

П. А. КОЛЕСНИКОВ

## ОБРАЗОВАНИЕ ГЛИКОКОЛА ИЗ ГЛИОКСАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 22 II 1954)

Ранее <sup>(1)</sup> нами было показано, что в экстрактах из зеленых листьев в определенных условиях накапливается глиоксалева кислота. Источниками ее могут быть пуриновые основания, гликокол, гликолева кислота и другие вещества. В свою очередь добавленная к зеленому экстракту глиоксалева кислота претерпевает какие-то превращения без дополнительного поглощения кислорода.

В целях выяснения путей превращений глиоксалевой кислоты в зеленых экстрактах из листьев нами были проведены исследования с применением метода хроматографии на бумаге. Объектом для исследования служили зеленые листья проростков ячменя. Зеленые экстракты получались по ранее описанному методу <sup>(1)</sup>. Хроматографированию на бумаге подвергались органические кислоты и аминокислоты. В первом случае в качестве растворителя применялась смесь из насыщенного водой бутанола и муравьиной кислоты в отношениях 95 : 5, а проявителем служил *n*-бромкрезол зеленый. Во втором случае растворителем служил 70% этиловый спирт, а проявителем нингидрин.

Для обнаружения органических кислот опытный зеленый экстракт, соответствующий 5 г листьев, освобождался от белков и осветлялся добавлением 0,1 объема 1 *M* уксусной кислоты, подкислялся серной кислотой до концентрации 0,5—1% и подвергался экстракции эфиром в сокслетах в течение 6 дней.

Полученный раствор кислот в эфире в экстракционных колбах сгущался до небольшого объема и переливался в маленькие фарфоровые чашки. Колбы ополаскивались 2 раза по 1 мл дистиллированной водой, которая сливалась в чашки с эфиром. Эфир из чашек удалялся путем самоиспарения под тягой при обыкновенной температуре. Несколько проб по 0,02 мл получившегося раствора (раствор № 1) наносились на бумагу. Оставшийся раствор в чашках выпаривался досуха на кипящей водяной бане. Остатки растворялись в 0,5 мл воды. Из этого раствора (раствор № 2) также отбирались пробы по 0,02 мл для хроматографирования. Для обнаружения аминокислот брались пробы по 0,01 мл или из исходного зеленого экстракта после осаждения белков или после экстракции из него органических кислот.

В 0,02 мл раствора № 1 нам не удавалось обнаружить на бумаге каких-либо органических кислот, но мы всегда находили азотную кислоту, которая, как мы выяснили, содержится в листьях ячменя и частично экстрагируется эфиром в применяемых нами условиях.  $R_f$  этой кислоты равен 0,12—0,14.

Если же инкубировался зеленый экстракт из листьев в течение 1 часа при 25° с добавлением глиоксалевой кислоты, то наряду с азотной кисло-

той всегда обнаруживалась янтарная кислота. Это имело место, когда инкубирование проводилось в темноте и на свету, в аэробных и анаэробных условиях. Янтарная кислота обнаруживалась и тогда, когда инкубация проводилась при добавлении гликолевой кислоты или глиоксала. Но с этими веществами янтарная кислота появлялась только в аэробных условиях, в которых примененные вещества окисляются в глиоксалевою кислоту. При хроматографировании 0,02 мл раствора № 2, т. е. более

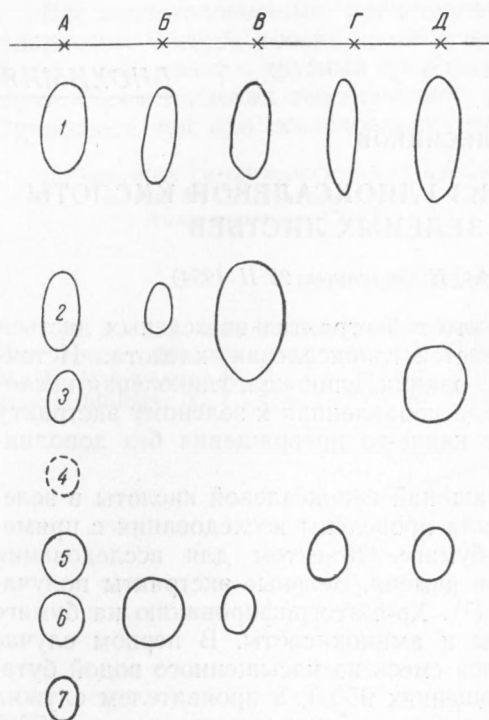


Рис. 1. Хроматография органических кислот: А — раствор № 1, концентрирован в 8 раз. Кислоты: 1 — азотная, 2 — яблочная, 3 — гликолевая, 5 — янтарная, 6 — фумаровая. Б — Д — растворы № 1 с субстратами: Б — с фумаровой кислотой, В — с яблочной кислотой, Г — с глиоксалевою кислотой анаэробно, Д — с гликолевой кислотой аэробно

концентрированного, чем раствор № 1 (в 4 раза), в контрольных пробах, помимо азотной кислоты, мы обнаруживали яблочную, янтарную и фумаровую кислоты. Мы не могли обнаружить лимонную кислоту даже и при концентрировании раствора № 1 в 8—10 раз, но в этих условиях мы нашли гликолевую кислоту и какую-то нами не идентифицированную кислоту с  $R_f$  несколько большим, чем для гликолевой кислоты. Те пробы, раствор № 1 которых в условиях наших определений на бумаге давал пятно янтарной кислоты, с раствором № 2 давали это пятно значительно больших размеров, чем контрольные пробы.

Количественные определения глиоксалевою кислоты показали, что она при инкубации зеленого раствора куда-то расходуется, при этом дополнительное поглощение кислорода не имеет места. Приведенные выше факты отчетливо указывают на какую-то связь между потреблением глиоксалевою кислоты в зеленом экстракте из листьев растений.

Используя в своих исследованиях прибор Варбурга, мы обнаружили, что лимонная, аконитовая, янтарная, фумаровая, яблочная, винная, уксусная и пировиноградная

кислоты не повышают поглощения кислорода исследуемыми нами экстрактами. Все эти кислоты, за исключением янтарной, в условиях наших опытов не вызывают увеличения количества янтарной кислоты в экстрактах.

Если зеленый экстракт инкубировался с добавлением яблочной кислотой, то раствор № 1 наряду с яблочной кислотой на бумаге давал отчетливое пятно фумаровой кислоты. В опытах с фумаровой кислотой появлялась яблочная кислота. Это свидетельствует о наличии в зеленом экстракте фумаразы.

Описанные факты показывают, что потребление глиоксалевою кислоты в зеленом экстракте не обусловлено превращением ее в янтарную кислоту через цикл карбоновых кислот или каким-либо другим путем. Недавно появились сообщения, что в экстрактах из зеленых листьев  $C^{14}$ -гликолевая кислота частично превращается в  $C^{14}$ -гликокол (2), а глиоксалевая кислота может медленно превращаться в гликокол путем переаминирования в буферных растворах при биологических условиях (3). Методом хро-

матографии на бумаге нами установлено, что в исследуемых нами зеленых экстрактах наряду с другими аминокислотами содержится гликокол и глютаминовая кислота. После инкубации зеленого экстракта в течение часа с глиоксалевой или гликолевой кислотой, когда имело место накопление янтарной кислоты, по сравнению с контролем количество гликокола увеличивалось, а количество глютаминовой кислоты снижалось. Добавление глютаминовой кислоты к опытной пробе с глиоксалевой кислотой ускоряло потребление глиоксалевой кислоты. Так например, из добавленных 2,5 мг глиоксалевой кислоты к 20 мл зеленого экстракта за 1 час при 25° Ц в контроле последней потребилось 0,5 мг, а в присутствии 0,01 М глютамата калия все 2,5 мг. В этом случае увеличивается и выход гликокола по сравнению с пробой с одной глиоксалевой кислотой. Для иллюстрации мы приводим схемы некоторых полученных нами хроматограмм (см. рис. 1 и 2).

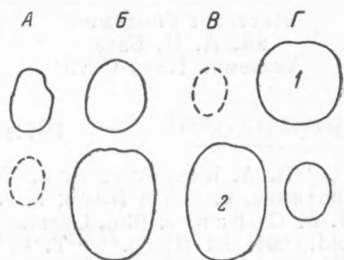


Рис. 2. Хроматография аминокислот (отрезок хроматограммы с гликоколом и глютаминовой кислотой). опыты: А — с глиоксалатом, Б — с глиоксалатом и глютаматом, В — с глютаматом, Г — с гликоколом. Пятна: 1 — гликокол, 2 — глютаминовая кислота

Методом Фридемана и Хаугена (4) в пробах с глиоксалевой и глютаминовой кислотами после инкубации обнаружено накопление кетоглутаровой кислоты.

Этим методом определяется и глиоксалевая кислота. Для определения этих кислот при одновременном их присутствии мы использовали метод Фостера и др. (5). Последним методом определяется только глиоксалева кислота, а кетоглутаровая не определяется. После инкубации в пробе с глиоксалевой + глютаминовой кислотами, первая указанным специфичным методом не была обнаружена, что свидетельствует о ее полном превращении. Эти факты говорят о том, что в зеленом экстракте из листьев растений совершается процесс переаминирования. Глютаминовая кислота, дезаминируясь, превращается в кетоглутаровую, а глиоксалева аминируется и превращается в гликокол.

Таблица 1

Декарбоксилирование глютаминовой кислоты (в мл на 0,5 г свежих листьев за 1 час)

Пробы	Поглощ. O <sub>2</sub>	Выделение CO <sub>2</sub>
Глиоксалат . .	44; 50	26; 30
Глютамат . .	37; 37	62; 62
Глиоксалат +		
+ глютамат . .	39; 37	71; 74

Известно, что α-кетоглутаровая кислота путем окислительного декарбоксилирования превращается в янтарную кислоту. Методом в приборе Варбурга мы нашли, что в условиях наших опытов такое декарбоксилирование проявляется очень слабо (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что глютамат вызывает увеличение количества углекислоты, выделяемой зеленым экстрактом; глиоксалат немного повышает это количество, но в обоих случаях не имеет места увеличение количества поглощаемого кислорода.

Известно (6), что в листьях ячменя имеется декарбоксилаза глютаминовой кислоты. Вероятно, наблюдаемое в наших опытах добавочное выделение углекислоты в присутствии глютаминовой кислоты и обусловлено деятельностью этой декарбоксилазы.

Эти факты не дают основания считать наблюдаемое нами накопление янтарной кислоты результатом биологического окислительного декарбоксилирования образующейся кетоглутаровой кислоты. Мы склонны считать, что она образуется в наших опытах из кетоглутаровой кислоты, преимущественно во время экстракции кислот.

Нами также обнаружено, что переаминирование глиоксалевой кислоты имеет место и с аспарагиновой кислотой. Однако этот процесс идет медленнее, чем с глутаминовой кислотой.

Из всего вышесказанного следует, что в зеленых экстрактах из листьев растений глиоксалева кислота легко превращается в гликокол путем переаминирования с некоторыми аминокислотами.

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

Поступило  
9 II 1954

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> П. А. Колесников, ДАН, **60**, 1205 (1948); **71**, 911 (1950); **90**, 221 (1953); Биохимия, в. 2, 124 (1949); Изв. АН СССР, сер. биол., 4, 87 (1950). <sup>2</sup> N. E. Tolbert, M. S. Cohen, J. Biol. Chem., **204**, 640 (1953). <sup>3</sup> H. J. Nakada, S. Weinhouse, *ibid.*, **204**, 831 (1953). <sup>4</sup> T. E. Friedeman, G. E. Haugen, *ibid.*, **147**, 415 (1943). <sup>5</sup> P. Foster, M. Esterer, *ibid.*, **156**, 161 (1944). <sup>6</sup> H. Beevers, Biochem. J., **48**, 132 (1951).