



УДК 547.458.61/611 + 577.154.1

ЗАВИСИМОСТЬ ИОДОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОТ ГЛУБИНЫ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ ПРИ ЭКЗО- И ЭНДОГИДРОЛИЗЕ

Вендецкий К. М., Павлова Е. С., Яровенко В. Л.

Всесоюзный научно-исследовательский институт продуктов брожения, Москва

Предложена модель, описывающая зависимость иодометрических характеристик полисахаридов (поглощение растворов комплексов с иодом) от значений среднечисленной степени их полимеризации. В основе модели лежит представление о пропорциональности между числом связываемых молекул иода и степенью полимеризации полисахаридной цепи. Исходя из наиболее вероятного распределения по длинам цепей, учитывали число цепей полисахарида, степень полимеризации которых превосходит значение нижнего предела для возможности комплексообразований с иодом, а также вклад «краевых» эффектов, связанных с тем, что концы таких цепей на некоторой своей длине не способны образовывать комплексы с иодом. Модель хорошо соответствовала экспериментальным данным при гидролизе амилозы и крахмала глюкамилазами, α -амилазами, не обладающими множественной атакой на полисахариды, и препаратами, содержащими α -амилазу и глюкамилазу. Представлены уравнения, позволяющие переводить текущие иодометрические характеристики в значения, отвечающие относительно количеству гликозидных связей полисахарида, расщепленных эндогидролазой.

Образование комплексов иода с полисахаридами, наиболее изученное на примере амилозы и линейных мальтодекстринов [1—4], характеризуется следующими особенностями. Молекулы иода входят внутрь спиральных участков молекул полисахарида и таким образом образуют окрашенные комплексы, в которых количество молекул иода строго соответствует длине спиральных участков. Но даже при оптимальных условиях спирализации и образования комплексов с иодом, зависящих от температуры и рН среды [5], в молекулах амилозы существуют неспирализованные участки на концах цепей, а у крупных молекул и внутри цепей [3]. Считая, что поглощение раствора комплекса с иодом прямо пропорционально количеству связанного иода [5], отмеченные выше условия можно выразить уравнением

$$\epsilon = k(n - m), \quad (1)$$

где $k = \text{const}$, ϵ — молярная экстинкция окраски полисахаридной цепи иодом, n — степень полимеризации цепи, m — общая длина неспирализованных участков; n и m — число ангидрогликозных единиц.

Зависимость (1) открывает возможность использовать текущие иодометрические характеристики полисахарида как удобную меру глубины и характера его гидролитического расщепления под действием полиглюканаза. Исследованию такой возможности посвящена настоящая работа.

1. *Гидролиз полисахарида экзогидролазой.* Экзогидролаза (глюкамилаза) отщепляет моносахаридные остатки от невозстанавливающихся концов полисахаридных цепей.

Для характеристики экспериментальных условий следует перейти от уравнения (1), описывающего одну цепь полисахарида, к уравнению, учитывающему концентрацию цепей полисахарида в растворе:

$$E_0 = k (n_0 s_0 - m s_0), \quad (2)$$

где E_0 — экстинкция окраски с иодом раствора полисахарида с молярной концентрацией цепей, s_0 , и среднечисленной степенью полимеризации, n_0 . К моменту времени t после начала действия глюкамилазы на субстрат среднечисленная степень полимеризации полисахарида уменьшится ($n_t < n_0$), а концентрация его цепей останется на начальном уровне ($s_t = s_0$). Последнее условие сохраняется почти до полного превращения полисахарида в глюкозу благодаря многоцепочечному механизму действия глюкамилазы [6]. Если общая концентрация цепей полисахарида, выраженная в молях составляющих их ангидроглюкозных остатков, перед началом гидролиза $n_0 s_0$, то после времени гидролиза $t - n_t s_t = n_0 s_0 - g_t$, где g_t — молярная концентрация свободной глюкозы, образовавшейся в результате экзогидролиза полисахарида к моменту времени t . Подстановка текущих значений соответствующих величин в уравнение (2) определяет зависимость

$$E_t = k s_t (n_t - m),$$

или

$$E_t = k (n_0 s_0 - m s_0 - g_t). \quad (3)$$

Однако условие $k = \text{const}$, благодаря которому осуществимы переход от уравнения (2) к уравнению (3), а также дальнейшие преобразования, может выполняться только при измерении значений поглощения растворов при длинах волн $\lambda_{0, \text{макс}}$ и $\lambda_{t, \text{макс}}$, отвечающих максимальным значениям соответствующих экстинкций [7] — $E_{0, \text{макс}}$ и $E_{t, \text{макс}}$. При действии экзогидролазы на полисахарид начальная область максимума спектра окраски с иодом по длине волны сохраняется весьма долго [8]: $\lambda_{t, \text{макс}} \approx \lambda_{0, \text{макс}}$. Это обстоятельство позволяет определять E_0 и E_t при одной длине волны (обычно в пределах 600—650 нм) и представлять результаты измерения как стехиометрически отражающие изменение концентрации связанного полисахаридом иода. Поэтому мы вправе считать, что из (2) и (3) следует

$$\frac{E_t}{E_0} = 1 - \frac{g_t}{n_0 s_0 - m s_0}, \quad (4)$$

где E_0 и E_t — экстинкции, измеренные при одной длине волны. Считая, что длина неспирализованных участков в цепях относительно невелика, т. е. что $m \ll n$, упрощаем уравнение (4):

$$\frac{E_t}{E_0} \approx 1 - \frac{g_t}{n_0 s_0}. \quad (4a)$$

На рис. 1 приведены экспериментальные данные по гидролизу амилозы и растворимого крахмала глюкамилазой, подтверждающие зависимость (4a).

2. *Гидролиз амилозы эндогидролазой.* Эндогидролаза расщепляет глюкозидные связи внутри цепей. Благодаря этому происходит одновременно и уменьшение степени полимеризации ($n_t < n_0$), и увеличение концентрации цепей полисахарида ($s_t > s_0$).

В условиях образования новых укороченных цепей влияние неспирализованных участков, а также малых цепей, не образующих спиралей, на связывание субстрата с иодом нельзя отразить на основе модели (2). Переход от уравнения (1) к уравнению, включающему концентрацию цепей полисахарида в растворе, в этих условиях возможен только с учетом молекулярновесового распределения (МВР) полисахарида.

Как правило, МВР амилозы отвечает наиболее вероятному распределению (НВР) [9, 10]. Поэтому существует некоторая часть цепей, не спо-

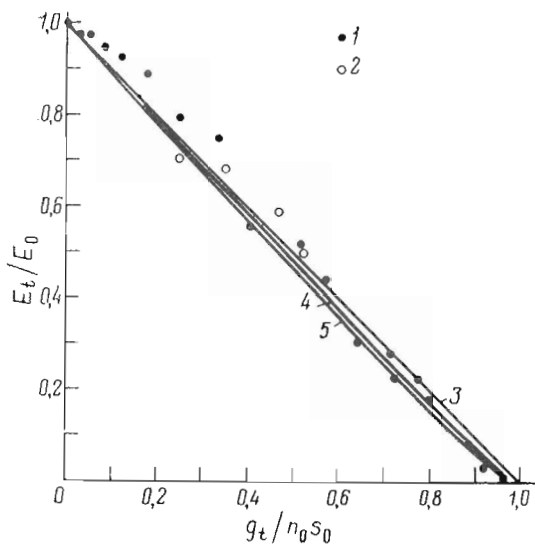


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость относительных значений экстинкции растворов полисахарида с иодом (E_t/E_0) от глубины превращения субстрата в глюкозу ($g_t/n_0 s_0$): 1, 2 — гидролиз глюкоамилазой из *Asp. awamori* амилозы и растворимого крахмала соответственно; 3 — прямая, соответствующая уравнению (4а); 4, 5 — кривые, рассчитанные согласно модели (11) для амилозы и растворимого крахмала соответственно

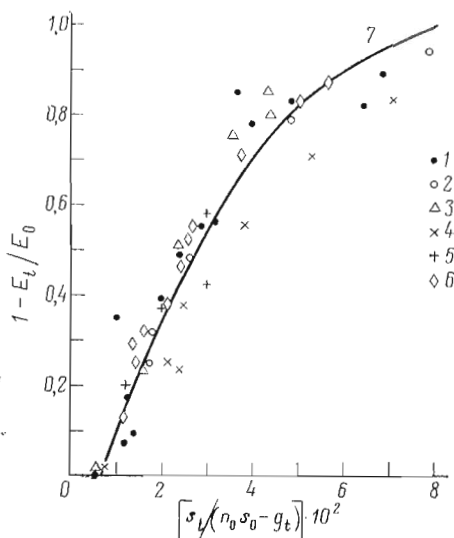


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость относительного изменения экстинкции растворов полисахаридов с иодом ($1 - E_t/E_0$ (λ 650 нм)) от глубины их превращения в продукты эндогидролиза, рассчитанной по данным измерения s_t и g_t : $s_t/(n_0 s_0 - g_t)$. Растворимый крахмал и его гидролизаты: 1 — серной кислотой; 2 — α -амилазой из *Bac. subtilis*; 3 — культурой из *Asp. batatae*; 4 — препаратом из *Asp. awamori*; 5 — препаратом из *Endomycopsis sp.* Амилоза и ее гидролизаты: 6 — α -амилазой из *Asp. batatae*. Кривая 7 рассчитана по уравнению (11а)

собная образовывать комплексы с иодом, так как их длина недостаточна для спирализации. В ряде работ отмечается, что предельная (наименьшая) степень полимеризации линейного олиглюкозида, способного давать комплекс с иодом, соответствует значению $n = 6-8$ [1, 3, 4]. Это значение отвечает величине витка спирали, выраженной числом ангидрогликозных единиц [1, 11]. Обозначим эту величину n_{lim} и тем самым отметим, что мальтоолигосахариды со степенью полимеризации ниже указанной ($n < n_{lim}$) не способны повышать поглощение растворов иода ни в УФ-, ни в видимой области спектра [4].

На основе приведенных соображений преобразуем уравнение (1) в уравнение для молярной концентрации цепей s_0 со среднечисленной степенью полимеризации n_0 и НВР:

$$E_{0, \text{ макс}} = kn_0 s_0 \int_{n_{lim}}^{\infty} \frac{n-m}{n_0^2} e^{-n/n_0} dn. \quad (5)$$

В уравнении (5) величина m может изменяться в зависимости от значения n , так как помимо длины неспирализованных участков на концах цепей она включает в себя длину неспирализованных участков внутри цепей. Согласно данным, приведенным в работе [3], число таких участков в амилозе тем меньше, чем ниже среднечисленная длина ее цепи (n_0), и уже при $n_0 \lesssim 100$ число неспирализованных внутренних участков в амилозе практически близко к нулю. Так как при эндогидролизе полисахаридов условие $n_i \lesssim 100$ достигается уже при относительно малой глубине превращения субстрата в продукт ($s_t/n_0 s_0 \lesssim 0,01$), мы можем пренебречь вли-

лияем внутренних неспирализованных участков больших цепей на величину m и считать, что $m = \text{const}$ независимо от n . Это условие позволяет преобразовать уравнение (5) в уравнение (6):

$$E_{0, \text{макс}} = kn_0s_0 [\exp(-n_{\text{lim}}/n_0)](1 + n_{\text{lim}}/n_0 - m/n_0). \quad (6)$$

В уравнениях (5) и (6) мы отразили также условие стехиометрического определения концентрации связанного полисахаридом иода [7]. Соблюдение этого условия, которое эквивалентно условию $k = \text{const}$, необходимо для перехода от уравнения (6) к уравнению, описывающему зависимость $E_{t, \text{макс}}$ от n_t . При совместном действии на амилозу глюкамилазы и α -амилазы к моменту времени t будем иметь следующие молярные концентрации продуктов: g_t глюкозы и s_t цепей со среднечисленной степенью полимеризации, n_t . Очевидно, что простейшим решением для описания зависимости $E_t(n_t)$ в наших условиях будет подстановка текущих значений соответствующих величин в уравнение (6):

$$E_{t, \text{макс}} = kn_t s_t [\exp(-n_{\text{lim}}/n_t)](1 + n_{\text{lim}}/n_t - m/n_t). \quad (7)$$

Так как текущая общая концентрация цепей, выраженная в молях составляющих их ангидроглюкозных остатков, $n_t s_t = n_0 s_0 - g_t$, то $n_t = (n_0 s_0 - g_t)/s_t$. Подставляя указанные значения в уравнение (7), получаем выражение для зависимости $E_t(s_t)$:

$$E_{t, \text{макс}} = k(n_0 s_0 - g_t) \{ \exp[-n_{\text{lim}} s_t / (n_0 s_0 - g_t)] [1 + n_{\text{lim}} s_t / (n_0 s_0 - g_t) - m s_t / (n_0 s_0 - g_t)] \}. \quad (8)$$

Однако необходимым условием для указанных преобразований должно быть сохранение НВР субстрата после совместного действия на него глюкамилазы и α -амилазы. Исследуемые нами α -амилазы, как чистые, так и в составе комплексных препаратов, содержащих кроме α -амилазы глюкамилазу, гидролизуют полисахариды тем же способом, что и кислота (рис. 2). Зависимость относительных изменений величин поглощения растворов полисахаридов с иодом $(1 - E_t/E_0)$ от глубины превращения субстратов под действием α -амилаз — $s_t / (n_0 s_0 - g_t)$ — практически одинакова во всех случаях. Это означает, что эндогидролиз полисахаридов использованными нами препаратами осуществляется аналогично кислотному гидролизу полисахаридов, а именно при помощи многоцепочечного механизма (беспорядочная деградация цепей полисахарида) [12], и на этот способ гидролиза не оказывает влияние присутствие глюкамилаз. Такой способ эндогидролиза приводит к сохранению первоначального НВР субстрата [10, 13]. Важно, что, по-видимому, существующие в амилопектиновом компоненте крахмала точки ветвления не создают особых условий эндогидролиза крахмала на первых стадиях его превращения (см. рис. 2).

Таким образом, можно полагать, что модель (6) — (8) пригодна для описания эндогидролиза амилозы α -амилазами, беспорядочно гидролизующими субстрат (без множественной атаки) как в отсутствие, так и в присутствии глюкамилаз. Из уравнений (6) — (8) следует

$$\frac{E_{t, \text{макс}}}{E_{0, \text{макс}}} = \left(1 - \frac{g_t}{n_0 s_0}\right) \left[\exp\left(\frac{n_{\text{lim}}}{n_0} - \frac{n_{\text{lim}}}{n_t}\right) \right] \cdot \frac{1 + n_{\text{lim}}/n_t - m/n_t}{1 + n_{\text{lim}}/n_0 - m/n_0}. \quad (9)$$

Для упрощения уравнения (9) принимаем, что величина m выражается целым числом значений n_{lim} ($m = l n_{\text{lim}}$). Экспериментальная проверка модели (9) при значениях $l = 0, 1, 2, 3, 4$ показала, что наилучшим образом адекватность модели эксперименту обеспечивается при значении $l = 2$. В этих условиях

$$\frac{E_{t, \text{макс}}}{E_{0, \text{макс}}} \cong \left(1 - \frac{g_t}{n_0 s_0}\right) \left(\frac{1 - n_{\text{lim}}/n_t}{1 - n_{\text{lim}}/n_0}\right)^2$$

или

$$\sqrt{\frac{E_{t, \text{макс}}}{E_{0, \text{макс}}(1 - g_t/n_0s_0)}} \cong \frac{1 - n_{\text{лим}}/n_t}{1 - n_{\text{лим}}/n_0} \quad (10)$$

Так как при совместном действии на полисахарид α -амилазы и глюкамилазы $n_t = (n_0s_0 - g_t) / s_t$, то

$$\sqrt{\frac{E_{t, \text{макс}}}{E_{0, \text{макс}}(1 - g_t/n_0s_0)}} \cong \left(1 - \frac{n_{\text{лим}}s_t}{n_0s_0 - g_t}\right) / \left(1 - \frac{n_{\text{лим}}}{n_0}\right). \quad (11)$$

Таким образом, согласно уравнению (11), в координатах $\sqrt{E_{t, \text{макс}}/E_{0, \text{макс}}(1 - g_t/n_0s_0)}$ от $s_t / (n_0s_0 - g_t)$ должна быть прямая линия, отсекающая на оси абсцисс значение $1/n_{\text{лим}}$, а на прямой $\sqrt{E_{t, \text{макс}}/E_{0, \text{макс}}(1 - g_t/n_0s_0)} = 1 - n_{\text{лим}}/n_0$.

На рис. 3 приведены совокупности экспериментальных точек, отвечающих зависимости $\sqrt{E_t/E_0}$ от s_t / n_0s_0 , наблюдаемой при действии α -амилазы на амилозы (для α -амилаз $g_t = 0$). ОП амилозы и ее гидролизатов, полученных действием α -амилазы из *Bacillus subtilis*, измеряли при $\lambda_{\text{макс}}$. Значения $E_{0, \text{макс}}$ и $E_{t, \text{макс}}$ определяли при различных начальных концентрациях амилозы, s_0 , и для различной глубины превращения, s_t / n_0s_0 , где значения s_t определены по приросту восстанавливающей способности инкубационной смеси (точки 1). Регрессионный анализ показал, что, несмотря на существенный разброс точек 1, они образуют прямую при высоком коэффициенте корреляции ($r = -0,937$). Кроме того, на указанную прямую регрессии (рис. 3,7) хорошо ложатся точки, рассчитанные нами ($E_{t, \text{макс}}/E_{0, \text{макс}}$ от s_t/n_0s_0) по данным опыта, где гидролиз амилозы осуществлялся при помощи кристаллической α -амилазы из *Aspergillus oryzae* (точки 4), и опыта, где гидролиз осуществлялся при помощи кристаллической α -амилазы из *Bac. subtilis* (точки 6). Указанные данные заимствованы из работы [14].

Значение $n_{\text{лим}}$, определяемое на рис. 3 прямой 7, хорошо соответствует известным из литературы [1, 3, 4] значениям наименьшей предельной степени полимеризации мальтоолигосахаридов, способного давать комплекс с иодом (табл. 1).

Следовательно, линейность в координатах рис. 3 и соответствие величин $n_{\text{лим}}$, вычисленной согласно модели (10) — (11) и истинной, отражает адекватность этой модели эксперименту.

Как показывают кривые рис. 1, рассчитанные, согласно модели (11) для условий $s_t = s_0$ (действие одной экзогидролазы) и значений $n_{\text{лим}}/n_0$, приведенных в табл. 1 (истинные значения $n_{\text{лим}}$ и n_0 для крахмала и амилозы), зависимости, рассчитанные таким образом (кривые 4, 5), мало отличаются от прямой, отвечающей уравнению (4). Более высокое положение

Таблица 1

Значения начальных степеней полимеризации (n_0), по полисахаридам и степени полимеризации мальтоолигоглюкозидов в ахронической точке ($n_{\text{лим}}$)

Субстрат	λ , нм	$n_0 \cdot 10^{-2}$		$n_{\text{лим}}$		$\frac{n_{\text{лим}}}{n_0}$
		согласно (11)	экспериментальное	согласно (11)	по данным [1, 3, 4]	
Амилоза	$\lambda_{\text{макс}}$	>2	5	$6,7 \pm 0,6$	6—8	0,012
»	620	2,6	5	10	6—8	0,012
»	650	2,6	5	13	6—8	0,012
Крахмал растворимый	650	$4,46 \pm 2,00$	4,7	$12,6 \pm 1,4$	6—8	0,035

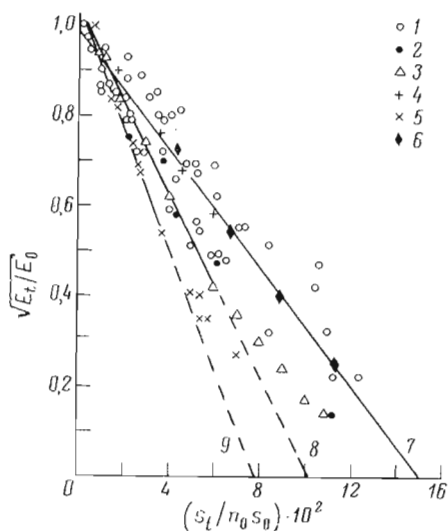


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость относительных величин поглощения растворов с иодом ($\sqrt{E_t/E_0}$) от глубины превращения амилозы в продукты эндогидролиза (s_t/n_0s_0): 1, 2 — гидролиз амилозы из картофеля α -амилазой из *Bac. subtilis*, поглощение измерено при $\lambda_{\text{макс}}$ (1) и 620 нм (2); 3, 4 — гидролиз амилозы из кукурузы α -амилазой из *Asp. oryzae* по данным работы [14], поглощение измерено при 610 нм (3) и $\lambda_{\text{макс}}$ (4); 5 — гидролиз амилозы из картофеля α -амилазой из *Asp. batatae*, поглощение измерено при 650 нм; 6 — гидролиз амилозы из кукурузы α -амилазой из *Bac. subtilis* по данным работы [14], поглощение измерено при $\lambda_{\text{макс}}$; 7 — линия регрессии, объединяющая точки 1 ($\lambda_{\text{макс}}$); 8, 9 — линии, объединяющие точки 2, 3 (λ 610—620 нм) и точки 5 (λ 650 нм) соответственно

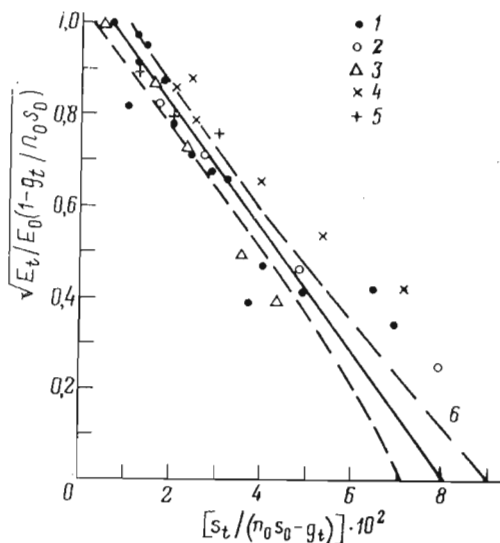


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость значений относительных величин поглощения растворов с иодом, $\sqrt{E_t/E_0 (1 - g_t/n_0s_0)}$ (λ 650 нм), растворимого крахмала от глубины его превращения в продукты эндогидролиза, $s_t/(n_0s_0 - g_t)$; 1 — гидролиз серной кислотой; 2 — гидролиз α -амилазой из *Bac. subtilis*; 3 — гидролиз культурой из *Asp. batatae*; 4 — гидролиз препаратом из *Asp. awamori*; 5 — гидролиз препаратом из *Endomycopsis sp.*; 6 — линия регрессии, составленная по всем точкам в области $0,39 \leq \sqrt{E_t/E_0 (1 - g/n_0s_0)} \leq 1,0$; пунктиром отмечена доверительная зона для средних значений $s_t/(n_0s_0 - g_t)$ (уровень значимости 5%)

экспериментальных точек в области $g_t/n_0s_0 \leq 0,5$ по сравнению с прямой 3 на рис. 1 можно объяснить множественной атакой глюкоамилазы на полисахарид на ранних этапах его превращения [6].

Важно отметить, что модель (11) формулирует значение величины отрезка, отсекаемого экспериментальной линией на оси абсцисс:

$$\left(\frac{g_t}{n_0s_0}\right)_{E_t/E_0=0} = 1 - \frac{n_{\text{lim}}}{n_0}$$

3. Гидролиз крахмала эндогидролазой. Пригодность модели, выраженной равенствами (5) — (11), для описания эндогидролиза разветвленных полисахаридов (амилопектина в крахмале) встречает принципиальные возражения: 1) представление о НВР субстрата, лежащее в основе модели, не соответствует действительному МВР амилопектина; 2) ветвление молекул амилопектина, по-видимому, определяет иные условия окраски его цепей с иодом, чем у цепей амилозы [5].

Тем не менее из рис. 2—4 можно видеть, что зависимости E_t/E_0 от $s_t/(n_0s_0 - g_t)$ для растворимого картофельного крахмала и для амилозы практически одинаковы. Вероятно, в основе наблюдаемого сходства отно-

сительных подомерических параметров амилозы и крахмала лежат следующие факторы.

На основании данных, приведенных в [5], можно показать, что в картофельном крахмале, содержащем 80% амилопектина и 20% амилозы, экстинкция окраски с иодом, определяемая при 650 нм, примерно на $\frac{2}{3}$ обязана взаимодействию с иодом амилозы и лишь на $\frac{1}{3}$ — взаимодействию с иодом амилопектина. Таким образом, основной сигнал в этих условиях идет от окрашенной амилозы и при использовании относительных значений поглощения растворов полисахарида с иодом, E_t/E_0 , по-видимому, происходит сглаживание реально существующих различий между амилозой и амилопектиновым компонентом крахмала, которые проявляются при сопоставлении их абсолютных подомерических характеристик. В частности, точки ветвления в амилопектине, вероятно, мало влияющие на способ действия α -амилаз на начальных этапах превращения субстрата, также до известной степени мало влияют на зависимость E_t/E_0 от глубины превращения субстрата при α -амилолизе.

Таким образом, экспериментальные данные подтверждают не только принципиальную обоснованность модели (5) — (11) для характеристики линейного полисахарида с НВР (амилозы), но и практическую применимость этой модели для описания эндогидролиза разветвленного полисахарида (амилопектина в крахмале) с МВР, возможно отличающимся от НВР.

Из рис. 3 видно, что на зависимость E_t/E_0 от s_t/n_0s_0 влияет длина волны, при которой определяется поглощение растворов полисахарида с иодом. Видимо, поэтому измерение экстинкции при одной длине волны приводит к некоторым искажениям, которые должны влиять на форму кривых

$$\sqrt{E_t/E_0(1 - g_t/n_0s_0)}(s_t/(n_0s_0 - g_t)).$$

Линейность графиков наблюдается лишь в области $0,4 \lesssim \sqrt{E_t/E_0(1 - g_t/n_0s_0)}$ (см. рис. 3 и 4, где приведены данные, полученные при фиксированных длинах волн — 610, 620 и 650 нм). Экстраполяция указанных прямых (8 и 9 на рис. 3 и 6 на рис. 4) до пересечения с осью абсцисс дает завышенные значения n_{lim} (см. табл. 1).

На рис. 2—4 даны результаты измерения поглощения растворов полисахаридов с иодом при 650 нм. Можно отметить некоторое отклонение экспериментальных точек 4 рис. 2, характеризующих препарат *Asp. awamori*, от общей совокупности точек. В координатах рис. 4 оно обнаруживается также и в раню проявляемой кривизне графика, который отвечает точкам 4. Вероятно, это указывает на слабовыраженный механизм множественной атаки у α -амилазы из *Asp. awamori* (показатель множественной атаки [15] = 1,2). Несмотря на это, мы использовали всю совокупность точек, находящихся в области $\sqrt{E_t/E_0(1 - g_t/n_0s_0)} \geq 0,39$ (рис. 4), для расчета прямой линии регрессии и получили высокое значение коэффициента корреляции ($r = -0,906$). Величина доверительной зоны для средних значений $s_t/(n_0s_0 - g_t)$ (указана пунктиром) позволяет заключить, что оценка значений $s_t/(n_0s_0 - g_t)$ по линии регрессии при $0,2 \lesssim 1 - E_t/E_0 \lesssim 0,8$ возможна с точностью не хуже $\pm 20\%$ (5% уровень значимости).

Уравнение этой линии регрессии

$$s_t/(n_0s_0 - g_t) = 0,0807 - 0,0739 \sqrt{E_t/E_0(1 - g_t/n_0s_0)} \quad (11a)$$

для условий, обычно применяемых при определении скоростей гидролиза крахмала (1% крахмал, $n_0s_0 = 55 \cdot 10^{-3} M \gg g_t$), преобразуется к виду

$$s_t = (4,44 - 4,11 \sqrt{E_t/E_0}) \cdot 10^{-3} M. \quad (11b)$$

Так как для 1%-ного растворимого крахмала, используемого нами, $s_0 = 0,33 \cdot 10^{-3} M$ ($n_0 = 170$), то $\Delta s_t = s_t - s_0 = 4,11 (1 - \sqrt{E_t/E_0}) \cdot 10^{-3} M = 4,11 (1 - \sqrt{E_t/E_0})$ мкмоль/мл, где Δs_t — концентрация прогидролизиро-

Значения α -амилазной активности комплексных ферментных препаратов

Ферментный препарат	АС, мкмоль·мин ⁻¹ ·г ⁻¹ (мл ⁻¹)		Ошибка определения по формуле (11в), %
	по s_t	по иоду (Формула (11в))	
	1	2	(1-2)/1
<i>Asp. awamori</i> 78-2	1440 1310	1200 1232	17 6
<i>Asp. batatae</i> 61	121	140	16
<i>Endomycopsis</i> sp.	4800	4500	6
<i>Asp. awamori</i> (поверхн.)	378	412	9

ванных α -амилазой глюкозидных связей 1%-ного растворимого крахмала к моменту времени t . Если зависимость $s_t(t)$ линейна, то

$$AC = \frac{4,11 (1 - \sqrt{E_t/E_0})}{bt} \text{МЕ/г (мл)}, \quad (11в)$$

где АС — эндогидролазная (α -амилазная) активность 1 г (или 1 мл) ферментного препарата, выраженная в международных единицах (так называемая амилолитическая способность); b — концентрация препарата, г (или мл) на 1 мл инкубационной смеси; t — время гидролиза, мин.

В табл. 2 сравниваются значения АС, установленные прямой оценкой изменения концентрации цепей, $AC = (s_t - s_0) / t b$ (s_0 и s_t определены по восстанавливающей способности, см. «Экспериментальную часть»), со значениями АС, найденными при помощи иодометрии с применением уравнения (11в). Изучено четыре амилолитических препарата, содержащих α -амилазу и глюкоамилазу в различных соотношениях. Результаты двух способов определения АС вполне удовлетворительно коррелируют. Расхождение между ними не превышает 20%.

В заключение приводим следующие практические замечания.

1. Перед использованием формул (11б) или (11в) для оценки α -амилазной активности целесообразно проверить препарат на содержание α -амилазы. Очевидно, что при $AC = 0$ (препарат обладает одной глюкоамилазной активностью) должно выполняться условие (4а). В этом случае равенства (11б) и (11в) непригодны, а характеристику глюкоамилазной активности препарата (ГА) можно осуществлять, используя иодометрические данные:

$$ГА = \frac{(1 - E_t/E_0) n_0 s_0}{bt} \text{МЕ/г}. \quad (12)$$

Если условие (4а) не соблюдается и $E_t/E_0 < 1 - g_t/n_0 s_0$ (препарат обладает α -амилазной активностью), то для определения α -амилазной активности можно использовать формулы (11б) или (11в).

2. Близость прямых g на рис. 3 (гидролиз амилозы, λ 650 нм) и b на рис. 4 (гидролиз крахмала, λ 650 нм) указывает на то, что значения n_0 полисахаридов, а также степень их ветвления в изученных пределах мало влияют на зависимость E_t/E_0 от n_t . Следует ожидать, что различные параметры крахмалов и амилоз, используемых в качестве субстратов, мало повлияют на зависимость (11а) и результаты определения значений s_t по формуле (11б), причем указанное влияние будет тем меньше, чем больше величина $1 - E_t/E_0$. Учитывая это, а также отношение доверительной зоны к средним значениям $s_t / (n_0 s_0 - g_t)$ на рис. 4, следует считать, что наилучшей областью измерения поглощения окраски гидролизата с иодом будет $0,3 \lesssim 1 - E_t/E_0 \lesssim 0,6$. В этих условиях ошибка определения значений $s_t / (n_0 s_0 - g_t)$, по данным иодометрии и уравнению (11а), не будет превосходить $\pm 10\%$.

3. Поскольку определяющей для положения прямой в координатах рис. 3 и 4 является длина волны измерения поглощения растворов полисахарида и его гидролизатов с иодом, это условие следует унифицировать. Выбранная нами длина волны, λ 650 нм, соответствует характеристике красного светофильтра на ФЭК - М. Можно полагать, что унификация других условий (постоянство температуры окраски субстрата иодом, использование иодного реактива с достаточной для насыщения субстрата концентрацией I_2 и оптимальным отношением KI / I_2 , постоянный уровень электролитов в пробах и т. д.) обеспечит более низкий уровень ошибок определения глубины превращения субстрата по формуле (11а), чем $\pm 10\%$.

4. При определении АС по формуле (11в) значение s_0 (и следовательно, n_0) играет существенную роль. Поэтому формулу (11в) нужно считать частным решением только для $n_0 = 170$ ($c = 1\%$). Более широкое употребление возможно для формулы (11б) ($c = 1\%$). По зависимости s_t (t) следует определять тангенс угла наклона прямой и определять таким образом значение АС, практически не связанное с параметром n_0 .

5. Нет оснований считать, что в условиях небольшой глубины превращения полисахарида, которую можно оценить по окраске с иодом ($s_t / (n_0 s_0 - g_t) \lesssim 0,1$), на зависимость E_t / E_0 от n_t может заметно повлиять какой-либо другой фактор, кроме множественной атаки эндогидролаз. Кислотный гидролиз и гидролиз субстратов α -амилазами из *Asp. oryzae*, *Asp. batatae* и *Bac. subtilis*, расщепляющими амилозу по многоцепочечному механизму [9, 12, 15], дают сходные результаты как при измерении экстинкции окраски гидролизатов с иодом при $\lambda_{\text{макс}}$, так и при фиксированных значениях длин волн (рис. 3,4).

Таким образом, можно полагать, что предлагаемая модель (10) — (11) применима для характеристики действия всех α -амилаз (а также комплексных препаратов, содержащих α -амилазы), обладающих способностью беспорядочно гидролизовать полисахариды (без множественной атаки).

Экспериментальная часть

Субстраты. Использовали субстраты: крахмал картофельный, растворимый рижского завода «Реагент» со среднечисленной степенью полимеризации $n_0 = 170$ и амилозу, полученную из нерастворимого картофельного крахмала по методу Шюха с соавт., со среднечисленной степенью полимеризации $n_0 = 500$ [16].

Ферменты. Использовали следующие ферментные препараты: ультраконцентрат культуры плесневого гриба *Asp. batatae* 61, полученный при помощи ультрафильтрации культуры через ацетат-целлюлозную мембрану, глюкамилазная и α -амилазная активность препарата — 45 и 121 МЕ/мл соответственно; осажденный спиртом препарат из глубинной культуры плесневого гриба *Asp. awamori* 78-2, глюкамилазная и α -амилазная активность — 580 и 1310 МЕ/г; осажденный ацетоном препарат из культуры дрожжеподобного гриба *Endomycopsis sp.* 20-9, глюкамилазная и α -амилазная активность — 1750 и 4800 МЕ/г; поверхностную культуру плесневого гриба *Asp. awamori*, глюкамилазная и α -амилазная активность — 44 и 378 МЕ/г; α -амилазу из *Bac. subtilis* (Koch-Light, Англия); α -амилазу из *Asp. batatae* 61, очищенную методом, описанным ранее [17]; глюкамилазу из *Asp. awamori* 78-2 [6].

Гидролиз. Гидролиз субстратов кислотой и нейтрализацию гидролизатов выполняли в соответствии с процедурой, приведенной в работе [13]. Для гидролиза субстратов ферментными препаратами составляли инкубационные смеси, содержащие различные концентрации субстратов и фермента. Инкубацию вели при 30°, рН 5,8 (для α -амилазы из *Bac. subtilis*) и рН 4,7 (для остальных ферментов). После гидролиза различной длительности пробы отбирали и инактивировали нагреванием в кипящей водяной бане в течение 5 мин.

Определение глубины превращения субстратов. В пробах определяли выход глюкозы (g_t) методом, описанным в работе [18], восстанавливающую способность (s_0 и $s_t + g_t$) методом Нельсона — Сомоги — Хироми и концентрацию углеводов ($n_0 s_0$) при помощи орцинового реактива, как описано в работе [6]. Процедура окрашивания субстратов и их гидролизатов иодом, а также измерения поглощения растворов на записывающем спектрофотометре СФ-10 описана ранее [16]. ОП окраски проб с иодом измеряли также на ФЭК-М при 650 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Степаненко Б. Н. (1947) Успехи химии, **16**, 708—736.
2. Dube S. K., Nordin P. (1962) Arch. Biochem. and Biophys., **99**, 105—109.
3. Szeitli J., Richter M., Augustat S. (1967) Biopolymers, **5**, 5—16.
4. Thoma J. A., French D. (1960) J. Amer. Chem. Soc., **82**, 4144—4148.
5. Рихтер М., Аугустат З., Ширбаум Ф. (1975) Избранные методы исследования крахмала, «Пищевая промышленность», М.
6. Бендецкий К. М., Яровенко В. Л., Лукьянова Л. Н. (1971) Биохимия, **36**, 525—531.
7. Szeitli J., Richter M., Augustat S. (1968) Biopolymers, **6**, 27—39.
8. Kerr A. W., Cleveland F. C., Katzbeck W. J. (1951) J. Amer. Chem. Soc., **73**, 3916—3927.
9. Banks W., Greenwood C. T. (1970) Carbohydr. Res., **12**, 79—82.
10. Banks W., Greenwood C. T. (1968) Stärke, **20**, 315—327.
11. Takeo K., Kuge T. (1969) Agr. Biol. Chem., **30**, 1174—1181.
12. Robyт J. F., French D. (1967) Arch. Biochem. and Biophys., **122**, 8—16.
13. Бендецкий К. М., Яровенко В. Л. (1975) Биоорг. химия, **1**, 808—815.
14. Kung J. T., Nahrahan V. M., Caldwell M. L. (1953) J. Amer. Chem. Soc., **75**, 5548—5553.
15. Бендецкий К. М., Яровенко В. Л., Лукьянова Л. Н. (1972) Биохимия, **37**, 117—123.
16. Бендецкий К. М., Яровенко В. Л., Лукьянова Л. Н. (1971) Прикл. биохимия и микробиол., **7**, 218—224.
17. Бендецкий К. М., Яровенко В. Л., Корчагина Г. Т., Сенаторова Т. П., Халанова Т. С. (1974) Биохимия, **39**, 968—974.
18. Lloyd J. B., Whelan M. J. (1969) Analyt. Biochem., **30**, 467—471.

Поступила в редакцию
24.II.1976

После переработки
1.VI.1976

‡ THE DEPENDENCE OF IODOMETRIC PROPERTIES ON DEGREE OF POLYSACCHARIDES CONVERSION ON EXO AND ENDOHYDROLYSIS

BENDETSKY K. M., PAVLOVA E. S., YAROVENKO V. L.

‡ All-Union Research Institute of Fermentation Products, Moscow

A model has been suggested which relates the iodometric parameters for polysaccharides (viz. optical density and colour developed on iodine treatment) and their average degree of polymerization. The model is based on the idea that a proportionality exists between the number of bound iodine molecules and the degree of polysaccharide chain polymerization. Taking into account the most probable distribution of chain lengths, the number of polysaccharide chains was estimated whose degree of polymerization exceeds that for lower limit of iodine complexation. A proper consideration was also given to the «end effects» that arise due to inability for iodine binding of some portions of chain ends. The model proposed fairly agrees with the experimental data on amylose and starch hydrolysis catalyzed by glucamylases and α -amylases (whose action is not characterized by multiple attack of polysaccharide chain), as well as on their digestion with preparations containing the enzymes of both title groups. The equations are presented which allow to transform the observed iodometric parameters into values describing the relative amount of glucosyl bonds cleaved by an endohydrolase.