

П. А. КОЛЕСНИКОВ

ОКИСЛЕНИЕ ГЛИОКСАЛЯ В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 18 III 1953)

Ранее нами было установлено, что в зеленых листьях растений в определенных условиях накапливается глиоксалева кислота. Одним из источников глиоксалевой кислоты является гликолевая кислота (1).

В связи с вопросом о предшественниках этих кислот представляет интерес исследование глиоксаля. Глиоксаль образуется при окислении химическим путем углеводов или из винной кислоты при воздействии на нее светом. Глиоксаль в растворах щелочей превращается в гликолевую кислоту, а в водном растворе и присутствии бисульфита натрия окисляется в глиоксалевою кислоту (2).

Объектами наших исследований служили экстракты, получаемые из листьев ячменя и кок-сагыза по методу, применяемому нами в предыдущих работах (1). Метод определения глиоксалевой кислоты описан там же. Глиоксаль определялся бисульфитным методом или нефелометрически с фенолгидразином, с которым он дает мутность. Колориметрирование и нефелометрирование производилось в электро-фото-колориметре-нефелометре системы Шипалова.

Манометрические измерения производились в приборе Варбурга. Хиноны определялись иодометрическим методом. Источником глиоксаля служил глиоксаль-бисульфит, который непосредственно перед опытом переводился в свободное состояние. 50 мг глиоксальбисульфита кипятились с 4 мл 0,5 N HCl пока объем не уменьшался до 2 мл, после чего добавлялось 4 мл воды и кипячение продолжалось пока объем снова не уменьшится до 2 мл. Охлажденный раствор нейтрализовался 0,1 N NaOH, чтобы он был щелочной по конго и кислый по лакмусу. Ни в коем случае не допускался излишек щелочи. Если по неосторожности щелочи добавлялось столько, что лакмусовая бумажка синела, то такой раствор отбрасывался. Это делалось для того, чтобы избежать дисмутации глиоксаля в процессе приготовления раствора. После нейтрализации объем доводился до 5—10 мл дистиллированной водой; такого раствора на общий объем испытуемого экстракта бралось 0,5 мл.

Опыты проводились в фосфатном буферном растворе M/15 при pH 6,8—7,0. В согласии с данными Нейберга (2), в приборе Варбурга мы нашли, что глиоксальбисульфит в водном растворе действительно окисляется в глиоксалевою кислоту. Окисление имеет место при pH 7 и выше и очень слабое при pH ниже 7. Так например, при 25° в M/15 фосфатном буфере за 1 час поглощалось кислорода (в мл): при pH 6—19; 21; при pH 7—93; 123; при pH 8—93; 90; при pH 9—81; 90.

После инкубации в растворе обнаружена глиоксалева кислота. Полученный нами раствор свободного глиоксаля при этих условиях не поглощал кислорода, но повышал поглощение кислорода экстрактами из листьев ячменя или кок-сагыза.

Типичные данные из многих опытов даны в табл. 1.

Таблица 1

Влияние глиоксаля на поглощение кислорода экстрактами из листьев.

$T = 25^\circ$. pH 6,9 (поглощение O_2 в μ л)

	Промежуток времени в мин.		
	60	60	Всего за 120
Ячмень			
Контроль . . .	16; 23	22; 17	38; 40
Глиоксаль . . .	171; 157	34; 34	205; 191
0,0001 м $NaNO_2$	22; 22	17; 15	39; 37
То же + глиоксаль . . .	182; 180	33; 34	215; 214
Кок-сагыз			
Контроль . . .	109; 133	11; 12	120; 145
Глиоксаль . . .	161; 172	15; 16	176; 188

После инкубации и осаждения белков в пробах с экстрактами и глиоксалем всегда обнаруживалась очень интенсивная реакция на глиоксальевую кислоту. Эти данные свидетельствуют о том, что экстракты из листьев совершают окисление глиоксаля.

Можно было предполагать, что в экстрактах содержится фермент альдегидоксидаза, который непосредственно окисляет глиоксаль в глиоксальевую кислоту $ОНС - СНО + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow ОНССООН$ или глиоксаль сначала дисмутируется в гликолевую кислоту $ОНС - СНО + НОН \rightarrow \rightarrow СН_2ОНССООН$, которая окисляется в глиоксальевую кислоту.

Кроме того, мы установили, что окисление глиоксаля в глиоксальевую кислоту может совершаться через циклические соединения.

Известно, что в растворе соды глиоксальбисульфит окисляется с образованием циклических соединений — тетраоксихинона и родизоновой кислоты (3).

Окисление тетраоксихинона $T = 25^\circ$; 2 мг тетраоксихинона на сосудик. Продолжительность 1 час

	Экстракт из ячменя		Фосфатный буфер	
	конт-роль	опыт	конт-роль	опыт
Поглощено O_2 , мл	17; 23	64; 76	0	53; 46
Выделилось CO_2 , мл . . .	24; 32	55; 59	0	48; 41
Глиоксальевая кислота . . .	—	+	—	+

Мы подтвердили, что в тех условиях, в которых идет образование тетраоксихинона, имеет место поглощение кислорода и не образуется глиоксальевая кислота. Образование тетраоксихинона идет в насыщенном на холоду растворе Na_2CO_3 . Однако мы обнаружили, что если применять более слабый раствор Na_2CO_3 , то окисление идет интенсивнее и в этих условиях образуется глиоксальевая кислота. Особенно хорошо глиоксальевая кислота образуется, если к раствору прибавить фосфатов.

Мы приготовили по известному методу (3) из глиоксаля тетраоксихинон и установили, что он в применяемом нами фосфатном буфере спонтанно окисляется с образованием углекислоты и глиоксальевой кислоты (табл. 2).

Мы попытались разрешить вопрос, каким же путем окисляется глиоксаль в экстрактах из листьев в нейтральной среде? Оказалось, что по ряду явлений, сопровождающих окисление глиоксаля, оно идентично с окислением гликолевой кислоты.

Так например как в том, так и в другом случае цианиды или азид натрия увеличивают, а свет снижает количество поглощаемого кислорода.

При окислении этих веществ ускоряется исчезновение нитритов в экстрактах. Можно было предположить, что окисление глиоксаля идет через дисмутацию его в гликолевую кислоту. Но методом бумажной хроматографии мы в примененных нами растворах глиоксаля не обнаружили гликолевой кислоты. Дисмутация глиоксаля не была обнаружена и в суспензии растертых листьев.

Из данных табл. 2 видно, что окисление глиоксаля через циклические соединения сопровождается выделением CO_2 . В опытах же с экстрактами мы не наблюдали увеличения количества выделяемой CO_2 . Следовательно, окисление глиоксаля в экстрактах не идет и через циклические соединения. Остается предположить, что окисление глиоксаля происходит с участием альдегидоксидазы. Но мы обнаружили, что KCN стимулирует окисление глиоксаля (см. табл. 3), в то время как известно, что он ингибирует альдегидоксидазу. Однако оказалось, что KCN, подобно бисульфиту, вызывает окисление глиоксаля. Поэтому в данном случае действие KCN не может служить критерием для характеристики альдегидоксидазы.

Таблица 3

Влияние KCN на окисление глиоксаля в фосфатном буфере $T = 25^\circ$. Продолжительность опыта 100 мин. (поглощение O_2 в $\mu\text{л}$)

	Концентрация KCN в мол.		
	0,001	0,01	0,05
Фосфатный буфер			
Глиоксаль . . .	97; 89	114; 116	—
Контроль . . .	—	4	2
Экстракт из листьев ячменя			
Глиоксаль . . .	124; 121	146; 138	154; 141
Контроль . . .	52; 56	—	—

Перед употреблением KCN нейтрализовался до такой же величины рН, как и раствор глиоксаля. В результате окисления глиоксаля обнаружена глиоксалева кислота. Ни азид натрия, ни гидроксилламин не вызывали окисления глиоксаля. Известно, что цианиды с альдегидами образуют циангидрины. С глиоксалем они образуют циангидрин глиоксаля



Это соединение по строению похоже на глиоксальбисульфит



который как было показано выше, тоже вызывает окисление глиоксаля в глиоксальевую кислоту. Очевидно, в обоих случаях действует один и тот же механизм окисления.

Суммируя все сказанное, мы приходим к выводу, что окисление глиоксала в экстрактах из листьев происходит с участием альдегидоксидазы — фермента, схожего с оксидазой гликолевой кислоты.

Нами также установлено, что в экстракте из листьев ячменя глиоксаль окисляется в глиоксальную кислоту *n*-бензохиноном (см. табл. 4).

Таблица 4

Влияние глиоксала на восстановление хинона зеленым экстрактом. $T = 25^\circ$. 3 мг хинона на сосудик

	Темнота						Свет					
	хинон			хинон+глиоксаль			хинон			хинон+глиоксаль		
	Промежуток времени в мин.											
	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Выделилось O_2 .	0	0	2	0	0	1	52	52	38	54	60	8
Израсходовалось хинона в мг в конце опыта . .	0,25			1,56			2,56			3,0		

В поставленных одновременно пробах в тех же условиях, но без зеленой суспензии, выделения газа не было, и количество хинона не изменилось. В конце опыта в пробе с глиоксалем обнаружена очень интенсивная реакция на глиоксальную кислоту. Нефелометрически установлено, что количество глиоксала уменьшилось до $\frac{1}{3}$ от первоначального. Как видно из этих данных, в зеленом экстракте из листьев имеются условия для окисления глиоксала с одновременным восстановлением хинона в темноте. Этот процесс идет и на свету, причем одновременно и независимо от темного восстановления хинона (ср. табл. 4).

Все изложенные здесь факты свидетельствуют о возможном участии глиоксала в обмене веществ зеленых растений.

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

Поступило
26 I 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ П. А. Колесников, ДАН, 60, 1205 (1948); 60, 1353 (1948); Биохимия, 13, 370 (1948); Изв. АН СССР, сер. биол., 4, 87 (1950). ² C. Neuberg, E. Simon, Biochem. Zs., 256, 485 (1932); C. Neuberg, M. Sobel, *ibid.*, 256, 475 (1932). ³ И. Губен, Методы органической химии, 3, в. 2, 1935, стр. 208.