

<https://doi.org/10.3176/biol.1968.4.02>

Ю. ВИЙЛЬ

ОБ ОБРАЗОВАНИИ ТРИПТОФАНА ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

Биосинтез органических веществ, имеющих сложные молекулы, протекает в зеленой клетке с использованием более простых органических субстратов, образовавшихся из неорганических соединений при фотосинтезе. Таким образом, синтез этих веществ связан с фотосинтетической ассимиляцией CO_2 косвенно, через образование субстрата. Реакции же их биосинтеза из этого субстрата не требуют непосредственного участия света. Тем не менее многие из них на свету ускоряются и становятся нечувствительными к воздействию, подавляющим окислительное фосфорилирование, однако одновременно с этим они приобретают чувствительность к ядам фотофосфорилирования. Это свидетельствует о переключении биосинтеза названных соединений с использования окислительной энергии на использование световой. К реакциям, для которых показана возможность такого переключения, относятся, например, усвоение и превращение экзогенных углеводов (Bishop, 1961; Kandler, 1954; 1955; Krall, Bass, 1962; MacLachlan, Porter, 1959), аминокислот (Spencer, 1965; Spencer, Wildman, 1967, Stephenson и др., 1956) и ацетата (Mudd, McManus, 1962; Stumpf и др., 1963; Stumpf, James, 1962; Смирнов, 1960), связанные с образованием полисахаридов, белков и жирных кислот. Такой реакцией является и исследованный нами биосинтез триптофана из экзогенных серина и индола. При всех перечисленных реакциях эффект света обнаруживался в условиях насыщения системы экзогенными субстратами. Нас заинтересовало, наблюдается ли энергетический эффект света и при вторичных биосинтезах из эндогенных предшественников, другими словами — могут ли такие биосинтезы лимитироваться энергией при том уровне субстратов, который имеется в нормальном листе. Это позволило бы выяснить значение энергетического эффекта света для жизнедеятельности зеленого растения.

Экспериментальная часть

Примером вторичного биосинтеза, при котором обнаружено действие света в условиях насыщения листа экзогенным субстратом (Вийль, 1966; Вийль, Воскресенская, 1965; Воскресенская, Вийль, 1966), для нас служило образование триптофана. Для исследования действия света на этот биосинтез из эндогенных предшественников мы использовали метод меченых атомов. Вместо введения предшественников извне в этих опытах листьям была предоставлена возможность самим формировать их мече-

ные фонды в процессе фотосинтеза. Для этого листья экспонировались в среде, содержащей $^{14}\text{CO}_2$. Затем следили за включением метки из первичных меченых продуктов фотосинтетической ассимиляции CO_2 в триптофан на свету и в темноте в среде азота (для исключения темнового дыхания).

Методика. Опыты проводились с 4-дневными зелеными проростками ячменя (*Hordeum vulgare*) сорта 'Харьковский 22'. Для экспозиции брали верхние части листьев длиной 3,5 см, которые экспонировались в фотосинтетической камере, сконструированной Т. Пярником и О. Кээрбергом (1966). Листья экспонировались в четырехугольной раме (4×5 см), в которой они закреплялись при помощи тонкой проволоки. Экспозиции проводились в условиях стационарного фотосинтеза, для чего перед экспозицией в среде с $^{14}\text{CO}_2$ листья 5 мин выдерживались в атмосфере с $^{12}\text{CO}_2$ (0,03%) при такой же интенсивности света, что и в камере. Одновременно экспонировались пять листьев с суммарным сырым весом около 0,2 г. Для получения одной параллельной пробы проводили шесть экспозиций. Фиксированный материал этих экспозиций объединяли. Сырой вес полученной таким образом пробы был 1,2—1,3 г. Источником света служила прожекторная лампа, снабженная фильтрами БС-10 и НС-7 и 5-сантиметровым слоем 0,5%-ного раствора CuSO_4 . Интенсивность света — $2,49 \times 10^{-2}$ вт/см², концентрация CO_2 в камере — 0,03%, радиоактивность — 440 мкюри/л, температура 19—20°С. Дополнительная экспозиция в азоте проводилась в маленьких стеклянных камерах с постоянным продуванием газом. Для очистки азот пропускали через фильтр из щелочного раствора пирогаллола. Интенсивность света при дополнительной экспозиции была $5,19 \times 10^{-2}$ вт/см².

Экспонированные листья фиксировали в кипящем 96%-ном этаноле (3 мин), растирали и экстрагировали с 80%-ным этанолом. Измеряли радиоактивность экстракта и нерастворимого осадка, при суммировании которых получали общую радиоактивность, усвоенную листьями. Для определения радиоактивности триптофана экстракт концентрировали до 0,5 мл и хроматографировали с дистиллированной водой (Вийль, Воскресенская, 1965). Расположение радиоактивных зон на хроматограмме определяли при помощи регистрирующей счетной установки. Поскольку зона, где был расположен триптофан, оказалась очень широкой и, по-видимому, содержала какие-то другие меченые соединения, близкие по R_f к триптофану, проводили повторное хроматографирование. Для этого зону вырезали, измельчали и элюировали с подкисленным 80%-ным этанолом. Элюат концентрировали и затем хроматографировали в системе изопропиловый спирт—аммиак—вода (9:1:1). Эта система оказалась подходящей для повторного разделения триптофана, поскольку зона, элюируемая после первого хроматографирования, уже не содержала сахаров, не отделяющихся в этой системе от триптофана. В результате повторного хроматографирования была получена компактная зона триптофана. Кроме того, на хроматограмме обнаружались две дополнительные радиоактивные зоны, одна на стартовой линии, другая рядом с триптофаном. Зону триптофана вырезали, измельчили и элюировали с подкисленным 80%-ным этанолом. Элюат концентрировали, из концентрата приготовили препараты и подсчитали их радиоактивность.

Результаты. Хотя в литературе имеется много данных об образовании аминокислот при фотосинтезе, для триптофана такие данные практически отсутствуют. Это обусловлено, по-видимому, тем, что фонд свободного триптофана в зеленых листьях мал и, кроме того, при методах, к которым обычно прибегают при исследовании аминокислот (свободных и связанных), триптофан частично или полностью разлагается.

Наши опыты показали, что триптофан, как и другие аминокислоты, метится при сравнительно кратковременных экспозициях в среде $^{14}\text{CO}_2$, однако метка в нем слабая. При 5-минутной экспозиции радиоактивность триптофана составляет 0,055% от общей радиоактивности, усвоенной

Таблица 1
Относительная радиоактивность триптофана в листьях, экспонированных в среде с $^{14}\text{CO}_2$

Время экспозиции, мин	Общая активность материала, 10^3 имп/мин	Активность триптофана	
		10^3 имп/мин	% от общей активности
5	1874	1,03	0,055
10	3670	2,36	0,064

листьями (табл. 1). С увеличением времени экспозиции относительная радиоактивность триптофана несколько увеличивается, вероятно, как следствие насыщения меченым углеродом фондов промежуточных продуктов биосинтеза триптофана. Пока нельзя точно сказать, какая часть молекулы триптофана метилась быстрее — индольное ядро или боковая цепь. Данные С. Аронова (Aronoff, 1961) показывают, что метка сначала появляется в остатке серина, который быстро синтезируется на свету из ассимилированного CO_2 . Однако, вероятно, за 5 мин определенная доля радиоактивности включается и в индольную часть молекулы. Возможно, увеличение доли триптофана в общей радиоактивности с продолжением экспозиции связано также с тем, что ассимилированный углерод начинает входить в триптофан двумя путями — как через серин, так и через индольное ядро.

Но кроме процесса образования субстрата при ассимиляции CO_2 , от ссвещения, по-видимому, зависит и дальнейшее превращение первичных продуктов, ведущее к образованию триптофана. На это указывают результаты опыта с дополнительной экспозицией в азоте листьев, предварительно экспонированных в среде с $^{14}\text{CO}_2$. Радиоактивность триптофана измерялась в двух вариантах опыта: 1) листья экспонировались 5 мин на свету в среде с $^{14}\text{CO}_2$, затем 30 мин на свету в азоте (вариант «свет»); 2) листья экспонировались 5 мин на свету в среде с $^{14}\text{CO}_2$, затем 30 мин в темноте в азоте (вариант «темнота»). Контролем служили листья, фиксированные непосредственно после 5-минутной экспозиции в среде с $^{14}\text{CO}_2$. Данные этого опыта приведены в табл. 2. В течение 5-ми-

Таблица 2

Эффект света при биосинтезе триптофана в анаэробной среде

Вариант	Общая радиоактивность материала, 10^3 имп/мин	Радиоактивность триптофана		
		10^3 имп/мин	% от общей активности	Прирост в азоте, 10^3 имп/мин
Контроль	2420	1,27	0,052	—
Темнота	2537	2,44	0,096	1,17
Свет	2629	3,77	0,144	2,50

нутной экспозиции в триптофан включилось 0,052% от общей активности, усвоенной листьями. При дальнейшей экспозиции в азоте метка в триптофане продолжала увеличиваться как на свету, так и в темноте. Однако на свету меченый углерод включается в эту аминокислоту более чем в два раза интенсивнее, чем в темноте. Поскольку уровни фондов меченых предшественников перед экспозицией в азоте были одинаковы для обоих вариантов, то свет не мог в этом опыте действовать через формирование субстрата для синтеза, но он способствовал протеканию реакций вторичных синтезов, в которых из сформированных субстратов образуется триптофан. Какие именно реакции ускоряются светом,

сказать трудно. Вероятно, одной из них может быть последняя, заключительная реакция — образование триптофана из индола и серина, а также образование триптофана из антраниловой кислоты, для которых непосредственно показано ускорение светом при наличии экзогенных субстратов. Вполне вероятно, что ускоряются и более ранние синтетические реакции, общие для всех ароматических биосинтезов.

Заключение

Полученные результаты показывают, что свет ускоряет биосинтез триптофана не только из экзогенных, но и эндогенных субстратов. По-видимому, в данном случае, как и в опытах с введением экзогенных предшественников, свет ликвидирует недостаток энергии, ограничивающий биосинтез в темноте. Если это так, то, следовательно, использование световой энергии во вторичных синтезах — не только потенциальная способность зеленых листьев, искусственно насыщенных субстратами, но оно имеет место и при фондах субстратов, нормально содержащихся в листе. Таким образом, различные соединения, которые метятся при фотосинтезе в $^{14}\text{CO}_2$, можно рассматривать как продукты фотосинтеза не только в отношении происхождения их предшественников, но и в отношении энергии, которая используется на всем пути биосинтезов, в которых расходуются эти предшественники.

ЛИТЕРАТУРА

- Вийль Ю., 1966. О характере действия света на биосинтез триптофана в зеленых проростках ячменя. Изв. АН ЭССР, сер. биол. **15** : 518—523.
- Вийль Ю. А., Воскресенская Н. П., 1965. Действие света на биосинтез триптофана в зеленых проростках ячменя. Физиол. растений **12** : 990—997.
- Воскресенская Н. П., Вийль Ю. А., 1966. Спектральная зависимость биосинтеза триптофана в зеленых проростках ячменя. Физиол. растений **13** : 762—758.
- Пярник Т., Кээрберг О., 1966. Усовершенствованная камера для кратковременных экспозиций листьев в атмосфере радиоактивного углекислого газа. Изв. АН ЭССР, сер. биол. **15** : 32—37.
- Смирнов Б. П., 1960. Биосинтез высших жирных кислот из ацетата в изолированных хлоропластах листьев *Spinacia oleracea*. Биохимия **25** : 545—555.
- Aronoff S., 1961. Dynamics of amino acids in plants. In : Amino Acid Pools. Duarte, Ed. Holden.
- Bishop N. I., 1961. The photometabolism of glucose by an hydrogen adapted alga. Biochim. biophys. acta **51** : 342.
- Kandler O., 1954. Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese. II. Gesteigerte Glucoseeinbau in Licht als Indikator einer lichtabhängigen Phosphorylierung. Z. Naturforsch. **9b** : 625.
- Kandler O., 1955. Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese. III. Hemmungsanalyse der lichtabhängigen Phosphorylierung. Z. Naturforsch. **10b** : 38.
- Krall A. R., Bass E. R., 1962. Oxygen dependency of *in vivo* photophosphorylation. Nature **196** : 791—792.
- Maclachlan G. H., Porter H. K., 1959. Replacement of oxidation by light as the energy source of glucose metabolism in tobacco leaves. Proc. Roy. Soc. London B **150** : 460.
- Mudd J. B., McManus T. T., 1962. Metabolism of acetate by cell-free preparations from spinach leaves. J. Biol. Chem. **237** : 2057.
- Spencer D., 1965. Protein synthesis by isolated spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. **111** : 381—390.
- Spencer D., Wildman S. G., 1964. The incorporation of amino acids into protein by cell-free extracts from tobacco leaves. Biochemistry **3** : 954.

- Stephenson M. L., Thimann K. V., Zamechnic P. C., 1956. Incorporation of ^{14}C -amino acids into proteins of leaf disks and cell-free fractions of tobacco leaves. Arch. Biochem. Biophys. **65** : 194—209.
- Stumpf P. K., Bové J. M., Coffeau A., 1963. Fat metabolism in higher plants. XX. Relation of fatty acid synthesis and photophosphorylation in lettuce chloroplasts. Biochim. biophys. acta **70** : 260.
- Stumpf P. K., James A. T., 1962. Light-stimulated enzymic synthesis of oleic and palmitic acids by lettuce chloroplast preparations. Biochim. biophys. acta **57** : 2

*Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР*

Поступила в редакцию
24/VIII 1967

J. VIII

TRÜPTOFAANI MOODUSTUMISEST FOTOSÜNTEESIL

Resümee

Uuriti ^{14}C lülitumist assimileeritud $^{14}\text{CO}_2$ -st trüptofaanisse odra lehtedes. Leiti, et peale 5—10-minutilist statsionaarset fotosünteesi on trüptofaanis 0,055—0,064% lehe poolt omastatud ^{14}C . Valgus soodustab trüptofaani moodustumist fotosünteesi primaarsetest produktidest.

*Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut*

Saabus toimetusse
24. VIII 1967

J. VIII

ON THE FORMATION OF TRYPTOPHANE DURING PHOTOSYNTHESIS

Summary

Labelling tryptophane was studied in barley leaves during photosynthesis in an atmosphere with $^{14}\text{CO}_2$. After a photosynthesis lasting for 5—10 minutes, 0.055—0.064 per cent of the carbon assimilated was found in tryptophane. Illumination enhanced the formation of tryptophane from the primary products of photosynthesis.

*Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology*

Received
Aug. 24, 1967