

П. А. КОЛЕСНИКОВ

О ХИНОНАХ И ЛОКАЛИЗАЦИИ ФЕНОЛОКСИДАЗЫ У КОК-САГЫЗА

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

Хиноны у растений интересуют нас как естественные переносчики водорода при дыхании растений. Изучение хинонов сопряжено с большими трудностями, что вызвано их малой устойчивостью. Свойства хинонов и их возможное участие в дыхании устанавливались преимущественно с применением синтетических хинонов или хинонов, образующихся из синтетических фенолов при действии фенолоксидазы из растений (¹).

Наличие в растениях различных фенолов, как возможных предшественников хинонов, позволяет предполагать, что хиноны, образующиеся из естественных фенолов, обладают теми же свойствами, которыми обладают и синтетические хиноны в модельных опытах. Так например, А. И. Опарин (²) показал, что выделенная из растений хлорогеновая кислота в присутствии фенолоксидазы может участвовать в дезаминировании аминокислот.

Хиноны в экстрактах из кок-сагыза нами определялись иодометрическим методом. Исследуемое растение растиралось в ступке с водой (1 : 10), прибавлялось 0,1 объема 1 М раствора уксусной кислоты или ацетатного буфера (рН 4,4) и фильтровалось через бумажный фильтр. Если фильтровалось медленно, то фильтрование проводилось на стеклянном фильтре, наполненном мязой из фильтровальной бумаги, с отсасыванием. Из прозрачного фильтрата отбиралось 5—10 мл. Прибавлялось 0,5—1,0 мл 1% раствора иодистого калия и 0,5—1,0 мл 10% серной кислоты. Через 10 мин. выделявшийся иод титровался 0,005 М гипосульфатом с применением 1—2 капель раствора крахмала как индикатора. Таким методом, за некоторыми исключениями, о которых будет сказано позднее, нами обнаружены хиноны во всех частях кок-сагыза.

Применяемым нами методом могут определяться также нитриты и различные перекиси. Об отсутствии нитритов в экстрактах мы убеждались применением реактива Грисса на нитриты. Этот реактив в 10 раз чувствительнее на нитриты, чем иодистый калий, и тем не менее он не давал реакции на нитриты.

О том, что в экстрактах были хиноны, а не какие-то перекиси, мы убеждались по свойствам этих соединений. Как известно, при растирании растений с водой получают окрашенные экстракты. Окраска экстрактов, как правило, обусловлена наличием различных окисленных фенолов и их производных. Окисление фенолов совершается через нестойкие промежуточные продукты — хиноны. Нами обнаружено, что и при растирании различных частей кок-сагыза наблюдается появление и при стоянии современем усиление окраски экстрактов. Но одновре-

менно с этим имеет место появление, а затем исчезновение веществ, выделяющих в кислой среде иод из иодистого калия (хинонов). Этим веществ нет в целом растении, они появляются только при растирании растений, причем превращение предшественника хинона в хинон происходит очень быстро. Образовавшись, хиноны начинают превращаться дальше. Через 1 час их остается около половины от начального количества.

Они не образуются, если растирание производить с водой, содержащей цианистый калий в концентрации не ниже 0,0002 М. При концентрации KCN 0,0001 М количество их значительно снижается. Они также не образуются, если растирание вести в присутствии диэтилдитиокарбамата в концентрации не ниже 0,001 М или в присутствии оксихинолина и при растирании прокипяченных растений. Эти факты говорят о том, что здесь мы имеем дело с хинонами. Применяемые нами яды и кипячение растений инактивировали фермент — фенолоксидазу, а следовательно, предотвратили окисление фенолов в хиноны и дальнейшее превращение хинонов в сильно окрашенные вещества.

Хиноны не обнаруживаются, если растирание растений проводить в растворах аскорбиновой кислоты. Известно, что аскорбиновая кислота является хорошим восстановителем хинонов. Восстанавливая хиноны, она сама при этом окисляется. Оказалось, что аскорбиновая кислота очень интенсивно окисляется в суспензии из кок-сагыза. Это установлено нами измерениями поглощаемого кислорода в приборе Варбурга, а также определениями ее обычным методом — титрованием 2,6-дихлорфенолиндофенолом. Так например, в суспензии из 0,5 г листьев и 5 мл раствора за 30 мин. окисляется 8—10 мг аскорбиновой кислоты. После того как прибавленная аскорбиновая кислота вся окислится, в суспензии вновь обнаруживаются хиноны. Следовательно, здесь естественный хинон является переносчиком водорода с аскорбиновой кислоты к кислороду воздуха.

Хиноны также не обнаруживаются, если кок-сагыз растирать в растворах аминокислот гликокола или α -аланина. Из многочисленных исследований известно, что хиноны в обыкновенных смесях с гликоколом или аланином, а также в модельных системах, состоящих из фенолоксидазы — пирокатехина — аминокислоты, дезаминируют эти аминокислоты (1). Оказалось, что хиноны из кок-сагыза также дезаминируют аминокислоты гликокол и α -аланин. При растирании кок-сагыза в растворах этих кислот соответственно обнаруживаются глиоксалева и пировиноградная кислоты. Они обнаружены нами в этих опытах колориметрическими методами и выделены в виде *n*-нитрофенилгидразонов. Однако в данном случае хиноны не являются переносчиками водорода, как это имеет место с аскорбиновой кислотой. Опыты в приборе Варбурга показали, что суспензия в присутствии этих кислот не поглощает дополнительно кислород. Дезаминирование происходит также и в освобожденном от белков экстракте из кок-сагыза. Следовательно, в данном случае мы имеем необратимые химические реакции.

А. Р. Гусева (4) показала, что растворы некоторых фенолов (дигидрорезорцин), подобно ацилфосфатам, окрашиваются в красный цвет в присутствии гидросиламина и хлорного железа. Раньше А. М. Кузин и Р. Я. Школьник (3) использовали эту реакцию для исследования, как они предполагали, соединений типа ацилфосфатов в различных растениях. Нами обнаружено, что подобную реакцию дают экстракты из листьев и корней кок-сагыза, причем, так же как и у Кузина и Школьника, если растирание вести в присутствии гидросиламина, то окрашивание сильнее, чем тогда, когда гидросиламин добавляется после растирания. Мы считаем, что в наших опытах это окрашивание обусловлено наличием в кок-сагызе фенолов, способных давать это окрашивание в данных условиях. Поскольку у кок-сагыза имеются

фенолы, способные при растирании быстро окисляться в свободные хиноны, и поскольку эти хиноны превращаются современем в другие вещества, то, естественно, наличие гидроксилamina в начале растирания растения встречается с большим количеством фенола и получается бо́льшая интенсивность окрашивания. Нами обнаружено, что если растирание ткани вести в присутствии 0,001 M цианистого калия, а затем добавить гидроксилamin, то окрашивание значительно интенсивнее, чем если растереть ткань в присутствии одного гидроксилamina. Как мы уже отметили выше, цианистый калий предотвращает окисление фенолов в хиноны. Естественно, что в этом случае имеется все количество содержащихся в растении фенолов, а следовательно, и наибольшая интенсивность реакции. Гидроксилamin, так же как и цианистый калий, предотвращает образование хинонов при растирании растений.

Фенолы, из которых образуются свободные хиноны при растирании кок-сагыза, распределены по разным органам и тканям неравномерно. Об этом можно судить по количеству хинонов, образуемых при растирании различных тканей (см. табл. 1).

Как видно (табл. 1), из всех исследованных частей кок-сагыза не обнаружено хинонов в покоеющихся семенах и латексе. Причины этого явления оказались неодинаковыми. Методом в приборе Варбурга с применением в качестве субстрата пирокатехина установлено, что в покоеющихся семенах отсутствует фенолоксидаза, а в латексе она очень активна. Если при растирании семян к воде добавить латекс, т. е. активную фенолоксидазу, то обнаруживаются хиноны (примерное количество их в таблице приведено в скобках). Таким образом, отсутствие хинона при растирании семян объясняется отсутствием в них фермента — фенолоксидазы, а в латексе есть активный фермент, но нет субстрата. В первое время произрастания семян количество хинонов увеличивается, затем, достигнув определенной величины, остается постоянным.

Особенно богатыми предшественниками хинонов являются листовые побеги, образующиеся на корнях после срезывания с них всех листьев. Иногда на 1 г сырой массы этих побегов идет свыше 10 см³ 0,005 M гипосульфита. Это обстоятельство, а также факт появления хинонов в моменте прорастания семян свидетельствуют о том, что фенолоксидазная система у кок-сагыза играет важную роль в процессах роста растения.

Как видно из табл. 1, в корнях кок-сагыза образующие хиноны вещества сконцентрированы, главным образом, в кожеце. Вероятно, они являются связующим звеном между кислородом воздуха и окисляющимися веществами внутри корня. В связи с локализацией хинонообразующих веществ было интересно проследить локализацию

Таблица 1

Содержание хинонов, образуемых при растирании различных частей кок-сагыза

Орган или ткань	0,005 M гипосульфита в мл на 1 г сырой массы
Покоящиеся семена	0 (0,8)
Прорастающие семена:	
на 2-й день	0,4
» 4-й „	1,6
Проростки:	
6-дневные, на свету	2,0
6 „ в темноте	1,44
6 „ на свету	1,8
6 „ в темноте	1,2
7- „ на свету	1,2
7 „ в темноте	1,6
Взрослые растения:	
листовые пластинки	1,6
черешки	1,1
корни	1,1
латекс	0
Корни:	
кожица	2,0
остальная часть	0,08

фенолоксидазы. Данные по фенолоксидазе, полученные в приборе Варбурга приведены в табл. 2. Субстрат — пирокатехин.

Таблица 2

Локализация фенолоксидазы у кок-сагыза

Орган или ткань	мл O ₂ на 100 г сухой массы за 30 мин.	
Кожица корня	363,	345
Корень без кожицы	91,	70
Латекс	237,	231
Листья целиком	1028,	1035
Листовые пластинки	1080,	1095
Покоящиеся семена	0	

Как видно из табл. 2, за исключением покоящихся семян и латекса, о которых мы уже говорили, активность фенолоксидазы согласуется с локализацией хинообразующих веществ.

Здесь следует обратить внимание на некоторое расхождение данных табл. 2 по содержанию фенолоксидазы в корнях с данными, полученными Д. М. Михлиным и К. В. Пшеновой⁽⁵⁾. Они нашли, что фенолоксидаза в корне локализована в латексе. В целом корне ее количество ничтожно или даже совсем не обнаруживается. Это обстоятельство

кажется странным, ибо когда они брали весь корень, то брали и латекс. Это несоответствие легко объясняется в связи с обнаруженными нами хинонами. Михлин и Пшенова пользовались методом определения фенолоксидазы, основанном на свойстве хинонов окислять аскорбиновую кислоту. К полученному экстракту прибавляется последовательно аскорбиновая кислота и пирокатехин. По разности количеств аскорбиновой кислоты в пробе без пирокатехина с пробой с пирокатехином судят об активности фенолоксидазы. Определение ограничивается секундами. Но, как уже сообщалось выше, в экстракте образуются свои хиноны, и они очень быстро окисляют аскорбиновую кислоту. Это имело место и в опытах Михлина и Пшеновой, естественно, они не могли обнаружить разницы в пробах с пирокатехином и без пирокатехина; в латексе же нет своих хинонов, но есть активная фенолоксидаза, поэтому и получались четкие результаты. Эти данные свидетельствуют об ограниченности применяемого ими метода.

Образование свободных хинонов при растирании растения не является специфичным для кок-сагыза. Все факты, полученные с кок-сагызом, мы наблюдали и при исследовании обыкновенного одуванчика. Хиноны образуются также и при растирании картофельной кожуры, но их нет при растирании очищенных клубней. Однако они не были обнаружены при растирании листьев ячменя, в которых нет фенолоксидазы. Они не могли быть обнаружены при растирании листьев чая, которые богаты фенолами и фенолоксидазой. Возможно, здесь образуются такие хиноны, которые чрезвычайно неустойчивы и немедленно превращаются дальше.

Таким образом, в результате исследований установлена возможность получения растворов свободных естественных хинонов из кок-сагыза и установлены некоторые биологические функции, которые могут выполнять эти хиноны в обмене веществ у кок-сагыза.

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

Поступило
18 XII 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. M. Trautner and Roberts, *Austr. J. Sci. Res.*, ser. B, 3, № 3, 365 (1950).
² А. И. Опарин, *Biochem. Zs.*, 182, 155 (1927). ³ А. М. Кузин и Р. Я. Школьник, *ДАН*, 65, 527, 719 (1949). ⁴ А. Р. Гусева, *ДАН*, 62, 113 (1948). ⁵ Д. М. Михлин и К. В. Пшенова, *Биохимия*, 16, в. 1, 5 (1951).