

А. А. БУНДЕЛЬ, М. П. ЗНАМЕНСКАЯ и В. Л. КРЕТОВИЧ

ОБРАЗОВАНИЕ АЛАНИНА ЗАПАСНЫМИ РАСТИТЕЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ В ПРИСУТСТВИИ ПИРОВИНОГРАДНОКИСЛОГО АММОНИЯ

(Представлено академиком А. И. Опариным 2 XI 1951)

Запасные белки семян обычно рассматриваются как инертный материал, расходуемый при прорастании семени и являющийся источником питания для зародыша. Такой взгляд получил особенно широкое распространение после работ Т. Б. Осборна (1).

Однако нужно иметь в виду, что запасной белок представляет собой тот основной материал, который на ранних этапах прорастания семени используется для построения разнообразных ферментативных систем, участвующих в обмене веществ растения.

Это заставляет предположить, что молекула запасного белка является весьма лабильной и обладает огромными химическими потенциями. Действительно, имеется ряд исследований, свидетельствующих о том, что запасные белки обладают, например, способностью к целому ряду окислительно-восстановительных реакций (2, 3).

Одной из важнейших реакций, протекающих в организме, является синтез аминокислот. В настоящее время установлено, что аминокислоты могут образовываться в растении путем прямого аминирования кетокислот аммиаком (4).

Возможность синтеза ряда аминокислот из аммиака и кетокислот в присутствии цистеина, являющегося в данной реакции донатором водорода, была доказана в модельных опытах Кноопом и Остерлином (5).

Можно думать, однако, что не только отдельные аминокислоты, но и сам белок в целом при взаимодействии с кетокислотами может являться источником водорода при синтезе аминокислот.

К. А. Тимирязев (6) указывал: «Где есть белки, а они образуют основу того вещества, которое мы называем протоплазмой, мы имеем не только материал — самое сложное органическое вещество, но и орудие — фермент, обуславливающее возможность бесконечного ряда продуктов его распада и их обратного синтеза. В комке белкового вещества потенциально дан весь разнообразный химизм живого тела».

Нам представлялось принципиально важным экспериментально проверить способность запасных белков к участию в реакциях образования аминокислот. С этой целью мы исследовали реакцию образования аланина из пировиноградной кислоты и аммиака в присутствии запасных белков. Для этого мы использовали легумин и глицинин, полученные по Осборну, а также пшеничный глиадин, полученный по В. Кретовичу (7). В опытах использовались также препараты восстановленных, окисленных и денатурированных нагреванием запасных белков. В качестве

восстановителя применялась амальгама натрия по М. Знаменской (3). Восстановление глиадина проводилось, кроме того, путем воздействия тока сероводорода на спиртовый раствор глиадина. В табл. 1 указаны содержание азота в применявшихся белковых препаратах и их восстановительная способность, выраженная в миллилитрах 0,1 N раствора $K_3Fe(CN)_6$, идущих на окисление 1 г препарата при pH 4,5 и длительно-сти воздействия окислителя, равной 2 суткам.

Таблица 1
Характеристика применявшихся белковых препаратов

Препарат	Общий азот в %	0,1 N раствор $K_3Fe(CN)_6$ в мл на 1 г препарата
Легумин исходный	18,04	—
» восстановленный	17,79	—
Глицин исходный	17,15	2,56
» восстановленный	16,89	4,34
Глиадин исходный	16,65	2,70
» восстановленный амальгамой натрия	14,45	5,10
Глиадин, восстановленный сероводородом	15,05	6,00

Окисление белка проводилось путем настаивания легумина в течение 2 суток с 0,1 N раствором $K_3Fe(CN)_6$ с последующим отмыванием препарата белком водой, спиртом и эфиром и высушиванием его в вакууме. Денатурированный нагреванием белок был получен следующим образом: к 50 мг легумина прибавлялось 2 мл дистиллированной воды, смесь нагревалась в течение 10 мин. в кипящей водяной бане, вода сливалась, белок дважды отмывался

2 мл воды путем декантации, после чего употреблялся в опыт, как далее описано.

Опыты проводились следующим образом: навески белка, равные 5С мг, тщательно размешивались в центрифужных пробирках с 2 мл фосфатного буфера (pH 8,7); после 10-минутного пребывания при 37° к смеси прибавлялось 0,3 мл воды в контрольном опыте и 0,3 мл раствора пировинограднокислого аммония (0,1 M) в основном опыте. Смеси оставались после этого при той же температуре на 90 мин.; затем белок осаждался 20% раствором трихлоруксусной кислоты, после чего в фильтрате определялся аланин (4).

Нами было проведено значительное число опытов; при этом необходимо отметить, что количественные показатели (количества образовавшегося аланина) в отдельных параллельных опытах несколько отличались друг от друга, что можно объяснить разной степенью набухания и растворения белка в жидкости.

Для контроля в опытном растворе проводилось определение молочной кислоты без предварительного дезаминирования; в этом случае молочной кислоты обнаружено не было. Молочная кислота образовывалась лишь в результате дезаминирования опытной смеси.

Были проведены также холостые опыты в отсутствие белка; оказалось, что пируват аммония с той же буферной смесью за 90 мин. не образует аланина.

В первую очередь были проведены опыты с легумином — нативным и обработанным различными способами (восстановленным, окисленным и денатурированным нагреванием).

Полученные нами данные приводятся в табл. 2.

Из таблицы следует, что аланин образовывался из пирувата аммония в присутствии всех испытанных препаратов легумина. Наибольшее количество аланина образовывалось в случае препарата восстановленного легумина. Окисленный же и особенно денатурированный нагреванием легумин образовывал значительно меньшие количества аланина, чем исходный препарат его.

Дальнейшие опыты имели целью выяснение влияния глутаминовой кислоты на процесс образования аланина при взаимодействии легумина с пируватом аммония. Глутаминовая кислота была испытана в связи с ее чрезвычайно важной ролью в обмене веществ у растений и ее большой химической активностью⁽⁸⁾. Эти опыты проводились по вышеуказанной схеме, концентрация глутамината аммония была та же, что и концентрация пирувата аммония, т. е. 0,1 М. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Можно видеть, что аланин образуется не только при взаимодействии белка с пируватом аммония, но также и при взаимодействии белка с глутаминатом аммония, еще большие количества аланина получаются при одновременном присутствии в реакционной смеси пирувата и глутамината аммония.

Таблица 3

Образование аланина при взаимодействии легумина с пируватом и глутаминатом аммония

Условия опыта	Аланин за вычетом контроля, в γ
Легумин + пируват аммония	19,9
» + глутаминат аммония	19,9
» + пируват + глутаминат аммония	35,0

количестве, чем в присутствии препаратов исходных белков.

Является ли наблюдавшееся в наших опытах образование аланина результатом восстановительного аминирования пириновградной кислоты при участии белка или же аланин является вторичным продуктом в реакции окисления отщепляющегося от белка в условиях наших опытов тирозина — еще неясно. Следует отметить возможность образования аланина из тирозина окислительным путем⁽⁹⁾.

Этот путь образования аланина является и в нашем случае возможным, поскольку наши опыты, проведенные в условиях вакуума при пониженной концентрации кислорода, не дали увеличения количества аланина по сравнению с вышеописанными опытами, проведенными в обычных условиях. В некоторых случаях в условиях вакуума аланина образовывалось даже меньше, чем в опытах, проводившихся при наличии кислорода. Возможно, что окислительному образованию аланина способствовало

Таблица 2

Образование аланина при взаимодействии легумина с пириновграднокислым аммонием

Препарат	Аланин за вычетом контроля, в γ
Легумин восстановленный . .	48
» исходный	28
» окисленный	17,6
» денатурированный нагреванием	9

Такие же опыты были проведены с глиадином и глицинином; полученные результаты представлены в табл. 4.

Можно видеть, что в присутствии препаратов как глиадина, так и глицинина также наблюдается образование аланина в реакционной смеси. При прибавлении восстановленных белков аланин образовывался в большем

Таблица 4

Образование аланина при взаимодействии глиадина и глицинина с пируватом и глутаминатом аммония

Условия опыта	Аланин за вычетом контроля, в γ
Глиадин + пируват аммония	10,9
» восстановленный сероводородом, + пируват аммония . .	31,7
Глиадин, восстановленный амальгамой натрия, + пируват аммония	28,5
Глицинин + пируват аммония . . .	14,3
» восстановленный амальгамой натрия, + глутаминат аммония	62,3

в наших опытах наличие фосфатного буфера, активизирующего окислительные превращения аминокислот и белков⁽¹⁰⁾:

Полученные нами результаты ясно показывают, что представление о химической инертности так называемых «запасных» белков семян является неправильным. Запасные белки представляют собою весьма лабильные и химически активные вещества, могущие при определенных условиях вступать в целый ряд реакций, ведущих к образованию аминокислот.

Несомненно, что в организме химическая активность так называемых «запасных» белков может быть значительно выше той активности, которая наблюдалась в наших опытах, поскольку белки присутствуют там в нативном состоянии, в условиях непрекращающегося взаимодействия с разнообразными продуктами обмена веществ.

При этом, несомненно, очень важным является состояние белка, в частности степень его окисления. На разных этапах развития организма состояние белка изменяется в связи с изменением всего комплекса условий его существования.

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

Поступило
20 X 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. Осборн, Растительные белки, 1935. ² M. Anson and A. Mirsky, Journ. Gen. Physiol., 19, 451 (1936). ³ М. Знаменская, Биохимия, 6, 368 (1941). ⁴ В. Крегович и А. Бундель, ДАН, 59, 1595 (1948); ДАН, 74, 107 (1950). ⁵ F. Knoor и H. Oesterlip, Zs. physiol. Chem., 170, 186 (1927). ⁶ К. Тимирязев, Соч., 5, 1938, стр. 396. ⁷ В. Крегович, Докл. ВАСХНИЛ, в. 6 (9), 313 (1937). ⁸ В. Крегович и Т. Дроздова, ДАН, 63, 167 (1948). ⁹ K. Felix и K. Zorn, Zs. physiol. Chem., 268, 257 (1941). ¹⁰ D. Bowman, Journ. Biol. Chem., 137, 293 (1941).