



УДК 582.657.2 : 581.19

Удо МАРГНА, Эви МАРГНА, Андреас ПАЛУТЕДЕР

СРАВНЕНИЕ L- И D-ФОРМ ФЕНИЛАЛАНИНА В КАЧЕСТВЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКА ФЛАВОНОИДОВ

При исследовании биосинтеза флавоноидов и других полифенольных соединений исследователю часто приходится ставить опыты с использованием меченых предшественников, особенно фенилаланина. Доступные коммерческие препараты этой аминокислоты, меченые как по углероду (¹⁴C), так и по тритию (³H), обычно представляют собой рацемическую смесь двух биологически неравноценных энантиоморфных форм. В опытах, не требующих количественной оценки включения предшественника, это обстоятельство практического значения не имеет. Однако в тех случаях, когда по количеству метки необходимо провести точные стехиометрические расчеты для установления баланса экзогенного фенилаланина в образовании фенольных соединений, наличие в среде L- и D-энантиомеров, различающихся по своей афинности к биологическим системам, может вызывать значительные интерпретационные трудности.

По аналогии с различиями в протениногенности L- и D-форм аминокислот, предполагается, что предшественником биосинтеза полифенолов может служить только L-фенилаланин. Основные каталитические свойства фенилаланин-аммоний-лиазы (ФАЛ), ключевого фермента на пути биосинтеза этих соединений, согласуются с этим представлением (Navir, Hanson, 1968; Walton, 1968). Однако строгая стереоспецифичность реакции дезаминирования фенилаланина с участием ФАЛ может быть нарушена при введении экзогенного D-энантиомера. Часть D-формы фенилаланина может после введения в клетки подвергаться там рацемизации (Ogawa, Fukuda, 1973; Stafford, Lewis, 1979; Miura, Mills, 1971; Durham и др., 1973; Forest, Wightman, 1972; Berlin и др., 1982) и в виде уже L-формы стать доступной для ФАЛ. Нужно также учесть, что в продолжительных экспериментах D-фенилаланин даже при очень низком уровне дезаминирования его ФАЛ-ой (Navir, Hanson, 1968) может в конечном счете дать начало измеримым количествам полифенольных соединений. Таким образом, некоторое включение экзогенного D-фенилаланина в полифенолы вполне может иметь место в опытах, в связи с чем появляется необходимость экспериментальной проверки фактического объема такого аномального синтеза. Выяснения требует также, в какой степени два энантиомера фенилаланина отличаются друг от друга по их способности преодолевать мембранные барьеры клетки и проникать из внешней среды в протоплазму.

В настоящей работе мы сделали попытку получить ответ на эти вопросы, принимая за основу опытов следующий количественный подход — сравнение включения метки из экзогенного фенилаланина в опытный материал и синтезируемые в нем флавоноиды при инкубации этого материала в среде, содержащей L- и D-формы указанной аминокислоты в разных соотношениях. Подобный метод ранее использовали Х. А. Стаффорд и Л. Л. Льюис при исследовании биосинтеза фенилуксусной кислоты (Stafford, Lewis, 1977, 1979).

Опыты проводили с изолированными семядольными листьями гречихи, отделенными от выращенных в воде этиолированных проростков в возрасте 80 ч. Изолированный материал помещали в чашки Петри и инкубировали на постоянном свете в течение 40 ч либо в растворе *L*-фенилаланина разной концентрации (1—100 мМ; предварительные опыты), либо в 10 мМ растворе фенилаланина с разным соотношением *L*- и *D*-форм (основные опыты). Инкубацию проводили в термостатированной камере ТКК-3, снабженной люминесцентными лампами ЛБ-20. Интенсивность освещения — 28 Вт/м², температура — 25 °С. Метку вводили прибавлением в инкубационный раствор рацемического препарата [¹⁻¹⁴C]-*L*, *D*-фенилаланина.

Основные варианты опытов различались по энантиомерному составу фенилаланина в питательной среде: А) практически чистый *L*-фенилаланин с примесью *D*-энантиомера лишь в той мере, сколько его попало в раствор в результате прибавления меченого рацемата (соотношение *L*- и *D*-форм примерно 260—280 : 1 в зависимости от конкретного опыта); Б) смесь равных количеств чистого *L*-фенилаланина и рацемата этой аминокислоты с приблизительным соотношением *L*- и *D*-форм в растворе 3 : 1; В) полный рацемат с равным содержанием в растворе как *L*-, так и *D*-энантиомера фенилаланина. В соответствии с этим соотношение относительной концентрации *L*-фенилаланина в инкубационном растворе вариантов А, Б и В, идентичных по суммарной молярной концентрации (10 мМ) обеих форм аминокислоты, равнялось 2 : 1, 5 : 1 (10 : 7, 5 : 5 мМ).

Абсолютное количество метки *L*, *D*-фенилаланина в растворе было в вариантах А, Б и В одинаковым. Вследствие этого удельная радиоактивность того или другого энантиомера варьировала в среде в зависимости от состава инкубационного раствора и была обратно пропорциональна по отношению к различиям в их относительной концентрации.

После окончания 40-часовой инкубации в растительном материале определяли содержание флавоноидов, уровень их радиоактивности и содержание свободного фенилаланина (в отдельной порции материала). В вариантах А, Б и В определяли еще суммарное количество как поглощенной, так и непоглощенной семядольными листьями метки.

Содержание индивидуальных флавоноидов определяли спектрофотометрически после хроматографического разделения их смеси в этанольных вытяжках из свежего материала с помощью двумерной бумажной хроматографии (Margna, Margna, 1969). Количество метки в отдельных флавоноидах (в элюатах соответствующих хроматографических пятен) и в инкубационном растворе фенилаланина определяли жидкостно-сцинтилляционной радиометрией на LS-100С фирмы «Beckman». Суммарную радиоактивность семядольных листьев определяли в высушенном материале, предварительно измельченном до порошка. Измерения проводили с помощью радиометрического устройства VA-H-100 («Vakutronik», ГДР) в комбинации с пересчетным прибором ПСТ-100 отечественного производства. Содержание свободных аминокислот (в спиртовых вытяжках из свежего материала) определяли автоматическим анализатором аминокислот ААА-339 («Mikrotechna», ЧССР).

Опыты проводили в 3—8 повторностях по времени. Результаты подвергали вариационно-статистической обработке с помощью *t*-теста Стьюдента и техники регрессионного анализа.

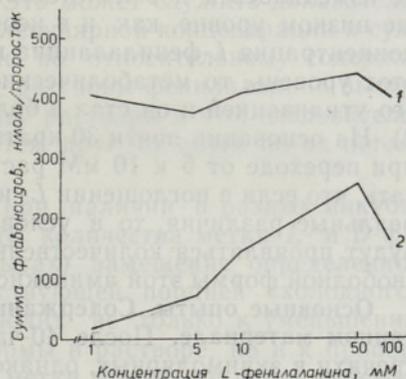
В работе использовали следующие препараты фенилаланина: *L*-фенилаланин (ч) фирмы «Reanal» (Венгрия), *L*, *D*-фенилаланин (чда) и [¹⁻¹⁴C]-*L*, *D*-фенилаланин — оба отечественного производства.

Результаты

Предварительные опыты. Прежде чем приступить к основным исследованиям, мы поставили ряд предварительных опытов для выяснения количественных параметров, характеризующих включение экзогенного *L*-фенилаланина в материал в зависимости от его концентрации в среде.

Опыты по изучению этого процесса на уровне синтезируемых флавоноидов показали, что включение экзогенного фенилаланина в эти соединения зависит непосредственно от вводимых в материал доз аминокислоты и с увеличением ее концентрации до 50 мМ резко возрастает. Общая интенсивность биосинтеза отдельных флавоноидных производных — рутина и четырех *C*-гликозилфлавонов — в этих условиях заметно не изменялась. Способность к биосинтезу больших количеств флавоноидов у семядольных листьев гречихи не подавлялась и при 100 мМ растворе фенилаланина, однако использование экзогенного предшественника при такой концентрации уже несколько уменьшилось

Рис. 1. Накопление флавоноидов (1) и их синтез за счет экзогенного *L*-фенилаланина (2) в изолированных семядольных листьях проростков гречихи в зависимости от концентрации аминокислоты в инкубационной среде. Данные представлены в виде суммы пяти флавоноидов (рутина, витексина, изо-витексина, ориентина и изо-ориентина).



(рис. 1). В диапазоне наиболее оптимальных для работы доз экзогенного *L*-фенилаланина (1—10 мМ) включение его во флавоноиды обнаруживало практически линейную зависимость от концентрации с лишь весьма незначительным отклонением от пропорциональности (табл. 1).

Таблица 1

Включение экзогенного *L*-фенилаланина во флавоноиды семядольных листьев гречихи в зависимости от концентрации аминокислоты в инкубационной среде, нмоль/проросток *

Флавоноид	Концентрация <i>L</i> -фенилаланина, мМ			Константы регрессии	
	1	5	10	<i>a</i>	<i>b</i>
Рутин	4,20	17,4	34,1	0,84	3,32
Витексин	2,00	8,10	18,1	-0,19	1,80
Изо-витексин	3,16	12,3	26,2	0,19	2,75
Ориентин	2,56	11,8	25,2	-0,27	2,52
Изо-ориентин	4,09	18,6	38,5	-0,03	3,83
Сумма	16,0	68,2	142	0,57	14,0

* Вычислено по радиоактивности отдельных флавоноидов с учетом того, что 1) *L*-фенилаланин используется для их биосинтеза в молярном соотношении 1 : 1, 2) удельная радиоактивность экзогенного *L*-фенилаланина варьировала в зависимости от концентрации среды и была следующей: при 1 мМ — 4207, при 5 мМ — 945 и при 10 мМ — 543 имп·мин⁻¹/нмоль.

По этим результатам можно было ожидать, что если в основных опытах из смеси *L*- и *D*-форм фенилаланина для биосинтеза флавоноидов будет использована только *L*-форма, то при пересчете данных радиоактивности на фактический синтез из этой формы аминокислоты будет обнаруживаться аналогичная пропорциональная зависимость с примерно таким же наклоном (*b*) соответствующей линии регрессии. В противоположном случае, вследствие большего накопления метки во флавоноидах за счет использования также *D*-фенилаланина, эта же регрессия (в случае применения в расчетах пересчетных коэффициентов для *L*-энантиомера) должна обнаруживать значительно больший наклон, или же вся зависимость будет иметь совсем иной характер.

Содержание свободного фенилаланина в семядольных листьях при воздействии на материал умеренными дозами этой аминокислоты много не изменялось и довольно стабильно удерживалось примерно на таком же низком уровне, как и в необработанном материале. Однако, когда концентрация *L*-фенилаланина в среде достигала 10 мМ или превышала этот уровень, то метаболические системы клетки уже не справлялись с его утилизацией и он стал в больших количествах накапливаться (табл. 2). На основании почти 30-кратного скачка в величине этого показателя при переходе от 5 к 10 мМ раствору инкубации можно было предполагать, что если в поглощении *L*- и *D*-энантиомеров фенилаланина имеются реальные различия, то в условиях основных опытов они непременно будут проявляться количественно в виде четких различий в накоплении свободной формы этой аминокислоты.

Основные опыты. Содержание свободного фенилаланина в обработанном материале. После 40-часовой инкубации семядольных листьев гречихи в эквимолярных, однако разных по энантиомерному составу, растворах фенилаланина существенных различий в накоплении этой аминокислоты не было обнаружено. Во всех вариантах опыта содержание свободного фенилаланина достигало к концу инкубации заметно более высокого значения, чем у контрольных семядолей и устанавливалось на уровне 200—300 нмоль/проросток. Такой уровень приблизительно соответствовал тому среднему значению, которое было нами установлено в предварительных опытах при 40-часовой инкубации материала в 10 мМ растворе *L*-фенилаланина. Это показывает, что *L*- и *D*-

Таблица 2

Содержание свободного фенилаланина в изолированных семядольных листьях гречихи в зависимости от концентрации *L*-фенилаланина в инкубационной среде

Концентрация <i>L</i> -фенилаланина, мМ	Содержание свободного фенилаланина, нмоль/проросток
0 (контроль)	2,15
0,5	0,70
1	1,11
5	7,55
10	210
50	2055
100	5417

Таблица 3

Суммарная радиоактивность обработанных семядольных листьев гречихи и остаточная радиоактивность инкубационных растворов при различном соотношении *L*- и *D*-фенилаланина в инкубационной среде

Соотношение <i>L</i> - и <i>D</i> -форм фенилаланина	Радиоактивность материала, имп · мин ⁻¹ /проросток	Остаточная радиоактивность в инкубационной среде, % от исходного уровня
<i>L</i> -форма 100%* (вариант А)	9426	38,6
<i>L</i> -форма 75%, <i>D</i> -форма 25% (вариант Б)	9678	36,9
<i>L</i> -форма 50%, <i>D</i> -форма 50% (вариант В)	9797	34,1

* *D*-фенилаланина ≈ 0,4%.

энантимеры этой аминокислоты практически не отличаются по их способности проникать из внешней среды в клетки, или же отличаются в этом отношении друг от друга лишь незначительно.

Радиоактивность обработанного материала. При инкубации семядольных листьев в среде с меченым фенилаланином изменение концентрации *L*-энантимера путем замещения в 10 мМ инкубационном растворе 25% (вариант Б) или 50% (В) *L*-формы этой аминокислоты *D*-формой не приводило к существенным различиям в суммарной радиоактивности обработанного материала. Во всех вариантах опыта она устанавливалась на уровне 9400—9800 имп·мин⁻¹/проросток, свидетельствуя о том, что из среды, не зависимо от ее энантиморфного состава, поглощалось практически одинаковое количество метки. Соответственно этому, остаточная радиоактивность инкубационных растворов к концу 40-часового периода обработки семядольных листьев оставалась также почти на одинаковом уровне (табл. 3). Это может служить доказательством того, что равные по суммарной молекулярной концентрации и суммарной радиоактивности, однако разные по относительному содержанию *L*- и *D*-энантимеров, инкубационные растворы фенилаланина выступали в опытах как идентичные по составу растворы и что, следовательно, указанные энантимеры не отличаются друг от друга по их поглощаемости растительными тканями.

Следует, однако, иметь в виду, что при наличии в разных инкубационных растворах равного абсолютного количества метки *L*- и *D*-фенилаланина (как это было в наших опытах) замещение определенной части одного из энантимеров соответствующей порцией «холодного» образца другой формы неизбежно приводит не только к уменьшению относительной концентрации данной формы в растворе, но и к пропорциональному уменьшению разбавления метки в этой же части субстрата, т. е. к увеличению ее удельной радиоактивности. В такой ситуации более или менее одинаковый уровень суммарной радиоактивности обработанного материала и инкубационных сред может устанавливаться к концу опытов и в том случае, если из среды поглощается только *L*-форма. Такой механизм в данном случае все-таки маловероятен. При селективном поглощении из среды одной лишь *L*-формы фенилаланина варианты А, Б и В существенно должны были бы отличаться по содержанию в материале свободной фракции этой аминокислоты (с резким уменьшением этого показателя при увеличении в инкубационном растворе доли *D*-формы), однако в опытах этого не наблюдалось.

Радиоактивность флавоноидов. Исходя из данных предварительных опытов следовало ожидать, что если для биосинтеза флавоноидов будет использована только *L*-форма фенилаланина, то между крайними вариантами опыта (А и В) будет обнаруживаться примерно двукратная разница в степени включения в эти соединения экзогенного *L*-фенилаланина. При этом количество метки во флавоноидах, с учетом обратно пропорциональных (к концентрации) различий в удельной радиоактивности *L*-формы в инкубационных растворах, должно во всех вариантах устанавливаться приблизительно на одинаковом уровне.

В действительности же, радиоактивность флавоноидов во всех повторных опытах была систематически несколько выше в вариантах с наличием в среде как *L*-фенилаланина, так и *D*-формы аминокислоты, чем в среде с одной лишь *L*-формой, причем в случае полного рацемата разница в этом показателе достигала почти 12% (табл. 4). В соответствии с этим, синтез флавоноидов из экзогенного предшественника (в пересчете на *L*-форму) оказался в вариантах Б и В несколько завышенным по сравнению с тем, что можно было ожидать по относительной концентрации этой формы в инкубационной среде. Тем не менее, линейная зависимость биосинтеза меченой фракции флавоноидов от концент-

Суммарная радиоактивность флавоноидов в семядольных листьях гречихи при различном соотношении меченых *L*- и *D*-форм фенилаланина в инкубационной среде

Соотношение <i>L</i> - и <i>D</i> -форм фенилаланина	Суммарная радиоактивность флавоноидов, имп · мин ⁻¹ /проросток	Удельная радиоактивность экзогенного <i>L</i> -фенилаланина, имп · мин ⁻¹ /нмоль	Синтезировано флавоноидов из экзогенного <i>L</i> -фенилаланина, нмоль/проросток*
<i>L</i> -форма 100%** (вариант А)	87779	462	190
<i>L</i> -форма 75%, <i>D</i> -форма 25% (Б)	92608	623	149
<i>L</i> -форма 50%, <i>D</i> -форма 50% (В)	97970	920	106

* *L*-фенилаланин используется для биосинтеза флавоноидов в молярном соотношении 1 : 1.

** *D*-фенилаланина ≈ 0,4%.

рации *L*-фенилаланина сохранялась, хотя пропорциональности уже не наблюдалось: соответствующие этой зависимости линии регрессии во всех случаях пересекали ось ординат значительно выше нулевой точки координат (рис. 2, табл. 5). Такое отклонение от пропорциональности указывает либо на некоторое участие в биосинтезе флавоноидов и *D*-формы фенилаланина, либо на видоизменение поглощения *L*-формы при использовании в качестве питательного субстрата рацемических смесей этой аминокислоты.

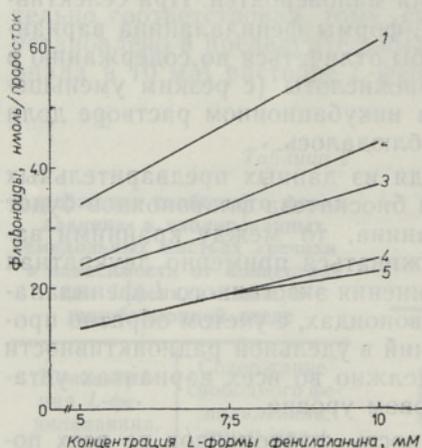


Рис. 2. Синтез флавоноидов из экзогенного *L*-фенилаланина в изолированных семядольных листьях проростков гречихи в зависимости от относительной концентрации *L*-формы этой аминокислоты в инкубационной среде — в 10 мМ растворе трех различных смесей меченых *L*- и *D*-фенилаланина. 1 — рутин, 2 — изо-ориентин, 3 — изо-витексин, 4 — ориентин, 5 — витексин.

Таблица 5

Константы регрессии, характеризующие синтез флавоноидов из экзогенного *L*-фенилаланина при инкубации семядольных листьев гречихи в 10 мМ растворе этой аминокислоты с разным соотношением в растворе ее *L*- и *D*-форм и варьированием концентрации *L*-формы в пределах 5—10 мМ

Флавоноид	Константы регрессии *	
	<i>a</i>	<i>b</i>
Рутин	6,67	5,44
Витексин	4,38	1,86
Изо-витексин	7,02	3,02
Ориентин	1,73	2,32
Изо-ориентин	3,35	4,06
Сумма	23,2	16,7

* Вычислены по данным рис. 2.

При использовании *L*-фенилаланина в качестве экзогенного действующего вещества в условиях, в которых неизбежно одновременное наличие в среде и его *D*-энантиомера, вопрос о возможных различиях в их свойствах поднимается в двух аспектах. Во-первых — насколько энантиомеры этой аминокислоты отличаются друг от друга по их способности проникать из внешней водной среды в клетки обрабатываемого растения, и во-вторых — в какой степени эти же формы отличаются по их метаболической судьбе, когда они уже поступают в контакт с каталитическими системами живого протопласта.

Первый из этих вопросов фактически касается возможных различий в эффективности преодоления *L*- и *D*-формами фенилаланина мембранных барьеров клетки либо пассивно, т. е. путем простой диффузии, либо с участием активных транспортных механизмов, функционирующих в мембранных структурах растительной клетки. Следует отметить, что хотя клеточная оболочка вместе с мембранными системами плазмалеммы и тонопласта в общем надежно защищают целостность интактных растительных клеток, изоляция протопласта в водной среде далеко не абсолютна. Установлено, например, что при интенсивном дождевании может иметь место некоторое вымывание содержащихся в клетках растений веществ (Tukey, 1970; Lee, Tukey, 1972). С другой стороны, разные естественные метаболиты (включая *L*-фенилаланин), а также многие чужеродные для растений вещества сравнительно просто поглощаются клетками из внешней водной среды и успешно могут диффундировать в любые клеточные компартменты. *D*-фенилаланин в этом отношении не исключение: заметное его поглощение клетками обработанных растений неоднократно наблюдалось в опытах (к примеру см. Scheffer и др., 1967; Eschrich, Hartmann, 1969; Stafford, Lewis, 1977, 1979), причем установлено, что он (также как и *D*-энантиомеры других аминокислот в отношении своих *L*-форм) не является конкурирующим субстратом для транспортной системы *L*-фенилаланина (Richmond, 1962; Berlin, Widholm, 1978; Berlin и др., 1982). Поглощение обеих форм, тем не менее, может быть количественно различным (Eschrich, Hartmann, 1969).

Результаты настоящей работы с семядольными листьями гречихи подтверждают легкую поглощаемость *D*-фенилаланина. Варьирование энантиоморфного состава этой аминокислоты в инкубационной среде семядолей не приводило к каким-либо четким сдвигам в содержании ее свободной формы в обработанном материале, свидетельствуя о том, что оба энантиомера фенилаланина либо поглощались в одинаковых количествах, либо отличались в этом отношении лишь незначительно. Таким образом, когда в изотопных экспериментах (с проростками гречихи) приходится использовать рацемические препараты меченого фенилаланина, то в стехиометрических расчетах необходимо учесть, что метка на уровне целого материала практически в равной степени обусловлена поглощением как *L*-, так и *D*-формы этой аминокислоты.

Менее ясным остается вопрос о степени включения *D*-фенилаланина во флавоноиды. Многими исследованиями показано, что в высших растениях *D*-формы аминокислот как чужеродные и в принципе токсические вещества обычно обезвреживаются путем ацилирования их малоновой кислотой (Eschrich, Hartmann, 1969; Rosa, Neish, 1968; Berlin и др., 1982; Zenk, Scherf, 1964; Forest, Wightman, 1972), в то время как протеиногенные *L*-формы аминокислот такому превращению не подвергаются (Eschrich, Hartmann, 1969). Других широко распространенных путей превращения *D*-аминокислот в растениях пока не установлено, маловероятным считается также наличие в клетках высших растений специ-

фических *D*, *L*-рацемаз для аминокислот, в частности для фенилаланина (Walton, 1968; Havis, Hanson, 1968; Eschrich, Hartmann, 1969).

Однако в последние годы стали накапливаться данные, которые показывают, что некоторая рацемизация *D*-аминокислот, либо прямая, либо косвенная (через аминокислототрансферную реакцию), все же может иметь место в растениях (Durham и др., 1973; Forest, Wightman, 1972; Ogawa, Fukuda, 1973; Miura, Mills, 1971; Berlin и др., 1982; Stafford, Lewis, 1977, 1979). В листьях сорго обнаружено присутствие довольно активных *L*- и *D*-аминотрансфераз фенилаланина, причем было показано, что *D*-активности лишь в 2—4 раза уступает активности фенилаланин-аммоний-лиазы (Stafford, Lewis, 1979), которая, как известно, является весьма высокоактивным ферментом (Margna, 1977). Поэтому не исключено, что значимой *D*, *L*-фенилаланин-аминотрансферазной активностью обладает и ряд других растений, в том числе проростки гречихи. Нельзя пренебрегать и возможную роль ФАЛ. Хотя в кинетических экспериментах с очищенной ФАЛ (из клубней картофеля) показано, что *D*-фенилаланин примерно в 200 раз менее эффективно, чем его *L*-форма дезаминируется этим ферментом, превращение его в течение 23 ч все же достигало 20% (Havis, Hanson, 1968). При введении в растение больших количеств *D*-фенилаланина он даже при таком уровне превращения может играть определенную роль в качестве субстрата для биосинтеза фенольных соединений.

Результаты настоящей работы не дают прямого ответа на этот вопрос, однако тот факт, что в проведенных нами опытах количественные особенности биосинтеза меченых флавоноидов при использовании в качестве субстрата *L*, *D*-смесей ^{14}C -фенилаланина не совпадали с количественной зависимостью, которая характеризует этот процесс при использовании чистого фенилаланина, достаточно ясно говорит о некоторой роли *D*-энантиомера. Можно, например, предположить, что установленное нами отклонение от пропорциональности в накоплении меченых флавоноидов, указывающее на повышенное включение метки при наличии в среде больших доз *D*-фенилаланина, обусловлено стимулирующим действием этой формы на синтез флавоноидов из *L*-фенилаланина. Посредником такой стимуляции может служить ФАЛ, активность которой, как показано многими исследованиями, под влиянием *D*-фенилаланина заметно увеличивается (Durst, 1976; Huault, Klein-Eude, 1978; Szkutnicka, 1979; Szkutnicka, Lewak, 1981). Такую интерпретацию делает сомнительным лишь то, что каталитический потенциал ФАЛ обычно намного превышает субстратные возможности клетки и, как правило, не ограничивает биосинтез фенольных соединений (Margna, 1977).

Поэтому существует альтернативная возможность, что дезаминированию подверглось помимо *L*-фенилаланина и некоторое количество *D*-формы этой аминокислоты и стало, таким образом, предшественником флавоноидов. Так как *D*-фенилаланин слабо конкурирует с его *L*-формой в качестве субстрата ФАЛ (Havis, Hanson, 1968) и, следовательно, скорость его дезаминирования существенно зависит от соотношения концентраций двух энантиомеров в среде, то в варианте А, где доля примеси *D*-фенилаланина не превышала 0,4%, условий для его утилизации, очевидно, не было и ^{14}C -метка во флавоноидах полностью или почти полностью произошла из *L*-формы. В вариантах же Б и В, где *D*-форма составляла до 50% всего экзогенного фенилаланина, она в какой-то степени уже могла подвергаться дезаминированию, а тем самым обуславливать и дополнительный синтез флавоноидов.

Судя по нашим данным, в материале, обработанном полным рацематом фенилаланина, дополнительный синтез флавоноидов из экзоген-

ного *D*-энантиомера (в случае 10 мМ раствора рацемата) может достигать 10—12% их синтеза за счет *L*-фенилаланина.

Таким образом, некоторое включение экзогенного *D*-фенилаланина во флавоноиды, очевидно, может иметь место в растительных тканях, однако существенным такой аномальный синтез может стать, видимо, только при введении этой формы в ткани в весьма больших количествах. В тех опытах, где *D*-фенилаланин в основной массе *L*-формы присутствует лишь в виде незначительной примеси, он, по всей вероятности, в биосинтез флавоноидов вовлечен быть не может и в соответствующих расчетах вполне оправдано учитывать только инкорпорацию *L*-формы. Тем не менее необходимо иметь в виду, что разные растения и их ткани могут существенно различаться как по их способности поглощать из среды двух форм фенилаланина, так и по эффективности их дальнейшего использования в качестве предшественника полифенольных соединений. Поэтому в каждом отдельном случае, как только в этом отношении возникают сомнения, связи *L*- и *D*-форм фенилаланина с конкретным материалом требуют специального рассмотрения.

Авторы статьи признательны сотрудникам отдела физиологии и биохимии растений Института экспериментальной биологии АН ЭССР Уку Аннусу за выполнение анализа аминокислот, Катрин Саул за математическую обработку данных на ЭВМ и Олаву Кээрбергу за консультацию в интерпретации данных.

ЛИТЕРАТУРА

- Berlin, J., Widholm, J. M. Amino acid uptake by amino acid analog resistant tobacco cell lines. — *Z. Naturforsch.*, 1978, 33c, 634—641.
- Berlin, J., Witte, L., Hammer, J., Kukoschke, K. G., Zimmer, A., Pape, D. Metabolism of p-fluorophenylalanine in p-fluorophenylalanine sensitive and resistant tobacco cell cultures. — *Planta*, 1982, 155, 244—250.
- Durham, J. I., Morgan, P. W., Prescott, J. M., Lyman, C. M. An amino acid transferase specific for the D-enantiomorph of methionine. — *Phytochem.*, 1973, 12, 2123—2126.
- Durst, F. The correlation of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid-hydroxylase activity changes in Jerusalem artichoke tuber tissues. — *Planta*, 1976, 132, 221—227.
- Eschrich, W., Hartmann, T. Translokation und biochemisches Verhalten von D- und L-Phenylalanin bei *Vicia faba*. — *Planta*, 1969, 85, 218—227.
- Forest, J. C., Wightman, F. Amino acid metabolism in plants. III. Purification and some properties of a multispecific aminotransferase isolated from bushbean seedlings (*Phaseolus vulgaris*). — *Can. J. Biochem.*, 1972, 50, 813—829.
- Havir, E. A., Hanson, K. R. L-Phenylalanine ammonia-lyase. II. Mechanism and kinetic properties of the enzyme from potato tubers. — *Biochem.*, 1968, 7, 1904—1914.
- Huault, C., Klein-Eude, D. L'acide trans-cinnamique et l'évolution de l'activité de la phénylalanine ammoniac-lyase dans les cotyledons de radis exposés à la lumière rouge lointain. — *Plant Sci. Lett.*, 1978, 13, 185—192.
- Lee, C. I., Tukey, H. B. Effect of intermittent mist on development of fall color in foliage of *Euonymus alatus* Sieb. 'Compactus'. — *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1972, 97, 97—101.
- Margna, U. Control at the level of substrate supply — an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells. — *Phytochem.*, 1977, 16, 419—426.
- Margna, U., Margna, E. A suitable chromatographic method for quantitative assay of rutin and flavone C-glycosides in buckwheat seedlings. — *ENSV TA Toim. Biol.*, 1969, 18, nr. 1, 40—55.
- Miura, G. A., Mills, S. E. The conversion of D-tryptophan in cell cultures of tobacco. — *Plant Physiol.*, 1971, 47, 483—487.
- Ogawa, T., Fukuda, M. Occurrence of D-amino acid aminotransferase in pea seedlings. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 52, 998—1002.
- Richmond, M. H. The effect of amino acid analogues on growth and protein synthesis in microorganisms. — *Bacteriol. Rev.*, 1962, 26, 398—419.
- Rosa, N., Neish, A. C. Formation and occurrence of N-malonyl-phenylalanine and related compounds in plants. — *Can. J. Biochem.*, 1968, 46, 797—806.

- Schejfer, F., Kickuth, R., Aldag, R. Die Aufnahme nichtproteinogener Aminosäuren durch höhere Pflanzen. — *Agrochim.*, 1967, **11**, 485—497.
- Stafford, H. A., Lewis, L. L. Interference by a phenylacetate pathway in isotopic assays for phenylalanine ammonia-lyase in leaf extracts. — *Plant Physiol.*, 1977, **60**, 830—834.
- Stafford, H. A., Lewis, L. L. Conversion of L- and D-phenylalanine to phenylacetate via phenylpyruvate in *Sorghum* leaf extracts. — *Plant Physiol.*, 1979, **64**, 176—181.
- Szkutnicka, K. Amoniako-liaza L-fenüülalaniini (PAL). I. Charakterystyka, występowanie, zmiany aktywności i rola fizjologiczna enzymu w roślinach. — *Wiadom. Bot.*, 1979, **23**, 89—101.
- Szkutnicka, K., Lewak, S. Action of D-phenylalanine and cycloheximide on L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in germinating apple embryos. — *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 1981, **176**, 139—150.
- Tukey, H. B. The leaching of substances from plants. — *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1970, **21**, 305—324.
- Walton, D. C. L-Phenylalanine ammonia-lyase activity during germination of *Phaseolus vulgaris*. — *Plant Physiol.*, 1968, **43**, 1120—1124.
- Zenk, M. N., Scherf, H. Verbreitung der D-Tryptophan-Konjugationsmechanismen im Pflanzenreich. — *Planta*, 1964, **62**, 350—354.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
28/VIII 1986

Udo MARGNA, Evi MARGNA, Andreas PALUTEDER

L- JA D-FENÜÜLALANIIN FLAVONOIDIDE EELLASENA

Selgitamaks fenüülalaniini *D*-enantiomeeri võimalikku segavat mõju isotoopkatsetes, kus toimeaine märkimiseks kasutatakse aminohappe radioaktiivset ratsemaati, võrreldi *L*- ja *D*-fenüülalaniini sisestumist taimmaterjali ning nende edasist lülitumist flavonoididesse. Katsematerjali (tatraidandite idulehed) inkubeeriti 40 tundi pidevas valguses erineva enantiomeerse koostise, kuid võrdse summaarse kontsentratsiooniga (10 mM) fenüülalaniini lahustes. Inkubatsiooni lõppedes määrati vaba fenüülalaniini sisaldus materjalis, viimase üldine radioaktiivsus ning ^{14}C -märke hulk üksikutes flavonoidides. Tulemusi võrreldi andmetega, mis samade näitajate kohta saadi materjali inkubeerimisel puhta *L*-fenüülalaniini erineva kontsentratsiooniga lahustes. Kõikides katsevariantides jäi niihästi materjali radioaktiivsus kui ka vaba fenüülalaniini sisaldus praktiliselt ühesuguseks ega olenenud fenüülalaniini *L*- ja *D*-enantiomeeride vahekorrast (*resp.* *L*-fenüülalaniini suhtelisest kontsentratsioonist) inkubatsioonikeskkonnas. Sellest võib järeldada, et mõlemad vormid sisestuvad taimmaterjali võrdse efektiivsusega. Seevastu märke hulk üksikutes flavonoidides oli *D*-enantiomeeri suurte dooside manulusel märksa (kuni 12%) kõrgem tasemest, mis ootuspäraselt oleks pidanud esinema, eeldades ainult *L*-fenüülalaniini kasutamist nende ühendite eellasena. Vastavalt sellele ei olnud flavonoidide märges *L*-fenüülalaniini suhtes proportsionaalne muutustega viimase kontsentratsioonis, olgugi et lineaarne sõltuvus säilis. Tulemustest nähtub, et kuigi normaalsetes füsioloogilistes tingimustes üksnes fenüülalaniini *L*-vorm allub desamineerimisele ja funktsioneerib flavonoidide eellasena, massiivsete dooside eksogeense manustamise korral võib ka *D*-fenüülalaniini teatud määral lülituda nende ühendite biosünteesiahelasse. *D*-fenüülalaniini tühise lisandi puhul, nagu see esineb *L*-fenüülalaniini märkimisel radioaktiivse ratsemaadiga, sel realset tähtsust siiski ei ole ning stöhhiomeetrilistes arvutustes tuleb arvestada üksnes *L*-fenüülalaniini biosünteesilise kasutamisega.

Udo MARGNA, Evi MARGNA, Andreas PALUTEDER

A COMPARISON OF EXOGENOUS L- AND D-PHENYLALANINE IN THE ROLE OF FLAVONOID PRECURSORS

In order to reveal possible interfering influence of the *D*-enantiomer in feeding experiments with *L*-phenylalanine labelled with a preparation of a radioactive racemate, a comparison of *L*- and *D*-phenylalanine incorporation into plant material and of their further incorporation into flavonoid compounds was carried out. Plant material (excised buckwheat cotyledons) was incubated for 40 h under continuous illumination in a series of equimolar (10 mM) solutions of ^{14}C -labelled phenylalanine differing from each other in their enantiomeric composition. In the treated material content of free soluble phenyl-

alanine, total radioactivity and the amount of label in separate flavonoids (rutin and four C-glycosylflavone derivatives) were assayed comparing the results with data obtained with plant material incubated in L-phenylalanine solutions of varying concentrations. Total radioactivity and the content of free phenylalanine in the treated material proved to be practically identical in all cases and showed no dependence on the enantiomeric composition of (*resp.* on the relative concentration of L-phenylalanine in) the incubation media. It clearly indicated that the two enantiomers of phenylalanine do not differ considerably by their ability to incorporate into plant tissues when introduced externally. In the presence of large doses of D-phenylalanine all flavonoids showed a markedly (up to 12%) higher labelling than what could be expected to occur when assuming that L-enantiomer may only function as the precursor. Correspondingly, the amount of ¹⁴C-label in the flavonoids showed no proportionality with respect to the relative concentration of L-phenylalanine in the racemic incubation media. From these results it can be deduced that although it is the L-enantiomer of phenylalanine that can normally undergo deamination in plant cells to be further channelled into the flavonoid pathway, exogenous D-phenylalanine, when used in massive doses, can also give rise to some amount of flavonoids. When present in the bulk of L-phenylalanine merely as an admixture as it occurs using for labelling L,D-racemates, incorporation of D-phenylalanine into flavonoids is probably of no real importance and, consequently, the corresponding stoichiometric calculations must be made by assuming incorporation of L-phenylalanine only.

Although phenylalanine ammonia-lyase (PAL) which is responsible for channeling phenylalanine units into phenylpropanoid pathway has usually shown some weak activity towards tyrosine (PAL activity is usually higher towards tyrosine than towards phenylalanine), the precursor of phenolic compounds in most plants except grasses where the activity of PAL is often comparable to that of PAL (for reviews see Young et al. 1966; Gammel et al. 1977). Our earlier experiments with barley seedlings revealed a considerable activity of PAL (1.5 nmol/h per primary leaf) that was more than 10-fold higher than the maximum activity of all other flavonoid biosynthetic enzymes under most realistic conditions. The incorporation of exogenous L-tyrosine (from 2-10⁻⁴ M solution) into barley flavonoids appeared to be only twice less than that of exogenous L-phenylalanine of the same concentration (Jäneski, 1981) compared to control. In searching for possible ways to increase the utilization of tyrosine for phenolic biosynthesis under experimental conditions we paid attention to the possibility of the primary inhibitory action of the herbicide isochlorogenic acid (Methyloxytyrosine). The primary inhibitory action of the herbicide is located at the reaction which leads to 3-oxo-tyrosine-3-phosphate and tyrosine in reducing the endogenous supply of L-phenylalanine and other aromatic amino acids (Lambert et al. 1980). It may be assumed that inhibition of tyrosine resources for the principal biosynthetic precursor, phenylalanine, in limited exogenous tyrosine might be more effectively used for flavonoid biosynthesis. In a recent work of our laboratory with buckwheat seedlings (Matus et al. 1985) it has been demonstrated that at a high glyphosate concentration (10⁻² M) the synthesis of flavonoids from exogenous L-tyrosine did indeed show an absolute increase as compared with lower glyphosate concentrations, and there occurred significant rise in the relative labelling of flavonoids. Still the effect was too slight to consider L-tyrosine a true alternative precursor of flavonoids in buckwheat seedlings. In the hope that barley seedlings would be a more suitable material to study the problem of the precursor role of tyrosine, we designed tracer experiments with that material using both phenylalanine and tyrosine on a glyphosate background.

Material and methods	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
10 ⁻²	1.88	0.56	1.30	0.55	0.73	0.31	0.10
10 ⁻³	1.87	0.21	1.12	0.69	0.35	0.24	0.01
10 ⁻⁴	1.64	0.22	0.77	0.27	0.01	0.01	0.01

The experiments were carried out with isolated primary leaves of barley (Hordeum vulgare L. cv. Astoria) excised from 80 d old etiolated seedlings grown in tap water. The excised material was incubated for 40 h in light (illumination from white fluorescent tubes, light intensity