

В. Л. КРЕТОВИЧ и А. А. БУНДЕЛЬ
СИНТЕЗ АЛАНИНА В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

(Представлено академиком А. И. Опариным 24 I 1948)

Вопрос о путях синтеза аминокислот в растительной клетке почти не подвергался экспериментальному исследованию, и существующие взгляды основаны главным образом на аналогиях, исходящих из данных, полученных при изучении белкового обмена в животном организме (1). В настоящее время, на основании опытов Эйлера с сотрудниками (2), показавших синтез глутаминовой кислоты из α -кетоглутаровой кислоты и аммиака, а также неубедительных данных Виртанена и Тартанена (3) о возможности синтеза в растительных тканях аспарагиновой кислоты из фумаровой под влиянием аспартазы и, наконец, факта наличия в растительной клетке процесса энзиматического переаминирования (4), наиболее распространена следующая схема синтеза аминокислот в растении.

Согласно этой схеме принимается, что восстановительное аминирование кетокислот по Кноопу — Остерлину в растительной клетке идет с достаточной интенсивностью лишь в случае щавелевоуксусной и α -кетоглутаровой кислот: образовавшиеся из них аспарагиновая и глутаминовая кислоты далее путем энзиматического переаминирования дают начало другим аминокислотам. Так например, Мотес (5), подводя итоги нашим знаниям в области химизма синтеза амидов в растении, приходит к заключению, что синтез аминокислот путем прямого аминирования кетокислот аммиаком либо не идет вовсе, либо идет с большим трудом. Подобная точка зрения разделяется многими исследователями. С другой стороны, еще С. Костычев (6) указывал на то, что в растении прямое аминирование кетокислот аммиаком — «это общий способ первичного построения не только аспарагиновой кислоты, но всех вообще аминокислот. В пользу этого предположения можно привести пока только косвенные факты, но осуществить прямые опыты вполне возможно». Точно так же Чибнелл (7) в своей монографии, посвященной белковому обмену в растении, давая схему путей синтеза аминокислот, считает одинаково вероятным как путь, идущий через прямое аминирование кетокислот, так и путь, предполагающий на первой стадии прямое аминирование щавелевоуксусной и α -кетоглутаровой кислот, а на последующих стадиях образование аминокислот при помощи энзиматического переаминирования за счет образовавшихся ранее дикарбоновых аминокислот и соответствующих кетокислот.

Задачей настоящей работы было экспериментальное исследование условий синтеза аланина из пирувата в растертых и живых тканях растений. Опыты велись, в основном, с этиолированными проростками люпина и тыквы, длиной в среднем 12—15 см. Эти два объекта были взяты как характерные представители двух типов азотистого обмена растений, накапливающих при прорастании аспарагин (люпин) и в рав-

ной мере как аспарагин, так и глутамин (тыква). Опыты с живыми тканями осуществлялись с помощью разработанного А. Курсановым (8) метода вакуум-инfiltrации соответствующих растворов в ткани проростков с последующей экспозицией. После инфiltrации и экспозиции проростки растирались с трихлоруксусной кислотой и в полученном экстракте углеводы осаждались сульфатом меди и известковым молоком.

При работе с кашцей мы исходили из прописи Альбаума и Коге-на (9). Проростки растирались с двууглекислой содой и фосфатным буфером (рН = 8,7), к 1 г кашицы прибавлялись растворы соответствующих субстратов (по 0, 3 мл) или воды (в случае контроля) при общем объеме 0,6 мл; смесь затем выдерживалась в течение 1,5 час. в бане при 37°C, после чего обрабатывалась трихлоруксусной кислотой, а полученный фильтрат — сульфатом меди и известковым молоком.

Определение аланина производилось нами по методу Фромажо — Гейтца в модификации Браунштейна — Бычкова (10) с усовершенствовани-

ем, предложенным Баркером и Саммерсоном для повышения интенсивности и постоянства окраски при реакции образующегося ацетальдегида с *p*-оксидифенилом (11), и сводилось к следующему. Дезаминирование, окисление и улавливание ацетальдегида производят по указанной прописи (10). Из жидкости в приемнике, доведенной до 10 мл, берут на определение 1 мл в широкую пробирку, прибавляют 0,05 мл 4% раствора $CuSO_4$ и 6 мл концентрированной H_2SO_4 , помещают в кипящую воду на 1 мин., затем опускают в холодную воду на 10—15 мин., прибавляют 0,1 мл щелочного раствора *p*-оксидифенила,

Таблица 1

Образование аланина в тканях проростков люпина

| Субстрат | Аланин в мг на 10 г сухого вещества | |
|---|--|---|
| | Кашка; экспозиция 1,5 часа; рН = 8,5; концентрация субстратов 0,0187 M | Вакуум-инfiltrация; экспозиция 24 часа; инfiltrировались 0,1 M растворы |
| Контроль нулевой . . . | 11,6 | — |
| Контроль с водой . . . | 14,0 | 3,4 |
| Пируват аммония . . . | 51,0 | 24,3 |
| Пируват аммония + глю-таминат аммония . . . | 209,0 | 26,5 |

диспергируют осадок возможно быстрее и равномернее, помещают пробирку в стакан с водой при 30° на 30 мин., затем погружают ее в кипящую воду на 90 сек., вынимают, быстро охлаждают до комнатной температуры и производят определение в штупенфотометре при толщине слоя, равной 1 см, и светофилтре S-57 (1,5% раствор *p*-оксидифенила готовится растворением сухого препарата в 5% NaOH при растирании и подогревании на водяной бане и температуре не выше 30° с последующим разведением до окончательной концентрации щелочи 0,5%).

В исследуемом растворе производят контрольное окисление молочной кислоты без дезаминирования, определяют образовавшийся ацетальдегид и результат определения вычитают из результата основного определения.

Каждая серия опытов сопровождалась контрольными определениями аланина как в исходном материале (контроль нулевой), так и в том же материале с добавленной к нему или инfiltrированной в него водой после соответствующей экспозиции (контроль с водой). Результаты опытов с проростками люпина представлены в табл. 1.

Из данных, приведенных в табл. 1, совершенно очевидно, что как в растертых, так и в живых тканях проростков люпина идет интенсивное образование аланина из пирувата аммония. Вместе с тем ясно, что одновременное введение в кашу или в живые ткани пирувата и глютамината повышает интенсивность синтеза аланина. Это особенно ярко видно из данных, полученных в опыте с растертыми тканями.

По этой же схеме нами был проведен опыт с живыми проростками кукурузы, выбранной в качестве типичного представителя растений, накапливающих в семенах главным образом углеводы. Результаты анализов представлены в табл. 2.

Таким образом, опыт с кукурузой также ясно свидетельствует о значительном усилении синтеза аланина при введении пирувата в живые ткани проростка и еще большем усилении этого процесса при одновременном введении с пируватом также и глютамината.

С целью выяснения вопроса о том, как во времени протекает процесс образования живыми тканями аланина из пирувата, мы поставили специальный опыт с проростками люпина, в одну порцию которых инфильтровалась вода, а в другую — пируват аммония (0,1 M раствор). Результаты определений аланина в проростках после разных сроков экспозиции приведены в табл. 3.

Данные табл. 3 свидетельствуют о том, что наибольшее накопление аланина при введении в проростки пирувата аммония наблюдается при 6-часовой экспозиции. По-

Таблица 3

Образование аланина при инфильтрации пирувата в проростки

| Экспозиция в часах | Аланин в мг на 10 г сухого вещества | |
|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| | Инфильтрация воды | Инфильтрация пирувата аммония |
| Контроль нулевой . . . | 0,2 | 0,2 |
| 2 | 0,1 | 2,7 |
| 6 | 5,4 | 33,6 |
| 24 | 3,0 | 6,0 |
| 48 | 0,3 | 6,9 |

Таблица 2

| Субстрат | Аланин в мг на 10 г сухого вещества |
|---|-------------------------------------|
| Контроль с водой . . | 7,1 |
| Пируват аммония . . | 15,7 |
| Пируват аммония + + глютаминат аммония | 27,9 |

этому в дальнейших опытах с живыми проростками мы придерживались именно этого срока экспозиции.

Опыты с проростками тыквы были проведены нами по более широкой схеме — нас интересовало сравнение интенсивности образования аланина при введении в кашу или живые ткани не только аммонийных, но также натриевых солей пировиноградной и глютаминовой кислот. Результаты соответствующих опытов представлены в табл. 4.

Данные, приведенные в табл. 4, еще раз подтверждают факт интенсивного образования аланина из пирувата в растительных тканях. Сопоставление данных, полученных с пируватом натрия и пируватом аммония, приводит к заключению о том, что как в растертых, так и в живых тканях проростков имеет место прямое аминирование пирувата, которое идет особенно интенсивно в присутствии избытка аммония.

Вместе с тем из всех наших опытов совершенно очевидно, что введение в растертую или живую ткань проростков дикарбоновой аминокислоты одновременно с пировиноградной кислотой вызывает резкое

усиление синтеза аланина, обусловленное интенсивно протекающим процессом энзиматического переаминирования. Наконец, обращает на себя внимание тот факт, что в живых тканях интенсивность образования аланина в несколько раз меньше, чем в кашнице. Можно было бы думать, что дело заключается в недостаточном количестве вводимых в живые ткани субстратов. Однако простой расчет показывает, что это не так. Действительно, в опыте с инфильтрацией пирувата аммония в проростки тыквы на 20 г проростков при влажности 90%_в было введено 1,28 г 0,1 М раствора пирувата аммония. Следовательно, на 10 г

Таблица 4

Образование аланина в тканях проростков тыквы

| Субстрат | Аланин в мг на 10 г сухого вещества | |
|--|--|---|
| | Кашница; экспозиция 1,5 часа; pH = 8,6; концентрация субстратов 0,0187 М | Вакуум-инфильтрация; экспозиция 5 час.; инфильтративный раствор 0,1 М |
| Контроль нулевой . . . | 2,8 | 5,3 |
| Контроль с водой . . . | 4,3 | 10,4 |
| Пируват натрия | 39,6 | 12,6 |
| Пируват аммония | 77,4 | 14,6 |
| Пируват натрия + глютаминат натрия | 135,8 | 15,7 |
| Пируват аммония + глютаминат аммония . . . | 135,8 | 21,4 |

сухого вещества было введено 67,2 мг пирувата аммония. Таким образом, различие интенсивности синтеза аланина в кашнице и живых тканях обусловлено тем, что несмотря на избыток субстратов, вводимых при вакуум-инфильтрации в межклетники живых тканей, эти последние, проявляя свойственную живой клетке избирательную проницаемость плазмы и координацию энзиматических реакций, активно регулируют процесс синтеза аланина, не давая протекать ему слишком энергично. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в тканях проростков синтез аланина (аминокислоты, играющей весьма существенную роль в обмене) осуществляется не только

путем реакции переаминирования через дикарбоновые аминокислоты, но также путем прямого аминирования пировиноградной кислоты аммиаком. Небезынтересно отметить, что в отношении дрожжей прямое аминирование кетокислот с образованием аланина было показано Фромажо и Минаром (12).

Задачей нашей дальнейшей работы является исследование условий синтеза аланина в тканях созревающего колоса — органа, являющегося прекрасным объектом для изучения синтетических реакций *in vivo*.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии Наук СССР

Поступило
24 I 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 Д. Прянишников, Азот в жизни растений и земледелии СССР, 1945.
- 2 E. Adler, N. Das, H. Euler u. H. Neuman, C. R. Lab. Carlsberg, s. chim., 22, 15 (1938); E. Adler, G. Günther u. J. Everett, Z. physiol. Chem., 255, 27 (1938).
- 3 A. Virtanen u. J. Tartanen, Biochem. Z., 250, 193 (1932).
- 4 А. Браунштейн, Успехи совр. биохимии, 1, 40, 1947.
- 5 K. Mothes, Planta, 30, 726 (1940).
- 6 С. Костычев, Физиология растений, 1, 347 (1933).
- 7 A. Chib-pall, Protein Metabolism in the Plant, 1938.
- 8 А. Курсанов, Обратимое действие ферментов в живой клетке, 1940.
- 9 H. Albaum and P. Cohen, J. of bioel. Chem., 149, 19 (1943).
- 10 А. Браунштейн и С. Бычков, Биохимия, 8, 2314 (1943).
- 11 S. Barker and W. Summerson, J. of biol. Chem., 138, 535 (1941).
- 12 C. Fromageot et G. Minard, Bull. Soc. Chimie Biol., 18, 1454 (1936).