

В. Л. КРЕТОВИЧ, А. А. БУНДЕЛЬ и К. Б. АСЕЕВА

## ОБРАЗОВАНИЕ АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РАСТЕНИИ ИЗ ЩАВЕЛЕВОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ И АММИАКА

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 VI 1951)

Дикарбоновые аминокислоты играют существенную роль в белковом и аминокислотном обмене растительного организма. Работами Д. Н. Прянишникова была установлена физиологическая роль аспарагина и глутаминина (1). Роль аспарагиновой и глутаминовой кислот в реакции переаминирования, а также распространение этой реакции в растениях в настоящее время выяснена работами ряда исследователей (2). В то же время вопрос о путях биосинтеза в растении аминокислот вообще и дикарбоновых аминокислот, в частности, до сих пор почти не привлекал к себе внимания.

Согласно общепринятой схеме, выдвинутой в свое время Эйлером (3), присутствующий в тканях растений аммиак вступает во взаимодействие с  $\alpha$ -кетоглутаровой и щавелевоуксусной кислотами, образуя глутаминовую и аспарагиновую кислоты. Предполагается, что затем эти аминокислоты путем реакции ферментативного переаминирования образуют другие аминокислоты. Однако экспериментально этот путь был проверен лишь в отношении образования глутаминовой кислоты из аммиака и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты. В отношении же аспарагиновой кислоты прямых опытов, подтверждающих такой путь ее образования в растении, до сих пор не имелось.

На возможность такой реакции указывал в свое время еще С. П. Костычев (4), считавший, что эта аминокислота синтезируется в растении путем прямого присоединения аммиака к щавелевоуксусной кислоте. Следует отметить, что в то время как возможность такого синтеза аспарагиновой кислоты не оспаривалась, возможность образования из  $\alpha$ -кетокислот и аммиака аминокислот, обладающих одной карбоксильной группой, вообще ставилась под сомнение рядом исследователей (5). Однако было доказано (6), что в растительном организме осуществляется прямое ферментативное присоединение аммиака к пировиноградной кислоте, приводящее к образованию аланина.

Вопрос о синтезе аспарагиновой кислоты в растительном организме особенно интересен. Помимо ее роли в реакции переаминирования, установлено ее наличие в значительном количестве в растении, в особенности на некоторых фазах его развития, например в созревающем колосе ржи (7), а также в проростках люпина и пшеницы (8). Аспарагиновая кислота входит в состав всех растительных белков, причем в некоторых белках ее содержание достигает 10%. Щавелевоуксусная кислота также широко распространена в растениях, являясь важным промежуточным продуктом обмена (9).

Задачей данной работы являлось исследование возможности синтеза в растении аспарагиновой кислоты из щавелевоуксусной кислоты и аммиака.

Опыты проводились нами: 1) в кашнице из проростков, 2) в живых проростках и 3) с выделенным из проростков ферментным препаратом.

Объектом исследования служили этиолированные проростки гороха. Щавелевоуксусная кислота была получена нами по методу Воля и Остерлина<sup>(10)</sup>; точка плавления полученного препарата 151°. Аспарагиновая кислота определялась по разработанному нами методу<sup>(8)</sup>.

Опыты с кашницей из проростков. Проростки тщательно растирались с фосфатным буфером в одном случае при pH 5,6, в другом при pH 8,67; к 4 г полученной при этом кашницы в опыте прибавлялось 2,4 мл 0,1 M раствора щавелевоуксусной кислоты, нейтрализованной аммиаком, а в контроле 2,4 мл дистиллированной воды, при окончательном объеме смеси, равном 6,4 мл. Затем смеси выдерживались в течение 90 мин. при 37°, после чего обрабатывались трихлоруксусной кислотой. Общий объем смеси после этого был равен 24 мл. На каждое определение бралось по 5 мл фильтрата, которые нейтрализовались содой и употреблялись для определения аспарагиновой кислоты. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Прямое аминирование щавелевоуксусной кислоты аммиаком в кашнице из проростков гороха

Возраст проростков	pH	Образование аспарагиновой кислоты (в мг)				Прирост аспарагиновой к-ты по отношению к контролю	
		Опыт		Контроль		на 6,4 мл смеси	на 10 г абс. сух. проростков
		на 6,4 мл смеси	на 10 г абс. сух. проростков	на 6,4 мл смеси	на 10 г абс. сух. проростков		
12 дней . . . . .	5,6	6,01	75,1	1,45	18,1	4,56	57,0
	8,7	5,00	62,5	2,64	33,0	2,36	29,5
18 дней . . . . .	5,6	5,74	71,7	2,77	34,6	2,97	37,1
	8,7	3,55	44,4	1,77	22,1	1,78	22,3

Из данных табл. 1 следует, что во всех опытах наблюдался прирост аспарагиновой кислоты за счет прямого аминирования щавелевоуксусной кислоты аммиаком. Эта реакция протекала интенсивнее в слабокислой среде и в более молодых проростках.

Опыты с живыми проростками. В живые проростки гороха в опыте путем вакуум-инfiltrации вводился 0,1 M раствор щавелевоуксуснокислого аммония, а в контроле — вода. Затем проростки оставались на 2 часа в темноте, после чего растирались в ступке с трихлоруксусной кислотой и в фильтрате определялась аспарагиновая кислота. Полученные результаты, приведены в табл. 2.

Из этих результатов следует, что реакция прямого аминирования щавелевоуксусной кислоты аммиаком протекает также и в живых проростках. Пониженный прирост аспарагиновой кислоты в данном случае, по сравнению с образованием аспарагиновой кислоты в кашнице, видимо, обуславливается избирательной проницаемостью плазмы.

Опыты с ферментным препаратом. Для доказательства ферментативной природы данной реакции, а также с целью исследования ее в среде, освобожденной от сопутствующих веществ, в первую очередь от дикарбоновых аминокислот, могущих влиять на изучаемую нами реакцию, мы выделили из проростков гороха ферментный препарат

и проверили его активность в отношении образования аспарагиновой кислоты указанным выше путем.

Получение ферментного препарата производилось нами по способу, примененному В. Кретовичем и А. Бундель (6). При этом были получены 2 фракции препарата (при 30 и 70% сульфата аммония).

Опыты производились следующим образом. В пробирки вносилось: 8 мл препарата, 1 мл фосфатного буфера рН 5,6 и 2,4 мл раствора щавелевоуксуснокислого аммония (0,2 М); в контроле вместо последнего раствора прибавлялось 2,4 мл дистиллированной воды.

Пробирки с содержимым выдерживались при 37° в течение 3 час. Затем прибавлялась трихлоруксусная кислота и в фильтрате определялась аспарагиновая кислота. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Приведенные данные указывают, что выделенный нами из проростков гороха ферментный препарат катализирует образование аспарагиновой кислоты из щавелевоуксусной кислоты и аммиака; обе фракции препарата обладали почти одинаковой активностью. Наличие незначительного количества аспарагиновой кислоты в контроле, повидимому, объясняется частичным гидролизом белка за время опыта.

Таблица 2

Прямое аминирование щавелевоуксусной кислоты аммиаком в живых проростках (количество образовавшейся аспарагиновой кислоты в мг)

	На 0,8 г абс. сух. проростков		На 10 г абс. сух. проростков	
	найдено	прирост	найдено	прирост
Опыт . . . . .	4,94	1,03	61,8	12,9
Контроль . . . . .	3,91		48,9	

Таблица 3

Прямое аминирование щавелевоуксусной кислоты аммиаком при помощи ферментного препарата из проростков

	Образование аспарагиновой кислоты в мг		
	при действии 8 мл препарата	прирост	при действии препарата из 100 г проростков

1-я фракция (30% сернокислого аммония)

Контроль . . . . .	0,41	2,80	9,48
Опыт . . . . .	3,21		

2-я фракция (70% сернокислого аммония)

Контроль . . . . .	0,48	2,11	6,36
Опыт . . . . .	2,59		

Таким образом, нашими опытами доказано, что одним из способов синтеза аспарагиновой кислоты в высших растениях является ее образование путем прямого аминирования щавелевоуксусной кислоты.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Д. Прянишников, Азот в жизни растений и в земледелии СССР, 1945.  
<sup>2</sup> М. Крицман, Биохимия, 4, 691 (1939); В. Кретович и А. Бундель, ДАН, 59, 1595 (1948); 66, 429 (1949); H. Albaum and P. Cohen, Journ. biol. Chem., 163, 687 (1946); M. Leonard and R. Burris, *ibid.*, 170, 701 (1947); N. Rautanen, *ibid.*, 163, 687 (1946). <sup>3</sup> H. Euler, E. Adler, N. Das et H. Neuman, C. R. Trav. de Lab. Carlsberg, 22, 15 (1938); H. Euler, E. Adler, G. Günther u. L. Elliot, Enzymologia, 6, 337 (1939). <sup>4</sup> С. Костычев, Физиология растений, 1, 327 (1933). <sup>5</sup> K. Mothes, Planta, 30, 726 (1940); D. Vonner, Plant Biochemistry, 1950. <sup>6</sup> В. Кретович и А. Бундель, ДАН, 74, 107 (1950). <sup>7</sup> В. Кретович, Физиолого-Биохимические основы хранения зерна, 1945. <sup>8</sup> В. Кретович и А. Бундель, ДАН, 73, 1243 (1950). <sup>9</sup> A. Virtanen, A. Arhimo, J. Sundman u. L. Jännes, Journ. f. prakt. Chem., N. F., 162, 71 (1943). <sup>10</sup> A. Wohl u. C. Oesterlin, Ber., 34, 1139 (1901).