

Член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ, Е. Б. ПЕРСКАЯ,
В. В. РАЧИНСКИЙ, Н. С. ГЕЙКО

ОБРАЗОВАНИЕ β -МЕРКАПТОПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ (КЕТОАНАЛОГ ЦИСТЕИНА) В ЛИСТЬЯХ PHASEOLUS VULGARIS

В. Л. Кретовичем и соавторами (¹) при исследовании включения меченого углерода (C^{14}) в кетокислоты при фотосинтезе было высказано предположение о вероятности образования β -меркаптопировиноградной кислоты (кетоналог цистеина). В данной работе изучалось образование кетоналога цистеина в листьях фасоли при коротких (секундных) экспозициях фотосинтеза. Опыты проводились на целых растениях фасоли с применением автоматической ассимиляционной камеры (²). Объектом исследования являлась фасоль *Phaseolus vulgaris* сорта Кустовая без волокна. Были приняты экспозиции фотосинтеза 1; 3; 5; 10 и 15 сек. C^{14} -кетокислоты определялись в виде их 2,4-динитрофенилгидразонов (2,4-ДНФГ). Идентификация подтверждена гидрогенолизом 2,4-ДНФГ кетокислот до соответствующих аминокислот. Условия проведения эксперимента и используемые методы анализа изложены в ранее опубликованных работах (^{3, 4}).

Проведенные опыты по изучению включения $C^{14}O_2$ в растения фасоли показали, что кетокислотная фракция из листьев фасоли содержит меченый углерод начиная с 1 сек. фотосинтеза. При этом одновременно с меченой пировиноградной кислотой обнаружено включение C^{14} в β -меркаптопировиноградную кислоту (рис. 1). Относительная радиоактивность образующейся β -меркаптопировиноградной кислоты на ранних стадиях фотосинтеза (1—2 сек.) составляет 13—14% от общей радиоактивности всех кетокислот и понижается до 6% с увеличением продолжительности фотосинтеза. Подтверждение образования β -меркаптопировиноградной кислоты в листьях фасоли было получено при хроматографии аминокислот, образовавшихся при гидрогенолизе 2,4-ДНФГ кетокислот. На радиоавтографах хроматограмм аминокислот видны зоны цистеина начиная с 1 сек. фотосинтеза (рис. 2).

Для определения β -меркаптопировиноградной кислоты были проведены также дополнительные исследования. Отдельные зоны хроматограмм 2,4-ДНФГ-кетокислот (рис. 1, зоны 1, 2), содержащие предполагаемую β -меркаптопировиноградную кислоту, элюировались 80% этиловым спиртом. Полученный элюат затем подвергался каталитическому гидрогенолизу с последующей хроматографией. Во всех применяемых системах растворителей величина R_f аминокислоты, образующейся при гидрогенолизе, соответствовала величине R_f цистеина — метчика (рис. 3). Кроме того, была проведена специфическая цветная проба на цистеин с нитропруссидом натрия (⁵).

Применение радиоактивного изотопа S^{35} позволило окончательно установить наличие β -меркаптопировиноградной кислоты в листьях фасоли. Растения выращивались в условиях водной культуры на питательной смеси Кнопа с удельной радиоактивностью S^{35} в растворе 20 $\mu C/l$ в начале выращивания растений. Анализ полученных S^{35} -кетокислот производился по аналогичной методике в опытах с $C^{14}O_2$ (^{3, 4}).

Радиохроматографический анализ фракции S^{35} -кетокислот показал, что в листьях фасоли образуются серусодержащие кетокислоты, в частно-

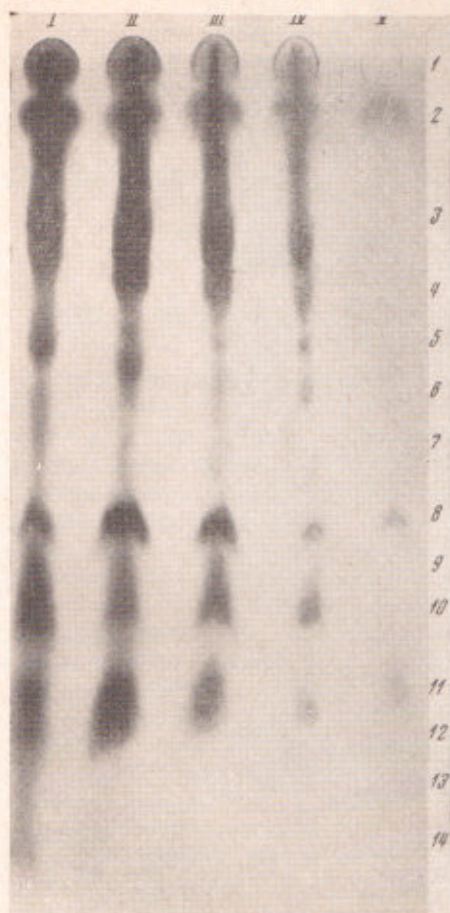


Рис. 1

Рис. 1. S^{35} -радиохроматограммы 2,4-ДНФГ-кетокислот из листьев фасоли (третичный амиловый спирт — этанол — вода 9:1:4). I — 1 сек., II — 3, III — 5, IV — 10, V — 15 сек.; 1, 5, 6 — неизвестные кислоты, 2 — β -меркаптопировиноградная (I); 3 — *d*-кетоглутаровая, 4 — щавелевоуксусная, 7 — глиоксилевая (I); 8 — пировиноградная (I); 9 — оксипировиноградная (I), 10 — глиоксилевая (II); 11 — пировиноградная (II); 12 — фенилпировиноградная; 13 — *d*-кето- β -метил-*n*-масляная, 14 — кето- β -метил-*n*-валериановая

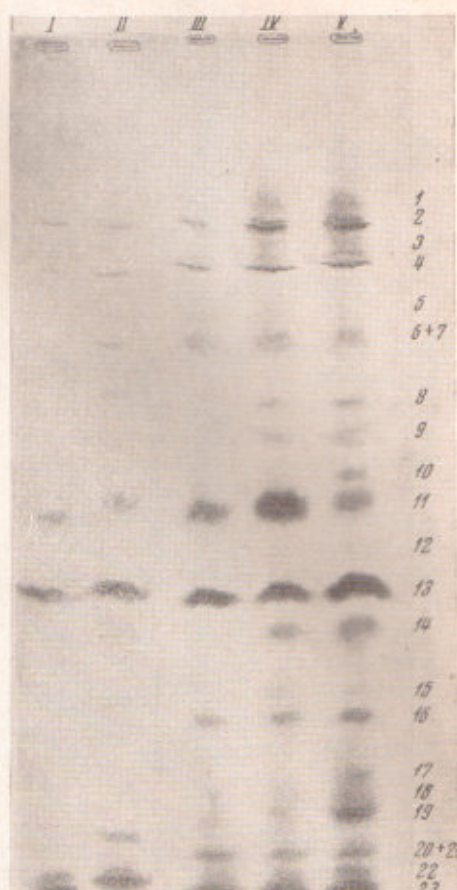


Рис. 2

Рис. 2. Радиохроматограммы аминокислот, образованных при гидролизе S^{35} -2,4-ДНФГ кетокислот из листьев фасоли (*n*-бутанол — уксусная кислота — вода 4:1:1; 300—60—140). I—V — то же, что на рис. 1. 1 — цистеин; 2—4, 10, 13, 15 — неизвестные кислоты, 5 — аспарагиновая кислота, 6 + 7 — глицин + серин, 8 — глутаминовая кислота, 9 — треонин, 11 — α -аланин, 12 — β -аланин, 14 — γ -аминомасляная кислота, 16 — тирозин, 17 — валин, 18 — метионин, 19, 23 — невосстановленные полностью 2,4-ДНФГ-кетокислот; 20 + 21 — лейцин + изолейцин, 22 — фенилаланин

сти β -меркаптопировиноградная кислота. На радиоавтографах хроматограмм S^{35} -кетокислот обнаружены три зоны. Известно (²), что 2,4-ДНФГ кетокислот образуют на бумажных хроматограммах несколько стереоизомеров. Возможно, что 2,4-ДНФГ β -меркаптопировиноградной кислоты при использовании для хроматографического анализа системы растворителей третичный амиловый спирт — этанол — вода (9:1:4) образует два изомера. Величина *R_f* цис-изомера (I) совпадает со значениями *R_f* для β -меркаптопировиноградной кислоты, полученными в опытах с меченой углекислотой (рис. 1, зона 2), и составляет 0,10—0,11.

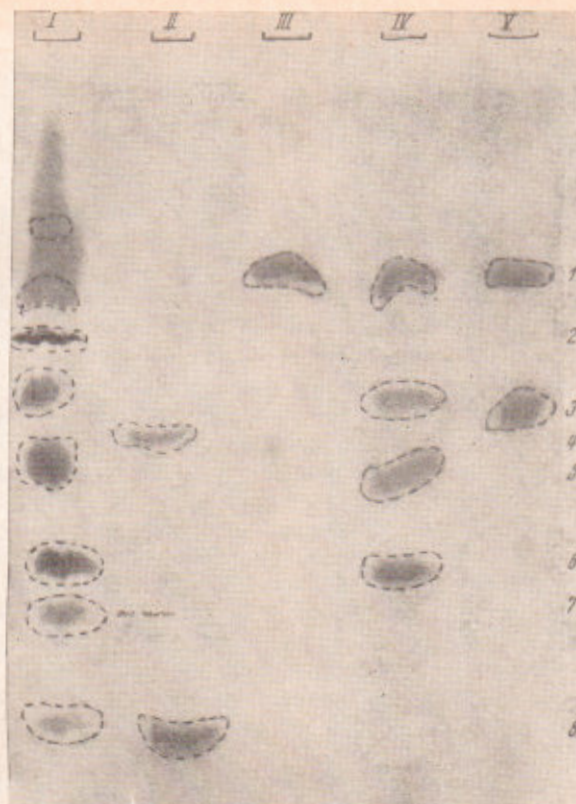


Рис. 3. Хроматограммы аминокислот, образованных при гидрогенолизе 2,4-ДНФГ-кетокислот (кетокислоты элюированы из отдельных зон на хроматограммах, *n*-бутанол — уксусная кислота — вода 4:1:1; 300:60:140). I, II, V — аминокислоты — метки; III — аминокислоты, образованные при гидрогенолизе 2,4-ДНФГ-кетокислот, элюированных из зоны I на хроматограмме, представленной на рис. 1; IV — аминокислоты, образованные при гидрогенолизе 2,4-ДНФГ-кетокислот, элюированных из зоны 2 на хроматограмме рис. 1. 1 — цистеин, 2 — аргинин, 3 — аспарагиновая кислота, 4 — серин, 5 — глицин, 6 — глютаминовая кислота, 7 — треонин, 8 — α -аланин

Значения R_f для второй зоны 0,63—0,65 (вероятно, транс-изомер). Третья зона на хроматограмме S^{35} -кетокислот, возможно соответствует кетоаналогу метионина. C^{14} - α -кето- γ -метилглутаминовая кислота — кетоаналог метионина — была обнаружена в опытах с меченой углекислотой после 10 сек. фотосинтеза (см. рис. 2).

Московский технологический институт
пищевой промышленности

Поступило
22 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Л. Кретович, М. П. Ценова и др., Изв. АН СССР, сер. биол., 4 (1967).
² П. С. Беликов, Г. Б. Асафов, Изв. ТСХА, № 1 (1968). ³ Е. Б. Перская, Докл. ТСХА, в. 144 (1968). ⁴ В. Л. Кретович, Е. Б. Перская и др., Докл. ТСХА, в. 149 (1969). ⁵ С. Арон, Изотопные методы в биохимии, ИЛ, 1959.
⁶ Биохимические методы анализа растений, ИЛ, 1960.