

J. W. SZARKOWSKI

OKSYDAZY KOŃCOWE ROŚLIN WYŻSZYCH

Kiedy kształtowały się pojęcia o oddychaniu oparte na fundamentalnych badaniach Lavoisiera, przez oddychanie rozumiano przeważnie procesy pobierania tlenu powietrza i wydalanie dwutlenku węgla. Badania skupiały się głównie na różnych mechanizmach transportu tlenu cząsteczkowego, na obserwowaniu wielkości wymiany w różnych warunkach, na zmienności ilorazu oddechowego itp. Mogło się wtedy zdawać, że oddychanie jest funkcją wyłącznie zwierzęcą, ponieważ u roślin proces oddychania był maskowany przez fotosyntezę. Później jednak udało się rozdzielić oba te procesy i wykazać u roślin bilans oddechowy podobnego rodzaju jak u zwierząt. Kiedy wreszcie na początku bieżącego stulecia zrozumiano, że oddychanie w dotychczasowym rozumieniu jest tylko objawem zewnętrznym procesów, które w komórce prowadzą do znikania tlenu i produkcji dwutlenku węgla, zatarła się granica między pojęciami oddychania i oksydacji składników ustroju. Okazało się wtedy, że tak pojęte oddychanie ma dłuższą historię i jest lepiej poznane u roślin niż u zwierząt. Jeszcze w podręczniku chemii fizjologicznej Parnasa wydanym w r. 1922 rozdział o utlenianiu w przeważnej części opiera się na znajomości utleniania u roślin. Już jednak w okresie pierwszej wojny światowej rozpoczął się szybki rozwój badań nad oddychaniem komórkowym zwierząt, który poprzez odkrycia Warburga, Wielanda, Thunberga, Keilina, Szent-Györgyi'ego doprowadził w okresie międzywojennym do względnie dokładnego poznania procesu oddychania. Badania nad biochemią komórki roślinnej, a także nad jej oddychaniem, nie nadążały w równym tempie i jeszcze do 1950 r. autorzy pracujący w tej dziedzinie ograniczali się przeważnie do szukania u roślin procesów chemicznych dobrze już poznanych u zwierząt. Dopiero w ostatnich latach jesteśmy świadkami pewnej emancypacji w tej dziedzinie.

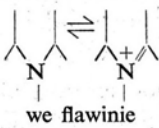
Odnaleziono u roślin większość ciągów reakcji składających się na oddychanie zwierzęce i niepewność dotyczy raczej stopnia ich udziału w metabolizmie roślin. Najsilniejsza dyskusja toczy się dookoła zagadnienia oksydazy końcowej u roślin.

Przez określenie oksydazy końcowej rozumiemy enzymy, które przenoszą uprzednio uwolnione elektrony bezpośrednio na tlen. Są one w ten sposób

ostatnim ogniwem przenośników elektronów uwalnianych w biologicznych procesach oksydoredukcyjnych. Oksydazy końcowe można podzielić na dwie zasadnicze grupy, przyjmując jako kryterium podziału wrażliwość na cyjanki. W ten sposób jedną grupę stanowią będą enzymy wrażliwe na cyjanki; będą to: oksydaza cytochromowa, tyrozynaza i oksydaza kwasu askorbinowego, a drugą — niewrażliwe na cyjanki samoutleniające się flawoproteidy i samoutleniające się cytochromy grupy b.

Enzymy wrażliwe na cyjanki są bardziej powszechne w tkankach roślin i z tego względu są dokładniej zbadane. W tablicy 1 podano ogólną charakterystykę układów oksydaz końcowych roślin.

Tablica 1
Charakterystyka oksydaz końcowych roślin

Oksydaza końcowa	Grupa prostetyczna	Źródło elektronów	Inhibitory specyficzne	Wrażliwość na cyjanki
Oksydaza cytochromowa	$Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++}$ w żelazo-porfirynie	Cytochromy	CO (inhibicja odwracalna na świetle)	+
Tyrozynaza	$Cu^{+} \rightleftharpoons Cu^{++}$	o-dwuhydroksy-fenole	CO (inhibicja nieodwracalna na świetle)	+
Oksydaza kwasu askorbinowego	$Cu^{+} \rightleftharpoons Cu^{++}$	Kwas askorbinowy	Dwuetylodwutiotkarbaminian sodu	+
Flawo-proteidy	 we flawinie	DPNH i TPNH	nieznane	—
Cytochrom b_3 Cytochrom b_7	$Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++}$ w żelazo-porfirynie	Prawdopodobnie DPNH i TPNH		—

Objaśnienie skrótów:

DPN = nukleotyd dwufosfopirydynowy

TPN = nukleotyd trójfosfopirydynowy

DPNH = postać zredukowana nukleotydu dwufosfopirydynowego

TPNH = postać zredukowana nukleotydu trójfosfopirydynowego

Oksydaza cytochromowa (cytochrom a_3)

Oksydaza cytochromowa jest enzymem katalizującym reakcję utleniania cytochromów przez tlen. Keilin w klasycznych już dziś badaniach w r. 1929 wykazał, że enzym ten jest identyczny z szeroko rozpowszechnionym we wszystkich prawie tkankach enzymem określanym wtedy jako oksydaza indofenolowa.

Keilin i Hartree (1939) badając widmo absorpcyjne związku tlenku węgla z samoutleniającym się barwikiem z mięśnia sercowego, cytochromem a_3 , zwrócili uwagę na identyczność jego z «czerwonym» enzymem oddechowym Warburga. Chance (1953 a, b, c, d) w badaniach swoich nad widmami cytochromów a i a_3 u drobnoustrojów dostarczył ostatecznych dowodów na identyczność cytochromu a_3 z oksydazą cytochromową.

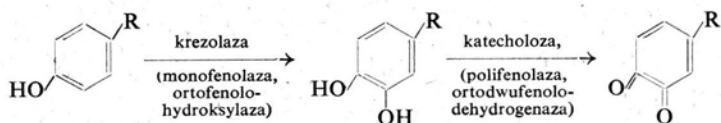
Cytochromy a i a_3 występują przeważnie razem i ponieważ nie udało się ich rozdzielić, istnieją przypuszczenia, że jest to kompleks złożony z dwóch grup prostetycznych związanych z jednym białkiem (Hartree 1957). Jednak według Chance'a (1953a) cytochromy te niekoniecznie muszą występować razem i ich stosunek ilościowy w komórce może być różny.

Cytochrom a_3 reaguje bezpośrednio z tlenem i tworzy z tlenkiem węgla połączenie odwracalne na świetle.

Obecność oksydazy cytochromowej stwierdzono w całym szeregu tkanek roślinnych (Bhagvat, Hill 1951, Hartree 1957, James 1957). Wykazuje się ją przeważnie pośrednio albo przez stwierdzenie charakterystycznych widm cytochromów, a , b , c , względnie przez manometryczny pomiar utleniania cytochromu c w obecności związków redukujących go, takich jak hydrochinon lub p-fenylendwuwamina.

Tyrozynaza (fenolooksydaza)

Drugą oksydazą końcową u roślin jest tyrozynaza, która katalizuje dwie reakcje, utlenianie monofenoli do ortodwufenoli i ortodwufenoli do odpowiednich chinonów. Obydwie te reakcje bada się zwykle na układach modelowych używając p-krezolu jako substratu dla aktywności monofenolazowej, a katecholu dla aktywności polifenolazowej. Stąd potocznie nazywa się również obie te aktywności odpowiednio krezolazową i katecholazową. Obydwie reakcje katalizowane przez tyrozynazę, mianowicie wprowadzenie tlenu w pozycję orto do obecnej już grupy hydroksylowej monofenolu (aktywność krezolazowa) i odwodorowanie powstałego w ten sposób dwufenolu (aktywność katecholazowa) są z chemicznego punktu widzenia zasadniczo różne. Pierwszą aktywność określa Mason (1957) jako ortofenolohydroksylazową, a drugą jako ortodwufenolodehydrogenozową.



Przypuszczano przez pewien czas, że istnieją dwa różne enzymy każdy katalizujący inną z tych reakcji, ale teoria ta została zarzucona, gdyż nikomu nie udało się rozdzielić tych aktywności między odrębne frakcje białkowe. Mallette i Dawson (1949) otrzymali z grzybów wysoko oczyszczony preparat tyrozynazy o obydwu aktywnościach i wykazali jego elektroforetyczną jednorodność. Więcej zwolenników ma utrzymująca się do dziś teoria unitarna, która obie aktywności przypisuje jednemu enzymowi.

W celu wyjaśnienia obserwacji związanych z utlenianiem monofenoli przez tyrozynazę stawiano cały szereg hipotez. Hipotezy te można podzielić na dwie grupy, w zależności od enzymatycznego lub nieenzymatycznego interpretowania obserwacji. Zostały one zreferowane w ostatnich przeglądach z historycznymi i bibliograficznymi szczegółami ((Dawson, Tarpley 1951, Nelson, Dawson 1944, Lerner 1953, Mason 1955, 1956, 1957). Pomijamy je tutaj, ponieważ mają one przeważnie charakter spekulatywny.

Element bezpośredniego doświadczenia wniosły tu dopiero badania izotopowe. Mason, Fowlks i Peterson (1955b), aby zbadać tę reakcję, przeprowadzili enzymatyczną hydroksylację 3,4-dwumetylofenolu w środowisku wodnym i w atmosferze tlenu, podając tlen izotopowy $^{18}\text{O}_2$ raz w fazie gazowej, a drugim razem związany w wodzie. Badania wykazały, że tlen wprowadzonego hydroksylu pochodził z fazy gazowej, a nie z wody. Nie stwierdzili oni również w tych doświadczeniach wymiany tlenu fazy gazowej z tlenem wody. Z doświadczeń swoich wyprowadzili wniosek, że przypuszczenia o nieenzymatycznym utlenianiu monofenoli w obecności tyrozynazy są niesłuszne. Jedną bowiem z głównych podstaw nieenzymatycznej interpretacji tego procesu, reprezentowanej jeszcze w 1952 r. przez Kertesza (1952) było założenie, że tlen wprowadzonego hydroksylu pochodzi z wody środowiska, a nie z fazy gazowej. Zgodnie więc z obserwacjami Masona i współpracowników utlenianie monofenoli w obecności tyrozynazy uważa się dziś za proces enzymatyczny.

Wobec tego, że obie funkcje tyrozynazy uważa się dziś za enzymatyczną aktywność jednego białka, nasuwa się zagadnienie jednego czy dwu centrów aktywności. Większość autorów wraz z Masonem (1956) przyjmuje jedno centrum, które kolejno z miedzią dwuwartościową ma aktywność polifenolazy, w postaci zaś zredukowanej z miedzią jednowartościową aktywność monofenolazy. Inną koncepcję wysunął Kendal (1949), wedle niego tyrozynaza jest pojedynczym enzymem lub kompleksem enzymatycznym posiadającym dwa odrębne centra aktywności dla obu czynności enzymatycznych.

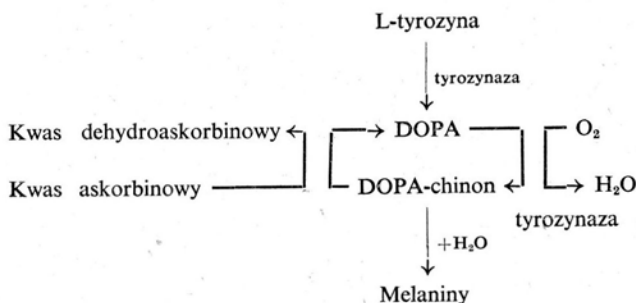
Sugestie co do udziału tyrozynazy w procesach oddechowych roślin można

wyprowadzić z badań prowadzonych w stosunkowo dawnych czasach (Bertrand 1896, 1907, Bourquelot, Bertrand 1895, Palladin 1908).

W 1908 r. botanik W. Palladin (1908) przedstawił pogląd, że u roślin chinony powstałe przez utlenianie fenoli działają z kolei jako utleniacze innych związków obecnych w komórkach. Procesy oksydoredukcyjne zachodzące przy tym są enzymatyczne, a chinony są ogniwami pośrednimi w układzie utleniania biologicznych. Hipoteza Palladina w swojej istocie i nawet pierwotnej formie do dziś nie straciła na aktualności.

Powiązanie tyrozynazy jako oksydazy końcowej z procesami oddechowymi roślin pierwsi wykazali w r. 1944 Robinson i Nelson (1944). Zauważyli oni, że w układzie zawierającym L-tyrozinę, kwas askorbinowy i tyrozinazę nie zachodzi utlenianie tyrozyny na melaniny do momentu, gdy cała ilość kwasu askorbinowego nie zostanie utleniona do kwasu dehydroaskorbinowego. Dopiero po utlenieniu kwasu askorbinowego następuje utlenianie tyrozyny do ciemnych związków melaninowych. Robinson i Nelson przyjęli, że przenośnikiem wodoru jest w tym przypadku powstała w wyniku utlenienia tyrozyny 3,4-dwuhydroksyfenyloalanina (DOPA). Utlenienie DOPA do odpowiedniego chinonu katalizowane jest również przez tyrozinazę (aktywność polifenolazowa), zaś odtwarzanie DOPA z DOPA-chinonu zachodzi pod wpływem kwasu askorbinowego aż do chwili utlenienia całej ilości kwasu askorbinowego. W tym czasie utlenianie tyrozyny nie wychodzi poza DOPA-chinon, a układ DOPA/DOPA-chinon działa jako przenośnik wodorów w reakcji utleniania kwasu askorbinowego. Opisany proces przedstawili Robinson i Nelson w schemacie 1.

Schemat 1

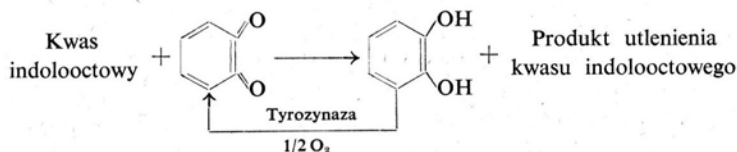


Objaśnienie skrótu:

DOPA = 3,4-dwuhydroksyfenyloalanina

Schemat Robinsona i Nelsona utleniania w obecności tyrozyny i tyrozinazy przyjmuje tyrozinazę w roli oksydazy końcowej. W procesach oddechowych wedle przedstawionego schematu mogą być utleniane również inne związki. U roślin występuje wiele substancji o charakterze fenoli, które może

Briggs i Ray (1956) wykazali, że kwas indolooctowy jest inaktywowany przez ekstrakty z liści paproci zawierających tyrozynazę, do których dodano katechol lub pirogallol. Proces inaktywacji ujęli oni w następujący schemat:



Inaktywacja polega według nich na utlenianiu kwasu indolooctowego przez tyrozynazę przy udziale chinonów jako akceptorów wodoru z kwasu indolooctowego. Z przebadanych przez nich fizjologicznych fenoli ani tyrozyna, ani DOPA nie mogły zastąpić katecholu i pirogallolu. Przypuszczają więc, że w roślinach istnieje jakiś inny fenol, biorący udział w tego rodzaju procesach.

Poparciem dla sugestii Biggsa i Raya co do roli tyrozynazy w procesie inaktywacji auksyn może być zaobserwowany przez Wagenknecht i Burrisa (1950) fakt, że układ inaktywujący kwas indolooctowy w korzeniach fasoli był hamowany przez związki wiążące miedź, i autorzy przypuszczali, że chodzi tu o enzymy zawierające miedź, do których należy tyrozynaza.

Istnieje również wiele danych doświadczalnych wskazujących na rolę tyrozynazy w utlenianiu mono- i polifenoli prowadzącym do syntezy flawonoidów i garbników, jak również brązowienia nasion, owoców i kory. Zagadnienia te są przedstawione przez Masona (1955, 1957) w artykułach zbiorczych.

W niektórych tkankach roślinnych i zwierzęcych stwierdzono istnienie nieaktywnej tyrozynazy (Horowitz 1955, Kenten 1955). Bodine ze współpracownikami (1945, 1954 a, b, c) opublikował szereg prac nad nieaktywną formą tyrozynazy u owadów, którą nazywa protyrozynazą. Kenten (1955) znalazł nieaktywną formę tyrozynazy w liściach *Vicia faba* L. Z badań Bodine'a przeprowadzonych na preparatach z jaj konika polnego *Melanoplus differentialis* wynika, że przejście protyrozynazy w formę aktywną można uzyskać działaniem niektórych rozpuszczalników lub detergentów, względnie przez krótkotrwałe ogrzewanie do ok. 70° lub krótkotrwałe działanie alkali (pOH 4).

Kenten (1955, 1957, 1958) aktywował nieczynną formę tyrozynazy z *Vicia faba* działaniem enzymów proteolitycznych, kwasów (pH 3—3,5) lub zasad (pOH 2,5—3,0) lub anionowych zwiłaczy.

Stwierdzono również u roślin, a mianowicie w młodych ziarnach żyta (Szarkowski 1957a, b) istnienie nieaktywnej formy tyrozynazy tylko w stosunku do monofenoli przy pełnej aktywności w stosunku do dwufenoli. Uzyskiwała ona aktywność w stosunku do monofenoli pod wpływem trypsyny.

Natura nieaktywnej formy tyrozynazy nie jest dotąd wyjaśniona. Wyniki badań dotychczasowych sugerują, że jest to albo prekursor, albo kompleks enzymu z inhibitorem natury białkowej.

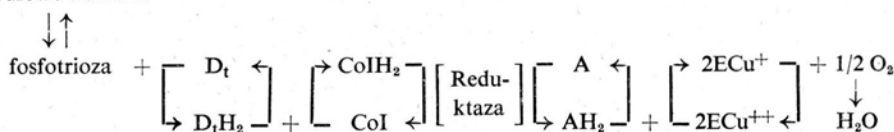
Oksydaza kwasu askorbinowego

Rola oksydazy kwasu askorbinowego jako oksydazy końcowej w procesach utleniania w tkankach roślinnych była często dyskutowana przez różnych autorów (James 1953a, b, 1954a, b, 1955, 1957, Reifer, Solecka 1958, Waygood 1950).

James (1953a) podaje, że zużycie tlenu przez klarowny dializowany sok z liści jęczmienia w obecności dwufosfoheksozy jest stymulowane przez dodatek kwasu askorbinowego i DPN. Przebieg tej reakcji przedstawia schemat 3.

Schemat 3

1/2 dwufosfo-heksoza



Objaśnienia skrótów:

D_t = dehydrogenaza fosfotriozy

AH_2 = kwas askorbinowy

ECu = oksydaza kwasu askorbinowego

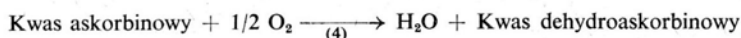
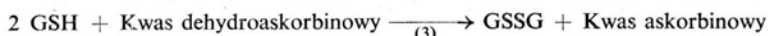
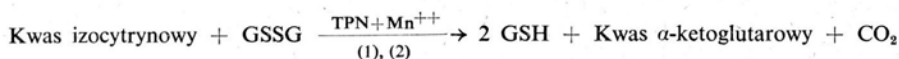
CoI = DPN^+

Ponieważ kwas askorbinowy nie reaguje bezpośrednio z $DPNH$, James przyjmuje obecność przenośnika (reduktazy) podobnego do znalezionej przez Waygooda (1950) barwnika pszenicy, który przechodził w formę barwną dopiero w obecności kwasu askorbinowego. Stwierdzono również (Waygood 1950), że preparaty pszenicy, do których dodano DPN i kwas askorbinowy, mogą utleniać kwas jabłkowy i alkohol.

Szent-Györgyi (1931a) w 1931 r. zwrócił uwagę na możliwość funkcjonowania układu glutacjon — kwas askorbinowy jako układu oddechowego. Następnie Hopkins i Morgan (1936) stwierdzili, że w odwracalnym utlenianiu kwasu askorbinowego redukcja kwasu dehydroaskorbinowego przez glutacjon jest procesem enzymatycznym.

W świetle prac Mapsona i współpracowników (1951, 1956) zagadnienie to wydaje się być wyjaśnione. Stwierdzili oni na preparatach z nasion grochu, że $TPNH$ może być utleniany poprzez glutacjon i kwas dehydroaskorbinowy. Stosowanie kwasu izocytrynowego jako substratu dla dehydrogenazy współ-

działającej z TPN pozwoliło im wskazać na możliwość powiązania oksydazy kwasu askorbinowego z utlenianiami cyklu kwasów trójkarboksylowych. Kolejne etapy utleniania kwasu izocytrynowego przedstawiają się następująco:



GSSG ——— postać utleniona glutajonu

GSH ——— postać zredukowana glutajonu.

Działają tu kolejno: (1) dehydrogenaza współdziałająca z TPN, (2) reduktaza glutajonu, 3(3) reduktaza kwasu dehydroaskorbinowego i jako oksydaza końcowa (4) oksydaza kwasu askorbinowego.

Wypada wspomnieć, że badanie oksydazy kwasu askorbinowego natrafia na duże trudności. Kwas askorbinowy może być utleniany nieenzymatycznie przy wszystkich pozorach reakcji enzymatycznej, jak to wykazali Reifer i Solecka (1958) na przykładzie preparatów z kielków pszenicy.

Samoutleniające się cytochromy grupy b i flawoproteidy

Badania Jamesa i współpracowników (1950, 1955) nad niewrażliwym na cyjanki oddychaniem kolb kwiatostanowych *Arum* wskazały zasadniczo na możliwość istnienia innych niż wyżej omówione trzech oksydaz końcowych. Nie udało im się wykazać w kolbach kwiatostanowych *Arum* ani oksydazy cytochromowej, ani fenolooksydazy. Endogenne oddychanie okazało się całkowicie niewrażliwe na stosunkowo wysokie stężenie cyjanków, dwuetylodwutiokarbaminianu sodu, jak również na wysokie ciśnienie tlenu węgla. Ekstrakt wolny od komórek katalizował szybkie utlenianie dwufosfoheksyzy i na reakcję tę również nie miały wpływu inhibitory. Frakcja mitochondrialna wyizolowana z kolb kwiatostanowych utleniała kwas cytrynowy, α -ketoglutarynowy i bursztynowy. Dodatek cyjanku nie hamował tych utlenień. Z doświadczeń tych autorzy wyciągnęli wniosek, że oksydazą końcową są samoutleniające się flawoproteidy.

Późniejsze badania Bendalla i Hilla (1956) przeprowadzone na kolbach kwiatostanowych *Arum maculatum* wykazały, że utlenianie może przebiegać poprzez samoutleniający się cytochrom grupy b, mianowicie poprzez cytochrom b_7 . Nie ma dowodów na to, czy cytochrom b_7 jest bezpośrednim akceptorem elektronów dehydrogenaz, czy też pośrednim. Cytochrom b_7 jest intensywnie redukowany przez bursztynian, a przez jabłczan tylko w niewielkim stopniu.

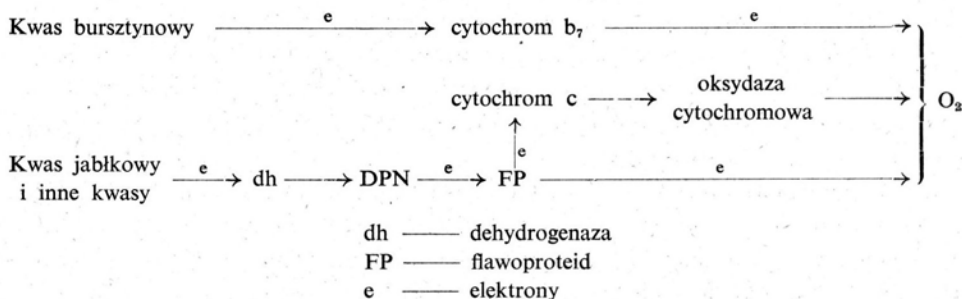
Martin i Morton (1955) badając frakcję mikrosomalną szypulek liści *Beta vulgaris* wskazują na możliwość istnienia niewrażliwej na cyjanki drogi oddechowej poprzez różny od b_7 samoutleniający się składnik cytochromów grupy b, mianowicie cytochrom b_3 . Frakcja ta katalizuje redukcję cytochromu b_3 przez DPN i TPN. Ponieważ cytochrom b_3 jest dość szeroko rozpowszechniony w roślinach, jego powiązanie z procesami oddechowymi niewrażliwymi na cyjanki zasługuje na dalsze badanie.

Udział samoutleniających się flawoproteidów jako oksydaz końcowych w procesie oddychania roślin przyjmuje się na podstawie prac nad oddychaniem niewrażliwym na cyjanki (James i współpracownicy 1950, 1955a, b).

Ostatnio James i Elliott (1958) wyisobnili z mitochondriów kolb kwiatostanowych *Arum* i częściowo oczyścili flawoproteid, którego grupą prostetyczną jest dwunukleotyd flawinoadeninowy. Flawoproteid ten wykazywał zdolność samoutleniania się, jak również zdolność redukcji cytochromu c w obecności DPNH. W ten sposób mógłby on odgrywać rolę reduktazy cytochromu c, jak również oksydazy końcowej w utlenieniach biegnących w tej tkance. Ponieważ, jak wykazano dawniej (Hackett, Simon 1954, James, Beevers 1950, James, Elliott 1955b) oddychanie kolb kwiatostanowych *Arum* jest niewrażliwe na cyjanki, flawoproteid ten wydaje się spełniać raczej rolę oksydazy końcowej.

James i Elliott tłumacząc jego rolę w oddychaniu przyjmują, że w tkankach kolb kwiatostanowych *Arum* mogą być obecne pewne niewielkie ilości cytochromu c i oksydazy cytochromowej, utlenianie tkankowe może zatem przebiegać przy udziale tego flawoproteidu również drogą poprzez oksydazę cytochromową.

Zestawiając swoje poglądy z sugestiami Bendalla i Hilla (1956) co do roli cytochromu b_7 jako oksydazy końcowej w oddychaniu kolb kwiatostanowych *Arum*, James i Elliott proponują poniżej umieszczony schemat oddychania tej tkanki z udziałem trzech oksydaz końcowych:



Nie ma jeszcze pewności co do dwóch dróg utleniania flawoproteidu, ponieważ preparat otrzymany przez Jamesa i Elliotta nie jest czysty i sami

autorzy przypuszczają, że może mają do czynienia z dwoma różnymi flawoproteidami, z których jeden ma własności reduktazy cytochromu c, tj. przenosi elektrony z DPNH na układ cytochromowy, drugi zaś przenosi atomy wodoru bezpośrednio na tlen.

Badanie roli flawoproteidowych oksydaz końcowych natrafia na szczególne trudności ze względu na brak selektywnych inhibitorów działających na tę grupę, które by nie zatruwały równocześnie flawoproteidów utleniających się za pośrednictwem układu cytochromowego.

Współdziałanie oksydaz końcowych

Istnieją dane, że w jednej tkance roślinnej mogą funkcjonować równocześnie różne oksydazy końcowe (James 1953b, James, Boulter 1955a, Mikhlin, Kolesnikov 1947, Thimann, Yocum, Hackett 1954, James 1953a).

Wyniki uzyskane *in vitro* na preparatach oksydaz końcowych dają nam tylko jakościową orientację co do roli tych enzymów w żywej tkance. Badanie ilościowego udziału oksydaz końcowych w żywej tkance roślinnej jest zagadnieniem bardziej złożonym. Przeprowadza się je mierząc intensywność oddychania tkanki, do której wprowadzono odpowiednie inhibitory oksydaz końcowych. Inhibitory oddechowe, jak cyjanki, azydki, dwuetylodwu-tiokarbaminian sodu itp. podawane w niewielkich stężeniach tkance roślinnej *in vivo*, ograniczają tylko częściowo oddychanie, a pozostała część oddychania jest już niewrażliwa na zwiększone stężenie danego inhibitora. Stąd krzywe zależności intensywności oddychania od stężenia podawanego inhibitora w pewnym zakresie jego stężeń mają przebieg horyzontalny (James, Boulter 1955 a).

Stosowanie inhibitorów *in vivo* nie zawsze daje dobre i jednoznaczne rezultaty ze względu z jednej strony na brak rzeczywiście selektywnych inhibitorów poszczególnych oksydaz, i z drugiej strony ze względu na trudności z wprowadzeniem inhibitora do komórki. Pierwszą wadę kompensuje do pewnego stopnia fakt, że różne oksydazy wykazują różnice we wrażliwości na poszczególne inhibitory. Np. dwuetylodwu-tiokarbaminian sodu w stężeniu milimolarnym hamuje w całości oksydazę kwasu askorbinowego jęczmienia, a oksydazę cytochromową w 25%. Obniżenie stężenia do 0,2 mM powoduje spadek inhibicji tych enzymów odpowiednio do 90 i 9%. Takie podwyższenie stosunku hamowania aktywności dwóch obok siebie działających enzymów pozwala dokładniej określić ich procentowy udział w ogólnym oddychaniu (James, Garton 1952). Jednak uzyskane zahamowanie nie musi być pełną miarą ilościowego udziału danego enzymu w ogólnym oddychaniu, ponieważ przy zahamowaniu jednego układu drugi może wzmacniać swój udział.

Obserwuje się również, że te same inhibitory w stosunku do tych samych enzymów różnych niezniszczonych tkanek roślinnych nie zawsze działają w równym stopniu hamująco, a czasami w ogóle nie wywierają wpływu hamującego. Na przykład oksydaza kwasu askorbinowego dyni jest unieczyniana przez tlenek węgla, podczas gdy jad ten nie hamuje jej aktywności w kielkach jęczmienia (James 1946). Fenolooksydaza jabłek i ziemniaków jest w różnym stopniu hamowana przez cyjanek (Sutter 1936, Wieland Sutter 1930). Najogólniej różnice te można tłumaczyć odmienną strukturą tkanek u różnych roślin, co może mieć wpływ na przenikanie inhibitora do wnętrza lub innego rodzaju wpływ ochronny tkanki. Poza tym u różnych gatunków możemy mieć do czynienia z zasadniczo różnymi enzymami, jakkolwiek działają na identyczne substraty i dają jednakowe produkty, a więc według terminologii enzymatycznej noszą jedną i tę samą nazwę. Na przykład dehydrogenaza kwasu mlekowego mięśni jest silnie hamowana przez 0,01 M kwas jodoctowy, podczas gdy kwas jodoctowy w tym samym stężeniu słabo hamuje enzym drożdżowy. Pisał o tym w 1937 roku Dixon (1937). Dzisiaj wiemy, że są to dwa enzymy o różnej budowie i różnych grupach prostetycznych.

W celu hamowania układu oksydazy cytochromowej stosuje się azydki i cyjanki, względnie w przypadku równoczesnej obecności fenolooksydazy — tlenek węgla. Zaznaczyć należy, że o ile w przypadku oksydazy cytochromowej i askorbinowej do zahamowania ich aktywności wystarcza najczęściej stężenie cyjanku 0,001 M (Hopkins, Morgan 1936, James, 1953b, Srinivasan 1936), o tyle w przypadku tyrozynazy stosować należy stężenie dziesięciokrotnie wyższe (Sutter 1936).

W nieobecności tyrozynazy udział oksydazy kwasu askorbinowego w ogólnym oddychaniu można badać, stosując inhibitory wiążące miedź. Najczęściej używany jest dwuetylodwutiokarbaminian sodu (dieca).

Albert i Gledhill (1947) badali zdolność wiązania różnych metali przez dieca. Stwierdzili oni, że dieca w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (pH 7,0, temp. 37°) daleko łatwiej wiąże miedź dwudodatnią niż żelazo dwu- jak i trójdatnie. Dobierając odpowiednio stężenie można używać hamowanie oksydazy kwasu askorbinowego bez wyraźnego hamowania oksydazy cytochromowej (James 1953a, b, James, Boulter 1955a).

Tak więc określenie udziału poszczególnych oksydaz końcowych w oddychaniu tkanki roślinnej wymaga najczęściej stosowania kilku inhibitorów, jak również przebadania całego szeregu stężeń.

Udział w ogólnym oddychaniu oksydaz końcowych niewrażliwych na cyjanki oznacza się z różnicy intensywności oddychania ogólnego i pozostałego, po zahamowaniu oksydaz metalicznych cyjankiem.

Wprowadzać inhibitor do tkanki roślinnej można albo przez infiltrację próżniową sposobem Kursanova (1941), lub też wytrząsając badaną tkankę

w roztworach buforowych inhibitora przez określony przeciąg czasu (James 1953b).

Dobór pH roztworów inhibitora wprowadzanych do tkanki musi uwzględniać zarówno trwałość inhibitora w danym pH, jak również wpływ pH na intensywność oddychania badanej tkanki. James (1953b) np. dla inhibitorów takich, jak dieca i azydek, które mają własności słabych kwasów, przy badaniu ich wpływu na oddychanie korzeni jęczmienia stosował roztwory buforowe o pH 5,0. Mikhlin i Kolesnikov (1947) infiltrowali do liści jęczmienia roztwory cyjanku o pH 6,81. Kwasota środowiskowa może mieć również wpływ na sam proces przenikania inhibitora przez błony komórkowe.

W oparciu o dzisiejsze sposoby badania i wyniki trudno jest nawet niekiedy odpowiedzieć, czy dana oksydaza stwierdzona w tkance roślinnej gra praktycznie rolę w jej oddychaniu. Odnosi się to głównie do oksydaz miedziowych, tj. do oksydazy kwasu askorbinowego i tyrozynazy, których rola jako oksydaz końcowych jest przez niektórych autorów kwestionowana (Eichenberger, Thimann 1957, Levy, Schade, Bergmann, Harris 1948, Reifer, Solecka 1958).

Jak widzimy, wyjaśnianie udziału poszczególnych oksydaz lub ich współdziałania jest zadaniem trudnym i nie zostało dotąd w zadowalający sposób opracowane. Metody, którymi się dziś posługiwać możemy, pozostawiają bardzo wiele do życzenia. Dalszy postęp w tej dziedzinie wymaga niewątpliwie udoskonalenia metod badawczych i lepszego poznania działających enzymów. Poza tym należy się liczyć z możliwością, że obraz może się zmieniać zależnie od stadium rozwojowego rośliny. Należy więc nie tylko udoskonalić metody badawcze, ale również dążyć do ścisłego ustalenia stanu rozwojowego i wieku fizjologicznego rośliny lub jej badanej części.

LITERATURA

- Albert A., Gledhill W. S., 1947. The Choice of a Chelating Agent of Inactivating Trace Metals. 1. A Survey of Commercially Available Chelating Agents, *Biochem. J.*, 41, 529—533.
- Bendall D. S., Hill R., 1956. Cytochrome Components in the *Spadix* of *Arum maculatum*, *New Phytolog.*, 55, 206—212.
- Bertrand G., 1896. Sur les rapports qui existent entre la constitution chimique des composés organiques et leur oxydabilité sous l'influence de laccase, *Compt. Rend.*, 122, 1132—1134.
- 1907. Action de la tyrosinase sur quelques corps voisins de la tyrosine, *Compt. Rend.*, 145, 1352—1355.
- Bhagvat K., Hill R., 1951. Cytochrome Oxidase in Higher Plants, *New Phytolog.*, 50, 112—120.
- Bodine J. H., 1945. Action of $HgCl_2$ upon Variously Activated Tyrosinase, *Arch. Biochem.*, 6, 479.
- 1954a. Preparation and Purification of Prototyrosinase, *Proceedings of the Iowa Academy of Sciences*, 61, 497—499.
- — Cerlson L. D., 1954b. Solubility of Prototyrosinase and Tyrosinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 40, 513—515.

- 1954c. Ultraviolet Absorption Spectrum of Protyrosinase and Tyrosinase, *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 85, 156—157.
- Bourquelot M. M., Bertrand G., 1895. Le bluissement et le noircissement des champignons, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 47, 582—584.
- Briggs W. R., Ray P. M., 1956. An Auxin Inactivation System Involving Tyrosinase, *Plant Physiol.*, 31, 165—167.
- Chance B., 1953a. The Carbon Monoxide Compounds of the Cytochrome Oxidase. I Difference Spectra, *J. Biol. Chem.*, 202, 383—396.
- 1953b. The Carbon Monoxide Compounds of the Cytochrome Oxidase. II Photodissociation Spectra, *J. Biol. Chem.*, 202, 397—406.
- 1953c. The Carbon Monoxide Compounds of the Cytochrome Oxidase. III Molecular Extinction Coefficients, *J. Biol. Chem.*, 202, 407—416.
- Smith L., Castor L., 1953d. New Method for the Study of the Carbon Monoxide Compounds of Respiratory Enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, 12, 289—298.
- Dawson C. R., Tarpley W. B., 1951. Copper Oxidases, *The Enzymes*, J. B. Sumner and K. Myrbäck, Academic Press, New York, t. II, cz. I 454—498.
- Dixon M., 1937. Action of Iodoacetate on Dehydrogenases and Alcoholic Fermentation, *Nature*, 140, 806.
- Eichenberger E., Thimann K. V., 1957. Terminal Oxidases and Growth in Plant Tissues. IV. On the Terminal Oxidases of Etiolated Pea Internodes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 67, 466—478.
- Hackett D. P., Schneiderman H. A., 1953. Terminal Oxidases and Growth in Plant Tissues, I The Terminal Oxidases Mediating Growth of *Avena* Coleoptile and *Pisum* Stem Sections, *Arch. Biochem. Biophys.*, 47, 190—204.
- Simon E. W., 1954. Oxidative Activity of Particles Prepared from the Spadix of *Arum maculatum*, *Nature*, 173, 162.
- Hartree E. F., 1957. Cytochrome in Higher Plants, *Advances in Enzymology* t. XVIII, Interscience, New York — London, 1—64.
- Hopkins F. G., Morgan E. J., 1936. Some relations between Ascorbic Acid and Glutathione, *Biochem. J.*, 30, 1446—1462.
- Horovitz N. H., Fling M., 1955. The Autocatalytic Production of Tyrosinase in Extracts of *Drosophila Melanogaster*, *Amino Acids Metabolism*, 207—218, Ed. by Mc Elroy W. D. and Glass B., John Hopkins Press, Baltimore.
- James W. O., 1946. The Respiration of Plants, *Ann. Rev. Biochem.*, 15, 417—434.
- Beevers H., 1950. The Respiration of *Arum Spadix*. A Rapid Respiration, Resistant to Cyanide, *New Phytolog.*, 49, 353—374.
- Garton, 1952. The Use of Sodium Diethyldithiocarbamate as a Respiratory Inhibitor, *J. Exptl. Botany*, 3, 310—321.
- 1953a. Oxidases of Plant Respiration, *Biol. Revs.*, 28, 245—260.
- 1953b. The Terminal Oxidases in the Respiration of the Embryos and Young Roots of Barley, *Proc. Roy. Soc., B*, 141, 289—299.
- 1954a. Terminal Oxidases of Cereal Seedlings, *The Advancement of Science*, t. XI. No 43, 273—276.
- 1954b. Reactions Paths in Plant Respiration, *Endeavour*, 13, 155—162.
- Boulter D., 1955a. Further Studies of the Terminal Oxidases in the Embryos and Young Roots of Barley, *New Phytolog.*, 54, 1—12.
- Elliot D. C., 1955b. Cyanide-Resistant Mitochondria from the Spadix of an Arum., *Nature*, 175, 89.
- 1957. Reactions Paths in the Respiration of the Higher Plants, *Advances in Enzymology*, t. XVIII, Interscience, New York — London, 281—318.
- Elliot D. C., 1958. A Flavoprotein from Arum Spadix, *New Phytolog.*, 57, 230—234.

- Keilin D., Hartree E. F., 1939. Cytochrome and Cytochrome Oxidase. Proc. Roy. Soc., B, 127, 167—191.
- Kendal L. P., 1949. The Action of Tyrosinase on Monophenols, Biochem. J., 44, 442—454.
- Kenten R. H., 1955. Latent Polyphenol Oxidase Activity in Extracts of Broad Bean (*Vicia faba*, L) Leaves, 3-ème Congr. Intern. Biochim., Bruxelles, 102.
- 1957. Latent Phenolase In Extracts of Broad Bean (*Vicia faba*, L) Leaves. 1. Activation by Acid and Alkali, Biochem. J., 67, 300—307.
- 1958. Latent Phenolase in Extracts of Broad Bean (*Vicia faba*, L) Leaves. 2. Activation by Anionic Wetting Agents., Biochem. J., 68, 244—251.
- Kertész D., 1952. Tyrosinase and Polyphenoloxidase. The Role of Metallic Ions in Melanogenesis., Biochim. Biophys. Acta, 9, 170—179.
- Kubovitz F., 1937. Über die chemische Zusammensetzung der Kartoffeloxydase, Biochem. Z., 292, 221—229.
- Kurssanov A., 1941. Untersuchung enzymatischer Prozesse in der lebenden Pflanze, Advances in Enzymology, Interscience, New York, t. I, 329—370.
- Lerner A. B., 1953. Metabolism of Phenylalanine and Tyrosine, Advances in Enzymology, Interscience, New York—London, t. XIV, 73—128.
- Levy H., Schade A. L., Bergmann L., Harris S., 1948. Studies in the Respiration of the White Potato. II Terminal Oxidase System of Potato Tuber Respiration, Arch. Biochem., 19, 273—289.
- Mallette M. F., Dawson C. R., 1949. Highly Purified Mushroom Tyrosinase Preparation, Arch. Biochem., 23, 28—44.
- Mapson L. W., Goddard D. R., 1951. The Reduction of Glutathione by Plant Tissues., Biochem. J., 49, 592—601.
- Moustafa E. M., 1956. Ascorbic Acid and Glutathione as Respiratory Carriers in the Respiration of Pea Seedlings, Biochem. J., 62, 248—259.
- Martin E. M., Moton R. K., 1955. Cytochrome b_3 of Microsomes from Plant Tissues, Nature, 176, 113—114.
- Mason H. S., 1955a. Comparative Biochemistry of the Phenolase Complex, Advances in Enzymology, Interscience, New York—London, t. XVI, 105—184.
- Fowlks W. L., Peterson E., 1955b. Oxygen Transfer and Electron Transport by the Phenolase Complex, J. Am. Chem. Soc., 77, 2914—2915.
- 1956. Structure and Functions of the Phenolase Complex, Nature, 177, 79—81.
- 1957. Mechanism of Oxygen Metabolism, Advances in Enzymology, Interscience. New York—London, t. XIX. 79—233.
- Mikhlin D. N., Kolesnikov P. A., 1947. O dichatielnykh sistemach rastienji, Biochimia, 12, 542—564.
- Nelson J. M., Dawson C. R., 1944. Tyrosinase, Advances in Enzymology, Interscience, New York, t. IV, 99—152.
- Palladin W., 1908. Die Atmungspigmente der Pflanzen, Hoppe Seyl. Z., 55, 207—222.
- Reifer I., Solecka M., 1958. Oksydazy końcowe kielków pszenicy, Acta Biochim. Polon., 5, 277—293.
- Robinson E. S., Nelson J. M., 1944, Arch. Biochem., 4, 111—117, cyt. za pozycją No 16.
- Srinivasan M., 1936. Ascorbic Acid Oxidase from Drumstick, *Moringa pterygosperma*, Biochem. J., 30, 2077—2084.
- Sutter H., 1936. Polyphenol-Oxydase Ergcb. Enzymforsch., 5, 273—284.
- Szarkowski J. W., 1957a. Trypsin-Induced Cresolase Activity of Tyrosinase, Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences Cl., II-Vol. V, No 1, 1—3.
- 1957b. Aktywowanie tyrozynazy z ziaren żyta, Acta Biochim. Polon., Vol. IV. No 3, 129—134.
- Szent-Györgyi A., 1931a. On the Function of Hexuronic Acid in the Respiration of Cabbage Leaf., J. Biol. Chem., 90, 385—393.

- Vietorisz K., 1931b. Bemerkungen über die Funktion und Bedeutung der Polyphenoloxydase der Kartoffeln, *Biochem. Z.*, 233, 236—239
- Thimann K. V., Yocum, Hackett D. P., 1954. Terminal Oxidases and Growth in Plant Tissues. III. Terminal Oxidation in Potato Tuber Tissue, *Arch. Biochem. Biophys.*, 53, 239—257.
- Wagenknecht A. C., Burriss R. H., 1950. Indoloacetic Acid Inactivating Enzymes from Bean Roots and Pea Seedlings, *Arch. Biochem.*, 25, 30—53.
- Waygood E. R., 1950. Physiological and Biochemical Studies in Plant Metabolism. II Respiratory Enzymes in Wheat, *Can. J. Bot.*, 28, 7—62.
- Wieland H., Sutter H., 1930. Beiträge zur Wirkungsweise von Oxydasen und Peroxydasen (XXII Mitteil. über den Mechanismus der Oxydationvorgänge). *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 63, 66—75.
- Wosilait W. D., Nason A., 1954a. Pyridine Nucleotide — Quinone Reductase, I. Purification of the Enzyme from Pea Seeds, *J. Biol. Chem.*, 206, 255—270.
- Terrel A. J., 1954b. Pyridine Nucleotide-Quinone Reductase, II. Role in Electron Transport, *J. Biol. Chem.*, 206, 271—282.