

RENATA CISZEWSKA
Akademia Rolnicza, Lublin

NIEKTÓRE ASPEKTY METABOLIZMU NIKOTYNY I NORNİKOTYNY W ROŚLINACH RODZAJU NICOTIANA

Rodzaj *Nicotiana* obejmuje około 60 gatunków roślin pochodzenia południowoamerykańskiego lub australijskiego. Jest prawie pewne, że wszystkie rośliny należące do tego rodzaju, a w ich liczbie liczne tytoń i machorki mają zdolność do syntezy i nagromadzania alkaloidów pirydynowych, niejednokrotnie w dość dużych koncentracjach (do 16% w przeliczeniu na suchą masę). Ogólna zawartość tych alkaloidów waha się u poszczególnych gatunków i odmian w bardzo szerokich granicach, uzależnionych zarówno od czynników genetycznych, jak i od określonego stanu fizjologicznego rośliny oraz od warunków środowiskowych (nawożenie, klimat itp.).

Całkowicie pozbawione alkaloidów tytoń, które zostały uzyskane na drodze hodowlanej są pozbawione raczej zdolności ich nagromadzania, aniżeli ich syntezy (4).

Podobnie jak większość innych znanych roślin alkaloidowych również i rośliny rodzaju *Nicotiana* nie zawierają pojedynczych alkaloidów, lecz mieszaninę wielu (około 12—17), bardzo zbliżonych pod względem strukturalnym. Jednakże z punktu widzenia występowania ilościowego na uwagę zasługują jedynie trzy alkaloidy: nikotyna, nornikotyna i anabazyna. Alkaloidy te są w świecie roślinnym daleko bardziej rozpowszechnione aniżeli sądzono to przed niewielu jeszcze laty. Każdy z nich może być alkaloidem głównym, z tym że występowanie anabazyny w ilościach dominujących stwierdzono tylko w niewielu roślinach rodzaju *Nicotiana* (5).

Mimo bardzo licznych prac nad biochemią wymienionych tu alkaloidów, wiele zagadnień związanych z ich powstawaniem i przemianami nie zostało w pełni wyjaśnione. Dotyczy to zwłaszcza biogenetycznego powiązania pomiędzy nikotyną i nornikotyną. Zagadnienie to związane jest w zasadzie z metabolizmem fragmentów jednowęglowych i sprowadza się w szczególności do problemów pochodzenia i powstawania grupy N-metylowej w nikotynie oraz demetylacji tego alkaloidu. Ponieważ wiele prac z tego zakresu zawiera kontrowersyjne wnioski, wydaje się celowe omówienie dotychczasowych danych.

Według do niedawna jeszcze powszechnie przyjętych poglądów biosynteza nikotyny kończy się na powstawaniu, względnie przyłączaniu grupy N-metylowej. Zgodnie z tym punktem widzenia pierwszym alkaloidem powstającym w tytoniu jest nornikotyna, która dopiero w wyniku metylacji przekształca się w nikotyne (19, 26):



Rys. 1. Powstawanie nikotyny z nornikotyny

Z teoretycznego punktu widzenia można wyróżnić dwa rodzaje reakcji metylacji. Najczęściej spotykanym w organizmach żywych rodzajem metylacji jest metylacja transmetylacyjna, polegająca na prznoszeniu „całych” grup metylowych z donatora na odpowiedni akceptor. Drugi rodzaj metylacji znany jest jedynie w przypadkach, gdy grupa metylowa powstaje *de novo*. Proces ten ma prawdopodobnie charakter redukcyjny, jednakże jego mechanizm nie jest dokładnie poznany.

Szeroko prowadzone badania nad biosyntezą nikotyny wykazały, że w powstawaniu jej grupy N-metylowej mogą uczestniczyć dostarczające fragmentów jednowęglowych niektóre aminokwasy: glicyna, seryna i metionina, jak też formaldehyd, mrówczan i kwas glikolowy (24). W badaniach przebiegu metylacji nornikotyny *in vitro* z zastosowaniem formaldehydu i kwasu mrówkowego nie stwierdzono powstawania trwałych związków pośrednich. Proces ten przebiega prawdopodobnie poprzez przejściowe powstawanie nietrwałych połączeń typu czwartorzędowych związków amoniowych, co jest, jak się wydaje, charakterystyczne dla wszystkich reakcji, w których zachodzi powstawanie przyłączania lub odrywania grup metylowych (7).

Donatorami grup metylowych nikotyny mogą być i inne związki w rodzaju np. choliny oraz betainy. Jak wykazano, cholina staje się donatorem grup metylowych po uprzednim utlenieniu do glicylobetainy. Czy grupa metylowa glicylobetainy zostaje przeniesiona bezpośrednio, czy poprzez metioninę nie wyjaśniono. Prawdopodobnie jest to proces transmetylacji z udziałem S-adenozylometioniny. Wskazują na to badania z podwójnie znakowaną choliną ($C^{14}D_3$), w których wykazano, że N- CH_3 nikotyny w 94% posiada ten sam stosunek C^{14} i D jak przy znakowanej metioninie (24). Badania wpływu chlorku chlorocholiny (CCC) na syntezę nikotyny w siewkach *Nicotiana rustica* wykazały, że związek ten, jako antymetabolit choliny, może powodować zakłócenia w procesach metylacji, prowadzących do powstawania nikotyny. Nie jest wykluczone, że jest to wynikiem zahamowania tworzenia się glicylobetainy z choliny — jednego z donatorów grup metylowych dla nikotyny (10).

Liczne prace wykazały, że nikotyna powstaje w korzeniach roślin *Nicotiana*, a gromadzi w częściach nadziemnych. Jeffrey i Tso (15) zaobserwowali, że nikotyna była głównym alkaloidem w liściach i łodygach pomidorów zaszczerpionych na różnych gatunkach tytoniu, nawet na *N. glutinosa*, w którym jak wiadomo głównym alkaloidem jest nornikotyna. Przy zaszczerpieniu natomiast tytoniu na pomidorze stwierdzono powstawanie nikotyny w nadziemnych częściach tytoniu, chociaż jedynie w ilościach niewielkich. W wierzchołkowych częściach *N. glutinosa* zaszczerpionych na pomidorze przebiegała synteza nornikotyny i jej metylacja do nikotyny. Te badania, jak i wiele innych przemawiają za tworzeniem się nikotyny w procesie metylacji nornikotyny i to zarówno w korzeniach jak i częściach nadziemnych roślin *Nicotiana* (24).

Jednakże ukazały się też doniesienia o innej drodze powstawania nikotyny. Już w 1957 roku Tso i Jeffrey (29) na podstawie badań roślin szczerpionych, przy jednoczesnym stosowaniu N^{15} zakomunikowali, że nornikotyna i nikotyna mogą powstawać niezależnie od siebie z jednego lub kilku różnych prekursorów. Merker (21) badając kiełkowanie i wzrost siewek odmian nornikotynowych tytoni wykazał, że w obu przypadkach nornikotyna pojawia się w nieznacznych ilościach później od nikotyny. Ponadto, chociaż metionina znakowana w grupie metylowej jest dobrym prekursorem grupy metylowej nikotyny (13), to jednak sama nornikotyna okazała się słabym prekursorem tego alkaloidu (19, 22). Również szeroko prowadzone przez Alwortha i Rapoporta (2) badania nad asymilacją znakowanego CO_2 w *N. glutinosa* wykluczają nornikotyne jako prekursora nikotyny w tych roślinach.

Z innych badań wynika, że metylacja przy azocie nikotyny może zachodzić jeszcze przed powstaniem pierścienia pirolidynowego, a więc przed ukształtowaniem się cząsteczki nornikotyny. I tak, Schütte i inni (27) stwierdzili, że N-metyloputrescyna ($N^{15}-C^{14}H_3$) włączana jest w budowę cząsteczki nikotyny w *Nicotiana rustica* bez uprzedniej demetylacji. Wykazano też, że γ -metyloaminobutanal jest wydajnym prekursorem nikotyny w tytoniu (16, 23). Szczegółowy przebieg omawianych procesów prowadzących do powstawania nikotyny, jak dotąd, nie został poznany. W świetle dotychczasowych danych wydaje się, że rośliny rodzaju *Nicotiana* muszą „rozporządzać” dwoma różnymi mechanizmami powstawania nikotyny. Jeden szlak przemian, związany z metylacją nornikotyny przebiegać może na drodze redukcyjnego powstawania grup metylowych *de novo* bądź też na drodze przyłączania „nienaruszonych” grup metylowych z odpowiednich donatorów w procesie transmetylacji. Drugi szlak powstawania nikotyny, to tworzenie jej ze zmetylowanych już prekursorów. Potwierdzać to mogą badania Alwortha i wsp. (cyt. za [25]), na podstawie których można przy-

puszczać, że synteza nikotyny w korzeniach roślin *Nicotiana* biegnie innym torem niż w łodygach tych roślin.

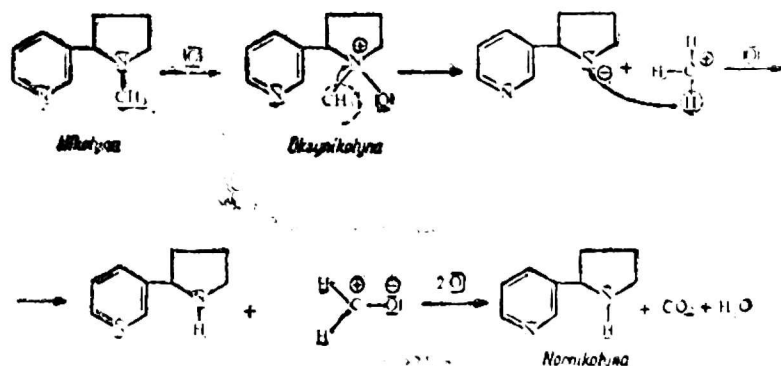
Obok prac, dotyczących powstawania nikotyny duże zainteresowanie budzą badania procesu odwrotnego, tj. przemiany nikotyny w nornikotyne. Wynika to między innymi z faktu, że nornikotyne obecna w tytoniu jest mniej toksyczna od nikotyny, w związku z czym tytonie, charakteryzujące się intensywną przemianą nikotyny w nornikotyne stanowią cel wielu prac hodowlanych.

Dotychczasowe badania tworzenia się nornikotyny w procesie demetylacji nikotyny wskazują, że przemiana ta zachodzi przede wszystkim w częściach nadziemnych roślin. Jednakże istnienie systemu sprzężonego nikotyne \rightleftharpoons nornikotyne stwierdzono również i w korzeniach roślin *Nicotiana*. Można sądzić, że na ogół procesy demetylacji nasilają się w miarę starzenia się roślin. I tak np. głównym alkaloidem młodych liści *N. glutinosa* jest nikotyne, a dojrzałych nornikotyne (24). W niektórych odmianach tytoniu proces demetylacji nikotyny jest szczególnie intensywny. Demetylacja w tych roślinach jest, jak wykazano, kierowana genetycznie (18). W innych odmianach tytoniu demetylacja przebiega dopiero w czasie fermentacji (5). Egri (12) stwierdził, że szybkość powstawania nornikotyny z nikotyny w poszczególnych odmianach tytoniu jest związana z aktywnością oksydazy polifenolowej. Tytonie, w których głównym alkaloidem jest nornikotyne charakteryzują się podwyższoną aktywnością tego enzymu w porównaniu z tytoniami o przewadze nikotyny. Wydaje się, że enzymy katalizujące procesy demetylacji nie wykazują wysokiej specyficzności substratowej. Stwierdzono bowiem, że i inne alkaloidy, zawierające grupy N-metylowe, nie występujące normalnie w tytoniu, a wprowadzone na drodze infiltracji do liści tych roślin ulegają demetylacji (np. kodeina, hordenina) — [24].

Z teoretycznego punktu widzenia można założyć, że procesy demetylacji mogą przebiegać albo poprzez transmetylację, albo też na drodze oksydacyjnej. Pierwszą możliwość, jak dotąd, potwierdzają tylko nieliczne prace. I tak, gdy nikotyne wprowadzano do homogenizatów tkanek tytoniu wraz z etanoloaminą zwiększała się nieznacznie zawartość nornikotyny. Natomiast w braku etanoloaminy nornikotyne nie powstawała (9). Dane te świadczą o przebiegu reakcji transmetylacji w tytoniu z przenoszeniem grupy metylowej nikotyny na aktywny akceptor w rodzaju etanoloaminy. Możliwość taką potwierdzają również badania Leete i Bella (20). Autorzy ci po wprowadzeniu do liści tytoniu nikotyny znakowanej w grupie metylowej, wykryli następnie tę grupę w cholinie. Wykazano też, że grupa metylowa nikotyny może być przenoszona nie tylko na cholinę, ale i na metioninę, kumarynę i skopoletynę (24).

Obok prac wskazujących na możliwość przebiegu demetylacji nikotyny

poprzez transmetylację istnieje wiele danych przemawiających za oksydacyjnym charakterem tego procesu (25). Już w 1959 roku Ilin i Sierbrowskaja zaobserwowali ciekawe powiązanie pomiędzy powstawaniem nornikotyny a intensywnością oddychania. Demetylacji nikotyny towarzyszyło mianowicie zwiększanie ilości pobieranego tlenu i wydzielanego dwutlenku węgla. Badania te przeprowadzone początkowo z liśćmi *N. glutinosa* potwierdzono i na innych roślinach, do których wprowadzono nikotyne. Natomiast infiltracja anabazyny, nie zawierającej grupy N-metylowej nie wykazała żadnych zmian we współczynniku oddechowym. Wyraźną różnicę w oddziaływaniu tych dwóch homologicznych alkaloidów można tłumaczyć jedynie obecnością w nikotynie grupy N-metylowej, która łatwo ulega utlenieniu do CO_2 . Mechanizm oksydacyjnej demetylacji nikotyny nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony. Na podstawie teoretycznych rozważań Wenkert (30) doszedł do wniosku, że proces ten przebiegać może poprzez przejściowe utworzenie oksynikotyny. Również badania *in vitro* wskazują na taką ewentualność (7). Przebieg reakcji w warunkach modelowych wyjaśnia załączony schemat (rys. 2).



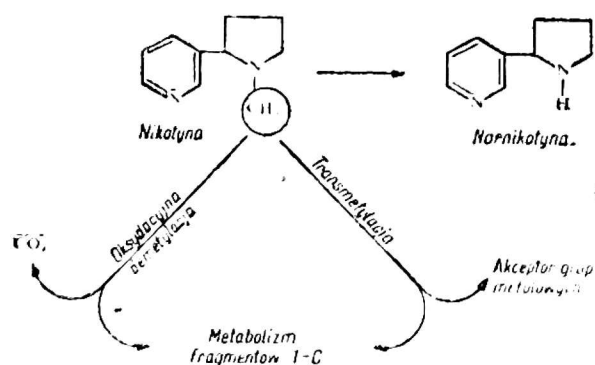
Rys. 2. Mechanizm oksydacyjnej demetylacji nikotyny (*in vitro*)

Jakkolwiek hipoteza Wenkerta znalazła częściowe potwierdzenie doświadczalne, to jednak znane są również prace zaprzeczające powstawaniu oksynikotyny jako metabolitu pośredniego w oksydacyjnej demetylacji nikotyny w roślinach. Jak wykazali Stepka i Dewey (28), oksynikotyna infiltrowana do liści tytoniu nie ulega przemianie do nornikotyny, ani też nie hamuje przemian nikotyny. Kasaki i Tamaki (cyt. za [1]) badali przemiany oksynikotyny infiltrowanej do liści *Nicotiana tabacum* pozbawionych alkaloidów. Chociaż autorzy ci stwierdzają pewien niewielki stopień przemiany oksynikotyny w nornikotyne (3,7%), to jednak sądzą, że przemiana ta ma raczej charakter procesu drugorzędowego. Również z badań Alwortha (1) wynika, że oksynikotyna może się przemieniać zarówno w nornikotyne, jak i w nikotyne.

Jakkolwiek dostatecznie udowodniono powstawanie nornikotyiny z nikotyiny w procesie demetylacji, to jednak znane są jeszcze doniesienia o innej drodze powstawania nornikotyiny w roślinach *Nicotiana*. Tso i Jeffrey (29) wykazali, że w izolowanych liściach tytoniu nornikotyina powstaje nie z nikotyiny, ale z innych zwiazkw pośrednich. Wyniki uzyskane przez Kisaki i Tamaki (17) wiadczy z kolei o tym, że przemiana nikotyiny w nornikotyinę nie jest reakcj prostej demetylacji, ale poprzedza ją rozerwanie pierscienia piroolidynowego nikotyiny, czemu może towarzyszy strata asymetrii przy 5 atomie węgla i dlatego też powstająca nornikotyina jest racematem. Przytoczone tutaj dane wyraźnie odbiegają od przedstawionych dotychczas dróg powstawania nornikotyiny i zmuszają do dalszych badan nie wyjaśnionych szlaków metabolizmu alkaloidów tytoniu.

Na podstawie dotychczasowych prac można sdzi, że są prawdopodobnie dwie drogi powstawania nornikotyiny; jedna z nikotyiny poprzez jej demetylacj. druga bezpośrednia z ornityny, czy też zwiazkw spokrewnionych z nią biogenetycznie. Ten drugi „rodzaj” nornikotyiny nie jest prekursorem nikotyiny, czyli w tym przypadku nikotyina nie może powstawa przez metylacj nornikotyiny (22).

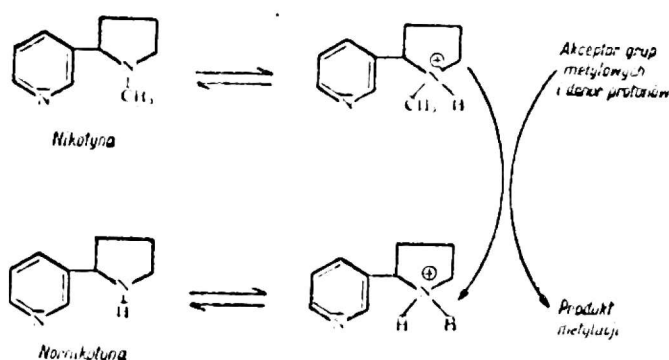
Jeśli chodzi o proces degradacji nikotyiny, to należy sdzi, że w roślinach rodzaju *Nicotiana* przebiega gównie demetylacja oksydacyjna z powstawaniem CO₂, jednakże niektóre grupy metylowe uczestnicz również w metabolizmie fragmentów jednowęglowych i mogą być przenoszone w „całości” na drodze transmetylacji — (rys. 3).



Rys. 3. Schemat demetylacji nikotyiny

Te dwa „rodzaje” demetylacji nikotyiny, jak się wydaje, uwarunkowane są odmiennymi czynnikami. Demetylacja oksydacyjna uzależniona jest od potencjału redox rodowiska, natomiast transmetylacyjna gównie od obecności odpowiednich akceptorów grup metylowych i jak można przypuszczać od stopnia jonizacji nikotyiny przy azocie piroolidynowym (7). Jest rzeczą interesującą, że przy pH około 6 azot piroolidynowy nikotyiny występuje prawie w 100% w postaci dodatnio naładowanego atomu „oniowego” (11). To wlnonie zjawisko jonizacji azotu w zakresie pH, jakie zasadniczo panuje w soku komerek roślinnych umożliwia przemian nikotyiny w nornikotyinę

na drodze transmetylacji. W obecności bowiem odpowiedniego akceptora grup metylowych w komórce, grupa metylowa zjonizowanej nikotyny może ulegać łatwo oderwaniu, lub co jest bardziej prawdopodobne, wymianie na proton. Mechanizm tej przemiany można przedstawić następująco:



Rys. 4. Przemiana nikotyny w nornikotynę w procesie transmetylacji

Można też przypuszczać, że w procesie demetylacji transmetylacyjnej możliwe jest przekształcenie lewoskrętnej L nikotyny w prawoskrętną D nornikotynę, ponieważ stopień jonizacji nikotyny, jak już wspomniano, zależy od pH, a pH z kolei wyraźnie wpływa na skręcalność optyczną nikotyny (10). Tym tłumaczyć można by fakt występowania w roślinach L (—) nikotyny obok D(+) nornikotyny.

Interesujące są zaobserwowane różnice w rozmieszczeniu powstającej nornikotyny w liściach *Nicotiana glauca* i *Nicotiana glauca*. Tam, gdzie proces demetylacji ma główny charakter przemian oksydacyjnych (*N. glauca*), tam rozmieszczenie nornikotyny nie jest równomierne w całej blaszce liściowej (3). Tam natomiast, gdzie mamy prawdopodobnie do czynienia z transmetylacją (*N. glauca*), tam rozmieszczenie nornikotyny jest równomierne w całym liście (8).

• Zarówno procesy metylacji jak i demetylacji przy azocie odgrywają doniosłą rolę w powstawaniu i przemianach nie tylko alkaloidów tytoniu, ale i wielu innych związków naturalnych. Jeśli chodzi o ich przebieg, można przypuszczać, że nie ma odrębnych mechanizmów metylacji i demetylacji dla alkaloidów tytoniu. Dotychczasowe badania wskazują bowiem, że grupa metylowa przy azocie może być przyłączana albo poprzez transmetylację, albo też może powstawać w wyniku metylacji redukcyjnej, odłączana zaś w wyniku demetylacji transmetylacyjnej lub oksydacyjnej.

Omówione prace z zakresu przemian alkaloidów związanych z procesami metylacji i demetylacji obok znaczenia poznawczego posiadają również aspekt praktyczny. Wiadomo jest bowiem, że współczesna hodowla oraz przemysł tytoniowy zwracają coraz baczniejszą uwagę na zagadnienie jakości surowca, uzależnionej między innymi od zawartości w nim określonych alkaloidów. Stąd konieczność badań mechanizmu przemian alkaloi-

dów tytoniu. Pełne wyjaśnienie tych problemów jest niezbędnym warunkiem bliższego poznania zagadnień genetycznych, dotyczących powstawania nikotyny i nornikotyny, a to z kolei stanowi podstawę współczesnej hodowli jakościowej. Obok dotychczasowych wyniki dalszych badań niewątpliwie powinny być drogowskazem w kierowaniu zawartością określonych alkaloidów w surowcu tytoniowym.

LITERATURA

1. Alworth W. L., Lieberman L., Ruckstuhl J. A.: *Phytochemistry*, 8, 1427, 1969.
2. Alworth W. L., Rapoport H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 112, 45, 1965.
3. Blaim K.: *Acta Soc. Bot. Polon.*, 32, 303, 1963.
4. Blaim K.: *Rocz. Nauk Roln., Ser. A.*, 88, 917, 1964.
5. Blaim K.: *Substancje swoiste roślin uprawnych*, PWRiL, W-wa, 1965.
6. Blaim K., Ciszewska R.: *Roczniki Chemii*, 42, 1025, 1968.
7. Blaim K., Ciszewska R.: *Biochimija*, 37, 706, 1972.
8. Blaim K., Ciszewska R.: *Streszczenia prac VII-go Zjazdu P.T. Bioch.*, Wrocław 1969 r., s. 169.
9. Bose B. C., De H. N., Mohamad S.: *Ind. J. Med. Res.*, 44, 91, 1956.
10. Ciszewska R.: *Praca doktorska*, WSR, Lublin 1971 r.
11. Domino E. F.: *Tobacco alkaloids and related compounds*, Pergamon Press, 1965 r., s. 303.
12. Egri L.: *Acta du 2^e Congr. Sci. Int. du Tabac, Bruxelles*, 1958 r., s. 386.
13. Griffith G. D., Griffith T.: *Plant Physiol.*, 39, 970, 1964.
14. Ilin G. S., Sierbrowskaja K. B.: *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, nr 1, 118, 139, 1958.
15. Jeffrey R. N., Tso T. C.: *Plant Physiol.*, 39, 480, 1964.
16. Kisaki T., Mizusaki S., Tamaki E.: *Arch. Biochem., Biophys.*, 117, 677, 1966.
17. Kisaki T., Tamaki E.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 92, 252, 1961.
18. Koelle G.: *Z. Pflanzenzüchtung*, 55, 375, 1966.
19. Ladesic B., Tso T. C.: *Phytochemistry*, 3, 541, 1964.
20. Leete E., Bell V. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4358, 1959.
21. Merker J.: *Ber. Inst. Tabakforsch., Dresden*, 10, 1, 1963.
22. Mizusaki S., Kisaki T., Tamaki E.: *Agr. Biol. Chem.*, 29, 714, 1965.
23. Mizusaki S., Kisaki T., Tamaki E.: *Plant Physiol.*, 43, 93, 1968.
24. Mothes K., Schütte H. R.: *Biosynthese der alkaloide*, VEB, Deutsch. Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1969.
25. Robinson T.: *The Biochemistry of Alkaloids*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1968.
26. Schröter H. B.: *Abh. Deutsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Geol. Biol.*, Nr 3, 157, 1966.
27. Schütte H. R., Maier W., Stephan U.; *Z. Naturforsch.*, 23b, 11, 1968.
28. Stepka W., Dewey L. J.: *Plant Physiol.*, 39, 283, 1964.
29. Tso T. C., Jeffrey R. N.: *Plant Physiol.*, 32, 86, 1957.
30. Wenkert E.: *Experientia*, 10, 346, 1954.