

Академик АН ГрузССР С. В. ДУРМИШИДЗЕ, А. Н. СОПРОМАДЗЕ,
А. Г. ШАЛАШВИЛИ, А. Б. МЕСХИ

РАСЩЕПЛЕНИЕ ЦИАНИДИНА РАСТИТЕЛЬНЫМИ ТКАНЯМИ В СТЕРИЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Способность выспших растений расщеплять бензольные ядра флавоноидных веществ была показана на примерах превращения катехинов, флавонолов и изофлавонов (¹⁻⁶). Окислительный разрыв ароматических ядер антоцианидинов, весьма важного и обширного класса флавоноидов, еще не изучен. Однако исследование превращения антоцианидинов может пролить свет и на общие вопросы метаболизма флавоноидов. Наиболее широко распространенным антоцианидином в растениях является цианидин. К тому же цианидин, (+)-катехин и кверцетин отличаются друг от друга только по уровню окисленности трехуглеродного фрагмента, и сопоставление результатов их превращений, возможно, выявит взаимосвязи между степенью окисленности гетероцикла и метаболизмом флавоноидов.

Нами была изучена возможность расщепления бензольных ядер C¹⁴-цианидина различными тканями растений в стерильных условиях.

Из семян винограда сорта «Саперави» идентифицирован лейкоцианидин (⁷). Показано, что он является основным лейкоантоцианидином «Саперави». Исходя из этого препарат радиоактивного цианидина был получен нами также из семян винограда «Саперави». Виноградный куст помещали в камеру из органического стекла емкостью 200 л, содержащую 1% C¹⁴O₂ с удельной активностью 50 мкС/л. Экспозиция продолжалась 72 час. Затем семена и кожицу ягод винограда отделяли от мякоти, размельчали и экстрагировали 80% водным метанолом (⁸). Экстракт фильтровался через стеклянный фильтр № 3, и фильтрат сгущался в вакууме при 35–40°. Концентрированный экстракт обрабатывали хлороформом. К очищенному экстракту добавляли концентрированную соляную кислоту с таким расчетом, чтобы в среде создавалась 2 N HCl. Смесь нагревали в кипящей водяной бане в течение 30 мин. с целью превращения лейкоантоцианидинов в соответствующие антоцианидины (⁹). Из полученного темно-красного раствора антоцианидины экстрагировали изоамиловым спиртом полностью. Экстракт концентрировали в вакууме при 55–60°, наносили в виде полосы (10 см) на бумагу Ватман 3 и хроматографировали в системе растворителей: уксусная кислота — соляная кислота — вода (30:3:10). Полосы, соответствующие цианидину, вырезали и элюировали изоамиловым спиртом в темноте при комнатной температуре. Элюат фильтровали и сгущали в вакууме до сухого остатка. Остаток затем высушивали в вакуум-эксикаторе над P₂O₅. В результате был получен красно-коричневый чистый препарат цианидина с удельной активностью 31610 имп/(мин·мг), который перед опытами еще раз был проверен методом хроматографии на бумаге. После эксперимента материал фиксировали кипящим этанолом и анализировали (¹⁰). Радиоактивность выделенного CO₂ определяли по BaC¹⁴O₃. Измерение радиоактивности проводили на установке типа ПП-8 с торцовым счетчиком БФЛ-25 и жидкостным сцинтилляционным спектрометром Sh-30. Идентификацию индивидуальных соединений проводили при помощи радиоавтографии и метода хрома-

тографии на бумаге. С целью идентификации кофейной кислоты определяли величины R_f в разных системах растворителей (2% уксусная кислота, бензол — уксусная кислота — вода (10:7:3)) (¹¹) и изучали ее химические и физические свойства сравнительно с аутентичной кофейной кислотой.

Были поставлены следующие два опыта. 1. Изолированные стерильные культуры ткани дикого винограда (*Parthenocissus tricuspidata*) в течение 3 мес. выращивали на питательной среде Хеллера с радиоактивным цианидином (¹²). В 300 мл колбу вносили по 50 мл питательной среды и по 0,5 мг радиоактивного цианидина, предварительно растворенного в 0,5 мл 96% этанола. Опыт был поставлен в 10 колбах. 2. Четырнадцатидневные проростки кукурузы сорта «Аджаметис тетри», выращенные в стерильных условиях, выдерживали на питательной среде Кнопа с радиоактивным цианидином при температуре 25° в течение 72 час. В каждую колбу были помещены по два проростка кукурузы и внесено по 25 мл раствора Кнопа с 11,2 мг радиоактивного цианидина, заранее растворенного в 0,5 мл 96% этанола. Физиологические условия в опытах были обычными.

C^{14} -цианидин при концентрации 0,5 мг на 50 мл среды Хеллера оказывал стимулирующее действие на рост изолированной ткани дикого винограда. Корни проростков кукурузы в присутствии C^{14} -цианидина на питательной среде Кнопа развивались нормально. C^{14} -цианидин из питательной среды Хеллера за 3 мес. почти полностью был усвоен культурой ткани дикого винограда, а проростки кукурузы за 72 часа из питательной среды Кнопа усвоили 65,1%. Усвоенное количество C^{14} -цианидина полностью успело метаболизироваться в тканях винограда. В проростках кукурузы за 72 часа превращениям подвергалось только 24,8% C^{14} -цианидина. Из корней кукурузы радиоактивность продуктов превращения цианидина передвигалась по стеблям.

Результаты исследования продуктов превращения C^{14} -цианидина показывают, что молекулы цианидина в растительных тканях претерпевают глубокое превращение (табл. 1, 2). Его бензольные ядра разрываются, и 80—90% продуктов их окислительного превращения включаются в обычные метаболиты обмена веществ клетки: органические кислоты, аминокислоты, сахара и углекислый газ дыхания. Самая большая часть радиоактивности приходится на долю органических кислот, затем следуют

Таблица 1

Включение радиоактивных атомов цианидина во фракции органических кислот, аминокислот, сахаров, CO_2 и веществ, не растворимых в 80% этаноле

Растительные ткани	Сырой вес, г	Радиоактивность ткани, 10^3 имп./ (мин.г)	Радиоактивность каждой фракции, %			Σ фракций CO_2	Вещества, связанные с полисахаридами, %
			органические кислоты	аминокислоты	сахара		
Стерильные культуры ткани дикого винограда	25,3	51	38,8	15,5	10,2	19,3	16,2
Корни стерильно выращенных проростков кукурузы	5,1	56	31,7	20,4	14,2	23,0	10,7

углекислый газ, аминокислоты и сахар. Радиоактивные вещества, связанные с белками и другими биополимерами клетки, в общей сумме радиоактивности фракций составляет 10—16%.

Одинаковая закономерность обнаруживается в обоих опытах и при распределении радиоактивности между идентифицированными соединениями. Самой высокой радиоактивностью обладают кофейная и фумаро-

Идентифицированные C^{14} -соединения при превращении C^{14} -цианидина

Растительные ткани	Распределение радиоактивности между идентифицированными соединениями, %										
	фумаровая кислота	яблочная кислота	хинная кислота	кофейная кислота	матеонин + валин	лизин + фенил-аланин	тирозин	треонин	глюкоза	фруктоза	сахароза
Стерильные культуры ткани дикого винограда	17,5	5,5	0,3	35,8	23,6	8,8	0,3	5,5	1,2	1,2	0,3
Корни стерильно выращенных проростков кукурузы	17,3	3,6	2,9	32,9	22,5	9,6	2,0	1,7	4,5	1,6	1,4

вая кислоты. $\frac{1}{3}$ часть радиоактивности идентифицированных веществ падает на долю кофейной кислоты. Ткани дикого винограда и проростков кукурузы обычно не содержат значительного количества кофейной кислоты. Поэтому высокое содержание радиоактивной кофейной кислоты в наших опытах дает возможность предполагать, что образование кофейной кислоты идет непосредственно из фрагмента C_6-C_3 -цианидина. В литературе имеются данные, указывающие на то, что наилучшим предшественником цианидина в *Petunia hybrida* является соответствующая оксикоричная кислота — кофейная кислота (¹³). Нам пока еще не удалось изучить распределение радиоактивности внутри молекул кофейной кислоты, и поэтому в настоящее время трудно судить о действительных путях ее образования. Высокая активность фумаровой кислоты приводит к мысли о том, что цианидин и продукты его превращения действуют на фумаратгидратазу. В каждом опыте высокая радиоактивность углекислого газа дыхания (соответственно 19,3 и 23%) и кофейной кислоты (соответственно 35,8 и 32,9%) указывает на возможность превращения цианидина с начала разрушения его флороглюцинового кольца.

Сопоставление данных превращения C^{14} -катехина (³), C^{14} -цианидина и C^{14} -кверцетина (⁴) показывает, что корни проростков кукурузы в одинаковых стерильных условиях выделяют соответственно 4, 23 и 45% радиоактивного углекислого газа. По-видимому, превращение катехина, цианидина и кверцетина, в частности окисление до CO_2 , предопределяется и степенью окисленности 3-го и 4-го углерода гетероцикла. Очевидно, действие разных ферментов или ферментных систем на трехуглеродный фрагмент гетероцикла обуславливается строением гетероцикла. В связи с этим следует отметить, что физиологическая активность флавоноидов зависит также от замещенных радикалов у 3-го и 4-го углерода в гетероцикле (¹⁴). Специфическое отношение к двойным связям гетероцикла флавоноидов выявляется и у грибов. Было показано, что для использования флавоноидов плесенью *Aspergillus flavus* необходима двойная связь между C_2 и C_3 (¹⁵, ¹⁶).

Результаты изучения усвоения и превращения (+)-катехина (³), кверцетина (⁴) и цианидина в корнях стерильно выращенных проростков кукурузы показывают, что растения могут усваивать флавоноиды непосредственно из почвы без их предварительного разложения микроорганизмами. Приведенные экспериментальные данные дают нам основание утверждать, что растительные ткани способны расщеплять бензольные ядра цианидина и продукты его окислительного превращения использо-

вать в нормальных физиологических условиях как источник энергии и строительный материал для биосинтеза различных веществ клетки.

Институт биохимии растений
Академии наук ГрузССР
Тбилиси

Поступило
17 IX 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Н. Запрометов, ДАН, 125, № 6, 1359 (1959). ² М. Н. Запрометов, В. Я. Бухлаева, Физиол. раст., 14, 5, 804 (1967). ³ С. В. Дурмишидзе, А. Г. Шалашвили, ДАН, 210, № 2, 427 (1973). ⁴ С. В. Дурмишидзе, А. Г. Шалашвили, ДАН, 181, № 6, 1489 (1968). ⁵ W. Hoesel, P. Shaw, W. Barz, Zs. Naturforsch., 27b, 8, 946 (1972). ⁶ W. Barz, Ch. Adamek, J. Berlin, Phytochemistry, 9, 8, 1735 (1970). ⁷ С. В. Дурмишидзе, А. Н. Сопромадзе, Тез. 7-го междунаrodn. симпозиума по химии природных соединений, Рига, 1970. ⁸ T. Swain, W. E. Hillis, J. Sci. Food Agric., 10, 63 (1959). ⁹ E. C. Bate-Smith, Biochem. J., 58, 1, 122 (1954). ¹⁰ Р. Я. Школьник, Н. Г. Доман, В. Н. Костылев, Биохимия, 26, 4, 621 (1961). ¹¹ В. А. Вохм, R. M. Truon, Canad. J. Bot., 45, 5, 585 (1967). ¹² Р. Г. Бутенко, Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений, М., 1964. ¹³ D. Hess, Planta, 60, 568 (1964). ¹⁴ С. В. Дурмишидзе, А. Б. Месхи, А. А. Гоциридзе, Сообщ. АН ГрузССР, 58, 2, 445 (1970). ¹⁵ D. N. S. Westlake, Canad. J. Microbiol., 9, 211 (1963). ¹⁶ D. W. S. Westlake, J. F. T. Spenser, Canad. J. Microbiol., 12, 165 (1966).