазу. Помимо куриной желчи и желчи куриного эмбриона активирующим свойством обладает и овечья желчь.

Исследования, проведенные нами, показали, что активирующее свойство желчи куриного эмбриона и овцы в отношении амилазы слюны обусловлено наличием в ней амилазы (в желчи), т. е. повышение амилолитической активности слюны после добавления желчи вызывается не за счет повышения активности имеющейся в ней амилазы, а за счет поступления новой порции ее из желчи. Таким образом, предыдущими исследованиями выяснено, что у определенных видов животных (овцы, куры) желчь содержит амилазу.

Настоящая работа ставила цель изучить сравнительные особенности некоторых физико-химических свойств (особенно термоустойчивость) амилазы слюны и желчи.

Методика. Материалом для определения амилазной активности служила желчь кур, куриного эмбриона и овцы. У только что забитого животного отделялся желчный пузырь (по мере возможности в стерильных условиях). Предварительно проверялись амилолитические свойства желчи. После положительной реакции на крахмал, желчь помещалась в коллодиумный мешок и диализировалась в течение 24 ч. против дистиллированной воды, вращая его через определенные промежутки времени, со сменой дистиллированной воды. В некоторых случаях диализировалась под проточной дистиллированной водой. После диализа вновь проверялись амилолитические свойства желчи на крахмал и при всех условиях получалось резкое понижение активности.

Опыты ставились в фосфатных буферных средах с рН равными 5,91; 6,47; 6,81; 7,2; 7,73; 8,08. В качестве субстрата служил 1,2% водный раствор крахмала, а в качестве активатора 0,5 м раствор NaCl. Реакционная смесь состояла из следующих компонентов: 1 мл фермента (разбавление 1 : 50), 5 мл 1,2% крахмального раствора, 1 мл 0,5 м раствора NaCl. Смесь инкубировалась 20 мин. при 37°C. Активность амилазы определялась по методу Smith B., Roe J. [2].

Колориметрирование проводилось ФЭК-М1 при использовании красного фильтра.

Первая серия опытов состояла из семи проб: первая проба не подвергалась частичной температурной инактивации. Из разбавленной желчи (1 : 30) бралась по 0,5—1 мл и добавлялась к реакционной смеси, со всеми приведенными рН, и инкубировалась при 37° в течение 20 мин. После инкубации пробы помещались в лед и добавлялось по 2 мл 1N HCl для прекращения действия фермента; затем, после добавления иодного раствора, определялось количество оставшегося крахмала. Остальные шесть проб до инкубации подвергались температурной обработке при 45, 50, 55, 60, 65, 70° в течение 10 мин., после чего они немедленно переносились в ледяную баню. Затем, как и к первой пробе, прибавлялась реакционная смесь и пробирки инкубировались при температуре 37° в течение 20 мин.

В следующей серии опытов инкубация производилась в течение 20 мин. при температурах 45, 50, 55, 60, 65, 70° без предварительной температурной обработки.

Опыты проводились с диализированной амилазой слюны и желчью.

Полученные результаты и их обсуждение. Данные I серии опытов, где фермент предварительно нагревался 10 мин. при температуре 45, 50, 55, 60, 65, 70° и после моментального охлаждения инкубировался при 37° в течение 20 мин., приведены в табл. 1.

Таблица 1

Активность амилазы желчи овцы в зависимости от частичной термoinактивации

Активность амилазы желчи овцы при разных температурных инкубациях

Рн	1а					1б					
	При инкубации 37° в течение 20 мин					При инкубации 20 мин.					
	37	при инактивации 10 мин				37	45	50	55	60	65
		45	50	55	60						
5,91	30*	5	2	2	0,0	30	44	33	20	5	0,0
6,47	39	5	2	2	0,0	39	52	35	25	5	0,0
6,81	40	6	2	2	0,0	40	52	35	30	5	0,0
7,20	36	8	2	2	0,0	36	52	26	18	5	0,0
7,73	30	8	2	2	0,0	30	48	15	15	5	0,0
8,04	28	3	2	2	0,0	28	41	10	10	5	0,0

* Расщепленный крахмал в мг в течение 20 мин. инкубации, от 1 мл амилазы желчи, разбавленного 1 : 50.

При детальном изучении выяснилось, что амилаза желчи овцы действует интенсивнее при нейтральном рН (6,81), чем в кислой или щелочной среде. Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что разведенная амилаза желчи овцы при температуре 37° в течение 20 мин. активизируется. При предварительном же нагревании фермента при 45° в течение 10 мин. и в последующем инкубировали при 37° в течение 20 мин. с субстратом, ферментативная активность сильно подавлялась, доходя до 6 мг. Нагревание при 50° в течение 10 мин. также приводило к подавле-

нию ферментативной активности, которая равнялась двум мг. При температурной обработке 55° значительного изменения в активности фермента не происходило по сравнению с предыдущей. При 60° температурной обработке фермент полностью терял свои каталитические свойства.

Необходимо отметить, что когда желчная амилаза подвергается частичной температурной обработке при 50 и 55° в течение 10 мин., то в этом случае активность фермента, изученная при всех указанных pH, падает и равняется 2 мг. Большой интерес представляет изменение активности фермента после температурной обработки при 45° в течение 10 мин. Если активность фермента, подвергнутого температурной обработке и инкубированного при pH 6,81, примем за 100% (40 мг), то после нагревания при 45° в течение 10 мин. активность фермента резко понижается, доходя до 6 мг, т. е. по сравнению с первоначальной активностью составляет 15%. Таким образом, замечаем, что фермент теряет 85% активности от первоначальной. В табл. 1 показаны изменения активности фермента, инкубированного при различной температуре с разными pH. Когда фермент инкубируется при 45° в течение 20 мин., активность его заметно повышается (расщепляет 52 мг крахмала). Это повышение происходит не только при pH 6,8, но и при pH 6,47, 7,2.

Инкубация желчи овцы при 50, 55, 60° в течение 20 мин. характеризуется понижением активности фермента. При температурной обработке фермента выше 37° отмечается следующее: с одной стороны фермент как белок подвергается денатурации, с другой—отмечается усиление скорости ферментативной реакции на определенную величину (повышение температуры на 10° приводит к двухкратному усилению скорости ферментативной реакции).

Из табл. 1 видно, что при частичной температурной обработке фермента при 45° в течение 10 мин., он теряет свою активность по сравнению с первоначальной на 85%. Инкубирование фермента без предварительной температурной обработки при 45° повышает его активность на 30% от первоначальной. Несмотря на повышение активности во время инкубации при 45° в течение 20 мин. фермент частично инактивируется и дальнейшая активация оставшегося фермента происходит за счет повышения температуры.

Для того, чтобы охарактеризовать то или иное свойство амилазы желчи овцы, надо сравнить его с хорошо изученным ферментом, физико-химические свойства которого известны. Таковой является амилаза слюны человека, особенности которой в наших опытах явились как бы эталоном для сравнения с амилазой желчи овцы.

С амилазой слюны проделаны те же исследования, что и с амилазой желчи овцы, данные приведены в табл. 2. Оптимальным pH действия слюны является 6,81; при других pH (в сторону кислой или щелочной) значительно снижается активность фермента. При нагревании амилазы слюны в течение 10 мин. при 45 и 50° активность фермента понижается незначительно, или же не отмечается каких-нибудь изменений. Нагрева-

Таблица 2

Активность амилазы слюны человека
в зависимости от частичной термо-
инактивации

Активность амилазы слюны человека
при разных инкубационных
температурах

Рн	Инкубации при 37° в теч. 20 мин.					При инкубации 20 мин.						
	37°	при инактивации 10 мин.				37	45	50	55	60	65	70
		45°	50°	55°	60°							
5,91	19*	20	15	12	0,0	16	21	30	26	20	5	0,0
6,47	36	28	28	21	0,0	24	35	49	42	34	15	0,0
6,81	39	30	31	25	0,0	28	39	55	45	35	15	0,0
7,2	32	25	30	24	0,0	27	36	45	39	33	15	0,0
7,73	23	22	25	17	0,0	21	29	36	33	26	9	0,0
8,04	15	15	13	13	0,0	16	20	21	22	18	6	0,0

* Расщепленный крахмал в мл в течение 20 мин. инкубации, от 1 мл амилазы слюны, разбавленного 1:50.

ние при 55° дает понижение активности в 1,5 раза, а при 60° фермент подвергается полной инактивации.

Приведенные данные показывают, что амилаза слюны инактивируется меньше, нежели амилаза желчи овцы под действием температуры. Если амилаза желчи овцы при 50 и 55° почти всецело подвергается инактивации, то амилаза слюны, при тех же температурных воздействиях, сохраняет больше половины своей активности. Амилаза слюны человека подвергается полной инактивации только при 60°. Полученные данные свидетельствуют о большей термолабильности амилазы желчи овцы по сравнению со слюной.

Таким образом, возникает вопрос: почему амилаза желчи овцы термолабильнее амилазы слюны? Может быть термостабильность амилазы слюны обусловлена входящими в состав слюны компонентами, в присутствии которых фермент становится термостабильным, или же последнее зависит от определенных физико-химических свойств данного фермента.

Для выяснения этих вопросов были поставлены следующие опыты: из разбавленной желчи овцы и слюны человека бралось по 1 мл пробы и в обоих случаях определялась активность фермента без температурной обработки. Выяснилось, что после 20-минутной инкубации амилитическая активность желчи овцы доходит до 33 мг, слюны же—до 37 мг. После 10-минутной обработки при 45° активность желчной амилазы овцы резко понижалась (с 33 до 3,5 мг); активность же амилазы слюны после температурной обработки изменилась в незначительной степени (с 37 до 34 мг).

Следующим вариантом наших исследований явилось нагревание смеси обоих ферментов при 45° в течение 10 мин. с последующей инкубацией в течение 20 мин. при 37°. В этом случае суммарная активность

фермента равнялась 37 мг. Таким образом, видно, что сумма активности ферментов отдельно инкубированной желчи и слюны (37,5 мг) равняется суммарной активности этих ферментов, инкубированных вместе (37 мг).

Приведенные исследования свидетельствуют, что термостабильность слюнной амилазы по сравнению с желчной, по всей вероятности, обусловлена его индивидуальными особенностями, а не наличием каких-либо определенных веществ, предотвращающих денатурацию фермента при его нагревании. Существование таких веществ оказало бы свое тормозящее действие на денатурационный процесс желчной амилазы при смешанной инкубации слюны и желчи, что не подтвердилось в данной серии наших исследований.

Известно активирующее действие некоторых электролитов нейтральных солей, например NaCl, на ферментативное действие амилазы [3]. В то же время известно, что эти электролиты предотвращают денатурацию амилазы под действием температуры [4]. В связи с этим представляло интерес выяснение роли NaCl в процессах предотвращения инактивации слюнной и желчной амилазы. Результаты этих исследований приведены в табл. 3. Опыты были поставлены по следующей схеме: в два параллельных ряда, состоящих из шести пробирок, помещалось по 1 мл слюны человека и желчи овцы. Первые пробы не подвергались температурной обработке и инкубировались в нормальных условиях при 37° в течение 20 мин. Активность фермента этих проб принималась за 100% и служила фоном для сравнения активности фермента последующих проб. Вторые пробирки подвергались температурной обработке при 45° в течение 10 мин., третьи пробы подвергались такой же температурной обработке при предварительном прибавлении 1 мл 0,5 м раствора хлористого натрия; четвертые пробы подвергались такой же температурной обработке после добавления 1 мл 0,5 м раствора сернокислого натрия. В пятые пробирки добавлялось эквивалентное количество растворов хлористого и сернокислого натрия и обработка производилась в тех же температурных условиях. Наконец, шестые пробы не подвергались температурной обработке и инкубировались в нормальных условиях без добавления активатора (NaCl).

Данные, приведенные в табл. 3, показывают, что у диализированного фермента (амилазы слюны и желчи) не выявляются каталитические свойства по отношению к крахмалу при инкубации без NaCl (графа 6). Как было упомянуто выше, NaCl предотвращает денатурацию белка во время термоинактивации фермента.

Во второй графе приведены результаты опытов, где фермент также подвергался термоинактивации без NaCl. При этом замечалось резкое подавление ферментативной активности. Термоинактивация действует не в одинаковой степени на амилазу слюны и желчи: активность амилазы слюны подавляется на 28%, а амилазу желчи на 94% по сравнению с первоначальной активностью. Инактивация фермента с NaCl предотвращает денатурацию амилазы слюны на 23%, а амилазы желчи на 47% (графа 3), чего не замечается при инактивировании фермента с

Таблица 31

Зависимость денатурации амилазы слюны и желчи овцы от NaCl и Na₂SO₄

Ри	1		2		3		4		5		6	
	Инкубация 20 мин. при 37° фермент + буфер + крахмал		Инактивация фермента при 45° и течение 10 мин. без NaCl и инкубация 20 мин. при 37°		Инактивация фермента при 45° 10 мин. и инкубация 20 мин. при 37°		Инактивация фермента 10 мин. при 45° и инкубация 20 мин. при 37°		Инактивация фермента 10 мин. при 45° и инкубация 20 мин. при 37°		Инкубация фермента без инкубации 20 мин. при 37°	
	в мг	первоначальная активность в %	в мг	% соотношение от первоначальной	в мг	% соотношение от первоначальной	в мг	% соотношение от первоначальной	в мг	% соотношение от первоначальной	в мг	% соотношение от первоначальной

С л ю н н а я а м и л а з а

6,8	39	100	28	72	37	95	29	74	41	100	0,0	0
-----	----	-----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	---

А м и л а з а ж е л ч и о в ц ы

6,8	30	100	2	6	16	53	2	6	25	83	0,0	0
-----	----	-----	---	---	----	----	---	---	----	----	-----	---

Na₂SO₄; последняя не оказывала заметного действия на термонинактивацию. Активность сохраняется полностью при инаktivации фермента вместе с NaCl и Na₂SO₄ (графа 5).

В ы в о д ы

1. Желчь куриного эмбриона, цыплят и взрослых кур, а также и овца обладает амилалитической активностью.
2. Амилаза желчи овцы термолабильнее по сравнению с амилазой слюны.
3. NaCl, как фактор предотвращающий денатурацию фермента, больше проявляет это свойство в отношении желчной амилазы, чем слюнной.
4. Разное отношение к температурной денатурации этих ферментов, по-видимому, связано с их физико-химическими особенностями.

Сектор биохимии
АН АрмССР

Поступило 21.1 1961 г.

Г. Р. АДУНИ, Р. Р. НЕРСИСЯН

ԼԵՂՈՒ ԱՄԻԼԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Սույն ուսումնասիրությունից պարզվել է, որ հավի սաղմի լեղին սաղմի զարգացման տարրեր էտապներում օժտված է տարրեր ամիլոլիտիկ հատկություներով:

Ուսումնասիրվել են մի շարք կենդանիների (ճագար, շուն, կով, այծ, ոչխար, բադ, հնդկահավ) լեղիների ամիլոլիտիկ հատկությունները, պարզվել է, որ այդ կենդանիներից միայն ոչխարի լեղին է, որ օժտված է ամիլոլիտիկ հատկությամբ:

Ոչխարի լեղու ամիլոլազի մի քանի հատկությունները համեմատելով մարդու թրի ամիլազայի հետ, պարզվել է, որ ոչխարի լեղու ամիլազան թերմոլարիլ է, նստրի քլորի դենատուրացումը կանխող հատկությունը ավելի շատ արտահայտվում է ոչխարի լեղու նկատմամբ:

Ջերմային դենատուրացիայի նկատմամբ ոչխարի թրի ամիլազաների ունեցած վերաբերմունքը, բառ երևույթին, պայմանավորված է նրանց ֆիզիկոքիմիական հատկությունների տարբերությամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адунц Г. Т., Нерсисян Р. Р., Чалабян Г. А. Известия АН АрмССР, (биол. науки), т. XIII, 10, 1960.
2. Smith B. and Roe J. J. Biol. Chem., 179, 53, 1949.
3. Benfeld P. Advances in Enzymology, vol. 12, 397, 1951.
4. Под редакцией Г. Нейрата и К. Бэйли. Белки, т. 2 (иностр. лит.), М., 1959.