

БИОХИМИЯ

С. Р. МАРДАШЕВ и Л. А. СЕМИНА

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ГЛИКОКОЛЛА ИЗ ГЛИОКСИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 13 VII 1950)

Гликоколл является заменимой аминокислотой для большинства животных, так как они обладают способностью синтезировать эту аминокислоту из других соединений. По литературным данным, источниками биологического образования гликоколла, повидимому, могут быть различные биохимические превращения других аминокислот, в частности серина и треонина<sup>(1)</sup>. Однако эти превращения, вероятно, не представляют основного пути биосинтеза гликоколла в животных тканях.

Принимая во внимание дезаминирование гликоколла, обнаруженное в печени и почках некоторых животных<sup>(2)</sup>, которое приводит к образованию глиоксиловой кислоты, можно считать возможным синтез гликоколла из глиоксиловой кислоты и подходящего донатора азота, необходимого для формирования аминогруппы.

С целью выяснения этого вопроса нами и было предпринято исследование биологического синтеза гликоколла из глиоксиловой кислоты. Опыты производились с печенью крыс. В аппарате Варбурга 300 мг срезов печени инкубировались в течение часа при 30° с 3 мл соответствующего раствора. После этого содержимое сосудиков переворачивалось в центрифужные пробирки, нагревалось 10 мин. на кипящей водяной бане, осадок отделялся центрифугированием. В полученном таким путем прозрачном растворе микробиологическим методом<sup>(3)</sup> определялся гликоколл. Параллельно этому указанный раствор подвергался хроматографическому анализу на фильтровальной бумаге. В предварительных опытах в качестве источника глиоксиловой кислоты служил раствор глиоксиловой кислоты, полученной восстановлением щавелевой кислоты магнием (см. табл. 1).

Таблица 1

Синтез гликоколла в атмосфере  $O_2$  (фосфатный буфер, рН 8,0)

Состав смеси	Гликоколл в мг на пробу
Глиоксиловая к-та * + аспарагин 0,04 M + печень . . . . .	0,70
Глиоксиловая к-та + аспарагиновая к-та 0,04 M + печень . . . . .	0,56
Глиоксиловая к-та + $NH_4Cl$ 0,04 M + печень . . . . .	0,37
Глиоксиловая к-та + глутамин 0,04 M + печень . . . . .	1,20
Глиоксиловая к-та + глутаминовая к-та 0,04 M + печень . . . . .	0,60
Глиоксиловая к-та + печень . . . . .	0,38
Печень . . . . .	0,11

\* Около 1,5—2 мг в 3 мл раствора.

Таблица 2  
Синтез гликоколла в атмосфере  $N_2$  (фосфатный буфер, pH 8,0)

Состав смеси	Гликоколла в мг на пробу
Глиоксиловая к-та 0,01 $M$ + $NH_4Cl$ 0,04 $M$ + печень . . . . .	0,31
Глиоксиловая к-та 0,01 $M$ + аспарагиновая к-та 0,04 $M$ + печень . . . . .	0,32
Глиоксиловая к-та 0,01 $M$ + аспарагин 0,04 $M$ + печень . . . . .	0,49
Глиоксиловая к-та 0,01 $M$ + глутаминовая к-та 0,04 $M$ + печень . . . . .	0,34
Глиоксиловая к-та 0,01 $M$ + глутамин 0,04 $M$ + печень . . . . .	0,78
Глиоксиловая к-та 0,01 $M$ + печень . . . . .	0,32
$NH_4Cl$ 0,04 $M$ + печень . . . . .	0,16
Аспарагиновая к-та 0,04 + $M$ печень . . . . .	0,15
Аспарагин 0,04 + $M$ печень . . . . .	0,20
Печень . . . . .	0,18

Таблица 3  
Синтез гликоколла в атмосфере  $N_2$  или  $O_2$  (фосфатный буфер, pH 6,0)

Состав смеси	Гликоколла в мг на пробу	
	$N_2$	$O_2$
Печень . . . . .	0,20	0,14
Печень + глиоксиловая к-та 0,01 $M$ . . . . .	0,32	0,30
Печень + глиоксиловая к-та 0,01 $M$ + $NH_4Cl$ 0,04 $M$ . . . . .	0,30	0,29
Печень + глиоксиловая к-та 0,01 $M$ + глутаминовая к-та 0,04 $M$ . . . . .	0,44	0,46
Печень + глиоксиловая к-та 0,01 $M$ + глутамин 0,04 $M$ . . . . .	0,66	0,63
Печень + глиоксиловая к-та 0,01 $M$ + глутамин 0,02 $M$ . . . . .	0,60	0,60

Таблица 4  
Хроматографический анализ на фильтровальной бумаге  
(концентрации см. табл. 3)

В атмосфере $N_2$	Растворитель: фенол + 0,1% $NH_3$ ; $t$ 26°	$R_F$ *		
			Гликоколла $M/200$	Гликоколла $M/200$
Глиоксиловая к-та + $NH_4Cl$ + печень . . . . .		0,48		
Глиоксиловая к-та + глутаминовая к-та + печень . . . . .		0,28; 0,48		
Глиоксиловая к-та + глутамин + печень . . . . .		0,28; 0,49; 0,63		
Глиоксиловая к-та + глутамин + печень . . . . .		0,28; 0,48; 0,62		
Глиоксиловая к-та + печень . . . . .		0,48		
Печень . . . . .		0		
Глиоксиловая к-та + $NH_4Cl$ + печень . . . . .		0,47		
Глиоксиловая к-та + глутаминовая к-та + печень . . . . .		0,27; 0,47		
Глиоксиловая к-та + глутамин + печень . . . . .		0,26; 0,47; 0,62		
Глиоксиловая к-та + глутамин + печень . . . . .		0,26; 0,47; 0,62		
Глиоксиловая к-та + печень . . . . .		0,47		
Печень . . . . .		0		
Гликоколл $M/200$ . . . . .		0,48		

\*  $R_F$ : 0,26 — 0,28 соответствует глутаминовой кислоте; 0,47 — 0,49 — гликоколлу; 0,62 — 0,63 — глутамину.

В этом случае глиоксиловая кислота в чистом виде не выделялась, ее примерная концентрация определялась титрованием с пере-

кисью водорода. Вероятное присутствие некоторого количества щавелевой кислоты и гликолевой кислоты, на основании наших данных, не отражается на результатах синтеза. В дальнейшем эти опыты были проведены на чистом препарате глиоксилата кальция (см. табл. 2 и 3)\*.

Полученные нами данные (см. табл. 1—4) с убедительностью доказывают возможность энзиматического синтеза глиоколла из глиоксиловой кислоты. Этот синтез протекает со срезами печени крысы как в аэробных, так и в анаэробных условиях как в кислой, так и в щелочной среде.

Однако механизм указанного синтеза не связан с прямым использованием аммиака и, следовательно, не является простой обратимостью реакции окислительного дезаминирования глиоколла. Об этом свидетельствуют факты интенсивного синтеза глиоколла как в анаэробных, так и в аэробных условиях, а также отсутствие дополнительного синтеза глиоколла после прибавления аммиачных газов к системе, содержащей глиоксиловую кислоту.

Простое сопоставление скоростей синтеза из аммиака, аминодикарбоновых кислот и их амидов указывает на то, что восстановительное аминирование не имеет здесь места. По эффективности влияния на синтез глиоколла из глиоксиловой кислоты испытанные нами источники аминогруппы можно расположить в следующий ряд: аспарагиновая кислота < глутаминовая кислота < аспарагин < глутамин.

Весьма вероятным казалось бы предположение о наличии переаминирования между аминокислотой и глиоксиловой кислотой. Но в таком случае следовало бы ожидать, что скорость синтеза из глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты должна быть больше, чем из глутамина или, соответственно, аспарагина, так как ни глутамин, ни аспарагин не вступают в реакции переаминирования без предварительного гидролиза амидной группы<sup>(4)</sup>. Между тем полученные нами данные говорят о противоположном. Скорость синтеза из глутамина или аспарагина значительно больше, чем из глутаминовой или, соответственно, аспарагиновой кислоты.

Полученные нами результаты получают естественное объяснение, если мы допустим непосредственный перенос амидогруппы с глутамина или аспарагина на глиоксиловую кислоту. В таком случае можно было бы считать, что аминодикарбоновые кислоты непосредственно в синтезе глиоколла не участвуют. Образование глиоколла за счет аминодикарбоновых кислот происходит благодаря тому, что они способствуют образованию соответствующих амидов (аспарагина или глутамина). Так как скорость синтеза аспарагина и глутамина не велика, то поэтому и скорость синтеза глиоколла в присутствии аминодикарбоновых кислот значительно меньше.

Однако нашими опытами не исключается возможность переаминирования в реакции синтеза глиоколла. Мы считаем ее при некоторых условиях вероятной. Необходим более точный учет всех начальных и конечных продуктов для того, чтобы на основе баланса реакции притти к окончательному выводу.

Но даже допуская возможность переаминирования в механизме синтеза глиоколла, необходимо признать, что данная реакция не является основной. Основной путь синтеза глиоколла в указанных условиях заключается в переносе амидной группы с глутамина или аспарагина. Весьма вероятно, что в этой реакции синтеза глиоколла участвуют, по крайней мере, два различных фермента.

Предположительный механизм этого синтеза, повидимому, состоит в конденсации амидогруппы глутамина или аспарагина с карбониль-

\* Глиоксилат кальция любезно предоставлен нам А. Е. Браунштейном, которому мы пользуемся случаем принести благодарность.

ной группой глиоксиловой кислоты, с последующим восстановлением и гидролизом продукта конденсации на гликоцелл и аминодикарбоновую кислоту.

Поступило  
11.VII.1950

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. Е. Браунштейн и Г. Е. Виленкина, ДАН, 66, 243 (1949); Г. Е. Виленкина, ДАН, 69, 385 (1949). <sup>2</sup> S. Ratner, V. Nocito and D. E. Green, Journ. Biol. Chem., 151, 119 (1944). <sup>3</sup> Б. И. Збарский, С. Р. Мардашев и Н. И. Слуцкий, Вопросы мед. химии, 2, в. 1 (1950). <sup>4</sup> А. Е. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, 1949.