

Н. М. СИСАКЯН и К. Г. ЧАМОВА

ДЕГИДРАЗЫ ПЛАСТИД

(Представлено академиком А. И. Опариным 21 V 1949)

Согласно представлениям, впервые развитым А. Н. Бахом ⁽¹⁾ более чем полувека тому назад, в основе как дыхания, так и фотосинтеза лежат окислительно-восстановительные процессы. В настоящее время установлено, что в процессах дыхания дегидразы, наряду с оксидазами, играют весьма важную роль. Несмотря на это, дегидразы растительной клетки изучены недостаточно. Так, при исследовании дегидразной активности высших растений В. Залесский и сотрудники ⁽²⁾ установили наличие дегидраз с активной группой типа козимазы в семенах гороха и в пшеничной муке. В. Кретович ⁽³⁾ в зародышах пшеницы обнаружил дегидразу типа пиридин-нуклеотидов. Недавно Н. Гельман ⁽⁴⁾ показала, что в ростке и эндосперме пшеницы содержится дрожжевая дегидраза. Е. Бойченко ⁽⁵⁾ обнаружила в хлоропластах гидрогеназу, которая, по ее мнению, способна в темновых реакциях фотосинтеза восстанавливать угольный ангидрид за счет водорода воды. Что же касается нахождения дегидраз в пластидах, то до настоящего времени по этому поводу мы не располагаем никакими данными. Между тем, исследование природы и характера действия дегидраз высокодифференцированных и специализированных биологических структур — хлоропластов имеет, как нам представляется, существенное значение в познании химизма двух важнейших процессов, лежащих в основе жизнедеятельности, — ассимиляции и диссимиляции. В связи с этим мы задались целью исследовать дегидразную активность изолированных пластид. Активность ферментов измерялась по скорости обесцвечивания метиленовой сини, которая, акцептируя водород, восстанавливается в бесцветное лейкосоединение. В качестве донаторов водорода нами были взяты различные аминокислоты, органические кислоты и глюкоза.

Опыты показали, что наибольшая активность дегидраз в пластидах обнаруживается при $pH = 8$, поэтому мы приводим здесь лишь результаты соответствующих опытов (табл. 1). Опыт производился в анаэробных условиях при температуре $37-39^\circ$. В контрольных определениях в трубки вносились инактивированные кипячением ферментные вытяжки.

Данные табл. 1 показывают, что наибольшим дегидразным действием из исследованных нами пластид обладают хлоропласты. В изолированных из листьев фасоли хлоропластах мы обнаруживаем весьма активную дегидразу гликоколлала, глютаминовой, аспарагиновой и яблочной кислот; в значительно менее активном состоянии находятся дегидразы лимонной, глюконовой, янтарной кислот и глюкозы. Особого внимания заслуживает факт обнаружения дегидразы аспарагиновой кислоты, поскольку до сих пор она еще не была обнаружена в высших растениях. В хлоропластах из листьев фасоли были обнаружены в очень активном состоянии дегидразы гликоколлала, глютаминовой кислоты и гистидина.

Таблица 1

Активность дегидраз в пластидах различного происхождения
(в минутах в пересчете на 10 мг сухого вещества при рН = 8)

Объекты исследования	Донаторы								
	Глю- тами- новая к-та	Глико- колл	Гисти- дин	Яблоч- ная к-та	Аспа- рагино- вая к-та	Лимон- ная к-та	Глюкто- ночная к-та	Янтар- ная к-та	Глю- коза
Хлоропласты									
Листья фасоли	16	7	—	32	19	270	270	270	270
Листья сахарной свеклы	16	13	17	нет	нет	нет	нет	нет	—
Листья клевера*	26	нет	26	53	»	»	»	»	46
Лейкопласты									
Клубень картофеля сорт «Зарница»	75	71	—	нет	—	»	»	»	—
Клубень картофеля гиб- рид 1/14343	71	23	—	»	—	»	»	»	—
Листья капусты	50	нет	—	»	—	»	»	»	—
Хромoplastы									
Корень моркови	Действие дегидраз не обнаружено								
Корень сахарной свеклы									

* Ферментативная активность была обнаружена лишь в присутствии прокипяченного дрожжевого сока.

В хлоропластах из листьев клевера нам удалось обнаружить лишь дегидразы глютаминовой кислоты, гистидина, яблочной кислоты и глюкозы. Следует указать, что в хлоропластах из листьев клевера, в отличие от хлоропластов, изолированных из других растений, дегидразы без прибавления прокипяченного дрожжевого сока не проявляют своей активности.

Здесь необходимо отметить, что неоднократные попытки, предпринятые нами с целью обнаружения дегидраз в лейкопластах картофеля, не увенчались успехом. Это обстоятельство, повидимому, связано с подавляющим действием продуктов окисления полифенолов на дегидразы, поскольку подобное явление было обнаружено А. Опариным и А. Курсановым (6) в отношении других ферментов. В действительности, в последующих опытах, где свежее изолированные лейкопласты клубней картофеля растирались в присутствии определенного (опытным путем установленного) количества пептона, нам удалось обнаружить в них дегидразы глютаминовой кислоты и гликоколла.

Таким образом, в пластидах, за исключением хромoplastов, мы обнаруживаем весьма активную дегидразную активность.

Опыты, проведенные нами с целью сравнительной характеристики дегидразной активности отдельных клеточных элементов, привели к установлению следующих фактов (табл. 2).

Данные табл. 2 показывают, что в хлорофиллоносных тканях наибольшая активность дегидразы глютаминовой кислоты приходится на долю сока после удаления пластид, затем пластид и наименьшая — на долю мязки после отжатия сока при давлении 300—350 атм. Однако, если при определении действия дегидразы глютаминовой кислоты мы обнаруживаем наибольшую ферментативную активность в соке, то это коренным образом изменяется при исследовании других ферментов из группы дегидраз. Так, в листьях клевера дегидразы глюкозы и яблочной

Таблица 2

Сравнительная активность дегидразы глютаминовой кислоты в различных клеточных элементах (в минутах на 10 мг сухого вещества при pH = 8)

Растения	Объекты исследования			
	Кашица	Мязга после отжатия сока при давлении 300—350 атм	Сок после удаления пластид	Пластиды
Листья фасоли	43	324	8	17
Листья сахарной свеклы	55	81	4	16
Клубни картофеля «Зарница»	следы	следы	нет	76
Клубни картофеля гибрид 1/14343	»	»	»	72
Листья капусты	130	320	»	53

кислоты локализованы преимущественно в хлоропластах, в листьях фасоли аналогичное положение наблюдается в отношении дегидраз глюкозы, аспарагиновой, яблочной, лимонной и глюконовой кислот.

Таким образом, на основании этих данных можно высказать предположение, что различные ферменты из группы дегидраз обладают неодинаковым сродством к пластидам. В то время как одни дегидразы в результате лабильности адсорбционных связей с липопротеидным комплексом пластид легко десорбируются, другие, наоборот, обладают более прочной адсорбционной связью и поэтому преимущественно локализованы на структурах пластид. Данные по лейкопластам говорят в пользу этого предположения.

При исследовании клубней картофеля нам не удалось обнаружить активную дегидразу в других, кроме пластид, клеточных элементах. В листьях капусты наибольшую активность мы обнаруживаем в лейкопластах и наименьшую в мязге. В соке после удаления пластид нам не удалось обнаружить активной дегидразы глютаминовой кислоты.

Для выяснения причин заметных различий в активности некоторых дегидраз в соке после удаления пластид и в пластидах мы ставили перед собой задачу проверить степень прочности адсорбционной связи дегидраз с липопротеидным комплексом пластид. При этом мы пользовались теми приемами, которые привели к определенным результатам при работе с другими ферментами (7-10). Опыты показали, что в результате автолиза происходит резкое падение активности дегидразы. Ранее Н. Сисакян и Е. Куваева (8) установили такое же влияние автолиза на активность пероксидазы и полифенолоксидазы.

Таким образом, если автолиз обуславливает нарастание каталитической активности гидролитических ферментов, то активность окислительно-восстановительных ферментов пластид под действием автолиза резко подавляется.

Опыты, проведенные с изменением осмотического давления в окружающей среде пластид в растворе, показали, что повышение осмотической концентрации до 2 мол. раствора маннита не привело к заметному сдвигу активности дегидраз пластид.

Как видно на рис. 1, при центрифугировании лейкопластов капусты в 0,87% растворе K_2HPO_4 происходит существенное нарастание дегидразной активности.

Опыты, которые проводились с повторным растиранием с буфером и последующим центрифугированием пластид, с очевидностью показали, что основная масса дегидраз переходит из пластид в раствор при первом же растирании и центрифугировании. Так, активность дегидразы

глутаминовой кислоты в лейкопластах капусты при первом растирании и центрифугировании выражалась в 55 мин., при втором — 720 мин., при третьем, четвертом и пятом растираниях и центрифугировании никакой ферментативной активности не было обнаружено. Данные как центрифугирования, так и повторного растирания и последующего центрифугирования свидетельствуют о том, что в результате лабильности адсорбционных связей

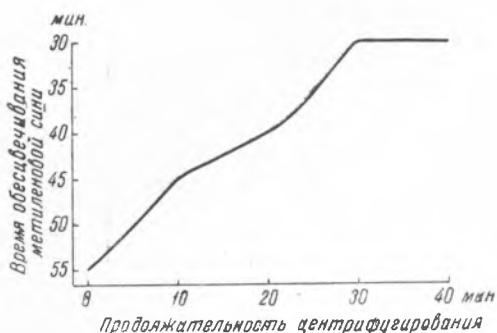


Рис. 1. Влияние центрифугирования на активность дегидразы глутаминовой кислоты в лейкопластах капусты при 1000 об/мин.

дегидраз с липопротеидным комплексом пластид главная масса ферментов переходит в раствор при тщательном растирании в буфере и последующем центрифугировании или настаивании.

Таким образом, в результате наших исследований впервые в растительных тканях обнаружена дегидраза аспарагиновой кислоты. Вместе с тем исследования дегидразной активности в отдельных клеточных элементах показали, что в

хлорофиллоносных тканях одни ферменты из группы дегидраз — дегидразы глутаминовой кислоты, гистидина, гликоколлы и янтарной кислоты наибольшую активность проявляют в соке после удаления пластид, а другие — дегидразы глюкозы, яблочной, лимонной и глюконовой кислот преимущественно локализованы в пластидном веществе.

В нехлорофиллоносных тканях исследованные нами дегидразы наибольшую активность проявили в пластидном веществе, незначительную в мязге, а в соке после удаления пластид дегидразной активности не обнаружено. Следовательно, локализация главной массы дегидраз в пластидном веществе нехлорофиллоносных тканей и менее выраженная активность этих ферментов в пластидах по сравнению с соком после удаления пластид у хлорофиллоносных тканей свидетельствуют о большей лабильности адсорбционных связей дегидраз с липопротеидным комплексом пластид, благодаря чему в цикле развития организма постоянно создается состояние подвижного равновесия между адсорбцией и элюцией ферментов. Сравнительное изучение дегидразной активности в хлоропластах, хромопластах и лейкопластах показало, что наибольшая активность дегидраз обнаруживается в хлоропластах, наименьшая в лейкопластах, а в хромопластах примененными нами методами дегидразного действия обнаружить не удалось.

Нахождение активной дегидразной системы в хлоропластах, повидимому, свидетельствует, помимо их участия в процессах дыхания, также и об участии этих ферментов в темновых реакциях восстановления углекислоты зелеными тканями растений.

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

Поступило
10 V 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Н. Бах, Сборн. избран. трудов, 1937. ² В. Залесский и др., Biochem. Z., 69, 289 (1914); 214, 343 (1929). ³ В. Кретович, Биохимия, 7, в. 5—6 (1942). ⁴ Н. Гельман, Дегидразы созревающего и прорастающего зерна пшеницы, Автореферат, 1949. ⁵ Е. Бойченко, Биохимия, 13, 219 (1948); ДАН, 64, № 4 (1949). ⁶ А. Опарин и А. Курсанов, Biochem. Z., 209, 181 (1929). ⁷ Н. Сисакян и А. Кобякова, Биохимия, 13, 88 (1948). ⁸ Н. Сисакян и Е. Куваева, ДАН, 62, № 1 (1948). ⁹ Н. Сисакян, А. Золковер и В. Бирюзова, ДАН, 60, № 7 (1948). ¹⁰ Н. Сисакян и А. Кобякова, ДАН, 61, № 6 (1948); Биохимия, 14, 86 (1949).