

С. Я. ДАВЫДОВА и А. С. КОНИКОВА

МЕХАНИЗМ ПРЕВРАЩЕНИЯ ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ МАЛИКОДЕГИДРАЗЫ

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 14 II 1948)

А. С. Кониковой, М. Г. Крицман и Р. В. Тейсс (1), а также А. С. Кониковой, Н. Н. Добберт и А. Е. Браунштейном (2) было установлено, что при действии аминотрансферазы на аминокислоты перенос α -водорода аминокислоты на кетокислоту происходит путем лабильзации α -водорода и его обмена на водород среды, причем этот процесс при определенных условиях может происходить и в отсутствие акцептора аминокислоты.

Согласно представлению упомянутых авторов, лабильзация α -водорода является первым моментом воздействия аминотрансферазы на субстрат.

В связи с этим в данной работе мы исследовали вопрос, является ли лабильзация α -водорода, предшествующая осуществлению реакции, свойством только аминотрансферазы, или же проявляется также при действии других ферментов; в частности, мы исследовали механизм превращения яблочной кислоты при действии фермента маликодегидразы.

Так как маликодегидраза является двухкомпонентным ферментом, осуществляющим превращение яблочной кислоты в щавелевоуксусную только при участии кофактора, которая является при этом первым акцептором водорода, мы исследовали также и роль кофактора в наблюдаемом нами явлении.

Опыты проводились в среде, содержащей тяжелую воду, конечная концентрация которой равнялась 20%. О лабильности α -водорода яблочной кислоты судили по вхождению в нее тяжелого водорода.

Работа проводилась с очищенной (3) маликодегидразой из свиных сердец. Степень очистки примененного препарата равна 70%.

В этом препарате фермент фумараза* полностью отсутствовал. Активность фермента измерялась в отдельных пробах по скорости обесцвечивания метиленовой сини.

Превращение яблочной кислоты в щавелевоуксусную является обратимым процессом, однако продукт этой реакции — щавелевоуксусная кислота — сильно его тормозит. Для устранения этого явления щавелевоуксусная кислота связывалась с цианистым калием, причем процесс окисления яблочной кислоты становится необратимым.

Опытные пробы состояли из яблочной кислоты, маликодегидразы, кофактора, цианистого калия и 20% тяжелой воды. Акцептор водорода (метиленовая синь) в реакционной смеси отсутствовал.

* Фумараза катализирует обратимую реакцию превращения фумаровой кислоты в яблочную.

Инкубация проб проводилась в аппарате Варбурга в течение 90 мин. при 38° С. Величина окисления яблочной кислоты в щавелевоуксусную определялась по поглощению кислорода. Не превратившаяся во время инкубации часть яблочной кислоты сжигалась, и в воде, полученной после ее сжигания, очищенной по способу Briscoe и др. (4), определялось содержание тяжелого водорода денсиметрическим методом.

Таблица 1

Энзиматическая лабилизация α -водорода яблочной кислоты.

(Состав проб: 1500 μ М яблочной кислоты, 3 мг козимазы, 19 мг цианистого калия, тяжелая вода = конечная концентрация 20%. Общий объем пробы 2 $\frac{1}{2}$ мл; рН=7,0; инкубация при 38° — 90 мин. Белки осаждались 10% раствором NaWO₄ и $\frac{2}{3}$ N раствором H₂SO₄)

№ проб	Фермент * в мл	Кипяченый фермент в мл	Козимаза в мг	Окисление яблочной кислоты в μ М	Атом. % избытка D
1	0,8	—	3	8	0,237
2	0,8	—	—	1,8	0,298
3	—	0,8	3	1,1	0,01
4	—	0,8	—	1	0,00
5	0,8	—	3	без инкубации	0,00

* 0,8 мл применяемого нами ферментного препарата маликодегидразы в присутствии яблочной кислоты и козимазы обесцвечивают метиленовую синь в течение 7 мин., контрольная проба не обесцвечивается.

Из представленных в табл. 1 данных следует, что лабилизация α -водорода яблочной кислоты и обмен его на дейтерий среды осуществляется в присутствии маликодегидразы, отсутствие козимазы не препятствует этому процессу.

Таким образом, соответствующее перемещение электронов в молекуле яблочной кислоты с последующей лабилизацией α -водорода осуществляется маликодегидразой без участия кофермента, что соответствует представлению Я. О. Парнаса (5) о роли фермента в каталитических реакциях.

В нашей постановке опыта 10% водорода яблочной кислоты обмениваются в течение 90 мин. на тяжелый водород среды. Если фермент инактивирован кипячением, то лабилизация α -водорода не имеет места.

Эти данные отличаются от наблюдений в работе А. С. Кониковой, Н. Н. Добберт и А. Е. Браунштейна, отмечающих способность кипяченой аминоферазы осуществлять лабилизацию α -водорода аминокислот.

Из табл. 1 следует, что окисление яблочной кислоты проходит в очень незначительной степени, а именно из добавленных 1500 μ М (яблочной кислоты) превратилось лишь 8 μ М. Такое незначительное окисление яблочной кислоты объясняется отсутствием в среде акцептора водорода.

Так как в условиях нашего опыта ферментная реакция может идти только в сторону образования щавелевоуксусной кислоты и обратная реакция предотвращена связыванием щавелевоуксусной кислоты цианистым калием, то полученные величины по вхождению дейтерия из среды в яблочную кислоту относятся в основном к неокисленной части яблочной кислоты.

В этом же направлении опубликованы недавно данные о лабилизации α -водорода в янтарной кислоте под влиянием сукцинодегидразы, в отсутствие акцептора водорода (6).

Таким образом, можно сделать вывод, что под влиянием фермента маликодегидразы происходит лабилизация α -водорода и обмен его на водород воды.

Роль фермента в этом процессе сводится, очевидно, к ослаблению в молекуле связей между углеродом и водородом, находящимся в α -положении, подобно тому, как это происходит при действии аминотрансферазы на аминокислоты.

На этом этапе действия фермента козимаза не принимает участия.

Лаборатория физиологической химии
Академии Наук СССР

Поступило
11 II 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. С. Коникова, М. Г. Крицман и Р. В. Тейсс, Биохимия, 7, 86 (1942). ² А. С. Коникова, Н. Н. Добберт и А. Е. Браунштейн, Биохимия, 12, 556 (1947). ³ F. V. Straub, Z. physiol. Chem., 275, 63 (1942). ⁴ H. J. Emeleus, F. W. James, A. King, T. G. Pearson, R. H. Purcell and H. V. A. Briscoe, J. Chem. Soc. (London), 1207 (1934). ⁵ Я. О. Парнас, Усп. совр. биол., 16, 225 (1943). ⁶ E. O. Weinmann, M. G. Morenhouse and R. I. Winrier, J. Biol. Chem., 168, 717 (1947).