Analiza transaminacji i dekarboksylacji kwasu glutaminowego w liściach niektórych roślin metodą chromatograficzną

*Study of transamination and decarboxylation of glutamic acid in leaves
of various plants*

M. GUBAŃSKI

WSTĘP

Odkrycie procesów transaminacji przez Braunsteina i Kritzmanna w 1937 roku było znacznym postępem w poznaniu metabolizmu azotu, a w szczególności w poznaniu dróg biosyntezy aminokwasów i sposobów ich degradacji.

Istota procesów transaminacji polega na międzycząsteczkowym przenoszeniu grup aminowych z aminokwasów na odpowiednie ketokwasy (Braunstein 1953, Braunstein i Azarch 1957, Krietowicz i Bundiel 1949). Reakcje transaminacji katalizowane są przez enzymy aminoferyazy, których grupę prostetyczną stanowi fosfopirydoksal. Donatorami grup aminowych mogą być teoretycznie wszystkie aminokwasy, jednak Wilson, King i Burris (1954) stosując metodę znakowanych pierwiastków wykazali, iż grupa aminowa różnych aminokwasów przenoszona jest na ketokwasy z niejednakową prędkością.

Po raz pierwszy znaczną aktywność tych procesów w roślinach wykazali: Kritzmann (1939), Virtanem i Laine (1938), natomiast Albaumi Cohen w roku 1943 otrzymali preparat bardzo aktywnych aminoferez.

Transaminacja przebiega aktywnie w kiełkach i młodych roślinach (Krietowicz i Bundiel 1949), stwierdzono ją również w pozostałych częściach roślin: korzeniach, łodygach, liściach (Ruggieri 1953). W wyce największą aktywność wykazano w brodawkach korzeniowych (Ruggieri 1953).

Według Cohena i Hekhiosa (1941) w tkankach zwierzęcych układ transaminacyjny — kwas glutaminowy + szczawiooctowy = kwas

ketoglutarowy + asparaginowy — posiada charakter odwracalny, przebiega w obu kierunkach i znacznie aktywniej niż odpowiednia reakcja aminokwasów dwukarboksylowych z kwasem pirogronowym. Leonard i Burris (1947) wykazali występowanie tego układu w roślinach, a Wilson, King i Burris (1954) potwierdzili te dane stosując znakowane aminokwasy.

Wyjątkowe znaczenie aminokwasów dwukarboksylowych w pośredniej przemianie azotowej uwarunkowane jest trzema okolicznościami (Krietowicz i Bundiel 1949, Chibnall 1952):

- a. udziałem tych aminokwasów w przemianie odpowiednich amidów;
- b. funkcją dawców grup aminowych w procesach transaminacji;
- c. aminokwasy te tworzą pomost między syntezą pozostałych aminokwasów a cyklem oddechowym.

Za dużym znaczeniem aminokwasów dwukarboksylowych przemawiają również doświadczenia ze znakowanym azotem mineralnym.

Według Turczyńska, Gumińskiej i Płyszewskiej (1955) po półgodzinnym hodowaniu roślin na pożywce z azotem, największa część N^{15} wbudowana jest w alaninę i kwasy dwukarboksylowe.

Na szczególną uwagę zasługuje kwas glutaminowy wykazujący stosunkowo większą aktywność w omawianych procesach niż kwas asparaginowy. Vicar i Burris (1948) stwierdzili, że właśnie kwas glutaminowy pomidorów hodowanych w pożywce ze znakowanym azotem charakteryzuje się największą zawartością N^{15} . Virtanem i Laine (1941) jeszcze w roku 1941 wykazali znacznie szybszą transaminację w układzie: kwas glutaminowy-pirogronowy niż w układzie kwas asparaginowy-pirogronowy. Wynik ten potwierdzili Krietowicz i Bundiel (1949).

Obok transaminacji w wielu roślinach wykazano dekarboksylację kwasu glutaminowego, w wyniku którego to procesu powstaje kwas aminomasłowy (Schales, Mims a. Schales 1946, Suzuki Yonezo a. Naboru Takakava 1957, Warburg u. Krippackl 1957).

Aminokwasy dwukarboksylowe są ciekawe jako możliwe prekursory niedawno zidentyfikowanych aminokwasów: beta-alaniny i kwasu gamma-aminomasłowego, których funkcja w metabolizmie nie jest ostatecznie wyjaśniona. Szczególnie ciekawa jest rola kwasu gamma-aminomasłowego, którego stężenie wynosi znaczny odsetek ogólnej ilości wolnych aminokwasów w niektórych roślinach. Występowanie tego kwasu stwierdzono w wielu gatunkach, reprezentujących różne rodziny nie wykluczając roślin niższych (Braunstein 1953, Steward, Thomson a. Dent 1946, Thomson, Pollard a. Steward 1953, Mc Vicar a. Burris 1954, Westall 1950).

Celem niniejszej pracy było zbadanie metodą chromatograficzną procesów: dekarboksylacji kwasu glutaminowego i transaminacji kwas glutaminowy-pirogronowy w liściach różnych roślin.

MATERIAŁ I METODA

Jako materiał posłużyły liście roślin hodowanych w ogrodzie. Do doświadczeń brano materiał na oko zdrowy, wyrównany. Pracę wykonano w miesiącach sierpień, wrzesień.

2 g świeżych liści rozcierano w moździerzu aż do uzyskania jednorodnej masy, następnie dodawano 3 ml wody dest. i rozcierano do chwili uzyskania jednorodnej zawiesiny. 1,5 ml tak przyrządzonego homogenizatu stanowiło wyjściową próbkę doświadczalną, do której dodawano 1 ml 0,025% kwasu bromooctowego, 1 ml 1% kwasu glutaminowego oraz 1 ml 1% kwasu pirogronowego. Kwasy przed użyciem do doświadczenia zobojętniano ługiem sodowym do pH — 7,5 wobec indykatora Kolthoffa. Po wymieszaniu próbkę rozdzielono na dwie części, z których jedną kontrolną celem zniszczenia enzymów zagotowano, po czym obie stawiano na okres dwu godzin do termostatu o $t = 37^{\circ}$. W trakcie inkubowania próbki dwukrotnie wstrząsano dla pełniejszego przebiegu reakcji. Działanie enzymów przerywano przez zagotowanie. Po tym zabiegu próbki filtrowano przez bibułę, przesącz brano do badania chromatograficznego.

W chromatografii aminokwasów stosowane są różne rozpuszczalniki, jednak do analizy produktów transaminacji kwasu glutaminowego wyjątkowo dogodnym okazał się rozpuszczalnik fenol nasycony wodą (8,2). Chromatografia trwała 6—8 godzin, po czym proces ten przerywano i zgodnie z przyjętą procedurą suszono, a następnie bibułę spryskiwano 0,1% roztworem ninhydryny.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ I ICH OMÓWIENIE

W zależności od systematycznej przynależności rośliny na chromatogramach otrzymywano 2—3 plamy, podczas gdy kontrole dawały tylko jedną. Fakt ten wskazuje, że nowe aminokwasy powstają w wyniku przemian enzymatycznych. Kwas glutaminowy ($R_f = 0,27$) zajmuje pozycję najbliższą punktu naniesienia. Plama o $R_f = 0,53$ występuje wyłącznie w próbkach doświadczalnych i odpowiada alaninie. Identyczność powyższych aminokwasów potwierdzono chromatograficznie.

We wszystkich liściach przebadanych roślin stwierdzono transaminację w układzie kwas glutaminowy-pirogronowy z tym, że aktywność tego procesu zależała od gatunku rośliny.

Na aktywność transaminacji mogą wpływać takie czynniki, jak wiek, stan fizjologiczny itp. Parametry te były w miarę możliwości w doświadczeniach uwzględniane.

Ryc. 1. Transaminacja i dekarboksylacja kwasu glutaminowego w homogenizatach liści *N. tabacum* i *Cannabis sativa*: 2,2a — *Cannabis sativa*; 3,3a — *Nicotiana tabacum*; a — kwas glutaminowy; b — alanina; c — kwas gamma aminomasłowy.

Fig. 1. Transamination and decarboxylation of glutamic acid in leaves of *N. tabacum* and *Cannabis sativa*: 2,2a — *Cannabis sativa*; 3,3a — *Nicotiana tabacum*; a — glutamic acid; b — alanine; c — gamma-aminobutyric acid

Na chromatogramach w przypadku większości roślin stwierdzono występowanie jeszcze jednego aminokwasu o R_f znacznie większym od R_f alaniny a więc najbliższej czoła rozpuszczalnika. Stosując do dalszych badań *Nicotiana tabacum* wykazano, że jest to produkt enzymatycznych przekształceń kwasu glutaminowego powstający tylko w jego obecności niezależnie od dodawanego kwasu pirogronowego. Z doświadczeń można było wysunąć przypuszczenie, iż jest to produkt dekarboksylacji kwasu glutaminowego — kwas aminomasłowy. Większą ilość tego produktu niezbędną dla identyfikacji wyizolowano na drodze chromatograficznej.

W trzech rozpuszczalnikach: fenol-woda, izopropanol-kwas octowy-woda (7:2:1) oraz izopropanol-etanol-woda (6:2:2) aminokwas ten, posiadał R_f identyczne z R_f wzorcowego kwasu gamma-aminomasłowego, podczas gdy alfa-aminomasłowy kwas w tychże warunkach posiadał R_f bądź większe, bądź mniejsze.

Wszystkie te próby wskazują jednoznacznie, iż produktem dekarboksylacji kwasu glutaminowego jest kwas gamma-aminomasłowy. Jakkolwiek przekonywające dowody przytoczono tylko dla *N. tabacum*, to jednak można przypuszczać, że we wszystkich przebadanych roślinach produktem dekarboksylacji kwasu glutaminowego jest kwas gamma-aminomasłowy, ponieważ w rozpuszczalniku fenol-woda odpowiedni aminokwas posiadał R_f identyczne we wszystkich przebadanych roślinach.

ZESTAWIENIE WYNIKÓW

Przebadany materiał ze względu na wzajemny stosunek procesów transaminacji i dekarboksylacji kwasu glutaminowego można podzielić na dwie zasadnicze grupy.

Pierwszą stanowią rośliny, w których liściach stwierdzono wyłącznie proces transaminacji. Należą tu z rodziny *Urticaceae* *Cannabis sativa* i *Urtica dioica*. Typowy obraz na chromatogramie (patrz *Cannabis sativa*).

Drugą grupę stanowią rośliny, w których liściach stwierdzono procesy zarówno transaminacji i dekarboksylacji (typowy obraz na chromatogramie, patrz *N. tabacum*). Należą tu rośliny:

Solanaceae: *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *Datura stramonium*, *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum*,

Gramineae: *Lolium perenne*,

Compositae: *Taraxacum officinale*,

Papilionaceae: *Phaseolus vulgaris*,

Cruciferae: *Brassica napus*,

Betulaceae: *Carpinus betulus*,

Aceraceae: *Acer dasycarpum*,

Salicaceae: *Salix* sp.

W roślinach: *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum* stwierdzono jednak nieznaczną aktywność transaminacyjną, natomiast w roślinach *Brassica napus*, *Carpinus betulus*, *Salix* sp., *Acer dasycarpum* stosunkowo małą aktywność dekarboksylacyjną.

DYSKUSJA

Przedstawione wyniki ze względu na szczupłość przebadanego materiału oraz zastrzeżenia podane poprzednio nie pozwalają na wysuwanie zbyt daleko idących wniosków. Wyniki te jednak poparte szerszym materia-

łem statystycznym mogą rzucić pewne światło na procesy związane z metabolizmem azotu w roślinach.

W wyniku prac badaczy starszego pokolenia (Chibnall 1952) oraz eksperymentów nowszych (Turczyn, Gumiński, Płysewska 1955, Mc Vicara. Burris 1948), zasadnicza rola aminokwasów dwukarboksylowych w metabolizmie azotowym jest udowodniona. Jednocześnie niektórzy badacze przypisują większe znaczenie kwasowi glutaminowemu w omawianych procesach niż kwasowi asparaginowemu.

Powyższe zagadnienie wiąże się ściśle z faktem występowania w roślinach kwasu gamma-aminomasłowego. Schales i wsp. (1946) badając dekarboksylację kwasu glutaminowego doszli do wniosku, iż w roślinach powstaje on w wyniku tego procesu. Na tej drodze tłumaczy się również powstawanie kwasu gamma-aminomasłowego w tkance mózgowej (3). Thomson i wsp. (1953), nie stwierdziwszy korelacji między natężeniem dekarboksylacji a zawartością kwasu gamma-aminomasłowego w różnych roślinach, poddali w wątpliwość tę tezę. Badacze ci opierając się na modelowych doświadczeniach wysuwają inną możliwość powstawania tego kwasu, a mianowicie na drodze bezpośredniej aminacji odpowiedniego ketokwasu. Koncepcja ta nie została jednak wykazana *in vivo*. Tezę tę trudno pogodzić z dużą „ruchliwością” kwasu glutaminowego. Stwierdzono, że w ziemniakach (w liściach) w porównaniu z innymi roślinami proces transaminacji kwas glutaminowy-pirogronowy jest stosunkowo słaby, jednocześnie wykazano znaczną aktywność dekarboksylazy tegoż kwasu. Jeżeli przyjąć procesy te za zasadniczą drogę przemian kwasu glutaminowego, koncepcja Thomsona i wsp. nie da się utrzymać. Za powstawaniem kwasu gamma-aminomasłowego w procesie dekarboksylacji kwasu glutaminowego przemawiają również prace najnowsze (25, 26).

Dalsze drogi przemian kwasu gamma-aminomasłowego nie są znane, aczkolwiek bardzo ciekawe, ponieważ kwas ten nie wchodzi w skład białek. Według Thomsona i wsp. kwas ten pobudza wzrost tkanek *Daucus carota in vitro*. Ostatnio stwierdzono występowanie kwasu gamma-guani-dynomasłowego zarówno w materiale roślinnym, jak i zwierzęcym oraz wykazano, iż kwas ten powstaje na drodze enzymatycznej z kwasu gamma-aminomasłowego i argininy — w tkankach zwierzęcych (Pisano a. Mitoma Chozo 1957, Silber Irreverre a. Evans 1957).

W tym miejscu składam serdeczne podziękowanie Prof. drowi W. Moychowi za kierownictwo, cenne uwagi oraz zachętę do wykonania niniejszej pracy, Prof. drowi J. Czosnowskiemu za dostarczenie aminokwasów niezbędnych do identyfikacji kwasu gamma-aminomasłowego oraz koledze mgrowi H. Urbanowskiemu za dostarczenie kwasu pirogronowego.

STRESZCZENIE

Metodą chromatograficzną badano transaminację i dekarboksylację kwasu glutaminowego w homogenizatach z liści różnych roślin (w charakterze akceptora grup aminowych stosowano kwas pirogronowy). Przebadany materiał ze względu na wzajemny stosunek procesów transaminacji i dekarboksylacji podzielono na dwie grupy. Do pierwszej zaliczono rośliny, w których stwierdzono wyłącznie transaminację (*Cannabis sativa*, *Urtica dioica*), do drugiej rośliny, w których stwierdzono oba procesy (*N. tabacum*, *N. glutinosa*, *Datura stramonium*, *Taraxacum officinale*, *Brassica napus*, *Carpinus betulus*, *Salix* sp., *Acer dasycarpum*, *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum*).

Wykazano, że produktem dekarboksylacji kwasu glutaminowego jest kwas gamma-aminomasłowy.

Zakład Fizjologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło dn. 29 XI.57 r.)

SUMMARY

Transamination and decarboxylation of glutamic acid (pyruvic acid was applied as acceptor of the NH_2 — groups) has been studied chromatographically in grinded leaves of various plants.

In such plants as: *Urtica dioica* and *Cannabis sativa* only transamination has been found. Besides transamination decarboxylation has been demonstrated in the following plants: *Sollanaceae* — *N. tabacum*, *N. glutinosa*, *Datura stramonium*; *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Papilionaceae* — *Phaseolus vulgaris*; *Gramineae* — *Lolium perenne*; *Compositae* — *Taraxacum officinale*; *Cruciferae* — *Brassica napus*; *Betulaceae* — *Carpinus betulus*; *Salicaceae* — *Salix* sp.; *Aceraceae* — *Acer dasycarpum*.

It has been proved that gamma aminobutyric acid is the product of decarboxylation of glutamic acid.

LITERATURA

- Albaum H. G. and Cohen P. P., 1943, J. Biol. Chem. 149, 19.
Braunstein A. E. i Azarch R. N., 1957, Biochimia 22, 438.
Braunstein A. E., 1953, Usp. Sowl. Biol. tom XXXV, 1, 27.
Cook F. S., 1956, Canad. J. Biochem. and Physiol. 34, 1, 15 (wg Biol. Abstr.).
Cohen P. and Hekhius J., 1941, J. Biol. Chem. 140, 711.
Crumpler H. R. and Dent C. E., 1949, Nature, 164, 441.
Chibnall A. C., 1952, Metabolizm białek w roślinie, Warszawa.
Giri K. W. and Rao N. A., 1953, J. Ind. Inst. Sci. 35, 343.
Hulme A. C. and Arthington W., Nature, 165, 716.

- Kritzmann M. G., 1939, *Nature*, 143, 603.
- Krietowicz B. A. i Bundiel B. A., 1949, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, t. LXVI, 5.
- Leonard N. J. and Burris R. H., 1947, *J. Biol. Chem.* 170, 701.
- Pisano J. J. and Mitoma Chozo., 1957, *Nature*.
- Ruggieri G., 1953, *Ricerca Sci.* 23, 7, 1208 (wg *Biol. Abstr.*).
- Schaless O., Mims V. and Schaless S. S., 1946, *Arch. Biochem.* 10, 455.
- Silber R., Irreverre F. and Evans R. L., 1957, *Nature*, 180, 704.
- Steward F. C., Thomson J. F. and Dent C. E., 1949, *Science*, 110, 439.
- Suzuki Yonezo and Naboru Takakava, 1957, *Naturwiss*, 12, 353.
- Turczyn F. W., Gumińska M. N. i Płyszewska E. G., 1955, *Sb. Statiej Mieczonyje atomy w isledowaniju pitanja rastienji*. M-wa, wyd. Akad. Nauk SSSR, str. 47.
- Thompson J. E., Pollard J. K. and Steward F. C., 1953, *Plant. Physiol.* 28, 41.
- Mac Vicar R. and Burris R. H., 1948, *J. Biol. Chem.* 176, 511.
- Virtanem A. J. and Laine T., 1938, *Nature*, 141, 748.
- Virtanem A. and Laine T., 1941, *Biochem. Z.* 308, 213, 20.
- Warburg O. und Günter, Krippakl, 1957, *Z. für Naturforsch.*, 12, 10.
- Westall R. G., 1950, *Nature*, vol. 165, 716.
- Wilson G. D., King K. W. and Burris R. H., 1954, *J. Biol. Chem.* 208, 2, 863.