Доклады Академии наук СССР
1955. Том 102, № 3

БИОХИМИЯ

Б. А. РУБИН и Е. Г. САЛЬКОВА

ДЕГИДРАЗЫ ТКАНЕЙ ЯБЛОК

(Представлено академиком А. И. Опариным 10 II 1955)

Дегидразы участвуют в первой фазе дыхательного процесса, осуществляя основной акт в анаэробиотическом расщеплении веществ — отнятие и перенос водорода. О роли дегидраз в дыхании свидетельствует тот факт, что обработка растительных тканей ядами, специфическими для дегидраз, приводит к резкому подавлению дыхания ([1]). В последние годы значительно усилился интерес к этой группе ферментов у высших растений ([2]).

Дегидразы обнаружены у многих видов семян и проростков ряда растений; напротив, сведения о дегидразах тканей сочных плодов до настоящего времени неполны и скудны. Между тем, изучение природы дегидраз и характера их действия в генеративных органах может иметь существенное значение для исследования дыхания этих органов — процесса, которому принадлежит важная роль в явлениях устойчивости плодов к инфекционным и физиологическим заболеваниям.

Неполнота знаний о дегидразах плодов во многом объясняется тем, что определение дегидраз в большинстве случаев производится в вытяжках из растертых тканей. Между тем, у целого ряда объектов дегидразы, повидимому, тесно связаны со структурными элементами клетки, вследствие чего они инактивируются при растирании ткани на воздухе. Как было показано в предыдущей работе ([3]), дегидразы у этих объектов могут быть обнаружены только в тканях с ненарушенной структурой (в тонких срезах), в растертой же ткани активность этих ферментов не поддается измерению. Определение дегидраз в тонких срезах ткани возможно потому, что фермент остается связанным со структурными элементами клетки, и в то же время большая суммарная поверхность срезов обеспечивает свободное взаимодействие ткани с метиленовой синью и донаторами.

Продолжая работы по изучению дегидразной активности тканей яблок, мы провели определения активности отдельных дегидраз у яблок различных сортов — летних, ранне- и позднезимних. Материалы этих исследований приводятся в настоящей статье.

Так как в яблоках содержится ряд веществ, которые могут служить донаторами водорода, срезы ткани необходимо промыть в токе водопроводной воды в течение 10 мин. для удаления этих веществ, выделившихся из клеток при разрезании. Определения активности дегидраз проводились следующим образом. Навеска ткани 0,5 г помещалась в трубку Тунберга, туда же наливался фосфатный буфер pH 8,0. В шарик трубки вносилось 0,5 мл 0,1 *н* раствора донатора и 0,5 мл метиленовой сини. После удаления воздуха (3 мин. на водоструйном насосе) трубки помещались в водяную баню при температуре 37°. Через 10 мин. содержимое шарика приливалось к ткани. Отмечалось время обеспечивания краски. В контрольные трубки донатор не добавлялся. Результаты определений выражались в относительных единицах ($\frac{1}{t} \times 100$).

Часть определений активности дегидраз проводилась по учету поглощения кислорода в приборе Варбурга. Этот метод, являясь более точным, кроме того, позволяет следить за ходом процесса во времени. Определения проводились следующим образом: тонкие срезы мякоти яблок помещались в количестве 0,5 г в основную часть сосудика. К ним добавлялось 3,5 мл фосфатного буфера, pH 8. В средний стаканчик наливалось 0,5 мл 20% KOH, и для увеличения поверхности поглощения вставлялась полоска фильтровальной бумаги. В боковой отросток наливалось 0,5 мл метиленовой сини, которая служит переносчиком водорода на кислород, и 0,5 мл 0,1 *н* раствора донатора водорода. В контрольные сосудики донатор не вносился. Определения активности проводились при 30°. Через 30 мин. после загрузки раствор из бокового отростка переливался в основную часть сосудика. Краны манометров закрывались через 2 мин. после смешивания растворов. Отсчеты производились с интервалом в 15 мин. в течение 1 часа. Результаты выражены в микролитрах O_2 на 1 г сырого веса.

Пользуясь вышеописанной методикой, мы установили присутствие в мякоти яблок дегидраз этилового спирта, яблочной, янтарной, изолимонной кислот и глицерофосфата. Активность алкогольдегидразы и дегидраз яблочной и янтарной кислот определялась периодически при созревании и хранении яблок.

В табл. 1 представлены результаты, полученные при определении активности дегидраз у яблок Антоновка.

Таблица 1

Активность дегидраз в мякоти яблок Антоновка (в μл O_2 на 1 г в час)

Дегидразы	5 VII	22 VII	25 VIII	10 IX	18 X	18 I
Алкогольдегидраза	67,0	82,6	39,7	26,7	25,1	16,1
Дегидраза яблочной кислоты	—	195,2	190,1	74,6	5,4	0
Дегидраза янтарной кислоты	87,0	92,0	102,0	103,8	85,2	73,0

Согласно полученным нами данным, активность различных дегидраз в мякоти яблок Антоновка неодинакова. У зеленых яблок (опыт 22 VII) наиболее активна дегидраза яблочной кислоты, ее активность вдвое выше, чем активность двух других изученных дегидраз. У собранных с дерева яблок наиболее активна дегидраза янтарной кислоты. Так, в опыте 18 X активность этой дегидразы в 17 раз выше, чем дегидразы яблочной кислоты, и более чем в 3 раза выше активности алкогольдегидразы.

Активность всех изучавшихся в мякоти яблок дегидраз снижается по мере созревания. Наиболее отчетливо это видно на примере алкогольдегидразы, активность которой за период с 22 VII по 25 VIII снижается вдвое, а за следующие 15 дней еще на 33%. Изменения активности алкогольдегидразы у хранящихся яблок гораздо менее значительны.

Дегидраза яблочной кислоты наиболее активна у зеленых яблок, но уже в самом начале созревания плодов ее активность быстро уменьшается. За 2 недели (25 VIII—10 IX) активность ее снижается больше чем в 2 раза. Через месяц хранения эта дегидраза почти полностью инактивируется.

Активность дегидразы янтарной кислоты возрастает до сбора плодов с деревьев, у хранящихся яблок активность ее постепенно снижается, уменьшаясь за 4 мес. хранения на 30%.

У разных сортов яблок активность дегидраз и их динамика в онтогенезе плодов весьма различны. На рис. 1 и в табл. 2 представлены результаты определений дегидраз у ряда сортов.

У летнего сорта яблок Грушовка снижение активности дегидраз идет с большей скоростью, чем у раннеспелых яблок Антоновка. У перезревших яблок, оставленных до I X, и у плодов с признаками внутреннего побурения (физиологическое заболевание) дегидразы вообще не обнаруживаются. Не представляется возможным определить дегидразы и у перезревших яблок поздних сортов.

Таблица 2

Активность дегидраз в мякоти яблок Грушовка (в μл O_2 на 1 г в час)

Дегидразы	10 VII	8 VIII	16 IX
Алкогольдегидраза .	77,8	64,2	18,8
Дегидраза яблочной кислоты	74,8	77,3	0
Дегидраза янтарной кислоты	48,4	26,1	20,1

На рис. 1 показаны изменения активности дегидраз у поздних сортов яблок (в качестве примера взяты 2 сорта из 9 изученных). Высокая при закладке плодов на хранение активность дегидраз значительно снижается за первые 4 мес хранения. У полностью созревших плодов (поздних сортов) активность дегидраз находится на очень низком уровне. В апреле, к концу хранения, некоторые дегидразы уже не обнаруживаются. Так, у яблок Джонатан (рис. 1 *А*) инактивируются дегидразы яблочной и янтарной кислоты, у яблок Пепин лондонский (рис. 1 *Б*) — дегидраза яблочной кислоты.

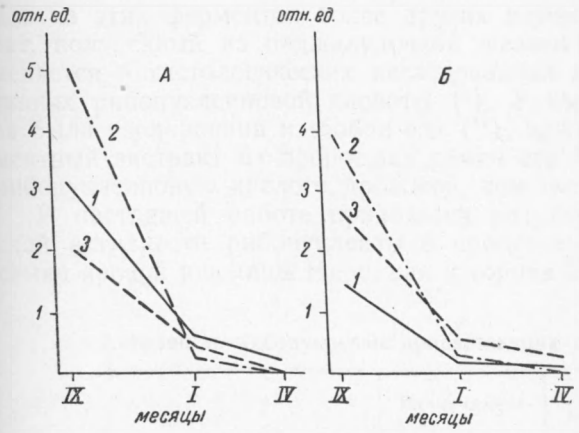


Рис. 1. Активность дегидраз в мякоти яблок. *А* — Джонатан; *Б* — Пепин лондонский. *1* — алкогольдегидраза; *2* — дегидраза яблочной кислоты; *3* — дегидраза янтарной кислоты

Из полученных нами данных видно, что соотношение активности алкогольдегидразы, дегидраз яблочной и янтарной кислот непостоянно. Оно значительно изменяется при развитии и созревании плодов. Это наводит на мысль о том, что в онтогенезе происходит смена различных дегидразных систем, участвующих в дыхательном процессе. Аналогичное явление в достаточной мере изучено для оксидаз ([4], [5]), причем показано, что смена одних окислительных систем другими имеет приспособительное значение. Результаты настоящей работы позволяют предполагать, что и изменения в составе ферментов дегидразного комплекса носят также приспособительный характер. Вопрос этот требует дальнейшего изучения.

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

Поступило
17 II 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] J. Caldwell, I. Meiklejohn, Ann. Bot., 1, 477 (1937). [2] Н. С. Гельман, Усп. совр. биол., 29, 412 (1950). [3] Б. А. Рубин, Е. Г. Гудалина, ДАН, 93, 127 (1953). [4] Е. В. Арциховская, Б. А. Рубин, Усп. совр. биол., 37, 136 (1954). [5] Б. А. Рубин, Е. В. Арциховская, Т. М. Иванова, Сборн. Биохимия плодов и овощей, в. 2, 21 (1951).