

Б. А. РУБИН, Н. М. СИСАКЯН и О. Т. ЛУТИКОВА

**ОБ ИЗМЕРЕНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ ЖИВОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ**

(Представлено академиком А. Н. Бахом 23 IV 1937)

Как известно, Szent Györgyi в 1931 г. (1) показал, что ткани капусты обладают способностью осуществлять окисление витамина С и что эта способность обусловлена присутствием особого биологического катализатора. Позднее аналогичный фермент был обнаружен Zilva (2) в яблоках и Tauber, Kleiner и Mishkind (3) в тыкве.

В работе Страчицкого и Рубина (4) показано, что энзим, подобный обнаруженному S. Györgyi в капусте, обладает значительно более широким распространением и в частности был обнаружен этими авторами в цветной капусте, салате и огурцах. В этой же работе была установлена способность живой растительной ткани восстанавливать известную часть введенной в нее аскорбиновой кислоты, предварительно окисленной кислородом в присутствии раствора энзима\*.

Наличие подобной же системы было доказано в самое последнее время Ткаченко для целого ряда рас молочнокислых бактерий [*B. bulgaricus*, *B. acidophilus*, *B. Leichmanni* (5)].

К изложенному следует присоединить и все увеличивающееся число фактов, которые свидетельствуют об исключительном распространении самой аскорбиновой кислоты в растительном мире.

Так, до сего времени почти неизвестны случаи, когда при исследовании зеленых частей какого-либо растения на присутствие в них витамина С были бы получены отрицательные результаты.

Перечисленные факты позволяют думать, что как аскорбиновой кислоте, так и превращениям ее в клетках растения должна принадлежать повидимому важная роль. К сожалению прямые исследования в этой области весьма немногочисленны.

Из уже опубликованных по этому вопросу работ можно лишь сослаться на исследования Рубина и Страчицкого, которые показали, что увеличение содержания аскорбиновой кислоты в живой ткани капусты (витамин

\* Аскорбиновая кислота в этих опытах вводилась в ткани методом вакуум-инfiltrации тотчас же по ее окислении, т. е. вся она находилась в дегидро- или обратимо-окисленной форме.

С вводился методом вакуум-инfiltrации) влечет за собой весьма заметное усиление дыхания.

Еще более убедительны данные Энгельгардта и Букина (6), которые установили, что скорость окисления витамина С в значительном числе случаев соответствует общей энергии дыхательного процесса в исследуемом объекте и нередко даже превышает ее. Авторы, правда, подчеркивают, что из этого правила имеются исключения, которые не позволяют смотреть на витамин С, как на дыхательный механизм универсального типа.

Интересными следует признать также данные работы Гудлет и Кардо-Сысоевой (7), которая была опубликована уже после завершения экспериментальной части нашей работы. Названные авторы показали, что скорость окисления аскорбиновой кислоты в водных вытяжках из тканей растений у различных групп последних различна и зависит от активности окислительной системы растения.

Таким образом уже из обзора весьма немногочисленных работ, посвященных биологической роли витамина С в растении, вырисовывается громадное значение этого соединения, а также и тех окислительно-восстановительных процессов, которые связаны с превращениями витамина и переходом из одной его формы в другую.

Идя по пути дальнейшего изучения этой проблемы, мы считали необходимым в первую очередь разработать метод определения окислительно-восстановительной способности живой растительной ткани, используя в качестве субстрата для соответствующих агентов клетки аскорбиновую кислоту. В этом случае изучение окислительного режима в клетках растения, которое и сейчас уже широко проводится в ряде лабораторий, получило бы значительно большую конкретность, так как оно привязывается к субстрату, биологическое значение которого, если еще не расшифровано полностью, то по крайней мере не оставляет сомнений.

Разработка этого метода рассматривается нами как первый этап изучения биологической роли и значения окислительных ферментов и всей суммы процессов, протекающих под их непосредственным влиянием. Первым результатам начатой нами работы и посвящена предлагаемая статья.

**Методика работы.** Раствор аскорбиновой кислоты\* применялся нами в концентрации 0.5 мг в 1 мл. Введение ее в ткани растений осуществлялось методом вакуум-инfiltrации, причем был использован принцип, положенный Курсановым в основу разработанного им метода определения активности сахаразы в живой ткани (8). Тотчас же после инfiltrации аскорбиновой кислоты пластинки листьев приводились в фене к первоначальному весу, вслед за чем в одной порции листьев производилось определение содержания аскорбиновой кислоты, а вторая порция оставлялась на 24 часа во влажном эксикаторе при +20—22°, после чего в ней также производилось определение содержания витамина С.

При определении восстанавливающей способности тканей в последние вводилась обратимо-окисленная форма витамина С, которая получалась следующим образом: через раствор витамина, к которому прибавлялось некоторое количество сока яблок, в течение получаса пропускался кислород. Пропускание кислорода прекращалось после исчезновения редуцирующей способности раствора.

Самое определение витамина С производилось методом Тильманса, улучшенным Девятниным (9).

\* Кристаллический препарат Szent Györgyi, полученный нами от акад. А. Н. Баха.

Все приводимые ниже цифры выражены в миллиметрах 0.001 *N* раствора краски 2.6-дихлорфенолиндофенола в пересчете на 10 г живых листьев за 24-часовую экспозицию.

I с е р и я о п ы т о в. В этом ряду опытов изучалась восстанавливающая способность листьев по отношению к инфильтрированной в их ткани обратимо-окисленной аскорбиновой кислоте.

Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Растения	Содержание витамина С в ткани листьев тотчас же после инфильтрации обратимо-окисленного витамина	То же через 24 часа после инфильтрации	Разница (количество витамина С, восстановленного живой тканью за 24 часа)
Капуста Амагер . . . . .	26.8	36.4	9.6
Цикламен ( <i>Cyclamen Persicum</i> ) .	30.8	32.4	1.6
Гортензия ( <i>Hydrangea Hortensia</i> )	33.0	45.8	12.8
Кукуруза ( <i>Zea Mais</i> ) . . . . .	2.4	4.4	2.0

Из табл. 1 видно, что наиболее энергичной способностью восстанавливать дегидро-форму аскорбиновой кислоты обладают листья гортензии и капусты. Очень мало активными в этом отношении оказались листья цикламена и кукурузы.

II с е р и я о п ы т о в. В ряде опытов, данном в табл. 2, изучалась энергия окисления витамина С в живой ткани (потеря редуцирующей способности).

Таблица 2

Растения	Содержание витамина С в ткани (исходное состояние)	То же через 24 часа	Разница (количество витамина С, окисленного в живой ткани за 24 часа)
Капуста Амагер . . . . .	39.6	26.8	12.8
Цикламен ( <i>Cyclamen Persicum</i> ) .	37.0	30.8	6.2
Гортензия ( <i>Hydrangea Hortensia</i> )	39.0	17.6	21.4

Из цифр видно, что и в этом случае удается установить вполне четкие отличия между листьями отдельных растений.

Несмотря на исключительно высокую редуцирующую способность аскорбиновой кислоты окисление последней в живой ткани протекает, как известно, крайне медленно по видимому благодаря присутствующим здесь мощным защитным системам [см. например Green<sup>(10)</sup>]. Окисление в этих условиях удается вызвать лишь в результате сильного смещения существующего в ткани равновесия между окисленной и восстановленной формой витамина, например путем инфильтрации.

Вследствие указанных фактов, мы провели наблюдения над окислением витамина в растертой ткани.

Опыты проводились следующим образом: брались две параллельные навески исследуемого материала, в одной из них производилось определение витамина С обычным путем, другая же навеска растиралась в ступке с толченым стеклом точно в течение 10 мин. Вслед за тем растертая кашица заливалась кислотой для прекращения работы фермента, и производилось определение содержания витамина С.

В табл. 3 приводятся некоторые из полученных нами данных.

Таблица 3

Растения	Контроль (исходное со- держание ви- тамина С)	Содержание ви- тамина С после 10-минутного действия окси- дазы	Энергия окисления витамина С
Капуста Амагер . . . . .	37.2	18.0	19.2
Цикламен ( <i>Cyclamen Persicum</i> ) .	32.4	24.4	8.0
Гортензия ( <i>Hydrangea Hortensia</i> )	40.4	4.2	36.2
Кукуруза ( <i>Zea M. is</i> ) . . . . .	4.8	2.2	2.6

Сопоставление этих цифр с данными по окислению витамина в живой ткани позволяет убедиться в том, что порядок расположения растений по силе окислительной способности ткани их листьев является в обоих случаях в общем очень близким. С нашей точки зрения предпочтение должно быть отдано методу окисления в растертой ткани, требующему для определения небольшого количества времени.

Дальнейшего упрощения этого метода мы предполагаем добиться путем работы с водными вытяжками фермента, получаемыми обычными приемами. Последнее позволит во много раз снизить расход аскорбиновой кислоты и сделает метод более доступным.

К интересным результатам приводит сопоставление энергий окисления и восстановления в тканях различных растений (табл. 4).

Таблица 4

Растения	Окислитель- ная способ- ность	Восстанови- тельная спо- собность	Отношение окислительной к восстано- вительной
Капуста Амагер . . . . .	19.2	9.6	2.0
Цикламен ( <i>Cyclamen Persicum</i> ) .	8.0	1.6	5.0
Гортензия ( <i>Hydrangea Hortensia</i> )	36.2	12.8	2.8
Кукуруза ( <i>Zea Mais</i> ) . . . . .	2.6	2.0	1.3

С помощью предлагаемого нами метода, как это видно из цифр, удается установить весьма четкие различия между растениями по их окислительно-восстановительной способности. Дальнейшее улучшение и усовершенствование метода, над которым мы сейчас работаем, позволит привлечь его к решению ряда весьма важных и практически и теоретически вопросов.

Институт биохимии  
Академии Наук СССР.  
Москва.

Поступило  
23 IV 1937.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> Szent Györgyi, Journ. Biol. Chem., 40, 385 (1931). <sup>2</sup> Zilva, Bioch. Journ., 28, 633 (1934). <sup>3</sup> Tauber, Kleiner u. Mishkind, Journ. Biol. Chem., 110, 211 (1935). <sup>4</sup> Страчицкий и Рубин, Биохимия, I, 6 (1936). <sup>5</sup> Каченко, Биохимия, I, 5 (1936). <sup>6</sup> Энгельгардт и Букин, Биохимия, II, 2 (1937). <sup>7</sup> Гудлет и Кардо-Сысоева, ДАН, XIV, 5 (1937). <sup>8</sup> Курсанов, Биохимия I, 3 (1936). <sup>9</sup> Девятинн, ДАН, III, 4 (1935). <sup>10</sup> Green, Bioch Journ., 27, 4 (1933).