

А. К. РОДОПУЛО

О ДЕГИДРОГЕНАЗАХ ВИНОГРАДА

(Представлено академиком А. И. Опариным 21 I 1954)

Дегидрогеназы растений и животных осуществляют дегидрирование субстратов и перенос водорода в конечном счете на кислород, активируемый окислительно-ферментативными системами. Этот процесс проходит через промежуточные соединения, которые способны обратимо окисляться и восстанавливаться. К этим промежуточным соединениям относятся коэнзимы I и II, флавопротеины, цитохромы, полифенолы и др. Изучением дегидрогеназ в растительных тканях занимался ряд исследователей⁽¹⁻⁸⁾.

В настоящей работе мы изучали активность дегидрогеназ в растертых тканях ягод винограда и в сусле для установления их роли при переработке винограда. Работа проводилась со следующими сортами винограда: Чинури, Горули-Мцване и Ркацители. При каждом определении активности дегидрогеназ бралось около 100 г винограда и отжималось через марлю. Кожура с мякотью растиралась до кашицеобразного состояния, затем полученная каша суспендировалась в отжатом сусле.

Вначале активность дегидрогеназ определялась по способности восстанавливать метиленовую синь в специальных вакуумных пробирках. Однако опыты показали, что кожура в присутствии донатора водорода (соли органической кислоты) полностью не обесцвечивает метиленовую синь в течение 90 мин. Очевидно, в растертом винограде образуются какие-то вещества, которые тормозят обесцвечивание метиленовой сини. Впоследствии выяснилось, что тормозящее действие оказывают полифенолы, которые в присутствии полифенолоксидазы окисляются в хиноны, тормозящие, как известно, действие многих дегидрогеназ. Действительно, после ингибирования полифенолоксидазы цианистым калием нам удалось установить наличие дегидрогеназ в винограде. Активность дегидрогеназ мы определяли по поглощенному кислороду в респирометрах Варбурга. При этом переносчиком водорода на кислород служила метиленовая синь.

Известно, что виноград содержит органические кислоты (винную, яблочную, лимонную и др.). Поэтому казалось целесообразным промыть дистиллированной водой растертый виноград и освободиться от тех субстратов, которые могут повлиять на поглощение кислорода. К промытым и отравленным цианидом тканям винограда добавляли метиленовую синь, янтарную, яблочную и лимонную кислоты — каждую в отдельности — для установления наличия дегидрогеназ названных кислот в винограде. Одновременно мы изучали окисление этих кислот без добавления цианистого калия и метиленовой сини. Результаты анализов приведены в табл. 1.

Из этих данных видно, что после трехкратной промывки растертых тканей винограда нам удалось уменьшить поглощение кислорода с 85 до 46 μ л. Добавление к промытым тканям винограда KCN и метиленовой сини вызвало уменьшение поглощения кислорода до 21,6 μ л. Прибавление янтарной кислоты к отравленным тканям вызвало увеличение поглощения

кислорода с 21 до 43 μ л. Малоновая кислота ингибирует окисление янтарной кислоты, но неполностью. Яблочная и лимонная кислоты также окисляются растертыми тканями винограда, но значительно слабее. Это можно объяснить недостатком самих дегидрогеназ или коэнзимов (кодегидрогеназ).

Таблица 1

Влияние различных органических кислот на поглощение кислорода в растертых и промытых тканях винограда (в μ л на 500 мг сух. вещества)

Реакционная смесь	Концентрация субстратов	Поглощение O_2 в μ л в течение 90 мин.
Растертый виноград (а)		85,0
Растертый и промытый виноград (б)		46,8
б + KCN + метилен. синь (в)		21,6
в + янтарн. к-та	$3 \cdot 10^{-2} M$	43,7
в + янтарн. + малонов. к-та	$3 \cdot 10^{-2} M$	25,6
в + яблочн. к-та	$3 \cdot 10^{-2} M$	32,6
в + лимонн. к-та	$3 \cdot 10^{-2} M$	30,2

В некоторых опытах в каждый сосудик Варбурга брались кружочки ягод винограда толщиной 2—3 мм в 1,5 мл фосфатного буферного раствора pH 7,2 и 0,5 мл субстрата (органические кислоты) и в таких же количествах цианистого калия и метиленовой сини, как и в первом случае. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние органических кислот на поглощение кислорода в кружочках ягод винограда (продолжительность опыта 90 мин., температура 25°)

Реакционная смесь	Поглощение O_2 в μ л
Виноград (кружочки) (а)	96,0
а + KCN + метилен. синь (б)	40,8
б + янтарн. к-та, $3 \cdot 10^{-2} M$	71,6
б + яблочн. к-та, $3 \cdot 10^{-2} M$	55,5
б + яблочн. к-та + DPN	54,6

Как видно из табл. 2, добавление яблочной кислоты к винограду не вызывало такого увеличения поглощения кислорода, как добавление янтарной кислоты, так как в винограде содержится яблочная кислота. При одновременном добавлении яблочной кислоты и дифосфо-

пиридиннуклеотида к кружочкам винограда окисление яблочной кислоты не усиливается. Возможно, что яблочная кислота в винограде окисляется не дегидрогеназой яблочной кислоты, а маликоэнзимом в присутствии трифосфопиридиннуклеотида (TPN) по схеме: яблочная кислота + маликоэнзим + TPN = пиривиноградная кислота.

Янтарная кислота окисляется в сусло гораздо слабее, чем в тканях винограда. Как видно, сукциндегидраза в тканях винограда, как и в других тканях растительного и животного происхождения, находится в связанном состоянии, и небольшие количества ее переходят в сусло вместе с тканями винограда. Таким образом, в винограде находится сукциндегидраза, которая переносит водород на кислород, активируемый окислительными ферментами. Интересно было выяснить, с какой завершающей окислительной ферментативной системой взаимодействует сукциндегидраза в винограде.

До сих пор известно участие сукциндегидрогеназы в системе, где завершающим ферментом является цитохромоксидаза. Мы попытались установить присутствие цитохромоксидазы в винограде. Но при прибавле-

нии цитохрома вместе с гидрохиноном не только не усиливается дыхание винограда, но даже наблюдается уменьшение окисления гидрохинона. Это видно из данных (см. табл. 3).

Гидрохинон энергично окисляется в некипяченых растертых тканях винограда, в то время как в растертой и прокипяченной массе гидрохинон почти не окисляется. Это дало нам основание предполагать возможность существования в винограде параполифенолоксидазы (9). Наши опыты показали также, что в растертом винограде при действии орто-полифенолоксидазы образуются орто-хиноидные вещества, а последние, возможно, дегидрируют гидрохинон. Окисляется ли гидрохинон в винограде параполифенолоксидазой или же продуктами действия орто-полифенолоксидазы — этот вопрос требует дальнейшего исследования. Во всяком случае гидрохинон в наших опытах оказался непригодным для обнаружения цитохромоксидазы в винограде. Поэтому мы решили при определении цитохромоксидазы пользоваться парафенилендиамином для восстановления цитохрома С. Результаты анализов приведены в табл. 4.

Таблица 4

Влияние цитохрома С и парафенилендиамина на поглощение O₂ в винограде

Реакционная смесь	Поглощение O ₂ в мл в течение 90 мин.
Растертый виноград (а)	86,2
а + парафенилендиамин (б) . . .	125,5
б + цитохром С	133,6
Растертый виноград (а)	88,2
а + янтарн. кислота (б)	119,8
б + янтарн. к-та + цитохром С (в)	120,5
в + янтарн к-та + цитохром С + + малон. к-та	14,5

полагать, что в винограде содержится цитохромоксидаза и что сукциндегидраза участвует в переносе водорода на цитохромоксидазную систему по схеме: янтарная → сукциндегидраза → цитохромоксидаза → O₂.

Однако прямое спектроскопирование показало, что виноград не содержит цитохрома С и добавленный к растертому винограду восстановленный цитохром С не окисляется при достаточной концентрации восстановителя. Вопрос о последнем звене системы, окисляющей янтарную кислоту в растениях, остается нерешенным. Можно предполагать, что сукциндегидраза участвует в переносе водорода на полифенолоксидазную систему по схеме: янтарная кислота → сукциндегидраза → кофакторы → полифенолоксидаза → O₂. Но до настоящего времени еще не было доказательств этого способа окисления.

Органические кислоты занимают видное место в обмене веществ винограда. При получении сусла они претерпевают значительные изменения. Известно, что при брожении сусла на мязге титруемая кислотность ниже,

Таблица 3

Влияние цитохрома С и гидрохинона на поглощение O₂ в винограде

Реакционная смесь	Поглощение O ₂ в мл
Растертый виноград (а)	86,0
а + гидрохинон (б) . . .	151,0
б + цитохром С	107,8
Кипяченый растертый виноград + гидрохи- нон	10,2

Из табл. 4 видно, что прибавление цитохрома С одновременно с парафенилендиамином к растертому винограду дало увеличение поглощения кислорода лишь на 8 мл. Следовательно, и с парафенилендиамином не удалось обнаружить цитохромоксидазу в винограде.

Интересно отметить, что окисление янтарной кислоты в винограде в присутствии цитохрома С почти полностью ингибируется малоновой кислотой, в то время как в отсутствие цитохрома С ингибирование неполное. Казалось бы, на основании этих данных можно

чем при сбраживании суслу без мязги. До настоящего времени это приписывали тому, что кожа и гребни адсорбируют кислоты. Приведенные выше данные показывают, что на уменьшение титруемой кислотности суслу в мязге в процессе брожения влияет действие специфических ферментов — дегидрогеназ.

Закавказский филиал
Всесоюзного научно-исследовательского
института «Магарач»

Поступило
4 IV 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Палладин, Изв. Акад. наук, 4, 309 (1915). ² В. Залесский, Biochem. Zs., 69, 289 (1915). ³ Д. Михлин, О. Бородин, Enzymologia, 9, 28 (1940). ⁴ Н. Сисакян, К. Чамова, ДАН, 67, 337 (1949). ⁵ Е. Додонова, Биохимия, 4, 342 (1939). ⁶ T. Thunberg, Scand. Archiv Physiol., 74, 16 (1936). ⁷ Н. Гельман, Биохимия, 14, 79 (1949). ⁸ J. Bonner, S. G. Wildman, Arch. Biochem., 10, 497 (1946). ⁹ А. Родопуло, Биохимия виноделия, Изд. АН СССР, 3, 1950, стр. 43.