

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  $\alpha$ -аминокислот из амиака и  $\alpha$ -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  $\alpha$ -кетоглютаровой кислот (<sup>1</sup>). Предполагалось, что образовавшиеся из них аспарагиновая и глутаминовая кислоты далее, путем энзиматического переаминирования, дают начало другим аминокислотам. Мотес (<sup>2</sup>) пришел к заключению, что синтез аминокислот в растении путем прямого аминирования кетокислот амиаком либо не идет вовсе, либо идет с большим трудом. Подобная точка зрения разделяется многими исследователями.

В предыдущей работе (<sup>3</sup>) 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 амиаком. 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  $\alpha$ -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 pH 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 M). Обе пробирки с содержимым погружались в водяной терmostat при температуре 37° на 90 мин., после чего белки осаждались трихлоруксусной кислотой и затем углеводы — сернокислой медью и известковым молоком. В фильтрате производилось определение

ние аланина по прописи, уже изложенной нами в предыдущей работе<sup>(3)</sup>. 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		Через 20 час. после получ. вытяжки	
	Сразу после получения вытяжки		абс.	прирост		
	абс.	прирост				
Воды . . . . .	2,08	3,36	0,50	1,18	0,53	
Пищевого аммония . . . .	5,44		1,68		1,15	
					0,62	

Как видно из приведенных данных, прибавление пищевого 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° становилась менее активной — аланин образовывался из пищевого аммония при ее прибавлении менее интенсивно.

Данные этого опыта показывают, что способностью синтезировать аланин непосредственно из пищевоградной кислоты и амиака 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<sup>(4)</sup>. Кроме того, в этих вытяжках всегда присутствует, хотя и в весьма незначительном количестве, свободный амиак. 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 пищевоградную кислоту, а также ее прямого аминирования собственным амиаком 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 пищевый аммоний, а в другую пищеват натрия. Третья пробирка с водой вместо пищевого 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	Пищевого натрия . . . .	1,92	
3	Пищевого 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 дестиллированной 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 колloidные 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 вносились по 1 мл диализата, 0,3 мл фосфатного буфера с pH 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 реагентов для осаждения белков и углеводов фильтрат подвергался дезаминированию и затем проводилось определение аланина обычным принятным 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, соотв. 100 г проростков		в гаммах на 1,6 мл смеси		в мг на 57 мл диализата, соотв. 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 амиака. 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

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