

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Л. НЕЗГОВОРОВ

ОБ АМИЛАЗЕ В ХЛОРОПЛАСТАХ

(Представлено академиком А. А. Рихтером 9 IX 1940)

Выделение хлоропластов из клетки и отделение их от цитоплазмы позволяют сейчас решать ряд физиологических вопросов, связанных с взаимоотношением отдельных частей клетки в ее общих процессах.

Предложенные методы выделения пока еще не могут считаться достаточно совершенными и выделение пластид сопровождается частичным, а иногда и значительным распадом их на части или гранулы. Предотвратить это, при массовом выделении пластид, пока не удается. Предложенный метод Granick (1938) для получения целых пластид все же страдает общим недостатком, к которому присоединяется еще загрязняемость глюкозой выделенной массы пластид.

Тем не менее выделенные и отмытые пластиды и их гранулы дают возможность обычными методами биохимии подойти к изучению некоторых свойств и состава пластид. Химическое исследование выделенных пластид дано в работах Menke (1938), Granick (1938), Neish (1939).

Исследование ферментов дано Neish—по каталазе и ангидразе и Crossing (1940)—по каталазе, пероксидазе, хлорофиллазе, амилазе и инвертазе. Свои замечания по методу и результатам Crossing'a изложим ниже. Мы исследовали амилазу в пластидах, выделенных по методу Neish'a (1939).

Работа по физиологии пластид проводится по предложению акад. А. А. Рихтера при непосредственном руководстве К. Т. Сухорукова.

Для получения пластид навеска вымытых под краном и сполоснутых дистиллированной водой листьев тщательно растиралась в ступке, с постепенным прибавлением воды (1 : 10). Вытяжка фильтровалась через сложенную вдвойне марлю и центрифугировалась в течение 6 мин. при 1 000—1 500 оборотах для удаления неразрушенных клеток. Полнота удаления контролировалась микроскопически. Но при этом мы теряем небольшую часть выпадающих в осадок наиболее тяжелых, из-за наличия в них крахмала, пластид.

К 500 см³ полученной взвеси приливаем 1,5 л дистиллированной воды и 6—10 см³ CaCl₂ уд. веса 1,33. После перемешивания жидкость оставляется в цилиндрах до полной флоккуляции, на что уходит от 20 мин. (для *Arctium tomentosum*) до 1—2 час. (у *Allium Cepa*). Затем жидкость сливается и замещается свежей водой. Если после перемешивания осадок вновь долго не образуется, то вторично приливается 5—6 см³ CaCl₂. Осадок центрифугируется при 2 000 оборотах до прекращения отделения промыв-

ной воды. Вес полученной таким образом пасты, состоящей из пластид и гранул, для каждого растения относительно постоянен. Паста от сырого веса листьев составляет у *Triticum vulgare*— $28,4 \pm 4,4\%$, у *Avena sativa*— $12,1 \pm 5,0\%$, у *Arctium tomentosum*— $14 \pm 8,5\%$, у *Trifolium pratense*— $21,2 \pm 6,5\%$ и у *Allium Cepa* $4,13 \pm 0,99\%$.

Мы в этом сообщении приводим результаты определения в пластидах свободной амилазы. Для этого 1—2 г полученных пластид растирались с 10 см³ воды и вносились в колбу с 50 см³ 1%-ного крахмала и 10 см³ $1/15$ M фосфатного буфера с pH 4,9. В качестве антисептика добавлялся толуол или смесь его с хлороформом. Через 20 час. стояния при 40° определялся прирост восстанавливающих сахаров. Сахара определялись иодометрическим методом Willstätter u. Shudel.

Одновременно определялась активность амилазы в 5—10 см³ вытяжки из листа (1 : 10), до осаждения из нее пластид. Результаты определения амилазы приведены в табл. 1.

Таблица 1

Активность амилазы (в см³ п/10 J на 10 г сырого веса листьев)

	Во всем листе		В пластидах		
	от—до	число анали-зов	от—до	в %	число анали-зов
<i>Avena sativa</i>	56—16	9	1,0—0,2	3,2—0,4	12
<i>Hordeum vulgare</i>	44—17	9	0,9—0,1	3,5—0,3	11
<i>Triticum vulgare</i>	45—21	6	1,3—0,3	5,5—0,9	7
<i>Bromus inermis</i>	41—33	3	2,3—1,3	6,2—3,1	3
<i>Melica altissima</i>	46—23	3	1,5—0,3	3,6—0,7	3
<i>Dactylis glomerata</i>	41—37	2	2,7—1,5	6,8—3,5	2
<i>Agropyrum repens</i>	15	1	0,98	6,1	1
<i>Trifolium pratense</i>	40—12	3	4,3—0,3	20 —4,1	8
<i>Phaseolus vulgaris</i>	43—37	2	2 —0,9	4,6—3,6	5
<i>Urtica dioica</i>	21—11	2	1,6—0,3	12,7—1,9	4
<i>Arctium tomentosum</i>	56—7	18	4,3—0,5	17,9—1,7	24
<i>Allium Cepa</i>	7—2,5	8	0,9—0,1	16,7—2,4	10
<i>Lilium Martagon</i>	5—12	2	0,6—0,5	9,1—4,4	2
<i>Convallaria majalis</i>	13—15	2	0,3—0,45	2,9—2,2	2
<i>Iris germanica</i>	6—2,5	2	0,1—0,05	4,9—1,6	2
<i>Nemero-callis flava</i>	2,0	1	0,1	5,2	1
<i>Narcissus</i> sp.	6—1,5	3	0,2—0,05	3,2—3,2	3

Опыты проводились в разное время лета 1940 г. с растениями, выращенными из полевых условий в разные фазы их развития. Этим можно объяснить колебания в активности амилазы, которые разрешают все же сделать вывод, что в пластидах содержится лишь от 1 до 15% свободной амилазы листа и что 85—99% ее находится, таким образом, в цитоплазме и клеточном соке.

Эти данные противоположны результатам Crossing'a, по нашему мнению, из-за недостатков примененного им метода. Осаждение пластид проводилось Crossing'ом из вытяжки 1 : 2, что делает маловероятным полное отделение пластид от цитоплазмы и обозначаемые им фракции носят поэтому весьма условный характер. Мы не касаемся уже метода отделения цитоплазмы от воднорастворимой фракции.

Метод Neish'a обладает в этом отношении явным преимуществом, так как в результате больших разбавлений вытяжек и промывки осажденных пластид достигается получение однородной по химизму массы. К недостаткам метода Neish'a следует отнести его большую громоздкость.

Помимо хлористого кальция мы осаждали пластиды пропусканием углекислого газа или дожидались самовыпадения их, наступавшего при длительном стоянии; растирание листьев пробовали проводить в 0,5 М глюкозе, чтобы уменьшить количество распадающихся до гранул пластид, но во всех случаях картина распределения амилазы оставалась прежняя.

Разрушение пластид. Для разрушения пластид и изменения их коллоидных свойств мы применили тщательное растирание с битым стеклом, резкую смену концентраций хлористого калия и замораживание погружением взвеси пластид на 2—8 час. в смесь льда с NaCl. Особенно действенным оказалось промораживание. Пластиды при этом чернели, слипались и давали резко отделенный от жидкости, выпадавший на дно осадок. Из высушенных в вакууме замораживавшихся пластид извлекается бензином больше хлорофилла, чем из контрольных, что говорит о глубоких изменениях в них. Но увеличения количества амилазы при всех этих воздействиях, как показывает табл. 2, не наблюдается.

Таблица 2
Амилаза при разрушении пластид (в см³ n/10 J на 10 г листьев)

Число		Замораживание	Растиран. со стекл.	Смена концен-траций	Конт-роль
13 VI	<i>Arctium tomentosum</i> . .	1,6	1,9	1,8	1,7
11 VI	<i>Hordeum vulgare</i>	0,4	0,25	0,45	0,3
11 VI	<i>Avena sativa</i>	0,24	0,24	—	0,3
13 VI	<i>Trifolium pratense</i> . .	0,4	0,3	—	0,4
15 VI	» »	0,2	—	—	0,2
15 VI	<i>Dactylis glomerata</i> . . .	1,75	—	—	1,5
16 VI	<i>Bromus inermis</i>	1,0	—	—	1,3

Однако, если центрифугированием отделить промораживавшиеся пластиды от воды, в которой они были взвешены, то обнаружим (табл. 3),

Таблица 3
Освобождение амилазы из пластид при их промораживании (в см³ n/10 J на 10 г сырого веса листьев)

Число		Конт-роль		Промороженные	
		В пласти-дах	Перешло в воду	В пласти-дах	Перешло в воду
30 VI	<i>Avena sativa</i>	0,16	0,05	0,13	0,07
30 VI	<i>Arctium tomentosum</i>	1,6	0,27	0,55	0,48
2 VII	<i>Triticum vulgare</i> . .	0,49	0,60	0,38	1,0
9 VII	» »	0,3	0,3	0,37	0,6
2 VII	<i>Allium Cepa</i>	0,06	0,1	0,03	0,2
9 VII	» »	0,14	0,06	0,05	0,08

что в воду при замораживании перешло больше амилазы, чем у контроля, стоявшего в течение того же времени при комнатной температуре.

Это заставляет полагать, что некоторое количество амилазы находится внутри пластид и гранул в свободном состоянии, возможно, вместе с остатками цитоплазмы, что не противоречит и современным представлениям о структуре пластид.

А. Орагин и А. Курссанов (1929) показали, что амилаза может адсорбироваться из растворов белковыми осадками, теряя при этом свою

гидролитическую способность. Однако эта амилаза может быть вновь полностью реактивирована при добавлении яичного альбумина или пептона, вызывающих ее элюцию.

Chrzaszcz и Janicki (1933) также констатируют факт реактивирования амилазы пептоном, хотя и дают ему иное толкование, относя пептон к элейто-веществам.

Мы провели ряд опытов, в которых вместо воды пластиды растирались с 10 см³ 1%-ного прокипяченного пептона. Приводим некоторые из них (табл. 4). Как видим, добавление к пластидам пептона не вызывает увеличения активности амилазы.

Таблица 4
Активность амилазы (в см³ n/10 J на 10 г листьев)

Число		Без пеп- тона	С пеп- тоном
28 VI	<i>Arctium tomentosum</i>	0,91	0,69
13 VII	»	1,14	0,56
2 VI	<i>Triticum vulgare</i>	0,50	0,49
19 VIII	<i>Trifolium pratense</i>	4,31	4,19

Причины наблюдавшегося в некоторых случаях торможения пептоном амилазной реакции нами не исследовались.

Лаборатория фотосинтеза
Академии Наук СССР и
Кафедра физиологии и биохимии растений
Томского университета им. В. В. Куйбышева

Поступило
13 IX 1940

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. Chrzaszcz u. Janicki, Bioch. ZS., 272 (1933). ² Crossing, Bioch. ZS., 305, Н. 5—6 (1940). ³ S. Granick, Amer. Journ. of Bot., 25, № 8 (1938); Menke, ZS. f. Bot., 32, Н. 6 (1938). ⁴ A. Ch. Neish, Bioch. Journ., 33, № 3 (1939). ⁵ А. О пар и н. А. Кур с са н о в, Bioch. ZS., 209, Н. 1—3 (1929).