

Н. М. СИСАКЯН и А. М. КОБЯКОВА

ФОСФОРИЛАЗА В ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЛАСТИДАХ

(Представлено академиком А. И. Опариным 21 VI 1948)

Интерес к изучению ферментных систем изолированных пластид прежде всего обуславливается стремлением исследователей выяснить механизм двух важнейших реакций, лежащих в основе жизнедеятельности — процессов фотосинтеза и дыхания.

До настоящего времени все еще допускается, что в процессе фотосинтеза активное участие принимают те из ферментных систем, при участии которых протекают окисление и восстановление. Вопрос же о роли пластид в реакциях превращения первичных продуктов фотосинтеза может быть решен лишь в результате обнаружения в пластидах соответствующих биокаталитических систем, под влиянием которых осуществляются процессы образования и распада органических веществ.

Чтобы приблизиться к решению поставленной выше задачи, мы задались целью исследовать фосфорилазу в пластидах. Пластиды изолировались по ранее описанному способу (1). Активность фосфорилазы измерялась как по убыли, так и по нарастанию неорганического фосфора, соответственно в присутствии крахмала и неорганического фосфора и глюкозо-1-фосфата при подавлении действия фосфатаз внесением в реакционную смесь NaF.

При определении фосфоролиза крахмала реакционная смесь состояла: от 0,2 до 0,5 г пластидного вещества + 3 мл фосфатного буфера (pH = 7,2) + 1 мл 1 N раствора NaF + 2 мл 3% раствора крахмала. Смесь доводилась дистиллированной водой до 10 мл и инкубировалась в термостате при 35—38° С.

При определении синтеза крахмала реакционная смесь состояла: от 0,2 до 0,5 г пластидного вещества + 3 мл цитратного буфера (pH = 6,7) + 1 мл 1 N раствора NaF + 1 мл 3% раствора крахмала + + 10 мг глюкозо-1-фосфата. Смесь доводилась дистиллированной водой до 10 мл и инкубировалась в термостате при температуре 35—38° С. После инкубации реакция прекращалась внесением 3 мл 40% раствора трихлоруксусной кислоты.

В фильтрате фосфор определялся по Фиксе-Субароу в штупенфотометре.

Результаты измерения скорости фосфоролиза крахмала под действием пластид приведены в табл. 1.

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что как хлоропласты, так и лейкопласты обладают значительной фосфорилазной активностью. В ряде случаев убыль неорганического фосфора в результате фосфоролиза крахмала достигает 20% при экспозиции в 1 час. В большинстве случаев процент убыли фосфора не превышает 12—15%.

Сопоставление данных по убыли неорганического фосфора при экспозиции в 1 час и 4 часа указывает, что после инкубации в течение

Таблица 1

Скорость фосфоролиза крахмала под действием изолированных пластид (содержание неорганического фосфора в ‰)

Наименование пластидного вещества	№№ опытов	Срок определения фосфора		
		сразу	через 1 час	через 4 часа
Хлоропласты крапивы	1	100	78,1	82,5
	2	100	83,3	80,0
Лейкопласты клубней картофеля	3	100	94,7	84,2
	4	100	88,2	94,1
	5	100	85,7	85,5

1 часа достигнутое при этом равновесие нарушается и реакция идет в направлении дефосфорилирования продуктов фосфоролиза крахмала.

Приведенные здесь результаты дают нам ясное представление о величине активности фосфорилаз пластидного вещества. Для получения

Таблица 2

Синтез крахмала под действием фосфорилазы лейкопластов клубней картофеля (содержание неорганического фосфора в ‰)

№ опытов	Срок определения фосфора		
	сразу	через 1 час	через 4 часа
1	100	109,7	99,2
2	100	103,2	—
3	100	103,0	101,0
4	100	103,0	99,7
5	100	108,0	102,0

более полного представления о наличии и характере действия фосфорилаз пластидного вещества мы провели измерение активности фермента не только по скорости фосфоролиза крахмала (убыль неорганического фосфора), но и по скорости образования продуктов полимеризации в результате дефосфорилирования глюкозо-1-фосфата (нарастания неорганического фосфора). Результаты этой серии опытов представлены в табл. 2.

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что пластидное вещество не только обладает способностью осуществлять фосфоролиз крахмала, но что под его

действием происходит и образование крахмала из глюкозо-1-фосфата. Если о скорости фосфорилазного синтеза, как это обычно и делается, судить по количеству выделившегося неорганического фосфора в результате дефосфорилирования глюкозо-1-фосфата, то при разных условиях процесс фосфоролиза под действием пластидного вещества выражается величиной 5—15%, а синтез крахмала 3—8%, что указывает на ясное превалирование реакции фосфоролиза над процессом дефосфорилирования.

Таким образом, на основании изложенных выше результатов, мы вправе сделать вывод, что изолированные пластиды обладают значительной фосфорилазной активностью.

Для суждения о природе фосфорилазы пластидного вещества мы провели серию опытов с диализованными хлоропластами, изолированными из листьев шпината. Диализ производился в коллодиевых гильзах с толуолом против водопроводной воды. После диализа в хлоропластах определялась активность фосфорилазы двумя описанными выше способами (табл. 3).

Результаты опытов, приведенных в табл. 3, ясно показывают, что диализ хлоропластов той или иной продолжительности заметным образом не сказывается на активности фосфорилазы. Кроме того, необходи-

Таблица 3

Активность фосфорилазы в хлоропластах листьев шпината до и после диализа (в $\mu\text{г}$ неорганического фосфора на 0,002 г сырой навески)

Условия опыта	Фосфоролит крахмала			Синтез крахмала		
	сразу	через 1 час	активность за 1 час	сразу	через 1 час	активность за 1 час
До диализа	36,0	31,2	4,8	39,8	58,2	8,4
Диализ 4 часа	36,9	32,4	4,5	38,8	46,4	7,6
Диализ 15 часов	37,4	32,0	5,4	33,2	41,9	8,7

мо указать, что прибавление адениловой кислоты к препаратам не привело к увеличению фосфорилазной активности хлоропластов, подвергнувших диализу.

Совокупность добытых фактов свидетельствует об устойчивости фосфорилаз пластидного вещества и об их идентичности с изолированными из других растений препаратами данного фермента (2).

В отличие от животной фосфорилазы препараты, выделенные из растения, активны и без кофермента — адениловой кислоты (2).

В ходе работ возникла необходимость исследования активности фосфорилазы в отдельных элементах растительной ткани. Опыты, которые были проведены нами с листьями крапивы и с клубнями картофеля, представлены в табл. 4.

Таблица 4

Активность фосфорилазы в различных элементах растительной ткани (в $\mu\text{г}$ неорганического фосфора на 1 г сырого вещества за 1 час)

В клубнях картофеля	300,0	В листьях крапивы	430,0
В мязге после отжатия сока при давлении 300 атм.	92,5	В мязге после отжатия сока при давлении 300 атм.	160,0
В соке после удаления пластид	72,0	В соке после удаления пластид	94,4
В лейкопластах	240,0	В хлоропластах	460,0

Из цифр табл. 4 явствует, что во всех исследованных нами клеточных элементах содержится весьма активная фосфорилаза. Пересчет активности фермента в микрограммах фосфора на единицу сырого веса показывает, что при всех равных условиях наибольшей фосфорилазной активностью обладают пластиды. Вслед за пластидами идет мязга и на последнем месте находится сок, отжатый при давлении 300 атм. после удаления из него пластидного вещества. Сопоставляя активность фосфорилазы в отдельных элементах клубней картофеля и листьев крапивы, нетрудно убедиться, что элементы листовой ткани значительно превосходят по фосфорилазной активности элементы картофельных клубней.

Таким образом, к числу уже обнаруженных в пластидах ферментов (1) необходимо отнести и фосфорилазу, которая играет существенную роль в превращении углеводов в тканях растения.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха
Академии Наук СССР

Поступило
19 VI 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1 Н. М. Сисакян и А. М. Кобякова. Биохимия. 13, 88 (1948). 2 J. Sumner and G. Somers, Chemistry and Methods of Enzymes. 1946.