

I. Значение на азотното хранене

В сухото вещество на растеничта освен С, О и Н₂ се съдържа и N-от 2 до 4%, а в белтъка той е 15-19%, като заема четвърто място по количество в състава на органичните вещества. За усвояване и включване на азота е необходима енергия, която се получава от разграждането на въглехидратите. От друга страна, растежът на растенията зависи от азот в почвата. Следователно между усвояването на азота и продуктивността на растенията има тясна корелация. Тази зависимост важи както за отделното растение, така и за цялата растителност, намираща се на земната повърхност. Растежните процеси при растенията много често се ограничават от количеството на азота, вследствие на което растенията остават ниски, с малко клетки в тъканите и груби клетъчни стени. От друга страна, въпреки че азотното съдържание в атмосферата е 70-80%, растенията гладуват за азот, са принудени да използват само този, който се намира в почвата. Азотът в почвата е в ограничено количество и за да се осигури нужното количество за растенията, е необходимо той да бъде внасян в почвата отвън чрез азотно подхранване.

Значението на азота и азотното хранене понастоящем още повече се усилва, тъй като наличното количество на белтъка е недостатъчно за изхранването на човечеството, в резултат на което се почвчва тъй нареченият „белтъчен глад“. Ето защо проблемът за белтъка и неговата синтеза стана една от най-сериозните и актуални за разрешаване теми в много лаборатории.

II. Азотни източници в почвата.

Източник на азот за повечето растения е този от почвата, който се намира в неорганична и органична форма. Минералните азотни вещества, които растенията извличат от почвата, са във вид на нитратни и амониеви соли, а органичните съединения са белтъчните вещества на хумуса и продуктите от тяхното разпадане – аминокиселини и др. (фиг.109)

Това са главно различните форми на азот, които растенията си доставят за синтеза на органични вещества. По литературни данни количеството на азота в почвата и то е от 0,002 до 0,004% амонячен азот и 0,004% нитратен азот и заедно неорганичен и

органичен азот от 0,3 до 0,4%. Както се вижда, в почвата преобладава органичният азот. Въпросът за усвояване на органичният азот е бил разрешен в стерилни опити, където органичният азот е подаден във вид на карбамид – $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$ или аспаргин – $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. CH_2 .C

2

.COOH. Било е установено, че тези съединения лесно се усвояват от растенията. Белтъците, липидите и други неразтворими във вода съединения не се усвояват от растенията. За да може азотът, съдържащ се в тези вещества да се поеме от растенията, последните в почвата се подлагат на процеса амонификация с участие на повече микроорганизми – амонификатори. Благодарение на ензими, съдържащи се в тези микроорганизми, белтъчните съединения се хидролизират до аминокиселини, а последните се дезаминират до оксикиселина и се освобождава амоняк:



Този амоняк под действие на нитрофициращи бактерии може да се окисли до нитрати или пък при кисели и недобре аерирани почви да образува амониеви соли. Обикновено зелените растения използват неорганично свързан азот под форма на нитрати и амониеви йони (NO_3^- и NH_4^+). Тъй като поглъщането и пренасянето на азота изисква енергия, която се получава при дишането, при студови и слабо аерирани почви растенията често страдат от недостиг на азот поради подтискане на дишането от ниските температури.

III. Асимилация на азота и първична синтеза на амоняк

Погълнатият от растенията азот се включва във вид на амино-група към въглеродните съединения, като се образува аминокиселина. Преди това, за да бъде усвоен азота от нитратите, е необходимо да се редуцира до амоняк. Това се извършва от няколко последователни реакции с участието на няколко вида ензими, както е показано на схемата на фиг. 110.

Ензимът, както се вижда на схемата, всяка реакция се съпровожда с изменение на валентността на азота и се катализира от съответните ензими: интратредуктаза, нитритредуктаза, хипонитритредуктаза, хидрокси ламинредуктаза. Всеки ензим работи с участието на определени микроелементи: при интратредуктаза – молибден,

нитротредуктаза и хипонитритредуктаза – мед, желязо и магнезий, а при хидроксиламинредуктаза – манган и магнезий. Всички изброени ензими са флавопротеиди и се активират от горепосочените микроелементи. Донатор на електрони за реакцията на нитритите са НАДН₂ и НАДФН₂ и редуцираният фероксин. Участието на тези вещества в редуцията на нитрати е представено на следната фигура:

Нитратредуктазата е индуктивен ензим, тъй като той се активира само в присъствие на малко количество нитрати (2-4 м на растение) и за кратко време (3-4 часа).

Реакцията на преминаване се катализира от специфични ензими трансминази или аминотрансферази, чиято активна група е фосфорният естер на витамин В₆ – пиридоксалфосфат:

VI. Първична синтеза на аминокиселини.

Тя протича по две реакции:

1 Реакция на редуционно аминирание. При растенията тя е била открита от Кретович при прорастъци от житни растения, тиква и грах. Тя протича по следната схема:

Който участва, е аланиндехидрогеназа и работи като кофактор НАДН. Друг ензим, открит от същият автор е глутаматдехидрогеназа, който катализира образуването на глутаминова киселина от кетоглутарова киселина и NH₃.

По разпространена реакция за синтеза на аминокиселини е реакцията на трансаминирание, открита от Браунщайн и Крицкин през 1937г. Тази реакция преминава през няколко етапа: аминокиселина взаимодейства с някоя кетокиселина, т.е. трансаминирането или преаминирането се извършва между аминокиселина, като приема аминогрупата от аминокиселината. (фиг. 111).

2) Втората важна реакция, водеща до включване на неорганичния азот в аминокиселини, е АТФ-зависимото превръщане на глутамата в глутамин:

Аминосинтезата на аспаргинова киселина се извършва по два начина:

1) Чрез реакцията на трансаминиране, при която кислородът в кетогрупата на оксалата се заменя с амино-група.

Подобни реакции са обратими и служат като звено между метаболитните пътища на аминокиселините и въглехидратите. Аспаргиновата киселина се синтезира в реакцията на пряко аминиране.

2) Чрез пряко аминиране на формулата:

Доскоро се смяташе, че основният път на асимилация на амония става посредством редукиращото аминиране, както това беше показано по-горе: α -кетоглутарова киселина, катализирана от глутамат дехидрогеназа и реакциите на трансаминиране. След откриване на новия ензим глутаматсинтаза е било показано, че бактериите *Aerobacter aerogenes* има друг алтернативен път, който функционира в условия на наличие на нитрати и при недостатъчно количество на амоний в средата. Сега този ензим е намерен не само в бактерии, но и във висши растения. Глутаматсинтезата катализира следната реакция:

α -глутамин + α -кетоглутарова киселина + НАД(Ф)Н \rightarrow 2 мол α -глутаминова киселина + НАД(Ф)

Както се вижда от реакцията, глутаминът е донор на аминогрупа, чрез която става аминиране на α -кетоглутаровата киселина. Образуват се 2 молекули глутаминова киселина. От уравнението се вижда още, че глутаматсинтезата работи при наличието на глутамин. Последният се синтезира от глутаминова киселина и амоняк с участието на ензима глутаматсинтаза:

Глутаминова к-на + NH_3 + АТФ \rightarrow глутамин + АДФ + Ф

По такъв начин двата ензима образуват система, която действа едновременно и последователно.

Въпросът за ключовите реакции на асимилацията амонийни първо синтезата на глутамин и от него на глутаминова киселина е непосредствено свързан с биологичната фиксация на молекулният азот, тъй като първият продукт от асимилацията на молекулният азот е амонякът, който след това ще бъде използван чрез горепосочените реакции за синтеза на аминокиселините.

Синтезата на аминокиселините може да се извърши още от първичният траен продукт на фиксацията при C_3 -тип растения – 3 фосфоглицеринова киселина (ФГК). Последната под действието на ензими от енолазната система се превръща във фосфофенолпируаза (ФЕП). Пируваткиназата превръща ФЕП в пирогроздена киселина, от която чрез пряко редуцирано аминиране се получава аланин.. Освен по този пряк начин, включвайки се в цикъла на Кребс, пирогроздената киселина става източник за получаването и на други киселини. Така например от оксалоцетната киселина чрез аминиране се получава аспаргинова киселина.

V. Вторична синтеза на аминокиселини и синтеза на амиди.

В резултат на хидролиза на белтъка се получават аминокиселини и амиди. Така получените аминокиселини се разграждат чрез реакциите:

1) Дезаминиране. При него се освобождава аминната група и се образува съответната кетокиселина. Обикновено то е окислително. Така например при окислително дезаминиране:

Аланин + H_2O - 2H \rightarrow пирогроздена киселина + H_3

Аспаргинова киселина + H₂O -- 2H⁺ ⇌ оксалоцетна к-на + H₃

Глутаминова киселина + H₂O -- 2H⁺ ⇌ кетоглутарова к-на + H₃

Освободените кетокиселини отново се превръщат в аминокиселини или се включват в дишането, като се разграждат до CO₂ и вода.

2) Окислително декарбоксилиране. При него се освобождава CO₂ от карбонилната група и се образуват тъй наречените амини:



Например: цистеин – цистеамин;

Аспаргинова к-на – β-аланин

(двата амина влизат в състава на КоА);

Триптофан – хетероауксин (γ-индолоцетна к-на – растежен автор);

Глутаминова к-на – γ-аминомаслена к-на

3) Взаимно превръщане на една аминокиселина в друга.

Например:

Пролин + O₂ – оксипролин

Серин + H₂ – цистеин

Пролин – орнитин

Освободеният при тези реакции амоняк отново се включва в органични съединения чрез реакции на амидиране на глутаминната и аспаргиновата киселина, в резултат на което се образуват двата най-разпространени амида – глутамин и аспаргин. Аспаргиновата киселина може да се синтезира освен чрез аминирането на осалоцетната киселина още чрез аминиране на фумалпаргиновата киселина се амидира подобно на глутаминовата киселина и се получава аспаргин.

VI. Биологична фиксация на азота.

Още през 1838г. Френският учен Бусенго е наблюдавал, че добивът от пшеница е по-голям когато се засява след бобови растения, отколкото след житни. От този факт Бусенго направил предположение, че бобовите растения асимилират молекулярен азот и по такъв начин обогатяват почвата с този макроелемент. Тези предположения не са били възприети тогава и даже много учени по това време, като Либих и др., са възразили на Бусенго. Едва след 50 год., с точни експерименти, проведени от Хелригел и др., било установено, че някои растения фиксират атмосферен азот. Този учен се счита за откривател на грудковите бактерии. Чиста култура от грудкови бактерии е била получена от Бейринт през 1888г., в която се извършва азотфиксация. С това той доказал че тези бактерии (*Rhizobium*) образуват грудките на корена. Както бе изтъкнато във въздуха се съдържа 70-80% свободен азот, който поради голямата си инертност не може да се редуцира при обикновени условия, а само при температура 400°C и 300 атмосфери налягане и катализатор може да се свърже NH₃. Способността да свързват по биологичен начин атмосферен азот имат някои свободни и симбиотично живеещи бактерии – синьо зелени водорасли. В почвата широко са разпространени

свободно живеещи азотфиксиращи бактерии. Така например за 1 г. Почвата съдържа от 2000 до 20 000 бактерии, които за 1 год. Могат да обогатят почвата с 20-40 кг азот на 1 хектар. Известни са два вида свободно живеещи бактерии – аеробни и анаеробни. От аеробните най-широко разпространени са *Azotobacter* и *Crococum*, а от анаеробните – *Clostridium pasteurianum*.

Синьозелените водорасли също улавят азот. По литературни данни натрупването на азот в почвата от тези водорасли може да достигне до 50 кг на един хектар за година. Обогатяване с азот с помощта на синьозелени водорасли практически се използва при отглеждането на ориз, като за целта се използват *Noctos* и др. Тези синьозелени водорасли са напълно автотрофни, тъй като усвояват и въглерод, т.е. фотосинтезират. Те са разпространени в почвата, във водоемите, в горещи източници и др. При тях фиксацията на азота започва с редукция на молекулярния азот – реакция, изискваща голямо количество енергия която се получава при дишането. Реакцията се катализира от ензима нитрогеназа. Установено е, че в лабораторни условия за фиксираната т.Г азот на азотобактериите са необходими 50г глюкоза, а *Cl. Stridium* изразходва 170г, което показва, че при естествени условия в почвата в недостатъчно количество са хранителните субстрати на развитите на белтък бактерии. Известно е също така, че при ниски температури (от 0 до 3-4°C) нитрогеназата при синьозелените водорасли изгубва активността си, което говори, че този ензим не се адаптира към ниски температури. Неговият температурен оптимум е 20-25 °C. Сега е известно, че способността да фиксират азот широко разпространени и при други видове бактерии, като сулфтредуциращите бактерии и пурпурната бактерия (*Rhodospirillum azotum*).

Освен свободно живеещите бактерии азот фиксират и симбиозно живеещите в корените на висшите растения бактерии. Най-разпространени видове са *Rhizobium*, разпространени в грудките на бонвите растения. Установено е, че симбиотичните азот фиксиращи в почвата може да натрупат 200кг азот на хектар – близо 10 пъти повече от свободно живеещите бактерии.

Витранен за първи път е установил, че грудковите клетки съдържат хемоглобин, наречен легхемоглобин, който снабдява клетките с O_2 . Този пигмент е известен като легхемоглобин и неговото количество се увеличава от интензивността на светлината. Бактериите *Rhizobium* са дребни X-образна форма. Когато живеят свободно в почвата, те се делят и размножават и въпреки че съдържат ензима нитрогеназа, не могат да усвоят азота от въздуха. Тези свободни бактерии придобиват в грудките на корена, където обикновено навлизат през кореновите власинки. В зависимост от вида на растенията грудките имат различна форма, натрупват различно количество и на определени места в корена. Например грудките при соята са разположени по целия

корен. След навлизането на бактерията в кореновата клетка, тя живее като паразит, получава от растителната клетка необходимите за растежа хранителни вещества – главно захари и аминокиселини. Бактериите в клетките на грудките претърпяват редица морфологични и биохимични промени, в резултат на което се образува бактериоид, който придобива функцията да фиксира N

2

от въздуха но не и в отсъствие на NH

3

. Същевременно с навлизането на бактериите в корена те предизвикват разрастване на неговите тъкани, което води до образуване на грудките. При пълно развитие на последните разтението престава да черпи азот от почвата поради азотфиксацията на бактериите. От казаното до тук се вижда, че в началото бактериите живеят паразитно, но по късно паразит става самото растение хазяин, като паразитира за сметка на фиксирания азот от бактериоида и накрая растението при умирането си ги разрушава. В междуклетъчната фаза двата организма живеят в типични симбиотични отношения – бактерията намира място за живеене и получава от клетката хазяин енергия и съединения от въглерода, а растението използва съединението на азота, образувани от бактерията. Поотделно нито бактерията нито бобовото растение имат способността да фиксират N

2

. също не се наблюдава асимилиране на азот, който върху корен от небобово растение се присади бобово растение .

Това е схематичен строеж на инфицирана клетка от грудка на бобово растение.

Понастоящем широко се прилагат азотните торове произведени по промишлен начин, но има и недостатъци при този вид торове състоящи се в това, че азотните торове лесно се измиват от водата (50%) и замърсяват водоемите и реките. Затова решаваща роля в кръговрата на азота в почвата все още играят растенията които свързват молекулярния азот от атмосферата , напр. Бобовите растения и др. Огромно значение на снабдяване с азот на всички растения , което ще се равнява на революция в биологията, ако е останалите растения (небобови – пшеница, ръж, царевица и др.) придобият способността да фиксират молекулярния азот. По принцип възможността за пренасяне на свойствата и признаци чрез пренасяне на генетична информация , т.е. чрез пренасяне на ДНК, е вече доказано през 1944г. Пренасянето на гени или съответни части на ДНК на живи същества от различни видове може да бъде успешно само в случаи, когато организмът, който приема гена, няма ензими за разрушаване или промяна на чуждата ДНК. Английските учени Диксън и Постгент през 1972г. Първи са осъществили пренос на гени отговорни за фиксацията на азот от бактерията *Klebsiella* , върху един щам *Escherichia coli*. Гените, отговорни за фиксацията на азот обозначени като *nif* (азотфиксация), са причина за синтеза на ензима нитрогеназа, което е било направено чрез редукция на ацитилен. Тези гени, които присъстват в *Escherichia coli*, се

предполага, че са във вид на пръстеновиден участък на ДНК, която не се среща в хромозомите на ядрото. Свойствата обаче на образуваната в *Escherichia coli* нитрогеназа все още не са известни. Възможността да се пренесе *nif*-генът от бактерията на висби растения се увеличава и от това, че бактериалната ДНК има същата пръстенообразна форма каквато е тази на хлоропластите. Хибридизацията на ДНК или на техните части ще бъде много по успешна, отколкото е хибридизацията на бактериална ДНК (прокариоти) с тези на растителна клетка, което коренно се различава от ДНК на бактерията, т.е. от ДНК на еукариотите.