

МІНІСТЕРСТВО СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
І ПРОДОВОЛЬСТВА УКРАЇНИ
ПОЛТАВСЬКИЙ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИЙ ІНСТИТУТ

НАУКОВІ ПРАЦІ

ТОМ 17

ПРОДУКТИВНІСТЬ І ЯКІСТЬ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ
ПРОДУКЦІЇ



SCIENTIFIC ARTICLES

VOLUME 17

PRODUCTIVITY AND QUALITY
OF AGRICULTURAL
PRODUCE

Полтава—1995

Зібрання наукових праць на честь 75 - річчя з дня заснування
Полтавського сільськогосподарського інституту. Видається за
рішенням Вченої ради інституту від 19-го вересня 1995 року.

Редакційна колегія:

КУЦЕНКО О.М., професор, ректор;

*ЖЕМЕЛА Г.П., академік АН ВШ України, проректор (від-
повідальний редактор);*

НАГАЄВИЧ В.М., доцент, проректор;

*ЛАПЕНКО Г.О., доцент, декан факультету механізації
сільського господарства;*

ПЕСТОВ І.І., доцент, декан агрономічного факультету;

ПІПКО О.С., доцент, декан заочного факультету;

САМЧУК М.А., доцент, декан економічного факультету;

*ТЕНДІТНИК В.С., доцент, декан факультету ветеринарної
медицини;*

ГОЛУБ Н.Д., доцент, начальник НДС;

ОПРЯ А.Т., доцент, завідувач кафедри;

*САМОРОДОВ В.М., старший викладач (відповідальний
секретар).*

ПОСПЕЛОВ С.В., кандидат сільськогосподарських наук, доктор філософії з сільського господарства, асистент кафедри загального землеробства

ВИДІЛЕННЯ І ОЦІНКА АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНІВ ҐРУНТУ

Лектини - це білки, які мають властивості зворотно та вибірково пов'язувати вуглеводи, не викликаючи при цьому їх хімічного перетворення. Вони взаємодіють з вільними моно- та олігосахаридами, а також з рештками вуглеводів у складі глікопротеїдів, полісахаридів та гліколіпідів. В найбільш простій формі ця взаємодія відбувається у вигляді реакції аглютинації частинок та клітин, наприклад, еритроцитів.

Розвиток учення про лектини почався більш, ніж 100 років тому. За цей час вони були знайдені майже на всіх рівнях організації органічного світу. Це свідчить про їх значну біологічну роль, яка на жаль, ще

остаточно не досліджена.

Разом з цим у літературі ми не змогли знайти яких - небудь посилань на наявність лектинів у ґрунті. Саме тому наші дослідження, проведені на протязі 1989 - 1993 рр., присвячені питанням виділення, ідентифікації та оцінки активності лектинів ґрунту. Об'єктом досліджень був чорнозем звичайний середньогумусний, зразки якого відбиралися на стаціонарній Полтавській обласній сільськогосподарській дослідній станції ім. М.І. Вавилова.

Для добування вивчаємих сполук із ґрунту, в першу чергу, були використані методики, які застосовуються для екстракції лектинів із рослинного матеріалу.

ґрунтові зразки у співвідношенні 1:10 на протязі 2-х годин екстрагували дистильованою водою, підкисленою водою (рН = 4,0) та 0,9% NaCl. Після цього ґрунтову суміш фільтрували і отриманий розчин оцінювали по активності реакції гемаглютинації у балах. Результати свідчать, що лектини, якщо і знаходяться у ґрунті, то, головним чином, у зв'язаному стані, і тому не добуваються традиційними методами (табл.1).

З метою більш ефективного добування були використані буферні розчини: фосфатно - буферна суміш (мінеральний буфер) та фосфатно - цитратний буфер (органо - мінеральна суміш). Термін експозиції був різним (табл.2), у відповідності до рекомендацій Бойд В. та Рекурер Р.(1949). З метою більшої об'єктивності буфери готувалися з трьома різними значеннями рН, які найбільш часто використовуються для визначення лектинів. Після інкубації суміш фільтрували і екстракт оцінювали на вміст лектинів.

Таблиця 1.

ГЕМАГЛЮТИНУЮЧА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТИВ ҐРУНТУ
(в умов. один.)

Варіанти дослідів	Дистильована вода	Підкислена вода	Фізіологічний розчин
Рілля	0	0	0.5
Переліг	0.5	0	1

При цьому виявилось, що витяжки мали здібність аглютинувати еритроцити людини у всіх вивчаємих варіантах (табл.2). Проте ефективність виділення орґано - мінеральним буфером була більш високою, що дало підставу в подальшому використовувати для цього саме цей буфер. Можливість використання фосфатно - цитратного

буфера доповнюється також і тим, що виділення аглютининів іде по всьому діапазону рН буфера - від 4,2 до 8,0.

Таблиця 2.

ГЕМАГЛЮТИНУЮЧА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТИВ ПРИБИДИЛЕННІ БУФЕРНИМИ СУМІШАМИ (в умов. один.)

Буфери	Варіанти	рН	Термін експозиції		
			2 год. при 20 гр. С	на протязі ночі при 4 гр. С	2 год. при 37 гр. С+віч при 4 гр. С
Фосфатна буферна суміш	Рілля	6	5	6.5	10
		6.8	4	7	8
		7.4	4.5	5.5	10
	Переліг	6	4	15.5	13.5
		6.8	4.5	6	10
		7.4	5.5	7.5	9.5
Фосфатно-цитратна буферна суміш	Рілля	6	4	20	22
		6.8	3	16	13.5
		7.4	5.5	11	12
	Переліг	6	4	16.5	17
		6.8	3.5	10.5	9
		7.4	4	8	11.5

Порівнюючи ефективність виділення даним буфером із екстракцією традиційним методом (фізіологічний розчин), слід вказати на високу статистичну вірогідність запропонованого методу (табл.3). Його визнано винаходом і захищено авторським свідоцтвом (Поспелов С.В., Голінська Е.Л., Самородов В.М. Спосіб виділення лектинів із ґрунту. А.с. 1663540 СРСР МКВ G-01№33/24).

Таблиця 3.

СТАТИСТИЧНА ВІРОГІДНІСТЬ ЕФЕКТИВНОСТІ ЕКСТРАГУВАННЯ АГЛЮТИНИНІВ ФОСФАТНО - ЦИТРАТНИМ БУФЕРОМ

Місце відбору зразків	Відносна гемаглютинуюча активність лектинів(в умов. один.) при екстракції		t факт	t 0.01
	Фізіологічним розчином	Фосфатно-цитратним буфером		
Переліг	3.5	8.5	17.24	9.93
Ліс	0.5	6	18.96	9.93
Рілля	2	8	12	9.93

Для того, щоб довести білкове походження сполук, екстракт витримували у термостаті при 105 градусах по Цельсію терміном у 3 години. Проведена після цього оцінка показала зниження гемаглютинуючої активності на 14 - 59% у порівнянні з контролем.

• Інкубація екстракту з протеолітичним ферментом проназою також викликала зниження аглютинуючої здібності витяжки на 19,55%.

Ці дослідні переконливо доказують білкову природу сполук, які визивають аглютинацію еритроцитів.

Слідуючим етапом вивчення білкових сполук ґрунту було виділення їх із екстрактів конвенційними методами. Для цього було використано спосіб двоступеневого низькотемпературного етанольного фракціонування. Він поєднував слідуючі етапи. Охолоджений до 4 градусів по Цельсію екстракт із ґрунту підкислювали до рН = 4,0 5н. HCl і насичували холодним етанолом до 20%-ої кінцевої концентрації по об'єму. Після 2-годинного витримування при + 4 градуси по Цельсію в осадок випадали компоненти екстракту темного кольору, що більш імовірно свідчить про флокуляцію гумінових кислот. Після центрифугування осадок розчиняли у буфері і використовували для подальшого аналізу (Фракція А).

Надосадочну рідину підлужували 5н. NaOH до рН = 5,5 - 5,8 та насичували охолодженим етанолом (- 2 градуси по Цельсію) до 76%-ої концентрації по об'єму. Після 2-х - 3-х годин витримування при 4 градусах по Цельсію утворювався білий аморфний осадок, який відокремлювався центрифугуванням, розчинявся у аліквоті буферу аналізувався (Фракція Б).

Обидві фракції перевіряли на активність аглютинації із еритроцитами усіх 4-х груп крові людини в системі АВО. При цьому встановлено, що фракція А проявила високу активність у всіх випадках. На наш погляд це пояснюється тим, що після першого етапу фракціонування у осадок випали гумінові кислоти, баластні білки та інші речовини, які викликали реакцію неспецифічної аглютинації. Проте фракція Б викликала значну аглютинацію тільки еритроцитів А/П/ групи крові. Активність реакції при цьому перевищувала інші групи більш, як в 4 рази.

Відомо, що лектини мають властивість змінювати свою активність в залежності від рН середовища. Саме тому була проведена оцінка рН -активності лектинів ґрунту. Для цього наважки ґрунту заливали фосфатно-цитратним буфером з рН від 4,2 до 8,0 у співвідношення 1:10. Після інкубації при температурі 37 градусів по Цельсію на протязі 15 годин та фільтрації екстракт оцінювали в тест - системі з еритроцитами людини.

Отримані дані (табл.4) ілюструють мінливість активності в залежності від реакції середовища. Аналіз свідчить, що найбільш суттєві відмінності по-

активності лектинів в залежності від культури добре співпадають з діапазоном рН, у середині якого знаходяться значення актуальної та обмінної кислотності ґрунту. Певно, ці дуже важливі ґрунтові показники у значній мірі визначають активність лектинів ґрунту.

Таблиця 4.

ГЕМАГЛЮТИНУЮЧА АКТИВНІСТЬ ҐРУНТОВИХ ВИТЯЖОК
В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД УМОВ ЕКСТРАЦІЇ

рН екстрагента	Цукровий буряк	Озима пшениця	рН екстрагента	Цукровий буряк	Озима пшениця
4,6	12,5	10,0	6,4	5,5	8,5
4,8	10,0	9,5	6,6	5,5	5,0
5,0	9,0	9,0	6,8	6,5	7,5
5,2	8,0	8,0	7,0	6,5	4,5
5,4	7,5	7,0	7,2	2,0	4,5
5,6	8,0	8,5	7,4	2,0	2,0
5,8	8,0	8,5	7,6	0,0	1,5
6,0	8,5	8,5	7,8	0,0	0,5
6,2	8,5	8,5			

Це дає нам змогу думати, що методично найбільш вірно при визначенні гемаглютинуючої активності ґрунту ураховувати реакцію ґрунтового розчину і виділення лектинів проводити буфером з відповідною реакцією середовища. Цим забезпечиться отримання показників незалежно від типу ґрунту, часу відбору та культури. Цей метод захищений нами авторським свідоцтвом (Поспелов С.В., Муха В.Д., Голинська Е.Л., Самородов В.М. Спосіб визначення активності лектинів у ґрунті. А.С.1707530 МКВ G-01№33/24).

Проведенні дослідження дають змогу зробити висновок, що у ґрунті поряд з багатьма сполуками присутні білкові речовини - лектини. Розроблено методики виділення та визначення їх активності. Той факт, що лектини існують у ґрунті у нативному стані дає змогу припустити їх певну роль у функціонуванні фітоценозів, рості та розвитку рослин та ґрунтових процесах.