

П. А. КОЛЕСНИКОВ

О КАРБОКСИЛАЗЕ У КОК-САГЫЗА

(Представлено академиком А. И. Опариным 19 V 1952)

Субстрат карбоксилазы пировиноградная кислота является узловым промежуточным соединением при распаде углеводов в организмах. От нее начинаются различные пути превращений углеводов. Для растений наиболее известны два возможных пути ее превращений — это или декарбоксилирование с участием карбоксилазы до ацетальдегида и CO_2 или карбоксилирование с участием β -карбоксилазы до щавелевоуксусной или яблочной кислот. Следовательно, наличие того или иного пути зависит от присутствия соответствующей карбоксилазы. Изучение карбоксилаз дает нам возможность познавать пути превращений углеводов у организмов.

Карбоксилаза нами определялась в приборе Варбурга. Листья или корни кок-сагыза растирались в ступке с $1/15$ M фосфатным буферным раствором (рН 5,5 или 6,0) в соотношении 1 : 10. В каждый сосудик Варбурга бралось по 4,5 мл суспензии и в боковой отрезок 0,5 мл 0,1 M пирувата натрия или воды. В части опытов применялось по 0,5 г кусочков листьев размером 0,3—1,0 см³ или кружочков корней толщиной 2—3 мм в 4,5 мл такого же фосфатного буферного раствора, как и в первом случае, и по 0,5 мл 0,1 M пирувата натрия или воды. Исследовался и латекс. Суспензия латекса получалась непосредственно перед опытами путем выпуска латекса в буферный раствор. Бралось по 0,2 г латекса на сосудик. Определения велись в аэробных условиях. Дрожжевая карбоксилаза получалась путем настаивания сухих дрожжей в $1/15$ M фосфатном буферном растворе (рН 7,2) в отношениях 1 : 10 при 37° в течение часа и последующего центрифугирования. Полученный раствор карбоксилазы для опытов разбавлялся в 5—10 раз водой, чтобы приблизить активность препарата к активности карбоксилазы в растительных объектах. В опыт бралось по 0,5 мл разбавленной карбоксилазы.

Пировиноградная кислота после осаждения белков $1/10$ объема 20% трихлоруксусной кислоты определялась колориметрическим методом (1). Ацетальдегид при качественных исследованиях определялся с фуксинсернистой кислотой, а при количественных — или бисульфитным методом или колориметрически с *n*-оксидифенилом. Отгонка ацетальдегида производилась в приборе (2), применяемом для определения аланина; при этом все манипуляции по превращению аланина в ацетальдегид, как ненужные, не проводились. Все колориметрические измерения проводились в фотоэлектрическом колориметре — нефелометре системы М. С. Шипалова.

В свежих растениях как в листьях, так и в корнях вышеупомянутыми методами ацетальдегид и пировиноградная кислота не обнаружены. Применяемыми методами можно обнаружить около 2 γ пирувата и 1 γ ацетальдегида в 1 мл раствора.

Далее оказалось, что суспензии из листьев или корней, а также

латекса не действуют ни на пировиноградную кислоту, ни на ацетальдегид. Добавленные к суспензиям, они не оказывают никакого действия на газовый обмен суспензий и после нескольких часов инкубации полностью обнаруживаются в суспензиях неизменными. Так например, из прибавленных к суспензии листьев 88 γ пирувата через 4 часа инкубации найдено 80—85 γ . Из прибавленных 80 γ ацетальдегида найдено через 3,5 часа инкубации 70—75 γ . Подобные результаты получены и с корнями. Известно, что в растениях содержится альдегидоксидаза, которая может окислять альдегид за счет кислорода нитратов, последние при этом восстанавливаются в нитриты. Поставленные опыты, аналогичные вышеуказанным, но с добавлением нитратов (0,1 мол.) показали, что ни с пируватом, ни с ацетальдегидом нитрит в суспензии не накапливается и добавленные вещества не расходуются. Так например, в суспензии корней вначале найдено прибавленного ацетальдегида 121, 103 γ , а после инкубации в течение 3 час. при 25° найдено 106, 110 γ , т. е. в пределах точности метода то же самое количество.

Приведенные данные показывают, что в суспензии из листьев или корней, а также латекса свежих растений карбоксилаза не обнаруживается. Более того, оказалось, что эти объекты содержат ингибиторы дрожжевой карбоксилазы. Прибавленные к дрожжевой карбоксилазе они прекращают или замедляют ее действие. Это можно видеть из табл. 1, в которой приведены типичные данные, полученные неоднократно в течение лета и

Таблица 1

Ингибирование карбоксилазы суспензиями из кок-сагыза (выделившаяся CO_2 в $\mu\text{л}$)

	Листья 45 мин.	Корни 30 мин.	Латекс 60 мин.
Карбоксилаза	42; 52	96; 95	113; 117
Карбоксилаза + суспензия	3; 5	37; 41	34; 31
	Листья 45 мин.	Корни 15 мин.	Латекс 30 мин.
Карбоксилаза + 0,001 М KCN	164; 152	18; 19	145; 146
Карбоксилаза + суспензия + 0,001 М KCN	44; 51	2; 5	47; 67

осени 1950 г. и зимы 1951 г. В каждом из указанных в табл. 1 опытов брались разные препараты карбоксилазы. Ингибитор обнаружен также в семенах и проростках кок-сагыза. Но ингибитор не был обнаружен в подвяленных корнях. И более того, в них обнаружилась активная карбоксилаза.

В табл. 2 приводятся данные о влиянии пировиноградной кислоты на дыхание кружочков корней в завязавшем состоянии от завяливания. Партия корней была разделена на 2 части. Одна часть была помещена в темный шкаф для подвяливания при комнатной температуре, другая — во влажную камеру. В разные сроки брались пробы по 0,5 г кружочков на сосудик. В таблице приведены средние цифры из двух параллельных опытов. Расхождения между параллельными опытами не превышали 10%.

Завяленные в течение 9 дней корни оставались живыми. Помещенные потом на 10 дней во влажную камеру, они выпустили большое количество новых корневых волосков. Из табл. 2 видно, что при подвяливании корней повышается дыхательный коэффициент, а пировиноградная кислота его еще больше повышает. Возвращение корней из подвяленного состояния в нормальное снова снижает дыхательный коэффициент до единицы и снимает действие пировиноградной кислоты. В некоторых других опытах дыхательный коэффициент с пировиноградной кислотой повышался до 3—5.

Таблица 2

Влияние пирувата на дыхание корней кок-сагыза
(продолжительность опыта 1 час, температура 25°)

Корни	Субстрат	Влажность корней в %	Поглошено O ₂ в мл	Выделилось CO ₂ в мл	CO ₂ / O ₂
Свежие	Контроль	74,8	128	135	1,0
	Пируват		136	142	1,0
Завяленные 3 дня	Контроль	73,2	141	155	1,0
	Пируват		136	189	1,39
Завяленные 6 дней	Контроль	70,0	133	137	1,0
	Пируват		133	162	1,2
Завяленные 8 дней	Контроль	63,0	155	222	1,4
	Пируват		131	283	2,2
Влажные 8 дней	Контроль	75,0	138	136	1,0
	Пируват		133	126	1,0
Завяленные 9 дней, затем влажные 10 дней	Контроль	75,4	111	105	1,0
	Пируват		113	116	1,0

Суспензия, полученная из подвяленных корней таким же способом, как из свежих, оказалась содержащей карбоксилазу (см. табл. 3).

В первые 6 час. инкубации вся расходуемая пировиноградная кислота декарбоксилируется с образованием ацетальдегида. Это установлено путем валового определения продуктов деятельности карбоксилазы. Однако через сутки количество ацетальдегида значительно меньше, чем должно быть при декарбоксилировании израсходованной пировиноградной кислоты. Так например, в присутствии антисептика толуола в экстракте, полученном из подвяленных корней путем растирания корней с фосфатным буфером (рН 6) в отношении корни : буфер = 1 : 5, из 9320 γ пирувата в 10 мл экстракта через 6 час. израсходовалось 800 γ пирувата и образовалось 396 γ ацетальдегида, и через 24 часа израсходовалось 2260 γ пирувата и обнаружено 660 γ ацетальдегида. В первом случае количество образовавшегося альдегида эквивалентно количеству израсходованного пирувата, а во втором случае оно значительно меньше.

В этом опыте через 24 часа инкубации микрометодом ⁽⁶⁾ найдено 50 γ ацетоина в 100 мл экстракта, что составляет около 1% от необнаруживаемого альдегида. Судьба остального альдегида не установлена. В опытах с прибавленным ацетальдегидом без пировиноградной кислоты ацетонин не обнаружен, и сам ацетальдегид не расходовался и при 24-часовой инкубации. Следовательно, ацетонин образовался из пировиноградной кислоты. Эти факты говорят о том, что в подвяленных корнях пировиноградная кислота в основном превращается путем декарбоксилирования.

Были сделаны попытки установить природу ингибитора карбоксилазы в свежих растениях. Известно, что деятельность карбоксилазы замедляют или даже совсем прекращают такие вещества, как нитриты, глиоксалева кислота, ацетальдегид, хиноны ⁽³⁾, медь и др. Мы не обнаружили в суспензии из кок-сагыза нитритов, глиоксалева кислоты и ацетальдегида. Следовательно, они не являлись ингибиторами карбоксилазы

Таблица 3

Карбоксилаза в подвяленных
корнях кок-сагыза
(продолжительность опыта 1 час, температура 25°)

Субстрат	Поглошено O ₂ в мл	Выделилось CO ₂ в мл	CO ₂ / O ₂
Контроль	28; 26	39; 40	1,44
Пируват . .	29; 27	111; 114	4,0

в наших опытах. Медь содержится во всех частях кок-сагыза (4). Нами обнаружены и хиноны в исследуемых экстрактах, причем в таких концентрациях, которые способны почти полностью ингибировать карбоксилазу. Однако, вероятно, и медь и хиноны также не являются ингибиторами карбоксилазы. Они содержатся и в экстрактах из подвяленных корней. С другой стороны, мы устраняли образование хинонов путем растирания корней в присутствии цианистого калия, но, как видно из табл. 1, и в этом случае экстракты ингибировали дрожжевую карбоксилазу. Мы устраняли образование хинонов и удаляли тяжелые металлы оксихинолином.

30 мл фосфатного буфера (рН 5,9) взбалтывались с 20 мл 0,1% хлороформенного раствора оксихинолина. Из водного слоя было взято по 3,5 мл в 2 сосуда Варбурга, а в остальной смеси в ступке растирались 5 г корней кок-сагыза. Затем содержимое сильно взбалтывалось, и из водного слоя бралось в другие 2 сосуда Варбурга по 3,5 мл экстракта. В каждый сосудик добавлялось по 0,5 мл раствора из 5 мг адениловой кислоты, 5 мг $MgCl_2$ и по 0,5 мл дрожжевой карбоксилазы. Пировиноградная кислота вносилась в боковой отросток и переливалась после выравнивания температуры в приборе. Результаты опыта приведены в табл. 4.

Таблица 4

Влияние экстракта из корней, обработанного оксихинолином, на карбоксилазу дрожжей

	Изменения колич. газа в мл	
	15 мин.	40 мин.
Карбоксилаза .	+41; +44	+74; +72
Карбоксилаза + + экстракт	-1; -6	-26; -22

Из табл. 4 следует, что обработанный оксихинолином экстракт из корней не потерял своего ингибирующего действия на карбоксилазу из дрожжей. Следовательно, оно не вызвано наличием в экстракте хинонов или тяжелых металлов.

За последнее время появился ряд сообщений (5) о том, что в листьях папоротника содержится какой-то фактор, разрушающий тиамин. Как известно, фосфотиамин является протетической группой карбоксилазы. Этот фактор отождествляют с ферментом тиаминазой, обнаруженной во внутренностях рыб. Показано, что этот фактор устраняется при высушивании листьев. Как следует из наших данных, поведение ингибитора карбоксилазы у кок-сагыза похоже на поведение фактора, разрушающего тиамин у папоротников, однако истинную природу его могут установить лишь специальные исследования.

Таким образом, в результате исследований установлено, что дыхательный коэффициент нормальных корней кок-сагыза равен единице. Он становится выше единицы при подвяливании корней. В нормальных корнях и других органах растения имеется ингибитор карбоксилазы, который устраняется подвяливанием. В нормальных корнях субстрат карбоксилазы пировиноградная кислота не потребляется; в подвяленных корнях она декарбоксилируется с образованием ацетальдегида и частично ацетона. Эти факты дают основания предполагать, что в нормальных корнях превращение углеводов идет другим путем, чем в подвяленных. В последнем случае они превращаются с участием карбоксилазы.

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

Поступило
18 XII 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. Е. Friedemann and G. E. Haugen, J. Biol. Chem., 147, 415 (1943).
² А. Е. Браунштейн и С. М. Бычков, Биохимия, 8, в. 5—6, 234 (1943).
³ R. Kühn и H. Beinert., Ber., 80, № 2, 101 (1947). ⁴ С. М. Маштаков, Изв. АН БССР, № 3, 117 (1949). ⁵ W. C. Evans, N. R. Jones and R. A. Evans, Biol. J., 46, No. 5, p. XXVIII (1950). ⁶ E. Stotz and J. Rabory, J. Biol. Chem., 147, 11 (1943).