

ИВАН БАЈА

Р. Проф. Александар Белић
Директор

ИЗУЧАВАЊЕ ЈЕДНЕ ДВОСТРУКЕ ФЕРМЕНТСКЕ АКЦИЈЕ.

Из ХСIII књиге „Гласа“ Српске Краљевске Академије.



У БЕОГРАДУ

ШТАМПАНО У ДРЖАВНОЈ ШТАМПАРИЈИ КРАЉЕВИНЕ СРБИЈЕ

1914.

vy 157-043 463

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

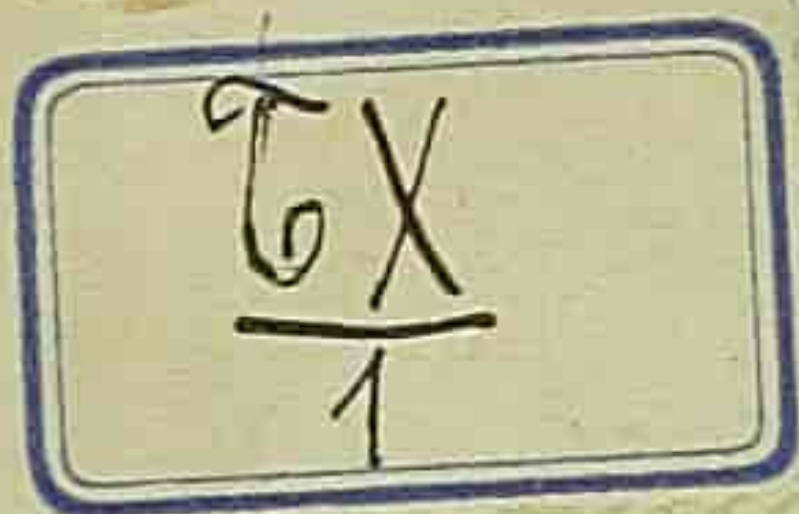
LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO

1957

1957

1957

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1957



УНИВ. БИБЛИОТЕКА

И. Бр. 12960.

Изучавање једне двоструке ферментске акције

од

ИВАНА ЂАЈЕ

(Примљено на скупу Академије Природних Наука 10. фебруара 1914. г.)

Увод.

Дуго времена посматрало се у ферментској хидро-
лизи амигдалина само крајњи резултат те реакције
која се може представити овом формулом:



Молекул амигдалина даје дакле, по један молекул
цијан-водоника и бенз-алдехида и два молекула гли-
козе. Пошто се мислило да се молекул амигдалина
од једном распада у те своје коначне производе, то
се запоставило изучавање односа у коме се појављују
производи распадања амигдалина у разним трену-
цима ферментске реакције. Држало се да су ти про-
изводи исти као и коначни производи и да се налазе
у ма коме тренутку у истој размери као и по
свршеној реакцији; из тога се закључивало да је
довољно одредити у извесном тренутку ферментске
реакције количину једног јединог производа да би
се знале и количине осталих, будући да су ти про-
изводи везани међу собом односом израженим у
горњој формули.



Manson Auld¹ с једне стране, Н. Е. Armstrong, Е. Ф. Armstrong и Е. Horton², с друге, први су показали да се у хидролизи амигдалина помоћу емулсина бадема, редукујући шећер и цијан-водоник не појављују у току реакције у односу од 2 молекула гликозе према 1 молекулу цијан-водоника, однос у коме се ти продукти налазе када је реакција свршена.

Доцније смо забележили³ да се и у хидролизи амигдалина под утицајем фермената пужа, *Helix rotatoria*, редукујућа моћ и цијан-водоник не појављују у теоријској размери коју изискује горња формула. Али у овоме случају одступање од теоријске размере јесте супротнога правца од онога констатована за емулсин бадема: док при утицају овога последњега фермента редукујући шећер појављује се у вишку према цијан-водонику (сматрајући да је нормалан однос 2 мол. гликозе: 1 мол. CNH) дотле при утицају фермената *Helix*-а, наилазимо на мањак гликозе према нађеном цијан-водонику у истом тренутку. У оба случаја пак, производи, цијан-водоник и гликоза, налазе се у теоријском односу када је реакција довршена.

Најзад ту скоро, Javillier⁴ је утврдио да ферментска течност *Aspergillus niger*-а садржи увек више амигдалазе него ли амигдалиназе, што значи да амигдалин под утицајем те ферментске течности даје у току реакције вишак редукујућега шећера према

¹ Manson Auld. The hydrolysis of Amygdalin by Emulsin. Journal of the chem. Soc. of London. XCIII. 1251—1281 (1908).

² Н. Е. Armstrong, Е. Ф. Armstrong and Е. Horton. The Enzymes of Emulsin. Proceedings of the royal Society, Serie B; 80. 821 (1908).

³ J. Giaja. Etude des ferments des glucosides et des hydrates de carbone итд. Paris 1909.

⁴ Javillier. Zinc et sécrétions diastasiques. Bull. de la Soc. chim (3) XIII—XIV. 91—92. février 1913.

којих су састављени, то ће у току реакције докле год сав дисахарид не буде био претворен у гликозу [2'] моћ редуковања течности бити слабија према нађеном цијан-воднику, него ли када реакција буде завршена.

Реакције које су представљене у [2] и [2'], било да су условљене или не реакцијама [1] и [1'], бивају свакако после ових. Тело на које ферменат утиче у реакцији [2] или [2'] јесте производ реакције [1] односно [1']. Отуда се ферментске реакције [2] и [2'] врше у сасвим другим околностима од реакција [1] и [1']. Видећемо приликом изучавања утицаја концентрације амигдалина на ход ферментске хидролизе, како се реакције [2] и [2'] понашају на сасвим особен начин. Те ферментске акције којима претходи једна друга ферментска акција која производи тело на које ће оне делати, назваћемо *секундарним ферментским акцијом*.

Што се тиче емулсина бадема, М. Auld¹ је успео да из једне недовршене хидролизе амигдалина изолује амигдонитрил-гликозид. Из недовршене хидролизе амигдалина под утицајем фермената *Helix*-а, издвојили смо једно тело које сматрамо да је дисахарид амигдалина; тај дисахарид не редукује.²

Треба одмах напоменути да резултати овог изучавања, изложени у следећим странама, јесу независни од тога да ли изложена хипотеза о распадању амигдалина одговара истини. У овоме изучавању посматрали смо однос између моћи редуковања и нађеног цијан-водоника, у разним огледним погодбама и у разним тренуцима реакције. Јасно је да је то

¹ М. Auld. loc. cit.

² J. Giaja. Sur l'isolement d'un sucre biose dérivant de l'amygdaline. Comptes rendus de l'Acad. des Sciences. 1910.

ствар независна од објашњења које ћемо дати факту да тај однос није теоријски (1 мол. CNH : 2 мол. гликозе) у току реакције.

Овим радом хтели смо нарочито видети да ли је однос у коме се јављају цијан-водоник и моћ редуковања у току ферментске реакције, једна непроменљива ствар или се на против може утицати на тај однос; другим речима, да ли се ферментска хидролиза амигдалина може заиста сматрати резултатом делања два фермента који су бар у неколико независни један од другог у својој акцији. На то питање, даље изложени резултати дају јасан одговор.

Огледна техника.

С обзиром на јаку ферментску моћ *Helix*-ова сока, (који је узиман из желуца и црева животиња које су бар неколико дана гладовале) тај је сок био увек претходно разблажен неколико пута додавањем дестиловане воде; на тај начин разблажен сок могао је бити употребљаван у сваком огледу у количинама од неколико кубних сантиметара те према томе и одмеравањем са довољно тачности, што је врло важно у упоредним огледима.

Емулсин бадема којим су огледи вршени, јесте купован препарат (Kahlbaum)

Цијан-водоник одређиван је квантитативно по методи Liebig-Denigès, употребљујући раствор сребрног нитрата $\frac{n}{20}$ и то на таквој количини течности, која изискује употребу бар 1^{cc} титрованог раствора NO_3Ag . У почетку смо увек претходно дестилovali цијан-водоник за његово квантитативно одређивање, али смо се доцније уверили да у огледима са *Helix*-овим соком, добивају се апсолутно исти резултати

када се цијан-водоник одређује у самој ферментској средини у којој се појавио. Жућкаста боја течности ни мало не смета да се тачно ухвати преокрет боје који назначује крај реакције у овој методи одређивања цијан-водоника. У огледима са емулсином бадема, цијан-водоник је увек претходно дестилован.

Моћ редуковања одређивана је методом Mohr-Bertrand. При томе одређивању треба добро пазити да течности буду претходно потпуно ослобођене цијан-водоника и цијанида. Иначе се добивају потпуно лажни резултати. Одређивање моћи редуковања вршено је на разним запреминама течности, према количини редукујућег шећера што те течности садрже. Али, да би се скучиле границе могуће грешке, нису никада употребљаване запремине ниже од 5^{cc}. Када концентрисаност течности не би дозволила употребу такве запремине, тада би се 5^{cc} најпре разблажило до 50^{cc}, па редукујућа моћ одредила на извесној запремини те разблажене течности.

Бенз-алдехид одређиван је квантитативно у облику фенил-хидрациона, по упутствима Herissey-а, дестилујући га у струји угљен-диоксида да би се избегло његово могуће оксидовање.

Потребно је промотрити осетљивост ових употребљених метода да би се знало шта у добивеним резултатима стоји изван граница могућних грешака.

При одређивању цијан-водоника, преокрет боје јасан је на приближно 1—2 капи сребрног нитрата

$\frac{n}{20}$. Пошто сваком кубном сантиметру NO_3Ag $\frac{n}{20}$ од-

говара 2 мгр. 7 СNH, то ће абсолютна грешка бити највише од 0 мгр. 27. Ако је одређивање вршено на 10^{cc} течности, количина коју смо обично употребљавали, тада ће на 100^{cc} та грешка бити од 2 мгр. 7,

а пошто су течности на којима је одређиван CNH садржавале у употребљеној запремини најмање 5 мгр. тог тела, та релативна грешка није већа од 5,5 процента.

У одређивању редукујуће моћи Mohr-Bertrand-овом методом грешка је у границама 1—2 кани титрованог калијум-пермангана; чему одговара 0 мгр. 25—0 мгр. 50 гликозе. Пошто смо одређивали редукујућу моћ на запреминама течности које су ретко кад садржавале мање од 30 мгр. гликозе (или извесну количину другог шећера чија редукујућа моћ одговара тој количини гликозе) то ће највећа грешка бити око 1,5 процента.

Што се тиче квантитативног одређивања бенз-алдехида, употребљена метода није велике тачности, али ипак довољно осетљива да би се без околишања могло решити да ли C_6H_5COH у своме појављивању у току реакције иде упоредно са редукујућом моћи или са CNH. У томе смо циљу једино и употребљавали ову методу.

У овоме што следује, под именом *теоријски шећер* (t) подразумевамо израчунату количину гликозе која одговара извесној количини CNH у размери од 2 молекула гликозе: 1 молекулу CNH (тај се однос налази, као што смо рекли, кад је амигдалин потпуно хидролизован). *Теоријски шећер* који одговара извесној количини CNH, добива се када се ова количина помножи са 13,33. На исти начин подразумеван *теоријски бенз-алдехид* добива се помноживши количину CNH са 3,925. Под називом *нађени шећер* (n) подразумевамо нађену моћ редуковања Mohr-Bertrand-овом методом, изражену одговарајућом количином гликозе.

Напоменимо да за *теоријски шећер*, који се изводи, као што смо видели, из нађенога CNH, важи

оно што смо рекли за ово последње тело у погледу границе могуће грешке при његову квантитативну одређивању. Према томе, у најнеповољнијем случају граница грешке у разлици између *нађенога шећера* и *теоријскога шећера* моћи ће досећи око 5%. С тога у резултатима које смо добили нисмо држали рачуна о вредностима које нису знатно више од тог броја.

Резултати.

І. Однос између *нађенога шећера* и *теоријскога шећера*, када је реакција завршена.

Доле изложени бројеви односе се на хидролизу амигдалина у разним концентрацијама (од 1,5—5%) под утицајем *Helix*-ова сока. Реакција се вршила на темп. од 37—40. Сок је додаван у таквој количини да је хидролиза била близу краја већ после неколико часова; али одређивање моћи редуковања и CNH вршено је тек после 24 часа.

теоријски шећер	нађени шећер
3,092	2,960
1,546	1,592
1,709	1,686
1,907	1,950
1,871	1,806
1,866	1,800
1,146	1,130
1,652	1,623
1,691	1,620
1,679	1,687
1,666	1,662

Из ових бројева видимо да разлика између *теоријскога шећера* и *нађенога шећера*, не превазилази 5%, да је дакле у границама неизбежне грешке. Одатле

можемо закључити да се редукујући шећер (гликоза) и СNH у хидролизи амигдалина под утицајем *Helix*-ова сока, налазе у теоријском односу (2 мол. гликозе : 1 мол. СNH) када је реакција довршена

Са емулсином бадема добивамо у истим огледним погодбама ове бројеве :

теоријски шећер	нађени шећер
1,127	1,134
2,483	2,573
2,519	2,560
2,932	2,980
0,827	0,816

Исти се закључак намеће као и за ферменте *Helix*-ова сока.

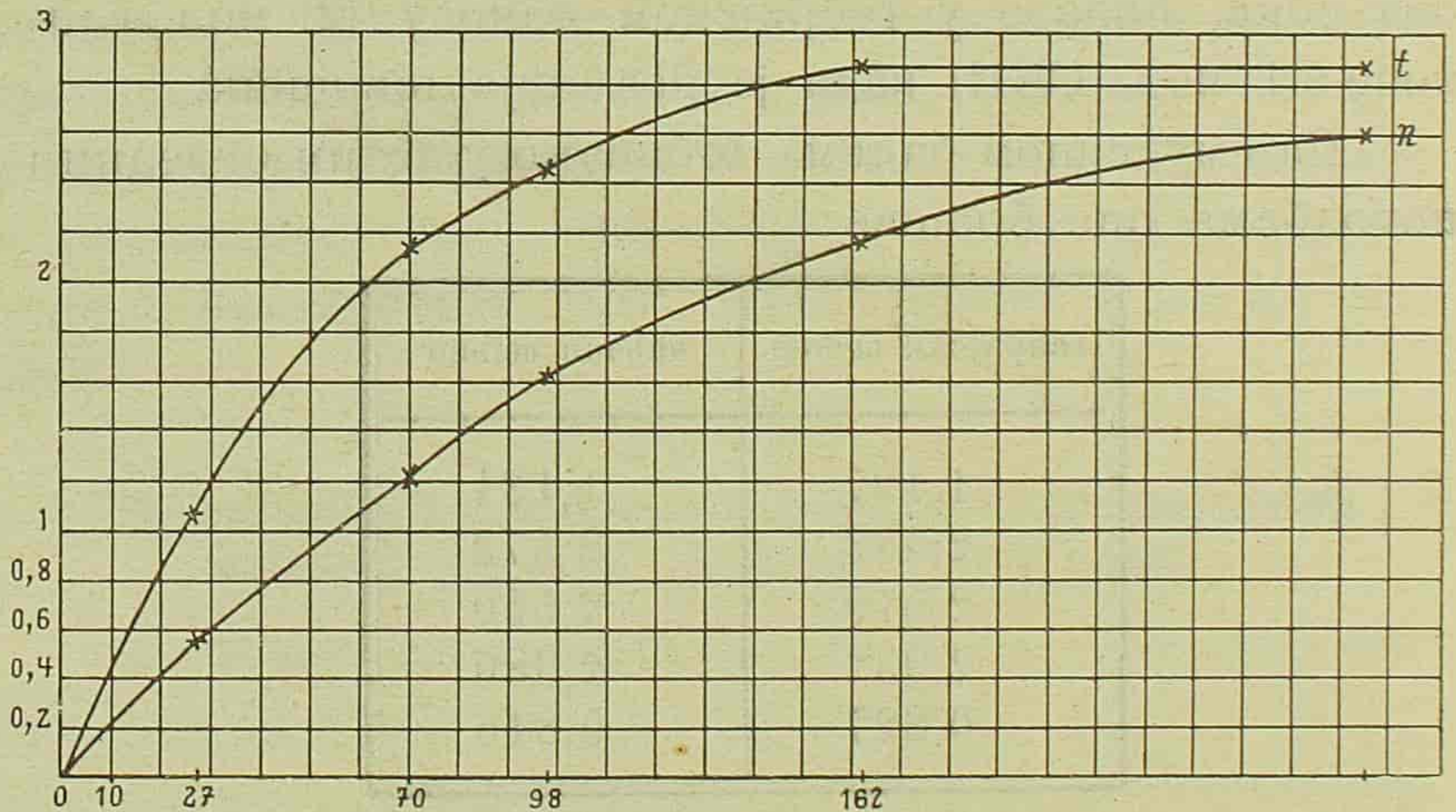
II. Ток хидролизе амигдалина.

У следећем огледу који је узет међу многобројним исте врсте, праћено је, упоредно од почетка до краја хидролизе, појављивање СNH и моћи редуковања. У овоме огледу који је вршен на температури од 39°, *Helix*-ов сок стављен је у додир раствора амигдалина 5‰.

Време	теориј. шећер (<i>t</i>)	нађени шећер (<i>n</i>)	$\frac{n}{t}$
27 мин.	1,079	0,550	0,50
70	2,159	1,204	0,55
98	2,447	1,620	0,66
162	2,807	2,180	0,77
265	2,807	2,605	0,92
20 час.	3,095	3,065	0,99

Ти су резултати графички представљени сликом 1. Време је пренето на абсцису а теоријски и нађени

шећер на ордонату. Горња крива представља теоријски шећер а доња нађени шећер. Због просторне



Слика 1.

ограничености цртежа, резултати добивени после 20 часова, када се горња и доња крива сучељавају у једну тачку, пису овде представљени. Из горње табле видимо да је вредност односа између нађенога и теоријскога шећера најмања у почетку реакције, да затим непрестано расте и да на крају огледа постаје једнака јединици.

Што се тиче тока хидролизе амигдалина под утицајем емулсина бадема, и он се може представити сличним двема кривим линијама, са том разликом што ће горња линија представљати нађени шећер а доња теоријски шећер и што су те две линије у целој својој дужини мање удаљене једна од друге. То значи да је вишак нађенога шећера у акцији емулсина бадема, мањи од оног дефицита нађенога шећера у акцији фермената Нелих-ова сока.

Следећи бројеви односе се на хидролизу једног 4% раствора амигдалина под утицајем емулсина бадема на температури од 36°.

Време	теоријски шећер	нађени шећер
90 мин.	0,701	0,995
300	1,295	1,595
24 часа	2,483	2,573

У хидролизи амигдалина *Helix*-овим соком, бенз-алдехид се појављује упоредно са цијан-водоником у теоријском односу: 1 мол CNH : 1 мол $C_6H_5 COH$. Ево вредности које смо добили:

Теоријски бенз-алдехид.	Нађени бенз-алдехид
0,274	0,270
0,318	0,310
0,410	0,400
0,534	0,525

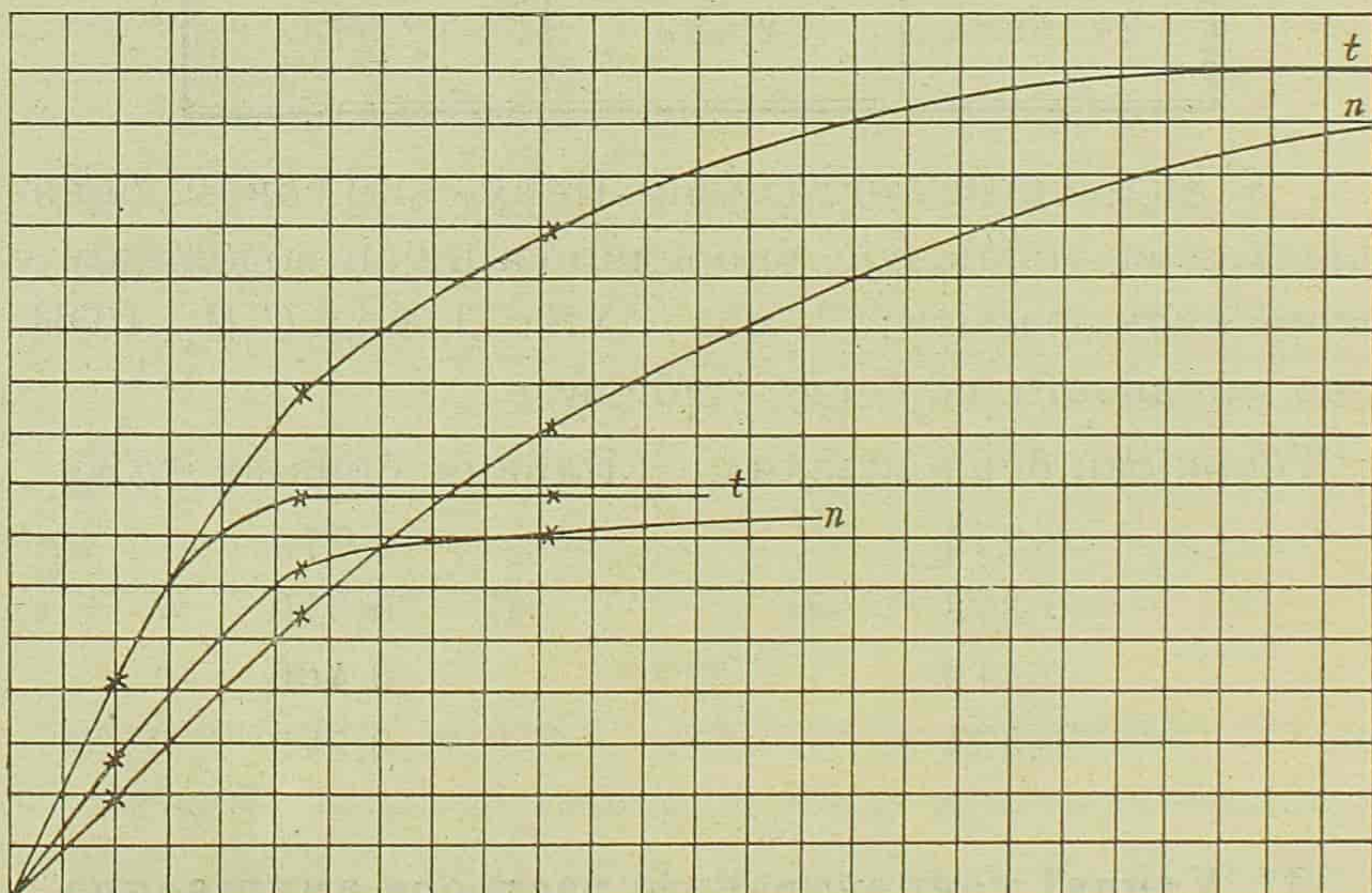
III. Утицај концентрације раствора амигдалина

У следећој табли изложени су резултати једног упоредног огледа извршена са *Helix*-овим соком на температури од 39° . Иста количина разблажена сока додана је у исто време с једне стране 5% раствору амигдалина, с друге 2,5% раствору истог гликозида. С времена на време одређивани су CNH и моћ редуковања, истовремено у оба раствора.

Време	5% раствор		2,5% раствор	
	теориј. шећер	нађ. шећер	теориј. шећер	нађени шећер
40 мин.	0,827	0,385	0,827	0,525
110	1,943	1,080	1,546	1,275
205	2,591	1,825	1,546	1,407
19 час.	3,092	2,960	1,546	1,592

Ти су резултати графички представљени сликом 2.

У овоме огледу видимо да бар у највећем делу реакције појављивање CNH односно теоријскога шећера, исто је за обе концентрације. Што се тиче по-



Слика 2.

јављивања *нађенога шећера*, налазимо једну сасвим непредвиђену ствар: слабија концентрација амигдалина даје у највећем делу реакције јачу моћ редуковања од јаче концентрације. Имајући у виду факат да у раствору амигдалина слабије концентрације, CNH се никада не појављује у већој количини него у раствору јаче концентрације (већ у истој или можда у слабијој количини), то се може закључити да она јача моћ редуковања *нађена* у раствору слабије концентрације, јесте резултат јаче активности једног фермента различна од фермента који ослобођава CNH . Овај је закључак сасвим парадоксалан, јер за ферменте важи правило да њихова активност расте са концентрацијом тела на које утичу, или бар остаје

иста. Међутим у овоме случају видимо да је активност фермента већа кад је раствор амигдалина разблаженији. Али треба имати на уму да је хидролиза амигдалина једна двострука ферментска акција и сматрајући је таквом видећемо да факат који изгледа парадоксалан улази у оквир општега правила. Као што изложисмо у Уводу, у првоме делу хидролизе амигдалина [1'] врши се ослобођавање СNH. Ферменат који производи ту реакцију не чини изузетак у општем правилу, јер видимо да у почетку реакције јача концентрација амигдалина даје исте количине СNH као и слабија. Тим самим, други ферменат који довршује хидролизу [2'] налази се у присуству или исте или веће количине дисахарида (тела на које тај ферменат утиче), у јачој концентрацији амигдалина него у слабијој. За акцију тог фермента констатујемо пак да је она већа у слабијем раствору амигдалина у коме има мање дисахарида на који утиче. Али у раствору јаче концентрације амигдалина не налази се само више дисахарида већ и више амигдалина. И тада је довољно претпоставити да је амигдалин једно тело које успорава акцију фермента амигдалинова дисахарида, да би се могло објаснити зашто је тај ферменат активнији када је у присуству слабије количине дисахарида и слабије количине амигдалина, и обратно. Тај »успоравајући« утицај амигдалина врло је вероватан, судећи по множини тела која могу успоравати акције разних фермената дисахарида (малтазе, инвертина и др.)

На претходној табли види се да истим количинама СNH (односно теоријскога шећера), одговарају јаче количине нађенога шећера за раствор амигдалина слабије концентрације. Према томе однос $\frac{n}{t}$

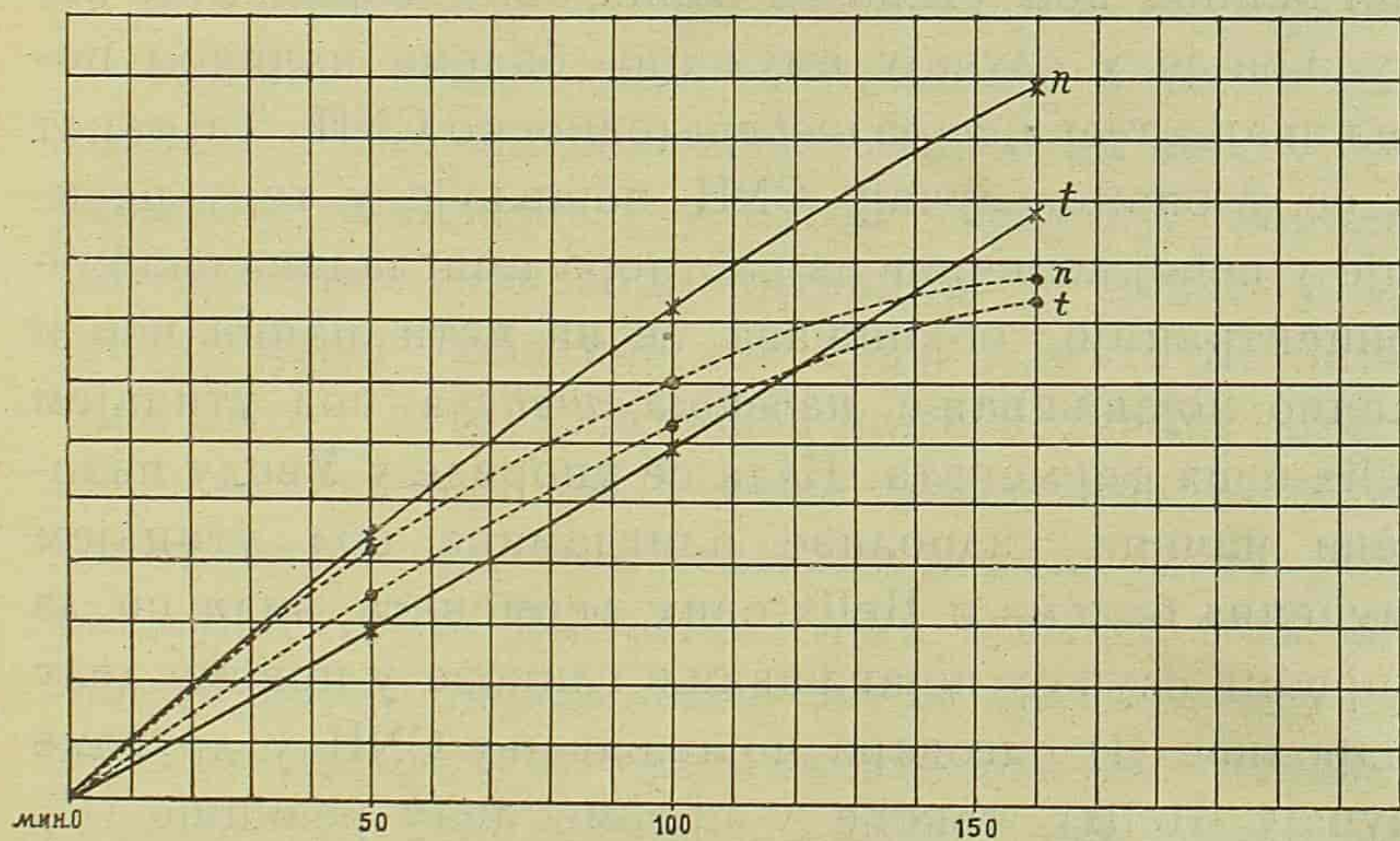
између нађенога шећера n и теоријског шећера t , посматран у функцији времена, веће је вредности за растворе амигдалина мање концентрације. Али да видимо како се понаша тај однос према концентрацији амигдалина, не више у функцији времена, већ у функцији процента ослобођена СNH. За раствор амигдалина 2,5⁰/₀, када је ослобођено 53⁰/₀ целокупног СNH што га може дати тај раствор, $\frac{n}{t} = \frac{0,525}{0,827} = 0,63$.

За почетну концентрацију амигдалина 5⁰/₀, у истоме огледу, у тренутку када је ослобођено 53⁰/₀ СNH, $\frac{n}{t} = \frac{0,850}{1,654} = 0,51$. Отуда закључак да за исти проценат ослобођена СNH на рачун амигдалина у раствору разних концентрација, под утицајем исте количине фермената *Helix*-ова сока, вредност $\frac{n}{t}$ мања је за раствор амигдалина слабије концентрације.

Да видимо сада шта се дешава у том истом погледу кад употребљујемо не више сок *Helix*-а већ емулсин бадема. У огледу чији су резултати у доњој табли, употребљена је иста количина емулсина у А и В, у истоветним погодбама на температури од 38⁰, с једном једином разликом: у А почетна концентрација раствора амигдалина јесте 2,5⁰/₀ а у В 1,25⁰/₀.

Време	А (2·50 ⁰ / ₀ раствор)		В (1·25 ⁰ / ₀ раствор)		$\frac{n}{t}$	
	теоријски шећер	нађени шећер	теоријски шећер	нађени шећер	I	II
50 мин.	0,288	0,444	0,344	0,436	1,5	1,2
100	0,593	0,826	0,629	0,701	1,3	1,1
160	0,989	1,188	0,845	0,870	1,20	1,02

Ако те резултате представимо графички (сл. 3) тада се одмах опажа да је добивени цртеж необичне сличности са сл. 2 којом су представљени резултати



Слика 3.

добивени по истоме предмету са ферментима *Helix*-а. Само што у случају емулсина бадема, доња крива представља теоријски шећер (односно CNH) а горња нађени шећер (односно нађену моћ редуковања изражену гликозом), дакле обрнуто од онога што се дешава за хидролизу помоћу фермената *Helix*-ова сока. Може се рећи да све оно што је речено за акцију *Helix*-ова сока, у овој глави, примењује се и на акцију емулсима бадема, али обрнуто. Док је за *Helix*-ове ферменте $\frac{n}{t} < 1$ у току целе реакције, дотле је

за емулсин $\frac{n}{t} > 1$. У првоме случају утврдили смо

да је $\frac{n}{t}$, посматрано у функцији времена, веће вредности за слабију концентрацију амигдамина, док овде, као што се може видети из горњег прегледа, тај је

однос мање вредности за слабију концентрацију. Најзад, онај неочекивани начин појављивања *нађенога шећера* у већим количинама из слабијега раствора алигдалина, под утицајем *Helix*-ових фермената, заступљен је у случају емулсина бадема начином појављивања *теоријскога шећера* (односно *CNH*). Тај факат да се у овоме случају *CNH* појављује у току реакције у већој количини из раствора амигдалина слабије концентрације, објашњава се на исти начин као и слично појављивање *нађенога шећера* под утицајем *Helix*-ових фермената. Када се упореде у Уводу изложени начини хидролизе алигдамина под утицајем емулсина бадема и *Helix*-ових фермената, види се да у првome случају појављивање гликозе у првome делу хидролизе [1] одговара појављивању *CNH* у другоме случају (*Helix*), такође у првome делу реакције [1']. Примењујући на хидролизу емулсином оно исто резонавање које смо применили на хидролизу *Helix*-овим ферментима, посматрана факта овако се објашњавају: у првome делу хидролизе [1] један ферменат ослобођава 1 молекулу гликозе од молекула амигдалина и тиме се ствара молекула амигдонитрил-гликозида. То ослобођавање гликозе у функцији концентрисаности раствора амигдалина, улази у опште правило ферментских акција: под утицајем исте количине фермента слабија концентрација даје мање гликозе.¹⁾

¹⁾ У почетку реакције (видети горњу таблу и сл. 3) налазимо исту моћ редуковања за обе концентрације. Али пошто у слабијој концентрацији амигдалина има више *CNH*, а ослобођавање *CNH* у вези је са ослобођавањем другог молекула гликозе који припада амигдалину, значи да у том раствору слабије концентрације има мање оне гликозе која је ослобођена у првом делу хидролизе амигдалинова молекула; с тога велимо да је акција фермента који врши ту прву хидролизу, слабија у раствору амигдалина слабије концентрисаности, и ако у почетку реакције налазимо исту моћ редуковања у обема концентрацијама амигдалина.

У другоме делу хидролизе [2], један ферменат ослобођава други молекул гликозе са молекулом СNH и бенз-алдехида. За ту ферментску акцију налазимо да је јача у раствору амигдалина *слабије* концентрације, у коме има, према ономе што рекосмо о акцији првог фермента, мање амигдонитрил-гликозида него у јачем раствору амигдалина, у истом тренутку. Ферменат амигдонитрил-гликозида активнији је дакле у присуству мање количине тог тела. Али то ће бити с тога што у исто доба поред мање количине амигдонитрил-гликозида има и мање амигдалина, тела које би према акцији тога фермента играло улогу „успоравајућег“ тела. Резултат свега тога биће да ће се *нађени шећер* појављивати истом брзином или спорије из слабијега раствора амигдалина него из јачега, а да ће се СNH (*теоријски шећер*) брже појављивати из првога него из другог раствора. То се у ствари из посматра у току реакције до пред сам њен крај.

Приметимо да ферментске акције које се тако особено понашају према концентрацији амигдалина јесу акције [2] и [2'] које смо назвали секундарним ферментским акцијама. Овај пример показује да се секундарне ферментске акције не владају, бар на први поглед, по законима примарних ферментских акција.

IV. Утицај количине фермента.

Следећа два огледа извршена су на амигдалину 5%. У оба огледа изучавана је хидролиза амигдалина под утицајем различне количине фермента, док су сви остали услови температуре и концентрације истоветни у оба огледа. Бројеви под В, добивени су у хидролизи амигдалина под утицајем два пута веће количине *Helix*-ова сока него у А.

Време	А		В	
	теоријски шећер	нађени шећер	теоријски шећер	нађени шећер
32	0,539	0,257	1,079	0,562
63	0,951	0,487	1,907	1,050
125	1,799	1,025	2,627	1,890
220	2,303	1,620	2,879	2,405
465	2,760	2,295	2,871	2,810

Време	А		В	
	теоријски шећер	нађени шећер	теоријски шећер	нађени шећер
40	0,251	0,129	0,503	0,257
90	0,689	0,323	1,331	0,621
215	1,223	0,705	2,051	1,340
415	1,627	1,180	2,447	1,975

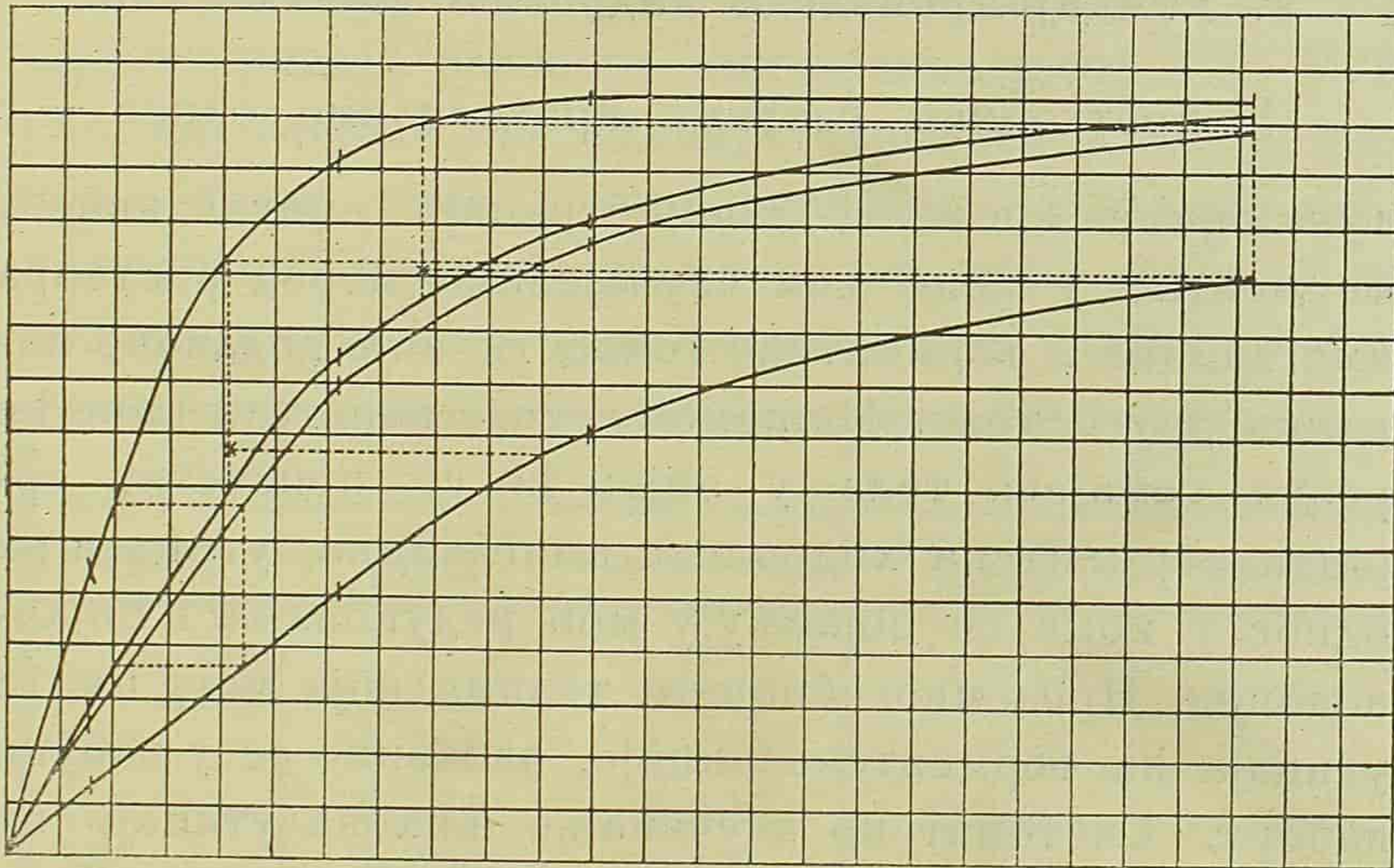
Резултати првога огледа представљени су графички сликом 4 а другога огледа сл. 5.

Као што се могло очекивати, хидролиза амигдалина врши се брже кад је већа количина фермента у присуству.

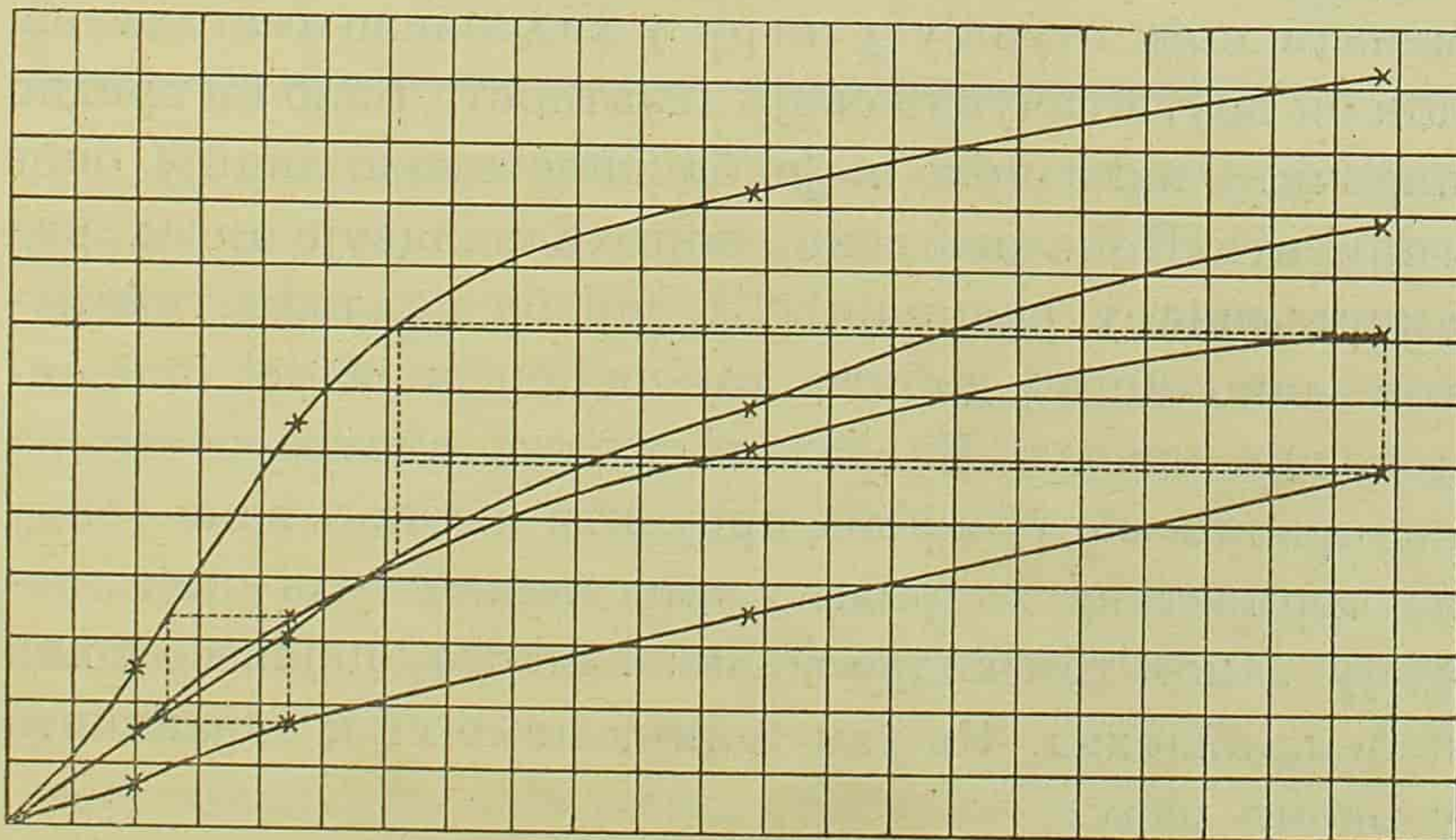
Што се тиче односа $\frac{n}{t}$, констатујемо на графикама, повлачењем паралела, да истим количинама теоријскога шећера одговарају веће количине нађенога шећера у хидролизи која се спорије вршила.¹⁾

¹⁾ Ово вреди за већи део тока реакције. У почетку пак хидролизе, у колико се може ценити по нашим цртежима, изгледа да је $\frac{n}{t}$ истевредности за обе концентрације фермента.

Према томе можемо закључити да $\frac{n}{t}$ у функцији количине ослобођена C_2H_2 има мању вредност у реакцији



Слика 4.



Слика 5.

која се извршила под утицајем веће количине фермента, а да смањујући количину фермента, појављи-

вање теоријскога шећера (односно CNH) успорава се више од појављивања нађенога шећера.

V. Утицај производа хидролизе амигдалина.

У претходним главама пратили смо однос $\frac{n}{t}$ у функцијама времена, концентрацијâ амигдалина и фермента; у свим тим случајевима поред раствора амигдалина и ферментске течности није додавано никакво друго тело. Можемо се сада запитати како ће разна хемијска тела у чијем ће се присуству вршити ферментска хидролиза амигдалина, утицати на однос у коме се појављују моћ редуковања и цијанводоник. Пред многобројним телима која могу имати утицаја на ферментске акције, налазимо се у забуну избора. Систематско изучавање њихова утицаја не би било без вредности, јер је могућно да би једно извесно тело спречило акцију једнога од двају фермената која ступају у игру у хидролизи амигдалина, док би други сачувао своју делатност. Било би вредно нарочито наћи тело које би спречавало акцију оног фермента *Helix*-ова сока, који хидролизује дисахарид амигдалина у реакцији [2'], јер би се тада тим путем лако могао добити тај шећер који је! још недовољно познат. Из разних узрока сматрали смо да на првоме месту треба проучити питање како утичу на ферментску хидролизу амигдалина тела која постају самом том хидролизом: гликоза, цијан-водоник и бенз-алдехид. На тим телима ћемо се и ограничити у овоме раду.

A. Утицај гликозе.

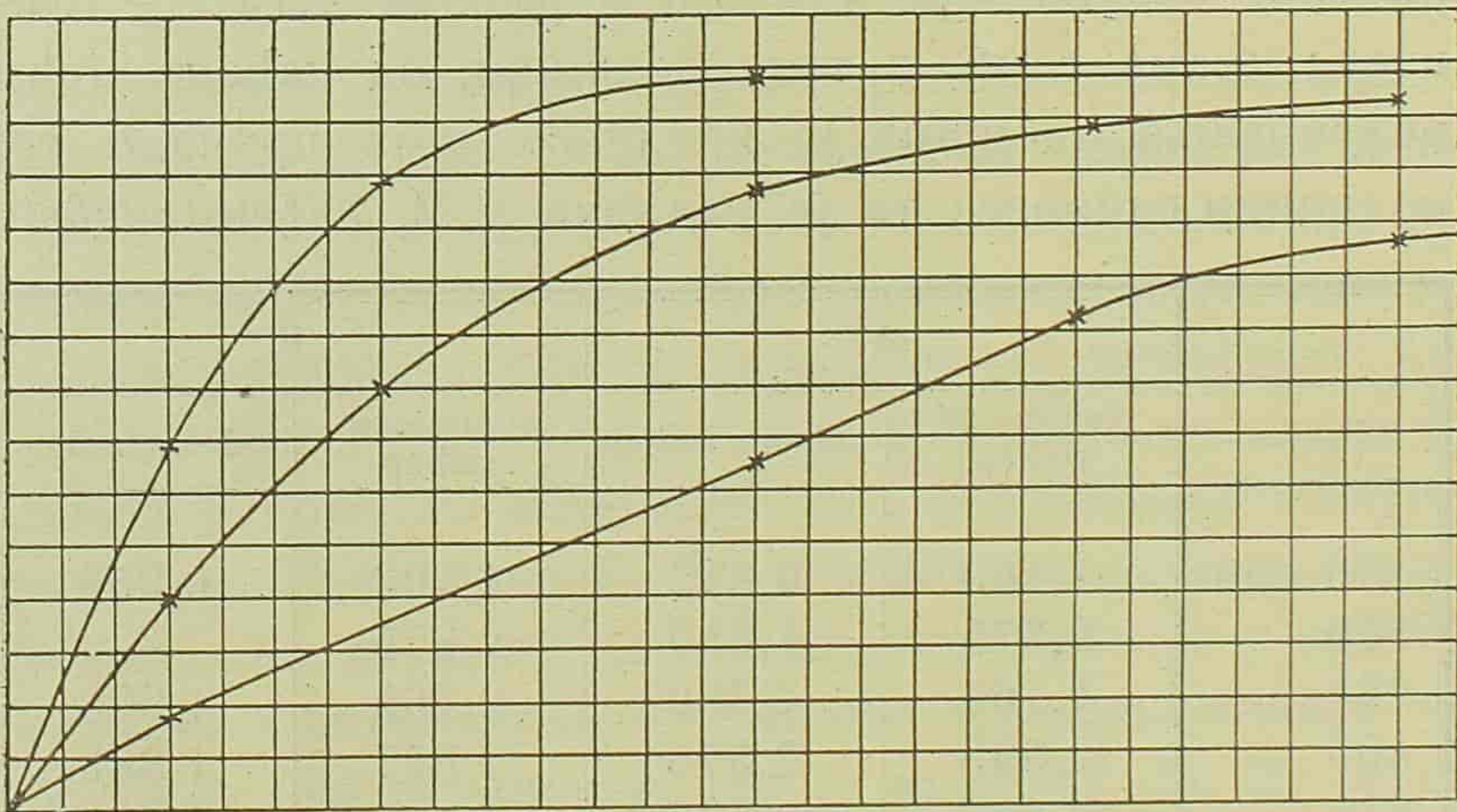
Једноме раствору амигдалина дода се извесна количина гликозе и тада се посматра појављивање

моћи редуковања и *CNH* под утицајем фермента, упоредно са појављивањем тих тела у истоме раствору без гликозе. У следећем прегледу изложени су резултати једног таквог огледа са соком *Helix*-а. Концентрација раствора амигдалина јесте 5%. У В, раствор садржи пре утицаја фермента 4,792% гликозе; према томе, у току реакције, од нађене моћи редуковања одбијана је вредност која припада тој количини гликозе; та је разлика у В, *нађени шећер*.

Време	А		В	
	теоријски шећер	нађени шећер	теоријски шећер	нађени шећер
60 мин.	1,403	0,812	1,403	0,358
140	2,375	1,650	2,375	—
280	2,765	2,330	2,765	1,338
405	2,699	2,575	2,627	1,883
545	2,624	2,690	—	2,193
48 час.	2,627	2,840	—	2,658

Из резултата изложених у овоме прегледу, види се да се *теоријски шећер*, односно *CNH*, на исти начин појављује у А и В. Значи да гликоза која је додана раствору В, без утицаја је на ферменат *Helix*-ова сока, који ослобођава *CNH*. Али ако упоредимо појављивање *нађенога шећера* у А, са појављивањем у В, видимо јасно да је појављивање у В много спорије. На пример, после 60 мин. налазимо у А 0,812 *нађенога шећера* а само 0,358 у В; тим тако различним количинама одговарају исте количине *CNH* (односно *теоријскога шећера*). Значи да додана гликоза која је без утицаја на ферменат који ослобођава *CNH*, успорава делање фермента који ослобођава гликозу у другоме делу хидролизе амигдали-

нова молекула. Сликом 6, представљени су графички, резултати тога огледа. Горња линија представља појављивање теоријскога шећера у функцији времена; она је заједничка растворима А и В. Друге две линије представљају појављивање моћи редуковања,



Слика 6.

дакле нађени шећер. Средња припада раствору А, доња раствору В. Оне показују како додана гликоза у В има знатног утицаја на појављивање нађенога шећера.

Вредно је приметити да је појављивање нађенога шећера у В представљено до близу краја реакције једном правом линијом, што се не посматра обично за примарне ферментне акције, које су представљене кривим линијама.

У претходноме огледу хидролиза није праћена до краја, за В нарочито у погледу теоријскога шећера, тако да се може учинити примедба да није доказано да ће се и у В на крају реакције теоријски шећер и нађени шећер наћи у теоријском од-

носу. Следећи оглед узет између многобројних исте врсте потврђује оно што смо закључили из претходнога и показује да додани шећер нема утицаја на крајне вредности *нађенога шећера и теоријскога шећера*.

Раствор амигдалина концентрације 1,25%. В садржи 2,338 додане гликозе.

Време	А		В	
	теоријски шећер	нађени шећер	теоријски шећер	нађени шећер
1 час.	0,701	0,594	0,683	0,383
4 »	0,881	0,665	0,899	0,397
19 »	0,899	0,884	0,899	0,842
50	—	—	0,866	0,842

Из овога прегледа може се закључити да додана гликоза не утиче на крајне вредности *теоријскога шећера и нађенога шећера*.

Ово што претходи односи се на делање фермената *Helix*-ова сока. Да видимо сада како гликоза утиче на хидролизу амигдалина под утицајем емулсина бадема. У идућем огледу употребљен је раствор амигдалина 2,2%. Раствор В садржи и 3,875% додане гликозе.

Време	А.		В.	
	t	n	t	n
1. час.	0,278	0,415	0,206	0,245
2,5 »	0,746	0,923	0,602	0,592

Додани шећер успорава дакле појављивање цијан-водоника (t) и редукујућег шећера (n), али је тај

утицај много знатнији према овоме последњему телу. Резултат тога биће да ће се онај вишак редукујућега шећера (према цијан-водонику) који се налази у току хидролизе амигдалина емулсином бадема, смањити под утицајем додане гликозе па чак и свести на нулу. То је случај за В после 2,5 часа кад је $t = n$. У том истом раствору, после 1 часа, видимо да је разлика између n и t много мања него у раствору А. Дакле гликоза успорава појављивање редукујућега шећера не само у акцији Helix-ова сока већ и у акцији емулсина бадема. Али пошто је у првој акцији $n < t$, а додана гликоза смањује вредност n , то ће $t - n$ под утицајем додане гликозе бити веће вредности у разним тренуцима реакције него у одговарајућим тренуцима реакције која се извршила без додане гликозе. У акцији пак емулсина бадема, имамо $n > t$, а како додана гликоза смањује n , резултат ће бити да ће вредност $n - t$ бити мања у току реакције која се врши у присуству додане гликозе. Видели смо да имамо у горњем огледу пример да је n постало једнако са t . Могућност није искључена да би се могло добити $n < t$, а то значи да би се начин хидролизе емулсином бадема свео на начин хидролизе Helix-овим ферментима. У неким случајевима добили смо заиста у хидролизи емулсином $n < t$, али је та разлика доста слаба, тако да не смемо тврдити да је изван граница могуће грешке.

В. Утицај цијан-водоника.

Цијан-водоник утиче готово незнатно на делање фермената амигдалина чак и онда када је додан у таквим количинама које су неколико пута веће од оне коју присутни амигдалин може дати потпуном

хидролизом. То важи за акцију Helix-ових ферментата као и за акцију емулсина бадема. Ево два примера за Helix-ове ферменте: раствор амигдалина 5‰; садржи у В. 0,243‰ додана CNH; температура 38°.

Време	А.		В.	
	t	n	t	n
1 час	0,935	0,440	0,935	0,420
4 часа	2,215	1,254	2,087	1,226
6 ч. 40 мин.	3,419	1,850	2,375	1,825

У идућем огледу употребљен је раствор амигдалина 1‰. В садржи 0,106‰ додана CNH; температура 38°.

Време	А.		В.	
	t	n	t	n
1 ч. 15 мин.	0,503	0 389	0,485	0,388
18 часова	0,783	0,773	0,719	0,730
43 часа	0,773	0,784	0,883	0,754

У првоме огледу CNH је додан од прилике у оној истој количини у којој се то тело појављује потпуном хидролизом амигдалинова раствора. У другом пак огледу додано је 0,106 CNH‰, а раствор амигдалина даје на крају реакције само 0,058 истог тела. У оба случаја видимо да је утицај цијан-водоника на ток ферментске хидролизе доста слаб. У почетку реакције, утицај није никакав. Доцније пак под утицајем CNH успорено је појављивање тога истог тела а можда и редукујућега шећера, али врло мало.

Цијан-водоник не разорава *Helix*-ове ферменте амигдалина: ставивши *Helix*-ов сок у додир са цијан-водоницом 24 часа, нашли смо да активност тога сока према амигдалину није била умањена. Вреди забележити ту неактивност према ферментима амигдалина, једнога тела као што је цијан-водоник који спада међу најјаче отрове живих организама, док утицај гликозе на делање истих фермената, као што видесмо, врло је знатан.

Као *Helix*-ови ферменти понаша се и емулсин бадема према цијан-водонику, као што показују следећи примери:

Раствор амигдалина 1,25%. Раствор В садржи 0,120 додана CNH. Температура 39°.

Време	А.		В.	
	t	n	t	n
1 ч. 45	0,503	0,610	0,539	0,589
24 ч.	0,827	0,816	0,827	0,816

У другоме огледу употребљен је раствор амигдалина 5%. В. садржи 0,240% доданог CNH.

Време	А.		В.	
	t	n	t	n
50 мин.	0,215	—	0,215	—
4 ч. 30	1,007	1,290	0,859	1,267

Пошто у овоме раду у главноме изучавамо однос између количина цијан-водоника и редукујућег шећера који су ослобођени ферментском хидролизом, значи да смо искључили могућност да ће ослобођени цијан-водоник и гликоза реаговати један на други.

Међутим знамо да та два тела нису без утицаја једно на друго (Kilian је показао да се шећери претварају под утицајем CNH у окси-киселине са већим бројем угљеникових атома; пошавши од тога E. Fischer је саградио шећере са 7, 8 и 9 угљеникових атома). Лако је уверити се да из једнога раствора цијан-водоника и гликозе, цијан-водоник брзо ишчезава а моћ редуковања смањује се. Али ако тај раствор садржи и бенз-алдехида, констатује се да CNH и редукујућа моћ остају непромењени бар за првих 24 часа. Пошто се шећер и CNH не налазе никада сами без извесне количине бенз-алдехида, то се може сматрати да у хидролизи амигдалина CNH и шећер не реагују један на други, бар за време трајања наших огледа.

С. Утицај бенз-алдехида.

Бенз-алдехид стављен извесно доба у додир са Helix-овим соком, смањује делатност овога према амигдалину. Када се раствору амигдалина дода у исто доба Helix-ов сок и неколико капи бенз-алдехида, посматра се такође да је хидролиза амигдалина много успорена под утицајем доданог бенз-алдехида. Тај утицај врши се вероватно не само на ферменат већ и на ферментску акцију. Успоравање које се констатује у томе случају, јесте резултат тих двају утицаја бенз-алдехида: на сам ферменат и на његово делање.

Ево једног огледа који показује да бенз-алдехид има утицаја на сам ферменат: стави се 7 с.с. разблажена Helix-ова сока у додир са 2 с.с. бенз-алдехида и остави се на температури лабораторије 24 часа. Тада се тај сок дода раствору амигдалина на температури 40°. Упоредно на истој температури дода

се истој количини раствора амигдалина 7 с.с. истога сока али који није био у додиру са бенз-алдехидом, већ му се у ономе тренутку када се стави у додир са амигдалином дода 2 с.с. бенз-алдехида. После 4 ч. 45 мин. резултат је овај.

А (сок који је био 24 ч. у додиру са $C_6H_5 COH$)
 $t = 0,719$; $n = 0,484$.

В ($C_6H_5 COH$ додан у почетку реакције) $t = 1,871$;
 $n = 1,320$.

У идућем огледу праћен је ток хидролизе амигдалина упоредно под утицајем Helix-ова сока без додатка бенз-алдехида (А) и уз додатак тог тела у тренутку када је сок стављен у додир са амигдалином. Концентрација употребљеног раствора амигдалина јесте око 10%. Раствору В додано је 3% чистог бенз-алдехида.

Време	А.		В.	
	t	n	t	n
1 час	0,647	0,266	0,215	0,206
2 ч. 8	1,885	—	—	—
2 ч. 42	1,727	0,794	—	—
3 ч. 10	—	—	0,495	0,358
4 ч. 5	2,231	1,122	—	—
4 ч. 20	—	—	0,575	0,484
19 ч.	4,246	2,700	2,807	0,740

Из ових резултата види се да бенз-алдехид јако успорава ферментску хидролизу амигдалина, и то да успорава и појављивање цијан-водоника (t) и појављивање моћи редуковања (n); али ову знатно више од првога. Тако после 1 ч. разлика између n (А) и n (В) много је мање вредности од разлике између t (А) и t (В). У В после 4 ч. 20, t је једнако 0,575 и томе одговара $n = 0,484$, док у А, после једног часа када је $t = 0,647$, тој вредности одговара $n = 0,267$ само

Управо речено, додавањем бенз-алдехида смањује се разлика на коју се налази у току хидролизе амигдалина под утицајем *Helix*-ових фермената, између теоријскога шећера (t) и нађенога шећера (n). У том погледу утицај бенз-алдехида је супротног правца од утицаја гликозе која, као што смо видели повећава вредност разлике $t - n$.

Изучили смо и утицај мешавине цијан-водоника и бенз-алдехида на хидролизу амигдалина *Helix*-овим ферментима. Та су два тела употребљена у сразмери у којој их амигдалин даје потпуном хидролизом; добивана су дестиловањем хидролизованог раствора амигдалина. Ево једног примера утицаја CNH и C_6H_5COH . Раствор амигдалина око 2,50%. В садржи додани CNH и C_6H_5COH . Температура 37° .

Време	А.		В.	
	t	n	t	n
3 ч. 15	0,935	0,742	0,319	0,308
5 ч. 30	—	—	0,775	0,742

Као што се могло очекивати према ономе што знамо о посебном утицају CNH и C_6H_5COH , њихов истовремени утицај своди се на успоравање појављивања цијан-водоника и моћи редуковања, али нарочито цијан-водоника; тако да разлика између t и n постаје мања. У наведеном примеру, у В, t је готово једнако са n . Случајем смо у томе огледу нашли да је за В, n после 5 ч. 30 мин. једнако са n у А после 3 ч. 12 мин; тим истим вредностима пак одговара у А, $t = 0,935$, а у В, $t = 0,775$.

У неколико случајева нашли смо да је под утицајем CNH и C_6H_5COH , у хидролизи амигдалина *Helix*-овим соком, t постало мање од n , тако да је хидролиза постала слична оној која се добива емулсином бадема.

Закључци.

1. У току хидролизе амигдалина емулсином бадема или Helix-овим соком, цијан водоник и моћ редуковања не појављују се у теоријској разреми (1 мол. CNH: 2 мол. гликозе) на коју се наилази када је ферментска реакција довршена.

2. У току хидролизе амигдалина Helix-овим соком, моћ редуковања слабија је од теоријске према нађеном цијан-водонику у истоме тренутку. Кад хидролизу врши емулсин бадема, моћ редуковања у току реакције јача је од теоријске према нађеном цијан-водонику у истоме тренутку.

3. Однос између моћи редуковања и цијан-водоника у разним тренуцима реакције, није једна непроменљива ствар, већ се на њ може утицати и мењати његову вредност.

4. На тај однос утичу: концентрација раствора амигдалина, количина фермента, продукти хидролизе (гликоза, цијан водоник и бенз-алдехид).

5. Употребљујући та средства успели смо да повољи мењамо, до извесних граница, однос у коме се појављују цијан-водоник и моћ редуковања.

6. Противно ономе што се зна о утицају концентрације раствора на ферментске акције, брзина појављивања моћи редуковања под утицајем Helix-ова сока, расте када почетна концентрација амигдалина опада. Под утицајем емулсина бадема, цијан-водоник се брже појављује из раствора амигдалина слабије концентрације. Та се факта објашњавају тиме што је у првоме случају појављивање моћи редуковања, а у другоме, појављивање цијан-водоника, резултат секундарног ферментског делања.

(Из Физиолошкога Завода Университета у Београду).



