

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 (1). 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 (2), которое приводит к образованию глиоксильной кислоты, можно считать возможным ресинтез гликоколл из глиоксильной кислоты и подходящего донатора азота, необходимого для формирования аминокруппы.

С целью выяснения этого вопроса нами и было предпринято исследование биологического синтеза гликоколла из глиоксильной 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 сосудов переводилось в центрифужные пробирки, нагревалось 10 мин. на кипящей водяной бане, осадок отделялся центрифугированием. В полученном таким путем прозрачном растворе микробиологическим методом (3) определялся гликоколл. Параллельно этому указанный раствор подвергался хроматографическому анализу на фильтровальной бумаге. В предварительных опытах в качестве источника глиоксильной кислоты служил раствор глиоксильной кислоты, полученной восстановлением щавелевой кислоты магнием (см. табл. 1).

Таблица 1

Синтез гликоколла в атмосфере O₂ (фосфатный буфер, pH 8,0)

Состав смеси	Гликоколл в мг на пробу
Глиоксильная к-та * + аспарагин 0,04 М + печень	0,70
Глиоксильная к-та + аспарагиновая к-та 0,04 М + печень	0,56
Глиоксильная к-та + NH ₄ Cl 0,04 М + печень	0,37
Глиоксильная к-та + глутамин 0,04 М + печень	1,20
Глиоксильная к-та + глутаминовая к-та 0,04 М + печень	0,60
Глиоксильная к-та + печень	0,38
Печень	0,11

* Около 1,5—2 мг в 3 мл раствора.

Таблица 2

Синтез гликоколл в атмосфере N_2 (фосфатный буфер, pH 8,0)

Состав смеси	Гликоколл в мг на пробу
Глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i> + NH_4Cl 0,04 <i>M</i> + печень	0,31
Глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i> + аспарагиновая к-та 0,04 <i>M</i> + печень . .	0,32
Глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i> + аспарагин 0,04 <i>M</i> + печень	0,49
Глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i> + глутаминовая к-та 0,04 <i>M</i> + печень . .	0,34
Глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i> + глутамин 0,04 <i>M</i> + печень	0,78
Глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i> + печень	0,32
NH_4Cl 0,04 <i>M</i> + печень	0,16
Аспарагиновая к-та 0,04 + <i>M</i> печень	0,15
Аспарагин 0,04 + <i>M</i> печень	0,20
Печень	0,18

Таблица 3

Синтез гликоколл в атмосфере N_2 или O_2 (фосфатный буфер, pH 6,0)

Состав смеси	Гликоколл в мг на пробу	
	N_2	O_2
Печень	0,20	0,14
Печень + глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i>	0,32	0,30
Печень + глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i> + NH_4Cl 0,04 <i>M</i>	0,30	0,29
Печень + глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i> + глутаминовая к-та 0,04 <i>M</i> . .	0,44	0,46
Печень + глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i> + глутамин 0,04 <i>M</i>	0,66	0,63
Печень + глиоксидовая к-та 0,01 <i>M</i> + глутамин 0,02 <i>M</i>	0,60	0,60

Таблица 4

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

Растворитель: фенол + 0,1% NH_3 ; <i>t</i> 26°		R_F^*
В атмосфере N_2	Глиоксидовая к-та + NH_4Cl + печень	0,48
	Глиоксидовая к-та + глутаминовая к-та + печень	0,28; 0,48
	Глиоксидовая к-та + глутамин + печень	0,28; 0,49; 0,63
	Глиоксидовая к-та + глутамин + печень	0,28; 0,48; 0,62
	Глиоксидовая к-та + печень	0,48
	Печень	0
В атмосфере O_2	Глиоксидовая к-та + NH_4Cl + печень	0,47
	Глиоксидовая к-та + глутаминовая к-та + печень	0,27; 0,47
	Глиоксидовая к-та + глутамин + печень	0,26; 0,47; 0,62
	Глиоксидовая к-та + глутамин + печень	0,26; 0,47; 0,62
	Глиоксидовая к-та + печень	0,47
	Печень	0
Гликоколл <i>M</i> /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 глиоксидовая 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 гликоколлала 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 гликоколлала. Об этом свидетельствуют факты интенсивного синтеза гликоколлала как в анаэробных, так и в аэробных условиях, а также отсутствие дополнительного синтеза гликоколлала после прибавления аммиачных солей к системе, содержащей глиоксиловую кислоту.

Простое сопоставление скоростей синтеза из аммиака, аминокислот и их амидов указывает на то, что восстановительное аминирование не имеет здесь места. По эффективности влияния на синтез гликоколлала из глиоксиловой кислоты испытанные нами источники аминогрупп 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 (⁴). 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 аминокислоты непосредственно в синтезе гликоколлала не участвуют. Образование гликоколлала за счет аминокислот 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 гликоколлала в присутствии аминокислот значительно меньше.

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

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

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

* Глиоксидат 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 гликоколл и аминокислотную кислоту.

Поступило
11 VII 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

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