

А. Н. ПЕТРОВА, И. Е. ЧЕРМЕНСКАЯ,  
член-корреспондент АН СССР В. Я. КРЕТОВИЧ

## ИССЛЕДОВАНИЕ САХАРОВ И НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА *RHIZOBIUM LUPINI* В СИМБИОЗЕ

Ранее показано (<sup>1</sup>), что в бактериоидах клубеньков люпина желтого, выращенного в полевых условиях, содержатся ферменты, расщепляющие гликоген: фосфорилаза, амилаза и мальтаза, обладающая трансферирующим действием. Кроме того установлено (<sup>2</sup>), что в бактериоидах клубеньков люпина содержится гликоген, количество которого значительно ниже у растений, инокулированных эффективным штаммом *Rhizobium lupini*. Представлялось важным исследовать сахара и некоторые ферменты углеводного обмена в бактериоидах клубеньков люпина, инокулированного эффективным (359а) и неэффективным (400) штаммами *Rhizobium lupini*.

Люпин желтый выращивали в стерильном песке с добавлением смеси Прянишникова с уменьшенной в 30 раз стартовой дозой азота. Бактериоды выделяли по методу (<sup>3</sup>), суспендировали 1:3 в 0,05 М трис-НСl буфере рН 7,2 и разрушали при охлаждении на ультразвуковом дезинтеграторе MSE (20 килоциклов в 1 сек.) в течение 4 мин. и затем центрифугировали при 12 000 g в течение 20 мин. дважды. В недифференцированных фракциях бактериодов определяли свободные редуцирующие сахара, суммарное действие гидролитических и фосфоролитических ферментов на молекулу крахмала и активность гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Диализ проводили против 0,05 М трис-НСl буфера рН 7,0 в течение 18–20 час. В диализованных фракциях изучали действие ферментов: амилазы, мальтазы и фосфорилазы.

Свободные редуцирующие сахара определяли методом нисходящей хроматографии на бумаге Niederschlag FN-1, используя в качестве растворителя смесь бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5), а в качестве проявителя — кислый фталат анилина. Суммарное действие гидролитических и фосфоролитических ферментов на молекулу крахмала определяли по иодной реакции, где за 100% принимали исходную окраску полисахарида с иодом и по отношению к ней рассчитывали процент понижения оптической плотности через 30 мин. инкубации. Активность гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы находили спектрофотометрически (<sup>4</sup>, <sup>5</sup>). Об активности амилазы судили по нарастанию редуцирующих веществ, которые определяли через 3 часа по методу Хагедорн — Йенсена (<sup>1</sup>). Действие мальтазы изучали в 7% растворе мальтозы методом хроматографии на бумаге. Активность фосфорилазы определяли по методу (<sup>6</sup>), неорганический фосфор — по методу Фиске — Суббароу в модификации Ломанна и Йендрассика (<sup>7</sup>). За единицу активности принимали то количество фермента, которое способно освободить 1 мкмоль фосфата при данных условиях реакции за 10 мин.

В бактериоидах клубеньков люпина желтого содержится глюкоза и фруктоза. Оказалось, что содержание свободных сахаров в бактериоидах клубеньков люпина, инокулированного эффективным штаммом *Rhizobium lupini*, ниже, чем в бактериоидах клубеньков люпина, инокулированного неэффективным штаммом. Таким образом, наряду с резким уменьшением содержания гликогена (<sup>2</sup>) в «эффективных» бактериоидах наблюдается резкое снижение содержания свободных сахаров. При исследовании активности

ферментов выявилось, что бактериоды клубеньков растений, инокулированных эффективным штаммом, обладают значительно более сильным расщепляющим действием.

Так, экстинкция подкрахмальных комплексов бактериодов растений эффективных штаммов понизилась на 70%, тогда как в бактериодах растений неэффективных штаммов понижение экстинкции составляет лишь 17%. Дальнейшие опыты показали, что более высокая степень деградации молекулы крахмала под действием гидролитических и фосфоролитических ферментов обусловлена более высокой активностью амилазы, мальтазы и фосфорилазы в «эффективных» бактериодах. Так, в бактериодах растений эффективных штаммов действие  $\alpha$ -амилазы было в 4,5 раза, а фосфорилазы в 7 раз выше, чем в бактериодах растений неэффективных. Таким образом, снижение содержания гликогена в бактериодах клубеньков растений, инокулированных эффективным штаммом, связано с усилением процессов его расщепления.

Наши опыты также показали, что повышена активность гликолитических ферментов: гексокиназы в растительной ткани клубенька и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в бактериодах клубеньков растений, инокулированных эффективным штаммом. Повышенной активностью этих ферментов можно объяснить тот факт, что несмотря на интенсивное расщепление гликогена в бактериодах, выделенных из растений, инокулированных эффективным штаммом, в них не происходит накопления сахаров, а, наоборот, количество их резко понижено. Это происходит вследствие усиления утилизации сахаров, результатом которого является синтез АТФ, необходимой для процесса фиксации молекулярного азота атмосферы.

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

Поступило  
18 III 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> И. Е. Черменская, А. Н. Петрова, Прикладная биохимия и микробиология, т. 10, № 2, (1974). <sup>2</sup> И. Е. Черменская, А. Н. Петрова, В. Л. Крегович, ДАН, т. 215, № 2, (1974). <sup>3</sup> F. J. Bergersen, Proc. Roy. Soc., v. 174, 401 (1969). <sup>4</sup> Methods in Enzymology, v. 5, 226 (1962). <sup>5</sup> Methods in Enzymology, v. 1, 323 (1955). <sup>6</sup> А. Н. Петрова, Т. Т. Володина, ДАН, т. 84, 1205 (1952). <sup>7</sup> В. В. Умбрейт, Р. Х. Буррис, Д. Ф. Шгауффер, Манометрические методы изучения тканевого обмена, ИЛ, 1951.