

З. Г. ЕВСТИГНЕЕВА и В. Л. КРЕТОВИЧ

## О РАЗЛИЧИИ СТРОЕНИЯ И ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АСПАРАГИНА И ГЛУТАМИНА

(Представлено академиком А. И. Опариным 25 X 1953)

Важная роль аспарагина и глутамин в обмене веществ растений, животных и микроорганизмов общеизвестна. Поскольку эти амиды отличаются друг от друга только одной группой —  $\text{CN}_2$  —, долгое время считали, что аспарагин и глутамин физиологически равноценны и полностью взаимозаменяемы в обмене веществ. Однако в настоящее время имеется целый ряд данных, указывающих на то, что аспарагин и глутамин значительно отличаются друг от друга как по своим физическим и химическим свойствам, так и по своей роли в обмене веществ. Так например, аспарагин значительно хуже растворим в воде и гидролизуеться с гораздо большим трудом, чем глутамин. Как амидная, так и аминная группы глутамин реагируют с азотистой кислотой, в то время как у аспарагина реагирует только аминная группа. В обмене веществ глутамин является более лабильным и, повидимому, играет более важную роль в таких процессах, как синтез аминокислот и белков (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>). В отличие от аспарагина, глутамин синтезируется только в присутствии АТФ и ионов Mg (<sup>3</sup>), в то время как синтез аспарагина протекает благодаря обращению действия аспарагиназы. Аспарагиназа и глутаминназа, катализирующие гидролитический распад аспарагина и глутамин, также различаются по своим свойствам (<sup>3</sup>).

Все эти данные указывают на то, что аспарагин и глутамин отличаются гораздо значительнее, чем можно предполагать на основании представления о них как гомологах. Можно предполагать, что разница в свойствах аспарагина и глутамин объясняется тем, что аспарагин, в отличие от глутамин, имеет циклическую структуру (<sup>4</sup>). Одним из доказательств циклической структуры аспарагина может быть его поведение при реакции с нингидрином. На особенностях этой реакции впервые указал Руэмманн (<sup>5</sup>), открывший цветную реакцию аминокислот с нингидрином. Руэмманн обнаружил, что аспарагин при реакции с нингидрином дает соединение, окрашенное в желтый цвет, в то время как глутамин в тех же условиях, подобно  $\alpha$ -аминокислотам, дает соединение сине-фиолетового цвета. Впоследствии Стьюарт и Томпсон установили, что, кроме разницы в окраске, реакция аспарагина с нингидрином отличается еще отсутствием выделения  $\text{CO}_2$ . При нагревании желто окрашенного соединения аспарагина с нингидрином цвет его постепенно переходит в сине-фиолетовый и одновременно начинается выделение  $\text{CO}_2$ . Из этих данных можно сделать вывод, что образование необычной желтой окраски и отсутствие выделения  $\text{CO}_2$  при реакции аспарагина с нингидрином говорят о том, что, повидимому, аспарагин имеет циклическое строение, причем амидная и карбоксильная группы соединяются друг с другом, образуя кольцо. При нагревании кольцо размыкается, и тогда аспарагин реагирует с нингидрином с выделением  $\text{CO}_2$ , подобно глутамину.

Одной из задач данной работы являлось сравнение спектров поглощения нингидриновых соединений аспарагина как в обычных условиях, так и при нагревании со спектрами поглощения глутаминового соединения, полученного в тех же условиях. К 0,2% водным растворам аспарагина и глутаминина в отношении 1 : 3 добавляли 0,5% раствор нингидрина в вероналовом буфере с рН 7,0.

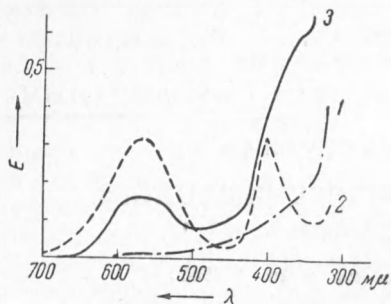


Рис. 1. Спектры поглощения: 1 — нингидрина с аспарагином, 2 — нингидрина с глутамином, 3 — аспарагина с нингидрином после нагревания

Смесь в открытых пробирках оставляли на 2 часа при комнатной температуре. В течение этого времени развитие окраски достигало своего максимума. Затем часть раствора желто окрашенного соединения аспарагина с нингидрином помещали в другую пробирку и нагревали в кипящей водяной бане, при этом происходило изменение окраски от желтой до красновато-фиолетовой. Спектры поглощения полученных соединений измеряли на спектрофотометре Бекмана. Исходные растворы для измерения были разбавлены в 16 раз.

Как видно из рис. 1, спектр поглощения нингидринового соединения глутаминина обладает тем же характерным максимумом поглощения при 570 м $\mu$ , как и все  $\alpha$ -аминокислоты, в то время как в тех же условиях спектр поглощения нингидридного соединения аспарагина совершенно иной. При нагревании окрашенного в желтый цвет продукта реакции аспарагина с нингидрином происходит изменение спектра поглощения, а именно, появляется максимум при 570 м характерный для  $\alpha$ -аминокислот и глутаминина.

Таким образом, изменение спектра поглощения аспарагинового соединения указывает на изменение его строения при нагревании, причем это изменение, очевидно, идет в сторону образования «нормальной», развернутой формы аспарагина. Грассман и Арним (6), а также Мур и Штейн (7) показали, что пролин, реагируя с нингидрином, дает соединение желтого цвета.

Поскольку циклическая форма аспарагина имеет строение, близкое к строению пролина, мы измерили спектры поглощения желтых соединений аспарагина и пролина с нингидрином. Были взяты 0,2% водные растворы аспарагина или пролина и к ним в отношении 1 : 3 был прибавлен 0,5% раствор нингидрина в вероналовом буфере при рН 7,0. Через 2 часа после начала реакции на спектрофотометре Бекмана были измерены спектры поглощения полученных желтых растворов, представленные на рис. 2.

Как видно из рис. 2, спектры поглощения соединений пролина и аспарагина с нингидрином очень близки между собой и резко отличаются от спектра поглощения глутаминового соединения (см. рис. 1) и от спектра поглощения раствора нингидрина в вероналовом буфере (контроль).

Это сходство спектров поглощения дает основание предполагать, что желто окрашенное соединение аспарагина с нингидрином подобно соединению, образуемому при реакции пролина с нингидрином, которое

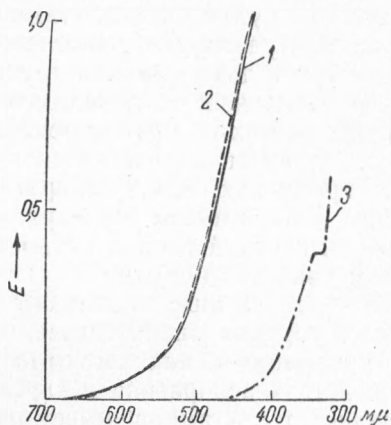
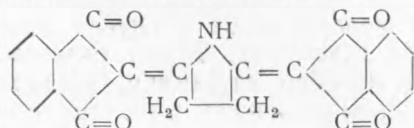
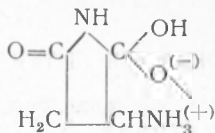


Рис. 2. Спектры поглощения: 1 — аспарагина с нингидрином, 2 — пролина с нингидрином, 3 — раствора нингидрина в вероналовом буфере

имеет следующее строение:



Возможное строение циклической формы аспарагина следующее:



Таким образом, очевидно, что циклическая форма аспарагина может давать с нингидрином соединение, аналогичное пролиновому соединению.

Нами обнаружено, что сине-фиолетовое окрашивание при реакции аспарагина с нингидрином имеет место не только при нагревании, но также и в анаэробных условиях. Если приготовить смесь, состоящую из 3 частей 0,2% раствора аспарагина и 1 части 0,5% раствора нингидрина в вероналовом буфере при pH 7,0, и одну половину раствора оставить в стаканчике, а другую поместить в узкую, закрытую пробкой пробирку, заполнив ее до верха раствором, то раствор в пробирке сначала желтеет, подобно раствору в стаканчике, но через некоторое время, примерно через 1 час, начинает приобретать сине-фиолетовый оттенок, который через 3—3,5 часа достигает максимальной интенсивности. Раствор в стаканчике сохраняет желтую окраску неопределенно долгое время. Подобные опыты были проведены также в трубках Тунберга, которые дают возможность создать анаэробные условия. Раствор аспарагина наливали в трубку Тунберга, а раствор нингидрина в шарик, затем воздух тщательно выкачивали и раствор нингидрина приливали к раствору аспарагина. При этом сразу появлялось сине-фиолетовое окрашивание без промежуточного образования желтого цвета.

На рис. 3 представлены кривые спектров поглощения желтого и сине-фиолетового соединений аспарагина с нингидрином. Желтый раствор получен при реакции в открытой пробирке, сине-фиолетовый — в трубке Тунберга. Концентрации аспарагина и нингидрина в обоих вариантах одинаковы. Исходные растворы для измерения разбавлены в 16 раз.

Из рис. 3 очевидно, что в отсутствие кислорода аспарагин реагирует с нингидрином в своей развернутой форме, а в его присутствии — в циклической. Повидимому, циклическая форма аспарагина является устойчивой только в присутствии кислорода, в бескислородной же среде она переходит в более реактивную ациклическую форму.

Для подтверждения полученных данных о различии между аспарагином и глутамином нами были проведены также реакции аспарагина и глутамина с ксилозой.

Исходя из данных В. Л. Кретовича и Р. Р. Токаревой<sup>(8)</sup>, мы исследовали взаимодействие аспарагина и глутамина с ксилозой. 25 мг амида и 100 мг ксилозы растворяли в 1 мл воды и помещали в термостат при 95° на 2 часа. Измерение спектров поглощения образующихся продуктов реакции показывает, что аспарагин и глутамин не обнаруживают в этом

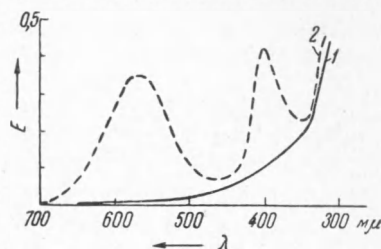


Рис. 3. Спектры поглощения соединений, полученных при реакции аспарагина с нингидрином в присутствии кислорода (1) и в анаэробных условиях (2)

смысле качественного различия, но значительно различаются по интенсивности развивающейся окраски. Судя по величине поглощения, количество образующихся меланоидинов в случае аспарагина почти втрое меньше, чем в случае глутамина. Таким образом, аспарагин, хотя и реагирует с ксилозой подобно глутамину, но гораздо медленнее, что объясняется существенным различием в их структуре.

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

Поступило  
12 X 1953

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> H. Waelsch, 2-me Internat. Congrès de Biochemie, Symposium Biogenese des Proteines, 1952, p. 26. <sup>2</sup> В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева, ДАН, **93**, № 5 (1953). <sup>3</sup> В. Л. Кетович, Основы биохимии растений, М., 1952. <sup>4</sup> F. C. Steward; J. F. Thompson, Nature, **169**, 4305, 739 (1952). <sup>5</sup> S. Ruhemann, J. Chem. Soc., **99**, 1486 (1911). <sup>6</sup> W. Grassmann, K. Arnim, Lieb. Ann., **510**, 288 (1934). <sup>7</sup> S. Moore, W. H. Stein, J. Biol. Chem., **176**, 1, 367 (1948). <sup>8</sup> В. Л. Кретович, Р. Р. Токарева, Биохимия, **13**, 6, 508 (1948).