

УДК: 577.112:581.134

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА И ТРАНСАМИНИРОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН СОИ (*GLICINE MAX L.*)

Е.Ф.Бездудная, П.А.Калиман

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

Изучали динамику содержания белка легкорастворимой фракции и активность аланин- и аспартаттрансаминазы у сои в процессе прорастания семян. Показано снижение содержания легкорастворимых белков в семядолях сои уже через сутки после замачивания. Аланин- и аспартатаминотрансферазные активности значительно повышаются в семядолях на третьи сутки проращивания, а на пятые сутки возвращаются к исходному уровню. Содержание белка в проростках практически не изменяется. Установлена высокая активность аланин- и аспартатаминотрансфераз в проростках. Обсуждается роль мобилизации запасных белков семян и их дальнейшей утилизации в реакциях переаминирования при прорастании семян.

Ключевые слова: *прорастание семян сои, проростки, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, водорастворимые белки.*

Введение

Прорастание семян растений сопровождается активацией протеаз, содержащихся в сухих семенах в комплексе с запасными белками. Этот процесс сопровождается мобилизацией белка (Muntz et al., 2001). Высвободившиеся в результате протеолиза аминокислоты утилизируются как в энергетическом, так и в пластическом обмене. При этом синтезируются многочисленные белки, в том числе ферменты, необходимые для прорастания и формирования проростка. Синтез новых белков требует постоянного пополнения фонда свободных аминокислот. Ключевыми субстратами для синтеза всех протеиногенных аминокислот в прорастающих семенах являются пируват, оксалоацетат, α -оксoglутарат и NH_4^+ (Гудвин, Мерсер, 1986; Lancien et al., 2000). Перечисленные кетокислоты образуются в обратимых реакциях, катализируемых аминотрансферазами. Активность фермента и направление реакции зависит от скорости утилизации образующихся продуктов (Кретович, 1986). Продукты реакций трансаминирования могут использоваться в нескольких метаболических путях. Среди них: синтез белков, новообразование аминокислот путем аминирования кетокислот (Гудвин, Мерсер, 1986), накопление глутамина и аспарагина (Lancien et al., 2000), окисление в цикле трикарбоновых кислот с образованием АТФ и восстановительных эквивалентов, в реакциях глюконеогенеза и др. Учитывая приведенное выше, направление трансаминазных реакций в условиях прорастания семян протекает преимущественно в сторону образования кетокислот, которые обеспечивают синтез глюкозы, необходимой для формирования и роста проростка, и энергообеспечение синтетических процессов.

Однако активность аминотрансфераз и изменение содержания белка в семенах при прорастании сои практически не изучены. Очень мало сведений об источниках аммиака, необходимого в реакциях аминирования кетокислот в процессе новообразования аминокислот.

Целью настоящей работы было изучить содержание белка и активность аланин- и аспартатаминотрансферазы у сои в процессе прорастания.

Материалы и методы

В опытах использовали семена сои сорта Clark. Их проращивали в чашках Петри при $23 \pm 2^\circ\text{C}$ (Жмурко, Джамеєв, 2001) на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой. Для анализа брали сухие семена, неповрежденные семядоли через сутки, трое и пять суток и проростки через трое и пять суток проращивания. Через сутки после замачивания семян появления проростков практически не отмечено.

Фракцию растворимых белков из сухих семян, семядолей и проростков (осевые органы без семядолей) экстрагировали трис-глициновым буфером (0,01 М, pH 7,8) (Методы ..., 1978).

Содержание белка определяли методом Лоури в модификации Миллера (Miller, 1959) и выражали в мг/г ткани. Экстракты использовали и для определения ферментативной активности.

Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) (КФ 2.6.1.2) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) (КФ 2.6.1.2) определяли по накоплению пирувата или оксалоацетата соответственно (Методы ..., 1978). Калибровочную кривую строили с использованием стандартных растворов пирувата или оксалоацетата и активность ферментов выражали в мкмольях аланина или аспартата, превращенных 1 мг белка за 1 час инкубирования.

Учитывая, что аспаратаминотрансфераза локализована преимущественно в митохондриях, при определении активности этого фермента образцы предварительно подвергали повторному замораживанию–оттаиванию. Все операции по выделению белка выполняли при 0–4°C.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ "Statistica 6.0".

Результаты и обсуждение

Как видно из данных табл. 1, содержание белка в семядолях через сутки проращивания значительно меньше, чем в сухих семенах, и постепенно уменьшается в процессе прорастания.

Это свидетельствует об активации протеаз при замачивании семян, что согласуется с данными о мобилизации белков, запасенных в семенах, и их последующей утилизации в процессе прорастания (Muntz et al., 2001).

Таблица 1.
Динамика изменения содержания белка у сои при прорастании семян (мг/г ткани)

Время прорастания семян, сутки	Содержание белка	
	Семядоли	Проросток
Сухие семена до прорастания	215,0 ± 8,4*	–
Первые	192,26 ± 6,84	–
Третьи	151,08 ± 13,73**	48,18 ± 2,89
Пятые	132,12 ± 10,01**	51,84 ± 8,28

**) мг/г сухой ткани, в остальных случаях – мг/г сырой ткани;*

****) различия достоверные ($P \leq 0,05$) по отношению к содержанию в первые сутки.*

Содержание белка в проростках практически остается на одном уровне (табл. 1). Поскольку проросток представляет собой активно формирующиеся осевые органы (зачаточную почку и листики, первичный корешок, который в последующем образует первичный корень), можно предположить, что содержащиеся в нем белки не подвергаются катаболизму, а функционируют как ферменты, необходимые для формирования элементов анатомической и морфологической структуры и обеспечивающие синтетические процессы в развивающихся проростках. В литературе имеются данные, что на содержание белка в проростках сои влияет сорт и температурные условия проращивания (Жмурко, Джамеев, 1999). Поскольку мы проводили наши исследования при постоянной температуре, содержание белка в проростках не изменялось в процессе прорастания.

Аланинаминотрансферазная активность значительно повышается в семядолях на третьи сутки проращивания по сравнению с первыми, а через пять суток резко снижается, причем ее активность в это время почти в три раза ниже, чем через сутки (табл. 2). В это время, т.е. на пятые сутки, резко возрастает активность АЛТ в проростках. Интересно отметить, что на пятые сутки активность АЛТ в проростках повышается в три раза, по сравнению с третьими. Поскольку длина проростка значительно увеличивается между третьими и пятыми сутками, можно считать, что аланинаминотрансферазная активность обеспечивает в это время включение пирувата в реакции глюконеогенеза и образование углеводного компонента, обеспечивающего рост проростка.

Аспаратаминотрансферазная активность в семядолях на третьи сутки также значительно повышается по сравнению с первыми, а на пятые возвращается к величинам, характерным для первых суток (табл. 2). АСТ в растениях обеспечивает накопление 2-оксоглутарата, который занимает центральное место в новообразовании аминокислот (Lancien et al., 2000).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что новообразование аминокислот из кетокислот и синтез новых белков в семядолях на третьи сутки повышается, а затем резко снижается. Снижение активности аминотрансфераз в семядолях на пятые сутки, по-видимому, связано с тем, что они в это время атрофируются.

В растениях наиболее активно протекают реакции переаминирования между глутаминовой кислотой и щавелевоуксусной, а также аланином и α -оксоглутаровой кислотой. При этом накапливаются пируват, оксалоацетат и α -оксоглутарат, используемые при синтезе аминокислот и в реакциях глюконеогенеза (Гудвин, Мерсер, 1986).

Таблица 2.

Динамика активности аминотрансфераз у сои в процессе прорастания семян (в мкмоль превращенного субстрата на 1 мг белка за 1 час)

Время прорастания, сутки	Аланинаминотрансфераза		Аспартатаминотрансфераза	
	Семядоли	Проростки	Семядоли	Проростки
Первые	3,55 ± 0,21	–	1,76 ± 0,42	–
Третьи	5,34 ± 0,23*	4,32 ± 0,35	5,71 ± 0,56*	8,3 ± 0,61
Пятые	1,01 ± 0,07*	12,66 ± 1,4**	1,69 ± 0,17	9,0 ± 0,58

*) различия достоверны ($P \leq 0,05$) по сравнению с первыми сутками;

**) различия достоверны ($P \leq 0,05$) по сравнению с третьими сутками.

Глутамат и аспарат в реакциях трансамидирования образуют глутамин и аспарагин соответственно. Последние гидролизуются глутаминазой и аспарагиназой с образованием аммиака, который является донором аминогрупп при новообразовании аминокислот. У растений аминирование кетокислот происходит только с использованием аммиака. У бобовых растений аминирование кетокислот и образование глутамина происходит за счет нитратов, поступающих из почвы, или восстановления молекулярного азота клубеньковыми бактериями в реакции, катализируемой нитрогеназным комплексом (Кретович, 1986).

В семенах сои на исследуемых нами этапах прорастания нет соответствующих систем восстановления молекулярного азота, а также отсутствует нитрогеназа, способная утилизировать атмосферный азот. Поэтому единственными донорами аммиака могут служить аспарагин и глутамин, которые высвобождают NH_4^+ в аспарагиназной и глутаминазной реакциях.

В реакциях аминирования аминокислот используются восстановительные эквиваленты (НАДН или НАДФН). Последние образуются главным образом в цикле трикарбоновых кислот. Субстратами ЦТК в наших условиях могут быть кетокислоты, образованные в реакциях трансаминирования. Поэтому повышение активности последних также свидетельствует об активации энергетического обмена.

Содержание белка в семядолях снижается от первых до пятых суток прорастания в связи с их использованием в энергетическом и пластическом обмене. Включение аминокислот в энергетический и пластический обмен осуществляется в результате активации аланин- и аспартатаминотрансфераз в различные сроки прорастания. Активация обеих аминотрансфераз в семядолях наиболее существенна на третьи сутки прорастания. В проростках активность АЛТ достигает наиболее высоких значений на пятые сутки, что, возможно, связано с участием пирувата в реакциях глюконеогенеза и синтезом глюкозы. Высокую активность АСТ в проростках на третьи и пятые сутки можно объяснить интенсификацией новообразования аминокислот, необходимых для синтеза белков-ферментов, обеспечивающих синтетические процессы, необходимые для укоренения проростка.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что на ранних этапах прорастания семян сои происходит мобилизация запасных белков и изменения активности аланин- и аспартаттрансаминаз в семядолях и проростках, что обеспечивает рост и последующее укоренение проростка.

Список литературы

- Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2-х т. – Т.2. – М.: Мир, 1986. – 393с.
- Жмурко В.В., Джамеев В.Ю. Дегидрогеназная активность и содержание растворимого белка в корнях проростков сои (*Glycine max* L.) при оптимальной и пониженной температурах // Физиология и биохимия культурных растений. – 1999. – Т.31, №4. – С. 308–313.
- Жмурко В.В., Джамеев В.Ю. Ріст, розвиток та фізіолого-біохімічні процеси у теплолюбивих культур при адаптації до пониженої температури // Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть. – 2001. – Т.2. – С. 182–189.
- Кретович В.Л. Биохимия растений. – М.: Высшая школа, 1986. – 503с.
- Методы биохимического анализа растений / Под ред. В.В.Полевого и Г.Б.Максимова. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1978. – 192с.
- Lancien M., Gadal P., Hodges M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonia assimilation // Plant Physiol. – 2000. – Vol.123. – P. 817–824.

Miller G.L. Protein determination for large number of samples // Anal. Chem. – 1959. – Vol.31, №5. – P. 964–966.

Muntz K., Belozersky M.A., Dunaevsky Y.E. et al. Stored proteinases and the initiation of protein mobilization in seeds during germ and seedling growth // J. of Experiment. Botany. – 2001. – Vol.52, №362. – P. 1741–1752.

ЗМІНА ВМІСТУ БІЛКА ТА ТРАНСАМІНУВАННЯ АМІНОКИСЛОТ ПРИ ПРОРОСТАННІ НАСІННЯ СОЇ (*GLICINE MAX L.*)

О.Ф.Бездудна, П.А.Каліман

Вивчено вміст білка в легкорозчинній фракції сухого насіння, сім'ядолей та паростків сої через добу, три доби та п'ять діб пророщування. Одночасно досліджено активність аланін- і аспартатамінотрансфераз за тих самих умов. Показано зниження вмісту легкорозчинних білків в насінні сої вже через добу після замочування. Аланін- та аспартатамінотрансферазні активності значно підвищуються в сім'ядолях на третю добу пророщування з поверненням до вихідного рівня на п'яту. Вміст білка в паростках практично не змінюється. Встановлена висока активність аланін- і аспартатамінотрансфераз в паростках. Обговорюється роль мобілізації запасних білків та їх подальше використання в реакціях переамінування в умовах проростання.

Ключові слова: *проростання насіння сої, паростки, аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза, водорозчинні білки.*

CHANGE OF PROTEINS CONTENT AND TRANSAMINATION OF AMINOACIDS DURING SOYBEAN GERMINATION (*GLICINE MAX L.*)

O.F.Bezdudna, P.A.Kaliman

The content of protein of water-soluble fraction in soybean seeds and seedlings after one day, three days and five days of germination was studied. Also we investigated the alanin- and aspartataminotransferases activity in these conditions. Decrease of water-soluble proteins content in soybean seeds after one day of germination was shown. Activity of alanin- and aspartataminotransferases considerably increased in seeds after three days of germination, but after five days they returned to initial level. Protein content in seedlings was unaltered. The high activity of alanin- and aspartataminotransferases in seedlings was established. The role of mobilization of store seed proteins and their role in the transamination of aminoacids during germination are discussed.

Key words: *germination of soybean seeds, seedlings, alaninaminotransferase, aspartataminotransferase, water-soluble proteins.*

Представлено В.І.Жуковим

Рекомендовано до друку В.В.Жмурком