

ВЛИЯНИЕ ГУМАТА НАТРИЯ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ГИДРОЛАЗ В ПРОРАСТАЮЩЕМ ЗЕРНЕ ЯЧМЕНЯ

Л. М. СТЕПЧЕНКО, Т. И. СКЛЯР

Протеолитические ферменты и РНК-аза служат моделью для изучения кинетики и специфичности ферментативных реакций, а также взаимосвязи между структурой и функцией белков.

Известно, что физиологически активные вещества природного происхождения, среди которых видное место занимает гуamat натрия, влияют на интенсивность белкового и нуклеинового обмена [1, 2, 4, 7]. Однако вопрос о влиянии гуминовых кислот на мобилизацию запасных белков семян при прорастании еще не изучен.

Учитывая все это, мы поставили перед собой задачу изучить влияние гумата натрия как возможного регулятора активности протеиназы, РНК-азы растений, а также доработать методику определения активности кислой протеиназы в прорастающем зерне ячменя.

Материалы и методы

В экспериментах использовался гуamat натрия, полученный из низинного торфа Замглайского месторождения в концентрации 0,005%. Исследования проводили на ячмене сорта До-нецкий урожая 1974 года. Зерно проращивали в термостате при температуре 27°C в течение 1, 2, 3 суток. Из проросших зерен на холоде выделяли эндосперм и проростки. Экстракты для протеиназы готовились при соотношении материала: дистиллированная вода 1:5; для РНК-азы (0,1 М фосфатный буфер, рН=6,8) 1:10. Экстракцию проводили на холоде в течение 1 часа. Супернатанты, полученные при центрифугировании гомогенатов на ЦЛР-1 при 6000 об/мин. в течение 20 мин., использовали для определения активности соответствующего фермента и белка.

Активность РНК-азы определяли по Филлипсу и Флетчеру [9].

Инкубационную смесь, состоящую из одного миллилитра супернатанта и двух миллилитров 0,15%-ного раствора РНК в 0,1 М фосфатном буфере, рН=6,8, выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 1 часа. Негидролизованная РНК осаждалась при 0°C HClO₄, содержащей 0,75% уранил-ацетата. После центрифугирования (3000 об/мин., 1 час) супер-

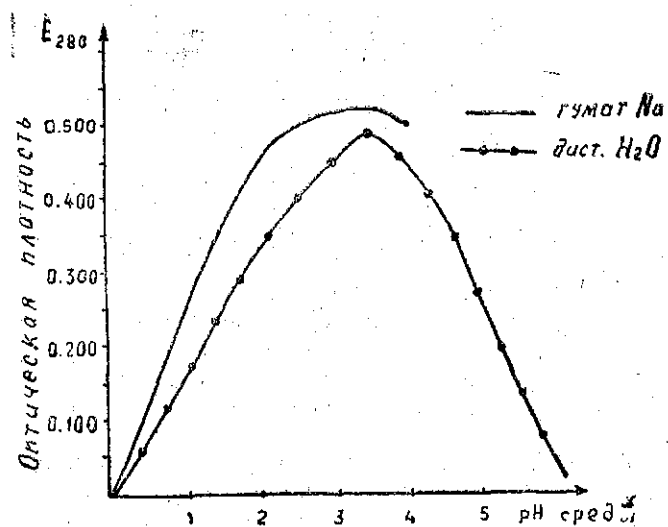


Рис. 1. Зависимость между активностью кислой протеиназы эндосперма ячменя и pH среды инкубации (измерения через 3 суток).

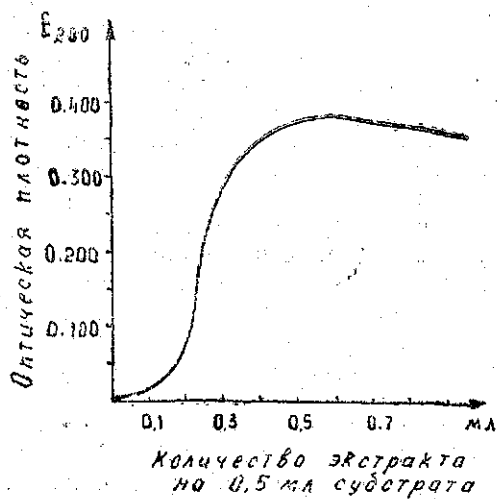


Рис. 2. Кинетика активности кислой протеиназы из эндосперма ячменя.

натант разбавляли (0,5 мл до 13 мл) и промеряли оптическую плотность раствора при 257 нм. Активность фермента выражали в единицах оптической плотности на 1 г сырого веса.

Активность протеиназы определяли модифицированным методом Ансона [8]. Реакционная смесь состояла из 0,5 мл ферментного экстракта, 0,5 мл 2%-ного раствора гемоглобина в ацетатном буфере, рН=3,8, и 0,01%-ного цистеина. Инкубация продолжалась 16 часов при температуре 33°С [3, 5]. ТХУ-растворимые продукты определяли в супернатанте после центрифугирования (3000 об/мин, 1 час) на СФ-16 при 280 нм. Активность выражали в единицах оптической плотности на 1 г сырого веса.

Нами исследовалась активность фермента при различных буферах и значениях рН с добавлением и без добавления цистеина, устанавливалась зависимость активности от способа денатурации субстрата, определялась кинетика работы фермента при различных концентрациях.

Белок определяли методом Лоури после осаждения его из ферментного экстракта 5%-ного ТХУ. После центрифугирования осадок растворяли в 1 мл 3%-ного NaOH. Белок коллориметрировали с помощью реактива Фолина [6] на приборе ФЭК-М при 750 нм. Калибровочную кривую строили по альбумину из сыворотки крови человека („Reanal“, Венгрия).

Результаты и обсуждение

В эксперименте установлено, что максимальная ферментативная активность протеиназы проявляется при рН=3,8, в ацетатном буфере при кислотной денатурации гемоглобина (рис. 1). При определении зависимости между концентрацией фермента и субстрата выявлено, что наибольшая активность проявляется при соотношении ферментативного экстракта и субстрата 1:1 (0,5 мл F + 0,5 мл S), (рис. 2).

Введение в инкубационную смесь цистеина в конечной концентрации 0,01% способствовало увеличению активности фермента примерно на 70%. Следовательно, кислая протеиназа, определяемая нами, — сульфгидрильный фермент.

При исследовании активности кислой протеиназы из эндосперма прорастающего зерна нами выявлено, что через одни и двое суток после высаживания материала активность фермента в эндосперме зерна, прорастающего на воде и на гумате натрия, достоверно не отличалась (табл. 1).

Через трое суток после высаживания материала активность кислой протеиназы и РНК-азы в эндосперме прорастающего зерна на гумате натрия достоверно отличается от контроля.

Таблица 1

Влияние гумата натрия на активность кислой протеиназы и РНК-азы в эндосперме прорастающего ячменя ($M \pm m$). Активность выражена в единицах оптической плотности на 1 г сырой ткани

Сутки	Кислая протеиназа			РНК-аза		
	вода	гумат натрия	P	вода	гумат натрия	P
1	13,2±1,0	11,9±1,0	>0,1	—	—	—
2	27,0±2,6	26,3±2,0	>0,1	—	—	—
3	20,41±2,24	37,30±1,73	<0,02	209,1±10,1	239,7±8,9	<0,05

В трехдневных проростках активность кислой протеиназы составляет: в контроле — $17,9 \pm 3,6$ ОЕ/гтк, в опыте — $10,8 \pm 3,7$ ОЕ/гтк; РНК-азы — $436,1 \pm 14,1$ ОЕ/гтк, $396,8 \pm 14,5$ ОЕ/гтк, т. е. достоверно уменьшается по сравнению с контролем ($P < 0,01$; $P < 0,001$).

Возможное усиление гидролитической активности таких ферментов, как протеиназа и РНК-аза, позволяет думать, что гидролитическое расщепление белка и РНК в эндосперме прорастающего зерна идет с большей скоростью при воздействии гумата натрия. Вероятно, и строительный материал для синтеза белков и РНК образуется с большей скоростью. Под действием гумата натрия стимулируются ростовые синтетические процессы в клетках и тканях растений, о чем свидетельствует более интенсивный рост проростков и снижение активности гидролаз в них. Эта мысль подтверждается данными по содержанию белка в экстрактах из эндосперма прорастающего зерна ячменя (табл. 2).

Таблица 2

Содержание белка в экстрактах из эндосперма ячменя через 3-е суток (мг/мл экстракта)

Способ экстракции			
Вода		0,1 М фосфатный буфер, pH 6,8	
вода	гумат натрия	вода	гумат натрия
0,038	0,046	0,040	0,047

Дело в том, что если бы подвижные формы белка не использовались в процессе синтеза, то их содержание должно бы быть выше и различия между вариантами резче. Однако полученные

цифры достоверно не отличаются по вариантам. Эти вопросы являются предметом дальнейшего исследования.

Выводы

1. Кислая протеиназа из эндосперма прорастающего ячменя проявляет максимум активности при $pH=3,8$.
2. Кислая протеиназа из эндосперма ячменя — сульфгидрильный фермент.
3. Гумат натрия не влияет на активность кислой протеиназы эндосперма ячменя через 1 и 2 суток после высаживания материала.
4. Через трое суток активность кислой протеиназы и РНК-азы эндосперма ячменя достоверно увеличивается под действием гумата натрия в сравнении с контролем.
5. В трехдневных проростках под действием гумата натрия активность гидролаз достоверно снижается.
6. Гумат натрия не влияет на содержание водорастворимого белка в эндосперме ячменя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Христова Л. А. О природе действия физиологически активных форм гуминовых кислот и других стимуляторов роста растений. — В сб.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, ч. III, К., «Урожай», 1968.
2. Христова Л. А. Действие физиологически активных гуминовых кислот на растения при неблагоприятных внешних условиях. — В сб.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, ч. IV, Днепропетровск, 1973.
3. Береш И. Д. Исследования протеолитических ферментов проросшего зерна пшеницы. Автореферат канд. дисс., Москва, 1972.
4. Дынкина Р. Л. О метаболизации физиологически активных веществ в связи с их функцией, внешними условиями и жизнедеятельностью растений. — В сб.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, ч. III, К., «Урожай», 1968.
5. Карпиленко Г. П., Попов М. П. Распределение протеаз ячменя и ячменного солода по аналитическим частям. Изв. Высших учебн. заведений. Пищевая технология, 1973, № 6.
6. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. Москва, «Высшая школа», 1971.
7. Фот Л. В. Влияние гумата натрия и условий азотного питания на белковый метаболизм озимой пшеницы в Степной зоне УССР. — В сб.: Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения, ч. IV, Днепропетровск, 1973.
8. Anson M. L. The purification of cathepsin. *J. Gen. Physiol.*, 1940, 23 695.
9. Phillips D. R., Fletcher R. A. Ribonuclease in leaves of *Phaseolus vulgaris* during maturation and Senescence. *Physiologia plantarum*, v. 22, № 4, p. 764—767, 1969.

Проблемная лаборатория по гуминовым удобрениям
Днепропетровского СХИ.