

Академик Я. В. ЦЕЙВЕ, Н. Н. ИВАНОВА

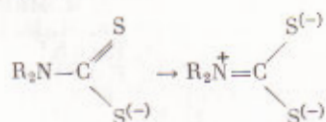
ХИМИЧЕСКОЕ И ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ НИТРАТОВ

Неферментативное восстановление нитратов осуществляется в довольно жестких условиях и требует либо наличия металлов и высокой щелочности, либо высокой температуры. Восстановление нитратов в растениях происходит в физиологических условиях при участии фермента нитратредуктазы. Установлено, что у высших растений нитратредуктаза является индуктивным ферментом с высокой специфичностью к НАД-Н₂ как донатору водорода. Однако механизм действия нитратредуктазы изучен слабо и этот фермент в полностью очищенном или кристаллическом состоянии еще не получен.

Одним из подходов к выяснению механизма действия ферментов может служить построение химических моделей — более простых соединений, осуществляющих реакцию, аналогичную ферментной. Нами было показано, что такой моделью для изучения ферментативного восстановления нитратов в растениях может служить реакция восстановления нитратов до

нитритов смесью двух веществ: диэтилдитиокарбамата $(C_2H_5)_2N-C \begin{matrix} \text{S} \\ \text{SNa} \end{matrix}$

(ДТК-Na) и сульфита Na_2SO_3 ; $Na_2S_2O_5$ в эквимоларных концентрациях. Реакция проводилась в среде фосфатного буфера pH 8,0 (0,05 M) при температуре 27°. В 1 мл инкубационной смеси, содержащей нитраты, внесли по 0,8 μмол. ДТК-Na и сульфита. Характер взаимодействия между ДТК-Na и сульфитом пока не выяснен, однако порознь эти вещества восстанавливающего действия на нитраты не оказывали. Среди многих исследованных карбаматов активными в данной реакции оказались только диметил- и диэтилпроизводные. По-видимому, способность этих карбаматов реагировать с сульфитом и в дальнейшем восстанавливать нитраты можно объяснить образованием структуры ^(3, 4).



Максимальную способность карбаматов к такой электронной перестройке проявляют метильные радикалы, а при замещении их более высокими по гомологическому ряду алкилами эта способность резко снижается. Все наши исследования проводились с диэтилдитиокарбаматом Na, хотя диметилпроизводное было более эффективным. Как показывают данные рис. 1, химическое восстановление нитратов зависит от их концентрации и в сильной степени активируется солями двухвалентного железа. Однако железо не является специфическим катализатором данной реакции, аналогичную роль могут выполнять соли Pt и Pd. Неэффективными оказались ионные формы Mn, Mo, Co. В связи с тем, что восстановление нитратов без металлов осуществляется очень слабо, ферментативная модель должна включать Fe^{2+} 25—50 μг/мл.

При использовании карбамат-сульфитного реагента в качестве донатора водорода нами был выделен из корней бобовых растений белковый препарат, обладающий высокой нитратвосстанавливающей активностью в отсутствие ионного Fe^{2+} . Объектом служили корни 2—3-недельных растений, выращенных на $1/6$ раствора Кнопа. Ход очистки препарата представлен в табл. 1. Для определения ферментативной активности в 1 мл инкубационной смеси (среда — 0,05 мол. фосфатного буфера pH 8) содержалось 40 μ мол. KNO_3 и 0,1—0,4 мл препарата фермента. Реакция начиналась до-

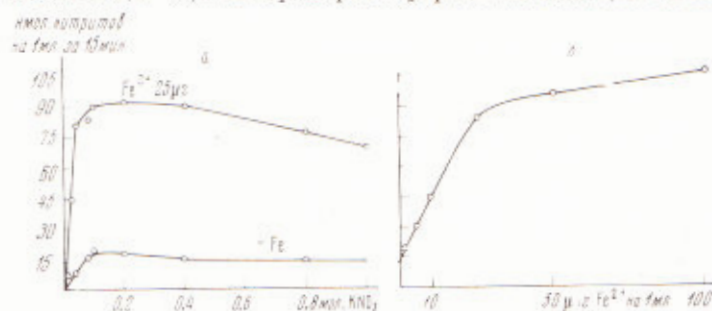


Рис. 1. Зависимость безызматического восстановления нитратов от их концентрации (а) и содержания железа в среде (б)

бавлением кофактора 0,2 мл буферного раствора, содержащего по 0,8 μ мол. ДТК-Na и сульфита. Время инкубации 15 мин., температура 27°. Активность фермента выражалась в понамолях образовавшихся нитритов на 1 мг белка в минуту. Сравнение нитратвосстанавливающих свойств у выделенного белкового препарата с НАД-Н-зависимой нитратредуктазой, выделен-

Таблица 1

Ход очистки нитратвосстанавливающего ферментного препарата

Стадии очистки	Фракция	Объем, мл	Белок, мг/мл	Удельная активность	Кратность очистки
1	Гомогенат в фосфатном буфере pH 8	90	0,8	25,3	—
2	Элюат с фосфатного геля	20	0,41	280	41
3	Сефадекс Г-100	6	0,025	3033	120

ной нами из листьев тех же кормовых бобов (¹), показало (табл. 2), что изучаемый ферментативный препарат из корней не способен использовать ни один из известных для нитратредуктазы донаторов водорода. В то же время НАД-Н-зависимая нитратредуктаза не проявляет активности указанного типа. На рис. 2, 3 дана характеристика некоторых других свойств выделенного препарата. Как видно из этих графиков, нитратвосстанавливающая активность зависит от концентрации донатора (рис. 2). Оптимальной является концентрация $(6 \div 10) \cdot 10^{-4}$ М. K_m для донатора составляла $4,4 \cdot 10^{-4}$ М. Для нитратов (субстрата) $K_m = 4,3 \cdot 10^{-3}$ М. Оптимум pH очищенного препарата в среде фосфатного буфера составлял 7,8—8,4. Активность резко снижалась при pH ниже 7 и выше 10. Как показывают данные рис. 3, зависимость активности фермента от времени инкубации носит линейный характер в течение 15 мин. По сравнению с НАД-Н₂-зависимой нитратредуктазой изучаемый белок относительно термоустойчив. Прогрев гомогената позволяет повышать удельную активность даже в 2—3 раза. Кипячение очищенного препарата в течение 1 мин. приводит к полной потере активности.

Длительный диализ против фосфатного буфера не изменяет активности фермента. Таким образом, высокая нитратвосстанавливающая активность фермента, достигающая до 3500 единиц активности (максимальная активность для НАД-Н-зависимой нитратредуктазы, полученная разными авторами⁽²⁾), доходила до 700—800), не связана с действием ионного Fe^{2+} . Наличие пероксидазной активности у изучаемого фермента дало основание предположить, что высокая нитратвосстанавливающая активность связана с наличием в препарате геминового железа. В табл. 3 приведены сравни-

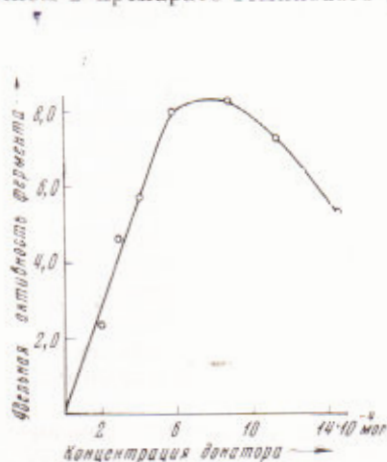


Рис. 2. Восстановление нитратов в зависимости от концентрации донатора водорода

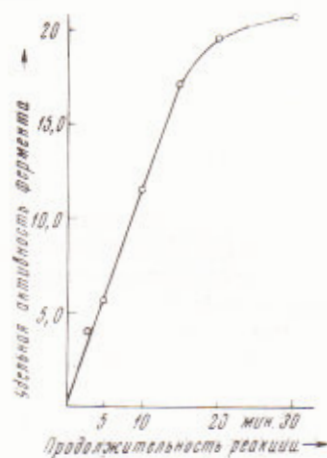


Рис. 3. Влияние продолжительности реакции на активность нитратредуктазы

тельные данные по нитратвосстанавливающей и пероксидазной активности у различных железосодержащих препаратов. Результаты показывают, что нитратвосстанавливающая активность не коррелирует с уровнем содержания железа в препаратах. Она достигает наиболее высокого уровня в препаратах с высокой пероксидазной активностью — в пероксидазе хрена и

Таблица 2

Сравнительные данные об активности двух типов нитратвосстанавливающих ферментов с различными кофакторами (в имол. нитритов на 1 мг белка в минуту)

Кофактор-донатор	НАД-Н-зависимая нитратредуктаза из листьев	Белковый препарат из корней
НАД-Н ₂	65,4	0
НАДФ-Н ₂	0	0
Сукцинат	0	0
ФМН-Н ₂	52,2	0
Метилвиологен восстановленный	65,4	0
ДТК + сульфит	0	2482

изучаемом ферментном препарате из корней кормовых бобов. Таким образом, химическая реакция восстановления нитратов требует наличия высокой концентрации ионного Fe. Активность геминового Fe даже ниже ионного. Но белок, связанный с гемом, вносит специфические особенности и резко повышает эффективность реакции. Обнаружение высокой нитратвосстанавливающей активности у пероксидазы представляет само по себе интересный факт. По-видимому, нитратвосстанавливающая активность не связана с активным центром, осуществляющим пероксидазную реакцию

Пероксидазная и нитратредуктазная активность различных железосодержащих препаратов

Препарат	Пероксидазная активность в условных единицах	Нитратредуктазная активность в $\mu\text{мол. нитритов}$ на 1 мг белков в 1 мин.	K_m (нитраты)	Железо в $\mu\text{г}$ на 1 мг белка
Белковый препарат из корней кормовых бобов	240	3456	$4,3 \cdot 10^{-3} M$	—
Пероксидаза хрена (диофиллизированный препарат)	300	1504	$2 \cdot 10^{-2} M$	1,3
Гемоглобин из клубеньков люпина***	16,2	263	—	1,5
Цитохром С (кристаллический)	1,5	9,5	—	3,4
Препарат белка, содержащий негеминное Fe из клубеньков люпина***	1,4	0	—	3,7
Гемин кристаллический Fe^{2+} 25 $\mu\text{г}$	3,2* 9,2**	70,5* 192**	— —	86 25

* На 1 мг препарата.

** На 1 мг Fe^{2+} .

*** Препараты получены в нашей лаборатории Г. Я. Жваневской и Л. И. Бороденко.

Это подтверждают наши опыты с ингибиторами: 5-сульфо-8-тиооксин ($10^{-4} M$) полностью ингибирует нитратвосстанавливающую активность при сохранении 60—65% пероксидазной активности. Карбамат-сульфитная смесь, в условиях проведения нитратвосстанавливающей реакции ингибирует на 62—64% активность пероксидазы. При использовании исследуемого донатора водорода нитратвосстанавливающая активность была обнаружена в гомогенатах из многих растений, произрастающих в условиях, когда не образуется НАД-Н-зависимая нитратредуктаза.

Можно предположить существование в растениях конститутивной нитратредуктазы, возможно «пероксидазного» типа, роль неидентифицированного природного донатора водорода которой может выполнять предложенная карбамат-сульфитная смесь.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
17 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Я. В. Пейве, Н. П. Иванова и др., Тр. Всесоюз. совещ. по микроэлементам, Иркутск, 1966, 1968. ² L. Beever, R. Hageman, Ann. Rev. Plant Physiol., 20 (1969). ³ G. D. Thorn, R. Ludwig, The Dithiocarbamates and Related Compounds, 1962. ⁴ Van der Herk, Van Raalte et al., Nature, 176, № 4476, 308 (1955).