ACTA AGROBOTANICA
Vol. XXIII, z. 1 — 1970

Aktywność proteolityczna wyciągów z jaryzowanych i nie jaryzowanych kiełków pszenicy

Proteolytic activity of extracts from vernalized and nonvernalized wheat germs

J. MYCZKOWSKI

Poznanie biochemicznego i fizjologicznego tła procesu jaryzacji w zakresie przemian związków azotowych u pszenicy wymaga ciągle jeszcze dalszych szczegółowych badań.

W pracy poprzedniej (Myczkowski 1967) stwierdzono między innymi wzrost aktywności proteaz nasion pszenicy ozimej pod wpływem działania temperatury jaryzacyjnej. Podobne wyniki uzyskali również inni autorzy (Błagowieszczenskij, Kiriłłowa 1955; Błagowieszczenskij, Kołobkowa 1951). Jak wiadomo, proces jaryzacji zlokalizowany jest w kiełkach, czego dowodzi możliwość uzyskania pełnego rozwoju roślin zbóż ozimych, pochodzących z kiełków izolowanych od endospermu i jaryzowanych na sztucznej pożywce (Gregory, Purvis 1938; Markowski, Ryka 1967). W oparciu o powyższe dane podjęto badania nad wpływem jaryzacji na aktywność proteaz w kiełkach pszenicy.

MATERIAŁ I METODYKA

Nasiona pszenicy ozimej 'Ostki Złotokłosej' oraz pszenicy jarej 'Ostki Chłopickiej' ze zbioru w 1966 roku kiełkowano w temperaturze 1,5°C w ciemności w specjalnych komorach jaryzacyjnych (Markowski 1962) oraz w temperaturze wykluczającej jaryzację (22°C) na szalkach Petriego w termostacie. Okres kiełkowania nasion w obu temperaturach oraz wartości suchej masy kiełków podano w tabeli 1. Po zakończeniu kiełkowania nasion kiełki izolowano od endospermu i wyciskano z nich sok za pomocą mikropraski. Podobnie jak w doświadczeniach opisanych w poprzedniej pracy (Myczkowski 1970) sok homogenizowano w ciągu 5 minut, a wszystkie czynności przeprowadzano w obniżonej temperaturze. Aktywność proteolityczną badano dwoma metodami (Singh 1962).

Tabela 1 — Table 1

Sucha masa kiełków izolowanych z nasion pszenicy, kiełkowanych w temperaturze 1,5°C oraz w temperaturze 22°C
Dry weight of embryos isolated from wheat seeds germinated at 1.5°C and 22°C

Obiekty Material	Temperatura kiełkowania nasion Temperature of seeds germination	Okres kiełkowania nasion	Sucha masa 100 kiełków w g Dry weight of 100 embryos in g
Pszenica ozima Winter wheat	1,5°C	52 dni 52 days	1,302
Pszenica jara Spring wheat	1,5°C	46 dni 46 days	1,248
Pszenica ozima Winter wheat	22°C	120—123 godziny 120—123 hours	1,256
Pszenica jara Spring wheat	22°C	119—121 godzin 119—121 hours	1,225

Metoda pierwsza polegała na przeprowadzeniu autolizy białka w soku kiełków. Sok rozcieńczano wodą destylowaną w stosunku objętościowym 1 : 4 i inkubowano w termostacie w temperaturze 37°C w ciągu 5 godzin, a następnie wytrącano białka 5% TCA przez 15 minut w temperaturze 0°C i wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C przy 1500 g celem oddzielenia białka od związków azotowych niebiałkowych. Po oddzieleniu supernatantu mikrossawką osad białkowy przemywano 5% TCA, powtórnie wirowano i ściągano supernatant, zawierający resztę azotu niebiałkowego. W ten sam sposób oddzielano azot białkowy od niebiałkowego w próbce kontrolnej (0 godzin autolizy) bezpośrednio po homogenizacji soku. Zawartość azotu białkowego w osadzie oraz azotu ogólnego w homogenizowanym soku z kiełków oznaczano metodą Kjeldahla. Zawartość azotu niebiałkowego wyliczano z różnicy między azotem ogólnym a białkowym. Analizy wykonano w 3 oddzielnych próbkach materiału roślinnego, a wyniki przedstawiono jako wartości średnie.

Drugim sposobem oznaczenia aktywności proteolitycznej soku kiełków była inkubacja surowej proteazy wobec 1% roztworu kazeiny w buforze (0,103 M fosforanu dwusodowego i 0,0485 M kwasu cytrynowego) przy pH 5,0. Sok wyciśnięty z kiełków wirowano przez 1 godzinę w temperaturze 4°C przy 10 000 g, a uzyskany supernatant (wyciąg enzymatyczny) ściągano mikrossawką i inkubowano z 1% roztworem kazeiny w stosunku objętościowym 1 : 4 w termostacie w temperaturze 27°C przez 24 godziny z dodatkiem chloroformu przy pH 5,0. Inkubowano również w tych samych warunkach wyciąg enzymatyczny bez kazeiny (kontrola) z wodą destylowaną w stosunku objętościowym 1 : 4. Azot

białkowy oddzielano od niebiałkowego tak samo jak w autolizatach. W wyciągu enzymatycznym oznaczono następujące frakcje azotowe przy pomocy metody Kjeldahla: azot ogólny, niebiałkowy i białkowy przed inkubacją oraz azot niebiałkowy po inkubacji bez kazeiny (kontrola). Aktywność proteazy wobec kazeiny oznaczono jako zawartość w inkubowanej próbce azotu niebiałkowego, uwolnionego z substratu. Zawartość tą oznaczono w 3 powtórzeniach metodą Kjeldahla.

WYNIKI BADAŃ

W tabeli 2 przedstawiono wpływ zróżnicowanej temperatury kiełkowania nasion na przebieg autolizy białka w soku kiełków pszenicy. Jako miarę aktywności proteolitycznej soku przyjęto ubytek zawartości azotu białkowego w czasie autolizy w odniesieniu do nie autolizowanej kontroli w przeliczeniu na mg oraz w procentach.

W soku kiełków pszenicy ozimej stwierdzono istotnie niższą zawartość azotu białkowego pod wpływem temperatury jaryzacyjnej zarówno przed autolizą, jak i po autolizie białka. Ubytek azotu białkowego wyliczony w mg oraz wprocentach był u jaryzowanych kiełków pszenicy ozimej istotnie wyższy w porównaniu z kiełkami nie jaryzowanymi.

U pszenicy jarej zawartość azotu białkowego była istotnie niższa przed autolizą białka soku kiełków w warunkach niskiej temperatury kiełkowania nasion w porównaniu z kiełkami, wyrosłymi w temperaturze 22°C, a po autolizie białka zawartość ta nie różniła się istotnie. Ubytek azotu białkowego w czasie autolizy był istotnie wyższy pod wpływem wyższej temperatury kiełkowania nasion.

Wyniki badań nad aktywnością surowej proteazy kiełków pszenicy przy zróżnicowanej temperaturze kiełkowania nasion podano w tabeli 3. Jako miarę aktywności proteazy przyjęto ilość azotu niebiałkowego, uwolnionego z kazeiny podczas inkubacji enzymu. Dla uzyskania tej wartości liczbowej przeprowadzono inkubację wyciągu enzymatycznego bez kazeiny, a ilość azotu niebiałkowego, pochodzącego z rozpadu białka rodzimego odjęto od ogólnej ilości azotu niebiałkowego, oznaczonego w próbce inkubowanej z kazeiną.

Aktywność proteazy przeliczona na 1 l wyciągu enzymatycznego była wprawdzie istotnie wyższa w kiełkach obu badanych odmian pszenicy pod wpływem niskiej temperatury kiełkowania nasion w porównaniu z temperaturą 22°C, lecz u odmiany ozimej różnice te były bardziej głębokie, niż u odmiany jarej.

W tabeli 3 podano również aktywność proteazy kiełków pszenicy w przeliczeniu na 1 g azotu białkowego, zawartego w inkubowanej próbce. Zawartość tę stanowiło białko rodzime wyciągu enzymatycznego

Tabela 2 — Table 2

Autoliza białka w soku kiełków pszenicy

Protein autolysis in wheat embryos sap

Obiekty Material	Azot w 1 ml soku w mg Nitrogen in 1 ml of sap, mg			Stosunek N białkowego do N niebiałkowego Ratio of protein N to non-protein N		Ubytek N białkowego po autolizie Loss of protein N after autolysis	
	Przed autolizą Before autolysis		Po autolizie After autolysis	Przed autolizą Before autolysis	Po autolizie After autolysis	mg	%
	N ogólny Total N	N białkowy Protein N	N białkowy Protein N				
Pszenica ozima kiełkowana w temperaturze 1,5°C Winter wheat germinated at 1,5°C	2,702	0,597	0,246	0,28	0,10	0,351	59
Pszenica jara kiełkowana w temperaturze 1,5°C Spring wheat germinated at 1,5°C	3,322	0,870	0,535	0,35	0,19	0,335	38
Pszenica ozima kiełkowana w temperaturze 22°C Winter wheat germinated at 22°C	1,923	0,756	0,544	0,65	0,39	0,212	28
Pszenica jara kiełkowana w temperaturze 22°C Spring wheat germinated at 22°C	2,414	0,963	0,487	0,66	0,25	0,476	49
Różnica istotna Significant difference		0,0596	0,0489				5,9

Tabela 3 — Table 3

Aktywność surowej proteazy z kiełków pszenicy
Activity of crude wheat embryo protease

Obiekty Material	Azot w 1 ml wyciągu enzymatycznego w mg Nitrogen in 1 ml of enzyme extract in mg					Jednostki aktywności proteazy* Protease activity units*	
	Przed inkubacją — Before incubation				N niebiałkowy po inkubacji bez kazeiny Non-protein N after incubation without casein		
	N ogólny Total N	N niebiałkowy Non-protein N	N białkowy Protein N	N kazeiny Casein N		na 1 l wyciągu enzymatycznego per 1 l of enzyme extract	na 1 g N białkowego per 1 g of protein N
Pszenica ozima kiełkowana w temperaturze 1,5°C Winter wheat germinated at 1,5°C	1,663	1,369	0,294	5,862	1,419	3994	649
Pszenica jara kiełkowana w temperaturze 1,5°C Spring wheat germinated at 1,5°C	1,732	1,338	0,394	5,862	1,543	3772	603
Pszenica ozima kiełkowana w temperaturze 22°C Winter wheat germinated at 22°C	1,548	1,165	0,383	5,862	1,361	1620	259
Pszenica jara kiełkowana w temperaturze 22°C Spring wheat germinated at 22°C	1,209	1,012	0,197	5,862	1,072	271,6	308
Różnica istotna Significant difference							43,6

* Jako jednostkę aktywności proteazy przyjęto ilość potrzebną do przyrostu zawartości azotu niebiałkowego o 1 mg przy inkubacji enzymu z 1% kazeiną w buforze (0,103 M fosforanu dwusodowego i 0,485 M kwasu cytrynowego) przez 24 godziny w 27° przy pH 5,0.

The unit of protease activity is defined as the amount required to give an increase of 1 mg in non-protein N when the enzyme was incubated with 1% casein in buffer (0,103 M disodium monohydrogen phosphate and 0,0485 M citric acid) for 24 hrs at 27°C at pH 5.0.

oraz białko kazeiny, dodane jako sztuczny substrat. Porównanie ilości azotu niebiałkowego w próbce inkubowanej bez kazeiny z ilością azotu ogólnego wyciągu enzymatycznego świadczy o tym, że białko rodzime uległo tylko częściowemu rozkładowi w czasie inkubacji, natomiast białko kazeiny było hydrolizowane bardzo intensywnie (ubytek kazeiny wynosił 28—68%). Powodem tego było zapewne wysokie stężenie sztucznego substratu, niemniej jednak stanowi to potwierdzenie opinii (S i n g h 1962) o przydatności kazeiny jako substratu do badań aktywności proteaz roślinnych.

Zawartość azotu białka rodzimego w wyciągach enzymatycznych badanych obiektów była zróżnicowana u pszenicy ozimej podobnie jak w soku, poddanym autolizie białka, natomiast u pszenicy jarej więcej białka zawierał wyciąg enzymatyczny z kiełków izolowanych z nasion kiełkowanych w niskiej temperaturze w porównaniu z temperaturą 22°C. Przyrost azotu niebiałkowego po inkubacji bez kazeiny był u wszystkich badanych obiektów wprost proporcjonalny do stężenia białka rodzimego w wyciągu enzymatycznym, natomiast zawartość azotu niebiałkowego, uwolnionego podczas inkubacji z kazeiny, była zróżnicowana w przeliczeniu na 1 g azotu białkowego podobnie jak po przeliczeniu na 1 l wyciągu enzymatycznego.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania nad aktywnością proteaz kiełków pszenicy przeprowadzone metodą autolizy białka oraz metodą inkubacji enzymu z kazeiną dały następujące wyniki: drogą autolizy białka stwierdzono istotny, stymulujący wpływ niskiej temperatury kiełkowania nasion na aktywność proteaz soku kiełków tylko u pszenicy ozimej, natomiast u pszenicy jarej wyższą aktywność proteolityczną wykazały kiełki w warunkach wyższej temperatury kiełkowania nasion. Podczas inkubacji proteaz z kazeiną aktywność enzymatyczna wzrastała istotnie pod wpływem następczym jaryzacyjnej temperatury kiełkowania nasion u obu badanych odmian pszenicy. Uwzględnić należy jednak fakt, że stężenie sztucznego substratu było jednakowe dla wszystkich badanych obiektów, a przed autolizą stężenie białka rodzimego w soku kiełków było zróżnicowane w poszczególnych obiektach. U pszenicy jarej intensywność autolizy białka była wprost proporcjonalna do jego stężenia, można więc przypuszczać, że przy jednakowych stężeniach substratu aktywność proteaz nie różniłaby się, mimo różnych warunków termicznych. Natomiast u pszenicy ozimej aktywność proteolityczna autolizowanego soku kiełków jaryzowanych była istotnie wyższa przy niższym stężeniu białka w porównaniu z sokiem kiełków nie jaryzowanych, które zawierały więcej białka

Spośród 4 badanych obiektów najwyższą aktywność proteolityczną — zarówno wobec białka rodzimego, jak też sztucznego substratu — stwierdzono w jaryzowanych kiełkach pszenicy ozimej. Wyniki badań nad aktywnością proteaz uzyskane dwiema metodami były zgodne w odniesieniu do pszenicy ozimej. Po uwzględnieniu tych rozważań oraz biorąc pod uwagę, że proces jaryzacji jest specyficzny tylko dla roślin ozimych, słuszne wydaje się przypuszczenie, że stwierdzony wzrost aktywności proteolitycznej kiełków pszenicy ozimej był nie tylko wynikiem działania niskiej temperatury kiełkowania nasion, ale pozostaje w związku z samym procesem jaryzacji.

Zakład Fizjologii Roślin PAN,
Kraków

(Wpłynęło dn. 11.2.1969 r.)

SUMMARY

The effect of vernalization on protease activity in winter wheat germs was investigated. As control served winter wheat germinated at a temperature excluding vernalization (22°C) and spring wheat germinated at both temperatures.

Protease activity was determined by two methods: the germs sap was subjected to autolysis, and the enzymic extract from the germs was incubated with casein. The diminution of protein nitrogen content after autolysis was adopted as measure of the proteolytic activity of the autolysed samples. The activity of crude protease towards casein was expressed as the amount of nonprotein nitrogen released from the substrate.

Results and conclusions

1. Protein autolysis indicated a significant stimulating effect of low temperature of seed germination on protease activity in the germs of winter wheat. In spring wheat this stimulating effect was exerted by a temperature of 22°C.

2. Protease activity towards casein was higher under low temperature germinating conditions as compared with a temperature of 22°C. The differences were more pronounced in winter than in spring wheat.

3. From among the four kinds of material investigated (tab. 2 and 3) the highest proteolytic activity was revealed by application of the two methods in vernalized germs of winter wheat.

4. It is believed that the noted increase in proteolytic activity of the winter wheat germs was not only due to the action of low temperature during seed germination but that it is also related to the process of vernalization itself.

Department of Plant Physiology,
Polish Academy of Sciences,
Cracow

LITERATURA

Błagowieszczenskij A. W., Kiriłłowa G. A., 1955, Wlijanije wremiennowo ochłażdenija na azotsoderżaszczije wieszczestwa zarodysza i endosperma ozimoj pszenicy, Dokł. AN SSSR, 100: 171.

Błagowieszczenskij A. W., Kołobkowa E. W., 1951, Izmienenije aktiwnosti i kaczestwa fiermentow pri prorastanij siemian, Tr. gł. bot. sada AN SSSR, 2: 73.

Gregory F. G., Purvis O. N., 1938, Studies in vernalization of cereals. II. The vernalization of excised mature embryos and of developing ears, Annal. of Botany, New Series, 2: 237.

Markowski A., 1962, Sterile vernalization of seeds for biochemical investigation, Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. biol., 10 (3): 95.

Markowski A., Ryka Cz., 1967, Metodyka wernalizacji izolowanych zarodków roślin uprawnych. Informator o wynikach badań naukowych zakończonych w 1966 r. Wydział Nauk Rolniczych i Leśnych, PWRiL, Warszawa.

Myczkowski J., 1967, Przemiany związków azotowych u pszenicy kiełkowanej w temperaturze 22°C oraz w temperaturze wernalizacji (1,5°C), Acta Agraria et Silvestria, Ser. Agraria, 7 (2): 33.

Singh S., 1962, Proteolytic activity of leaf extracts, Journ. Sci. Food Agric., 13 (6): 325.