

Д. М. МИХЛИН и З. С. БРОНОВИЦКАЯ
ДЕГИДРОГЕНАЗЫ КОК-САГЫЗА

(Представлено академиком А. И. Опариним 19 II 1953)

Нами было найдено, что в латексе кок-сагыза содержится очень активная полифенолоксидаза (1). Впоследствии удалось установить, что корень кок-сагыза, как и листья, содержит значительное количество (до 2% на сухой вес) дубильных веществ катехиновой природы, очень чувствительных к действию полифенолоксидазы (2). Полифенольные соединения, легко окисляемые, находятся также в млечном соке. Таким образом, было доказано наличие в корневом каучуконосе завершающей окислительной системы, состоящей из полифенолоксидазы и ее естественных субстратов. В молодых проростках преобладает цитохромная система (1).

В настоящей работе подверглись изучению ферменты кок-сагыза, катализирующие первый этап биологического окисления, т. е. дегидрогеназы. Изучались с этой целью латекс, богатый полифенолоксидазой, молодые проростки и целые корни кок-сагыза второго года вегетации (июнь 1952 г.).

Для изучения дегидрогеназ латекса мы пользовались млечным соком, полученным в сентябре — октябре из корней кок-сагыза первого года вегетации. Применяемый в технике для стабилизации латекса аммиак оказался неподходящим стабилизатором при изучении дегидрогеназ. После ряда испытаний мы нашли, что наилучшим стабилизатором, не влияющим на ферменты латекса и предохраняющим латекс от коагулирования, по крайней мере на протяжении 24 час., является 0,87% -й раствор двусосновного фосфорнокислого калия. В стабилизированном таким образом латексе и производилось изучение активности ряда дегидрогеназ методом метиленовой сини. Смесь составлялась из 2 мл разбавленного латекса + 2 мл раствора, содержащего 2 мг коэнзима I (дифосфопиридин — нуклеотида) + 0,5 мл 0,1 N раствора нейтрализованной карбоновой кислоты или 0,1 M раствора альдегида или этилового спирта. После эвакуирования пробирки Тунберга в нее из боковой реторты вносили 1 мл M/5000 раствора метиленовой сини. Отмечалось время обесцвечивания при температуре 37°. В контрольных пробирках раствор субстрата заменялся водой.

Оказалось, что сам латекс, без добавления извне коэнзимов и субстратов, обладает редуцирующей способностью, которая утрачивается при его кипячении. Это может быть объяснено тем, что латекс содержит некоторые дегидрогеназы и соответствующие им субстраты. В самом деле, прибавление к латексу в описанных выше условиях 2 мг коэнзима I сокращает время обесцвечивания с 60 мин. до 20 или даже до 12 мин. Такое ускоряющее действие кофермента свидетельствует о ферментативном характере восстановления метиленовой сини самим латексом, без каких-нибудь добавлений извне.

Но в выделенном из корней латексе недостает коэнзимов для насыщения находящихся там дегидрогеназ. Поэтому мы добавляли коэнзим I извне для ферментов, требующих этот коэнзим для своего действия. В качестве предполагаемых субстратов действия дегидрогеназ применялись натриевые соли кислот: яблочной, фумаровой, молочной, янтарной, глутаминовой и лимонной. Кроме того изучалось влияние глицеринового альдегида и этилового спирта на обесцвечивание метиленовой сини. В опытах с янтарной кислотой и глицериновым альдегидом коэнзим не прибавляли, так как действие этих ферментов не зависит от коэнзимов. Результаты опытов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Скорость обесцвечивания метиленовой сини латексом, выраженная в минутах на 0,25 г сырого материала

	Без коэнзимов				В присутствии коэнзима I							
	янтарно-кисл. натрий		глицерин. альдегид		яблочно-кислый натрий		фумарово-кислый натрий		глутаминово-кислый натрий		этиловый спирт	
Опыт	11;	12	8;	9	3;	3	4;	4	4;	3	2;	2
Контроль	18;	19	16;	18	13;	15	10;	13	24;	24	16;	18

Хотя сам латекс обладает способностью восстанавливать метиленовую синь, но прибавление сукцината, глутамината, фумарата, малата, а также этилового спирта и глицеринового альдегида ускоряет это обесцвечивание в 2—8 раз. Следовательно, в латексе содержится сукциндегидрогеназа, глутамикодегидрогеназа, маликодегидрогеназа, альдегидрогеназа и алкогольдегидрогеназа. Влияние фумарата на скорость обесцвечивания свидетельствует, кроме того, о наличии в латексе фумаразы, превращающей фумарат в малат. Что касается лимонной кислоты, то ее присутствие не влияет на обесцвечивание. Это может объясняться тем, что для ферментативного восстановления метиленовой сини лимонной кислотой потребовалось бы, во-первых, превращение ее в изолимонную и затем участие коэнзима II, которого не было в нашем распоряжении. Что касается молочной кислоты, то для ее окисления в растениях существует специфическая оксидаза альфа-оксикислот⁽³⁾.

Изучению также подверглись четырехдневные проростки кок-сагыза, отделенные от эндосперма. По данным Н. С. Гельман⁽⁴⁾, ростки пшеницы обладают дегидрогеназами, но действие этих ферментов здесь лимитируется, по ее мнению, содержанием коэнзимов, находящихся в ростках в недостаточных количествах или разрушающихся при растирании. Так как мы добавляли извне достаточное количество коэнзима I, то возможное лимитирующее действие этого фактора отпадает. Тем не менее, мы в ростках кок-сагыза в отсутствие цианида не могли обнаружить активности ни одной из тех дегидрогеназ, действие которых нами отчетливо было выявлено в латексе. Лишь при растирании ростков в 0,05 N растворе цианистого калия нам удалось обнаружить некоторые из дегидрогеназ, найденных в латексе.

Более того, прибавление суспензии из ростков кок-сагыза к растворенным пшеничным росткам лишает эти последние их дегидрогеназной активности или сильно тормозит их действие. Это видно из следующего примера: время обесцвечивания двухдневных проростков пшеницы без добавления суспензии было 20 и 10 мин., а в присутствии суспензии из ростков кок-сагыза 60 и 45 мин.

Активность дегидрогеназ четырехдневных ростков кок-сагыза (в минутах на 0,5 г сырого веса)

	Без коэнзимов				В присутствии коэнзима I					
	глицериновый альдегид		яблочнокислый натрий		фумаровокислый натрий		глутаминовокислый натрий		этиловый спирт	
Опыт	27;	24	40;	12	19;	15	23;	21	10;	15
Контроль	60;	60	60;	60	60;	54	56;	55	41;	46

* Следовательно, в ростках кок-сагыза имеется какой-то ингибитор или, возможно, ингибиторы, тормозящие действие дегидрогеназ, или способные инактивировать эти ферменты. Так как торможение не снимается прибавлением коэнзима, то, следовательно, оно объясняется не недостатком коэнзима или его разрушением, а относится к самой дегидрогеназе, т. е. к апоэнзиму. Это подтверждается еще тем, что торможение распространяется на сукциндегидрогеназу, не зависящую от коэнзимов.

Кажется вероятным, что очень вялое действие других растительных дегидрогеназ, кроме сукциндегидрогеназы, особенно как это показано Н. М. Сисакином и К. Г. Чамовой⁽⁵⁾ для незеленых частей растений, объясняется наличием во многих растениях ингибиторов, проявляющих свое влияние при нарушении целостности ткани. Здесь приходится думать о полифенольных соединениях, вероятно окисленных, действие которых на различные ферменты было показано А. И. Опариним и А. Л. Курсановым⁽⁶⁾. Затем, не в меньшей степени, роль ингибиторов или даже инактиваторов, принадлежит ионам тяжелых металлов. Вот почему нам удалось посредством цианида, при прибавлении его в момент разрушения ткани, предохранить некоторые дегидрогеназы от инактивирования (см. табл. 2). Цианид ускоряет восстановление метиленовой сини ростками кок-сагыза и без прибавления извне каких-нибудь донаторов водорода, но только в некипяченой суспензии, за счет собственных субстратов. Следовательно, действие цианида должно рассматриваться как защитное по отношению к дегидрогеназам, но не как влияние на возможное химическое, неферментативное восстановление метиленовой сини. Известно, что активность многих дегидрогеназ зависит от наличия у них сульфгидрильных групп, с большой легкостью связываемых или окисляемых ионами тяжелых металлов. Этим, несомненно, можно объяснить общеизвестные трудности обнаружения в растительных ферментных препаратах сукциндегидрогеназы, играющей большую роль в дыхании растений, особенно на ранних стадиях развития, когда преобладающей оксидазной системой является цитохромная.

Мы могли убедиться, что сукциндегидразная система пшеничных проростков полностью тормозится не только прибавлением растертых проростков кок-сагыза, но и незначительными количествами (3×10^{-6} M) меди в виде сернокислой меди.

Действие сукциндегидрогеназы животного происхождения тормозится медью в концентрациях порядка 10^{-8} M Cu^{++} . Активность алкогольдегидрогеназы также сильно зависит от сульфгидрильных групп⁽⁸⁾, чувствительных к действию тяжелых металлов. Влияние тяжелых металлов на активность ферментов особенно сказывается при совместном присутствии некоторых из них. Не исключена возможность, что более слабая активность некоторых дегидрогеназ в ростках кок-сагыза по сравнению с латексом объясняется более низким содержанием ионов тяже-

лых металлов в латексе, чем в корнях или проростках. Вообще, распределение в целом растений того или иного тяжелого металла, как и ферментов, крайне неравномерно. Так, в ростках кок-сагыза найдено 10^{-6} меди и 10^{-4} железа. Корни кок-сагыза в конце вегетационного периода, после их измельчения, не обнаруживают никакой дегидразной активности, даже в присутствии цианида. Содержание меди в таких корнях достигает 8×10^{-6} , железа $1,6 \times 10^{-4}$ г на 1 г сухого вещества. В латексе, по данным С. М. Маштакова⁽⁹⁾, железа в три раза меньше, чем в корнях. Остается еще выяснить, каково значение тяжелых металлов в проявлении тех особенностей обмена веществ, которые у корневых каучуконосов ведут к биосинтезу каучука.

Из изложенного следует, что наибольшая дегидрогеназная активность кок-сагыза проявляется в свежее выделенном латексе, стабилизированном 0,87%-м раствором двуосновного фосфата калия. В латексе обнаружены дегидрогеназы янтарной, яблочной и глутаминовой кислот, а также глицеринового альдегида и этилового алкоголя. Косвенным путем установлено наличие фумаразы.

В 3—4-дневных проростках найдены алкогольдегидрогеназа, маликодегидрогеназа и глутамикодегидрогеназа, но лишь при растирании ростков с 0,05 *N* раствором цианистого калия. Также обнаружены альдегидрогеназа и фумараза. Растертая ткань проростков кок-сагыза ингибирует действие сукциндегидрогеназы пшеничных ростков, которая ингибируется также прибавлением Cu^{++} (3×10^{-6} *M*). В корнях кок-сагыза не обнаруживаются никаких дегидрогеназ, даже в присутствии цианида. Торможение действия дегидрогеназ ставится в связь с накоплением корневыми каучуконосами сравнительно больших количеств ионов тяжелых металлов, которые играют большую роль в регулировании обмена веществ у растений.

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

Поступило
22 XI 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. М. Михлин, К. В. Пшенова, Биохимия, 16, 57 (1951); Д. М. Михлин, З. С. Броновицкая, ДАН, 71, 1089 (1950). ² Д. М. Михлин, К. В. Пшенова, Биохимия, 18, 1 (1953). ³ П. А. Колесников, ДАН, 60, 1205, 1353 (1948); С. О. Claggett, N. E. Tolbert, R. H. Burris, J. biol. Chem., 178, 977 (1949). ⁴ Н. С. Гельман, Биохимия, 14, 79 (1949). ⁵ Н. М. Сисакян, К. Т. Чамова, ДАН, 67, 337 (1949). ⁶ A. Oparin, A. Kursanow, Biochem. Zs., 209, 181 (1929). ⁷ В. L. Horrecker, Enzymologia, 7, 331 (1939). ⁸ H. Theorell, R. Bonnichsen, Acta Chem. Scand., 5, 329 (1951). ⁹ С. М. Маштаков, С. М. Гольдина, ДАН, 73, 1077 (1950).