

В. Л. КРЕТОВИЧ и А. А. БУНДЕЛЬ

ОБРАЗОВАНИЕ АЛАНИНА В РАСТЕНИИ ПУТЕМ ПРЯМОГО АМИНИРОВАНИЯ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 6 VII 1950)

Образование α -аминокислот из аммиака и α -кетокислот у растений почти не изучено. До сих пор было распространено мнение, что восстановительное аминирование кетокислот в растительной клетке происходит лишь в случае щавелевоуксусной и α -кетоглутаровой кислот (1). Предполагалось, что образовавшиеся из них аспарагиновая и глутаминовая кислоты далее, путем энзиматического переаминирования, дают начало другим аминокислотам. Мотес (2) пришел к заключению, что синтез аминокислот в растении путем прямого аминирования кетокислот аммиаком либо не идет вовсе, либо идет с большим трудом. Подобная точка зрения разделяется многими исследователями.

В предыдущей работе (3) нами впервые было обнаружено, что в живых тканях этиолированных проростков люпина и тыквы, наряду с образованием аланина вследствие энзиматического переаминирования аспарагиновой и глутаминовой кислот с пировиноградной кислотой, идет его интенсивное образование путем прямого аминирования этой кетокислоты аммиаком. То же наблюдалось и в растертых тканях.

Таким образом было установлено, что образование столь важной аминокислоты, какой является аланин, происходит в растительном организме не только путем переаминирования, но и путем прямого аминирования пировиноградной кислоты. Это дает возможность предполагать, что и образование других α -аминокислот может идти этим же путем.

Растертые ткани представляют собой весьма сложную смесь различных структурных элементов тканей, состоящую из растворимых и нерастворимых в воде белков, углеводов и других веществ. Для того чтобы выяснить, сохраняется ли исследуемая нами способность к аминированию пирувата в вытяжках, полученных при отфильтровывании растертых с фосфатным буфером тканей, мы произвели следующие опыты.

К 6 г этиолированных проростков тыквы, тщательно растертых с прибавлением песка, 0,3 г двууглекислой соды и 6 мл фосфатного буфера с рН 8,67, добавлялось 4 мл воды, смесь оставлялась на 30 мин. при постоянном размешивании и центрифугировалась. Мутная жидкость отфильтровывалась через бумажный фильтр до получения прозрачного фильтрата. В одну пробирку помещали 1 мл вытяжки и 0,6 мл дистиллированной воды, в другую — 1 мл вытяжки, 0,3 мл дистиллированной воды и 0,3 мл раствора пировинограднокислого аммония (концентрация пировинограднокислого аммония в реакционной смеси 0,0187 М). Обе пробирки с содержимым погружались в водяной термостат при температуре 37° на 90 мин., после чего белки осаждались трихлоруксусной кислотой и затем углеводы — сернокислой медью и известковым молоком. В фильтрате производилось определе-

ние аланина по прописи, уже изложенной нами в предыдущей работе (3). Полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Образование аланина вытяжками из проростков тыквы
(мг аланина на 6 г проростков)

Вариант вытяжки с добавлением	Опыт 1		Опыт 2			
	Сразу после получения вытяжки				Через 20 час. после получ. вытяжки	
	абс.	прирост	абс.	прирост	абс.	прирост
Воды	2,08	3,36	0,50	1,18	0,53	0,62
Пирувата аммония	5,44		1,68		1,15	

Как видно из приведенных данных, прибавление пирувата аммония к вытяжкам приводит к интенсивному образованию аланина. Интересно отметить, что в опыте 1, проведенном с более молодыми проростками, оно было втрое больше, чем в опыте 2, для которого проростки были взяты позднее. С другой стороны, в опыте 2 та же вытяжка после 20 час. хранения на холодильнике при $+8^{\circ}$ становилась менее активной — аланин образовывался из пирувата аммония при ее прибавлении менее интенсивно.

Данные этого опыта показывают, что способностью синтезировать аланин непосредственно из пировиноградной кислоты и аммиака обладают не только живые или растертые ткани растений, но и фосфатные вытяжки из растертых этиолированных проростков.

В вытяжках из растительного материала всегда присутствует довольно значительное количество свободных аспарагиновой и глутаминовой кислот (4). Кроме того, в этих вытяжках всегда присутствует, хотя и в весьма незначительном количестве, свободный аммиак. Поэтому представлялась не исключенной возможность образования в опытах с вытяжками некоторого количества аланина за счет переаминирования, т. е. переноса аминогрупп, присутствующих в вытяжках дикарбоновых аминокислот, на добавленную пировиноградную кислоту, а также ее прямого аминирования собственным аммиаком вытяжки. Чтобы учесть оба эти фактора, мы провели следующие опыты. Тем же способом, как описано выше, были получены вытяжки из проростков тыквы и поставлены опыты, но в одну пробирку был прибавлен пируват аммония, а в другую пируват натрия. Третья пробирка с водой вместо пирувата служила контролем. Результаты этих опытов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Образование аланина вытяжками из
проростков тыквы за счет прямого
аминирования (мг аланина на 6 г
проростков)

№ опыта	Вариант: вытяжка с добавлением	Абс.	Прирост
1	Воды	1,76	0,16
2	Пирувата натрия	1,92	
3	Пирувата аммония	2,64	0,72

При прибавлении пирувата натрия к вытяжкам в реакционной смеси хотя и происходит образование аланина, но оно весьма незначительно. Повидимому, в этом опыте аланин образуется за счет переаминирования свободных дикарбоновых аминокислот с добавленным пируватом и прямого аминирования пирувата аммиаком, присутствующим в вытяжках. Гораздо интенсивнее протекает процесс прямого аминирования в опыте 3 с прибавлением пирувата аммония. В данном случае образование аланина путем прямого аминирования значительно превышает его образование в опыте 2.

Чтобы исследовать данный процесс в среде, освобожденной от сопутствующих веществ, могущих влиять на изучаемую нами реакцию, мы попытались выделить из проростков тыквы ферментный препарат, осуществляющий синтез аланина из пировиноградной кислоты и аммиака. Для этого тщательно растертые проростки тыквы настаивались с дистиллированной водой в 4-кратном количестве в течение 1 часа при комнатной температуре, при встряхивании. Смесь отфильтровывалась до прозрачности, к фильтрату прибавлялся сернокислый аммоний (30 г на каждые 100 мл фильтрата) и все оставлялось на ночь на холодильнике. Затем осадок собирали фильтрованием, а к фильтрату прибавляли еще сернокислого аммония (по 40 г на каждые 100 мл) и вновь оставляли на ночь на холодильнике. После этого второй осадок также собирали фильтрованием. Оба осадка, каждый в отдельности, были перенесены в коллодийные мешочки и подвергались диализу в проточной воде при охлаждении до потери реакции на серную кислоту. Объем диализатов в обоих случаях был равен 70 мл.

Полученные диализаты немедленно испытывались на способность к образованию аланина из пировиноградной кислоты и аммиака. Опыты ставились следующим образом: в пробирки вносилось по 1 мл диализата, 0,3 мл фосфатного буфера с рН 8,7; в контрольную пробирку добавлялось 0,3 мл воды, а в опытную 0,3 мл пирувата аммония. Затем пробирки погружали в водяной термостат при 37° на 90 мин. После прибавления реактивов для осаждения белков и углеводов фильтрат подвергался дезаминированию и затем проводилось определение аланина обычным принятым нами способом.

Были получены следующие результаты (см. табл. 3).

Таблица 3

Образование аланина ферментным препаратом

Вариант	Опыт 1				Опыт 2			
	в гаммах на 1,6 мл смеси		в мг на 43 мл диализата, соответств. 100 г проростков		в гаммах на 1,6 мл смеси		в мг на 57 мл диализата, соответств. 100 г проростков	
	абс.	прирост	абс.	прирост	абс.	прирост	абс.	прирост
1 осадок:								
Контроль . . .	16		0,68		24		1,37	
Пируват аммония	68	52	2,90	2,22	92	68	5,24	3,87
2 осадок:								
Контроль . . .	24		1,02		16		0,91	
Пируват аммония	68	44	2,90	1,88	28	12	1,59	0,68

Приведенные данные показывают, что нам удалось выделить из растительных тканей ферментный препарат, катализирующий образование аланина из пировиноградной кислоты и аммиака. Присутствие незначительного количества аланина в контролях, повидимому, объясняется частичным гидролизом белка за время опыта.

Задачей нашей дальнейшей работы является исследование химической природы данного фермента и условий его действия.

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

Поступило
4 VII 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Кретович, Совещание по белку, 1948, стр. 247. ² K. Mothes, *Planta*, 30, 726 (1940). ³ В. Кретович и А. Бундель, ДАН, 59, 1595 (1948). ⁴ В. Кретович и А. Бундель, ДАН, 61, 861 (1948).