Aktywność antyproteolityczna białek ziarniaków jęczmienia w czasie ich rozwoju

Anti-proteolytic activity of proteins from barley caryopses during their development

H. MARCINIAK

WSTĘP

Embrionalny rozwój roślin rozpoczyna się od momentu zapylenia i następującego po nim zapłodnienia komórki jajowej (Avery, Berger, Shalucha 1942; Modilewski 1950; Polakow i Michajłowa 1951), obejmuje okres formowania nasion i trwa do chwili ich kiełkowania. We wczesnym okresie tego rozwoju różnorodne substancje organiczne intensywnie dopływają z rośliny macierzystej do tworzącego się nasienia (Arutjunowa i Gubanow 1950; Britikow 1951, 1954; Grzesiuk 1961), w którym ulegają przekształceniu na związki tworzące strukturę komórki i substancje zapasowe. W tym czasie w woreczku zalążkowym nagromadza się zestaw enzymów o wyższej aktywności aniżeli w otaczających go tkankach. Powyższym procesom towarzyszy intensywna synteza białek — w pierwszym okresie biologicznie czynnych, a w miarę rozwoju ziarniaka — zapasowych (Grzesiuk 1967).

Intensywność przemiany materii w miarę rozwoju ziarniaka maleje. Spowodowane to jest stopniowym obniżaniem się aktywności enzymów, głównie dzięki pojawieniu się w ziarniakach inhibitorów (Grzesiuk 1967), których zadaniem jest regulacja procesów anabolicznych i katabolicznych w żywej komórce (Reifer, Muszyńska, Ber 1968). Inhibitory mogą mieć charakter drobnocząsteczkowy (Ferenczy 1957; Sumere 1960; Meyer & Poliakoff-Mayber 1963) lub są białkami tworzącymi z enzymami nieaktywne kompleksy (Rackis & Sasame 1962). W nasionach wielu gatunków roślin stwierdzono występowanie białkowych inhibitorów enzymów proteolitycznych. Ostatnio tego typu inhibitory wykryto w nasionach różnych gatunków roślin z rodziny *Gramineae*, m. in. w nasionach jęczmienia (Lorenc-Kubis 1969; Mejbaum-Katzenellenbogen i Marciniak 1969).

Celem tej pracy było zbadanie zachowania się białek oraz prześledzenie pojawienia się i narastania aktywności antyproteolitycznych w czasie rozwoju ziarniaków jęczmienia.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Użyte odczynniki chemiczne zostały podane w pracy Mejbaum-Katzenellenbogen i Marciniaka 1969.

Materiał roślinny

Badania prowadzono na rozwijających się nasionach jęczmienia browarnianego, odmiany 'PZHR', wysianego w 1968 r. w Wojewódzkiej Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Zebiszowie przez Katedrę Biologii i Przechowywania Nasion IHAR we Wrocławiu. Materiał zbierano od momentu wykłoszenia się jęczmienia aż do całkowitej dojrzałości nasion, pobierając próbki do badań w odstępach 3—4-dniowych.

Ekstrakcję białek z rozwijających się nasion jęczmienia przeprowadzano w ten sposób, że 2 g ziarniaków ucierano w moździerzu z 5 ml 0,9% NaCl i następnie wirowano przy 12 000 obr/min przez 20 min. Osad odrzucano.

Metody analityczne

Białko oznaczano turbidymetryczną mikrometodą taninową według Mejbaum-Katzenellenbogen 1955. Przebieg proteolizy mierzone w teście peptydowym według Mejbaum-Katzenellenbogen, Wilusza i Polanowskiego 1966. W 1 ml inkubatu znajdowało się 180 µg kazeiny, 1 µg enzymu i 20 µg białek ziarniaków jęczmienia. Inkubację prowadzono w 30°C w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,6. Reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie 1 ml odczynnika taninowego do 0,5 ml mieszaniny inkubacyjnej uzupełnionej do 1 ml 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,6 i w tym samym momencie rozpoczynano oznaczanie białka metodą taninową.

Ilość produktów nie reagujących z taniną obliczano z różnicy ilości białka oznaczonego w inkubacji przed i po reakcji.

Ilość białka przechodzącego do 0,15 M kwasu sulfosalicylowego oznaczano w ten sposób, że 1 ml wyciągu chlorkowego zadawano 1 ml 0,3 M kwasu sulfosalicylowego i po 10 min. wirowano przy 3000 obr/min. przez 10 min. W płynie nad osadu oznaczano białko mikrometodą taninową.

WYNIKI

Na wykresie I (ryc. 1) przedstawiono ilość białek ekstrahujących się do 0,9% NaCl z ziarniaków jęczmienia w czasie ich rozwoju. W pierw-

Ryc. 1. Ekstrakcja białek z rozwijających się ziarniaków jęczmienia do 0,9% NaCl
 Fig. 1. Proteins extracted into 0.9% NaCl during development of barley caryopses

szych dniach rozwoju zawartość białek spada, a od 9 do 33 dnia wzrasta i od tego momentu utrzymuje się na stałym poziomie stanowiąc 2,3% świeżej masy ziarniaków.

Na wykresie II (ryc. 2) przedstawiono kształtujące się w czasie rozwoju ziarniaków wzajemne stosunki między frakcją białek ekstrahujących się 0,9% NaCl i strącających się kwasem sulfosalicylowym oraz rozpuszczalnych w tym kwasie. Wartości na diagramie przedstawiono w procentach białek ekstrahowanych do chlorku sodu z ziarniaków pierwszego zbioru. Stężenie tych białek w pierwszych dniach rozwoju spada, nato-

Ryc. 2. Zachowanie się białek ziarniaków jęczmienia w czasie ich rozwoju

Fig. 2. Behaviour of proteins from barley caryopses during their development
 1 — Białka ekstrahujące się 0,9% NaCl (proteins extracted into 0.9% NaCl); 2 — białka strącające się kwasem sulfosalicylowym (proteins precipitated with sulphosalicylic acid); 3 — białka rozpuszczalne w kwasie sulfosalicylowym (proteins soluble in sulphosalicylic acid)

Ryc. 3. Narastanie aktywności antyproteolitycznych białek ziarniaków jęczmienia
 Fig. 3. Increase of anti-proteolytic activity of proteins from barley caryopses during their development

1 — aktywność antytrypsynowa (anti-trypsin activity); 2 — aktywność antychymotrypsynowa (anti-chymotrypsin activity). Za jednostkę aktywności inhibitora przyjęto hamowanie 1 μ g enzymu, który trawi w ciągu 10 min. w 30° w pH 7,6, w przypadku trypsyny 26 μ g, a w przypadku chymotrypsyny 50 μ g kazeiny

One unit of the inhibitor activity is defined as the amount of protein which inhibits the activity of 1 μ g of the enzyme which causes a degradation of 26 μ g (in case of trypsin) or 50 μ g (in case of chymotrypsin) of caseine during 10 min. at 30°, pH 7.6

miast od 9 do około 33 dnia, to jest do optycznej dojrzałości nasion, szybko wzrasta i po tym czasie utrzymuje się na stałym poziomie.

Białka przechodzące do kwasu sulfosalicylowego utrzymują się na stałym poziomie do 9 dnia rozwoju, następnie ich zawartość wzrasta do 33 dnia, po czym szybko obniża się.

Odmienne zachowują się białka strącające się kwasem sulfosalicylowym, których poziom ulega periodycznym wahaniom. Minima stężenia przypadają na 9 i 33 dzień, a maksima na 3, 23 i 44 dzień rozwoju. Wahania te wskazywałyby na zmianę charakteru białek strącających się kwasem sulfosalicylowym w czasie rozwoju ziarniaków i na wzajemne przechodzenie białek strącających i rozpuszczających się w tym kwasie.

Ponieważ aktywności antyproteolityczne występują w białkach strącających się kwasem sulfosalicylowym, zachowanie się w czasie rozwoju aktywności antytrypsynowej i antychymotrypsynowej białek ziarniaków jęczmienia przedstawiono w przeliczeniu na 1 mg białek strącających się kwasem sulfosalicylowym i w przeliczeniu na 1 g ziarniaków. Aktywności antytrypsynowa i antychymotrypsynowa białek strącających się kwasem sulfosalicylowym wykazują zgodny wzrost w czasie rozwoju ziarniaków.

Ryc. 4. Przebieg trawienia kazeiny trypsyną w obecności białek ziarniaków jęczmienia ekstrahowanych do 0,9% NaCl

Fig. 4. Time-course of casein degradation by trypsin in the presence of proteins extracted into 0.9% NaCl from barley caryopses

1 — próba właściwa, 20 μ g białek ziarniaków (sample containing 20 μ g of proteins from caryopses); 2 — próba kontrolna, bez białek ziarniaków (sample without proteins from caryopses). Inkubat zawierał białko ziarniaków zebranych w 26 dniu rozwoju. W 1 ml znajdowało się 180 μ g kazeiny, 1 μ g trypsyny, temperatura inkubacji 30°, pH 7,6

The incubation mixture contained proteins from caryopses collected on the 26th day of development, 1 ml contained 180 μ g casein, 1 μ g trypsin, the temperature was 30°, pH 7.6

Ryc. 5. Przebieg trawienia kazeiny alfa-chymotrypsyną w obecności białek ziarniaków jęczmienia ekstrahowanych do 0,9% NaCl

Fig. 5. Time-course of casein degradation by alfa-chymotrypsin in the presence of proteins extracted with 0.9% NaCl from barley caryopses

1 — próba właściwa, 20 μ g białek ziarniaków (sample containing 20 μ g of proteins from caryopses); 2 — próba kontrolna, bez białek ziarniaków (sample without proteins from caryopses). Inkubat zawierał białko ziarniaków zebranych w 38 dniu rozwoju. Warunki doświadczenia podano pod ryc. 4

The incubation mixture contained proteins from caryopses collected on the 38th day of development. Details of experiment given in Fig. 4

Wzrost aktywności właściwej zachodzi do 33 dnia rozwoju, a po tym czasie obie aktywności maleją (ryc. 3). Wzrastaniu aktywności antyproteolitycznych odpowiada obniżanie się procentowej zawartości białek strącających się kwasem sulfosalicylowym w białkach ekstrahowanych 0,9% NaCl. Przy rozpatrywaniu obu aktywności w odniesieniu do białek ekstrahowanych chlorkiem sodu lub strącających się kwasem sulfosalicylowym, zawartych w 1 g ziarniaków, uwidoczniają się rozbieżności w ich narastaniu. Aktywność antytrypsynowa osiąga szczyt w 26, natomiast aktywność antychymotrypsynowa w 38 dniu rozwoju. Na wykresie (ryc. 4) przedstawiono przebieg trawienia kazeiny trypsyną, a na ryc. 5 alfa-

-chymotrypsyną w obecności białek ziarniaków jęczmienia. W obu przypadkach uwidacznia się hamowanie powstawania produktów nie oznaczających się taniną (peptydy).

DYSKUSJA

Mejbaum-Katzenellenbogen i Lorenc-Kubis 1967 zastosowały do oznaczania białek nasion *Gramineae* mikrometodę taninową i wykazały, że zachodzi dobra zgodność wyników uzyskanych przy oznaczaniu białek przez pomiar zmętnienia, jaki dają kompleksy białko-taninowe i przez oznaczanie azotu tych kompleksów metodą Kjeldahla. Wykazano ponadto, że materiał białkowy oznaczający się taniną można rozfrakcjonować przez zastosowanie kwasu sulfosalicylowego lub tróchlorooctowego na dwie grupy. Grupę pierwszą stanowią białka strącające się tymi kwasami, które są odpowiednikiem „białka surowego” oznaczonego metodą Kjeldahla, a drugą stanowią polipeptydy lub glikoproteidy, które przechodzą do odbiałcza, oznaczają się taniną i zwykle łącznie z innymi drobnocząsteczkowymi związkami azotu są zaliczane do tak zwanego „azotu niebiałkowego”.

Całość materiału białkowego oznaczanego w tej pracy mikrometodą taninową w wyciągach chlorkowych ziarniaków jęczmienia zawiera zatem dwie frakcje — białkową i polipeptydową. W wyciągach odbiałczanych kwasem sulfosalicylowym pierwsza była obreślana jako „białko strącające się”, a druga jako „białko rozpuszczalne” w kwasie sulfosalicylowym.

Periodyczne wahania ilości białek wiążą się z dynamiką rozwoju zarodka, w którym skupia się większość enzymów ziarniaka. Pierwszy okres wzrostu białek związany jest z szybkim rozwojem ziarniaka, zarówno zarodka, jak i bielma, a tym samym nagromadzeniem się białek funkcjonalnych. Ponowny wzrost, przypadający na dojrzałość morfologiczną ziarniaków, wiąże się z rozbudowaniem aparatu enzymatycznego, szczególnie w zarodku i warstwie aleuronowej bielma. W tym samym czasie następuje gromadzenie inhibitorów typu białkowego, blokujących działanie enzymów w chwili wchodzenia ziarniaków w okres spoczynku.

Zachowanie się polipeptydów można tłumaczyć ich powiązaniem z syntezą białek zapasowych. Polipeptydy mogą stanowić formę transportową materiału białkowego syntetyzowanego w zielonych częściach rośliny. W początkowym okresie rozwoju ziarniaka synteza białek strukturalnych wyprzedza gromadzenie białek zapasowych (Grzesiuk 1967). W tym okresie stężenie polipeptydów nie wykazywało zmian. Późniejsze wzrastanie stężenia polipeptydów w ziarniakach przebiegało zgodnie z rozwojem bielma i magazynowaniem w nim substancji zapasowych. W okresie dojrzałości morfologicznej stężenie polipeptydów

Tabela 1 — Table 1

Zachowanie się aktywności antyproteolitycznych białek ziarniaków jęczmienia
w czasie rozwoju

Anti-proteolytic activity of proteins from barley caryopses during
their development

Dni rozwoju Days of development	Białko strącające się 0,15 M SSA Proteins precipi- tated with 0,15 M SSA		Jednostki aktywności Units of activity					
	w 1 mg białka ekstr. do 0,9% NaCl in 1 mg protein extrac- ted into 0,9% NaCl	w prze- liczeniu na 1 g ziarnia- ków calcula- ted for 1 g of caryop- ses	w 1 mg białek ekstrahowanych do 0,9% NaCl in 1 mg proteins extracted into 0,9% NaCl		w 1 mg białek strącających się 0,15 M SSA (aktywność właściwa) in 1 mg proteins precipitated with 0,15 M SSA (specific activity)		w przeliczeniu na białko strącające się 0,15 M SSA zawarte w 1 g ziarniaków calculated for protein precipi- tated with 0,15 M SSA from 1 g caryopses	
			antryp- synowe anti- trypsin	antychy- motryp- synowe anti- chymo- trypsin	antytryp- synowe anti- trypsin	antychy- motryp- synowe anti- chymo- trypsin	anty- trypsy- nowe anti- trypsin	antychy- motryp- synowe anti- chymo- trypsin
3	0,927	10,2	19	0	20	0	204	0
5	0,866	5,2	36	8	42	9	218	47
9	0,800	4,8	48	20	59	25	283	120
12	0,714	5,0	59	24	32	34	410	170
16	0,579	5,5	66	25	114	43	627	236
19	0,543	7,6	70	26	129	48	980	365
23	0,520	10,4	72	29	139	56	1446	582
26	0,447	9,7	73	32	162	72	1571	698
30	0,272	6,0	56	34	203	125	1218	750
33	0,200	4,6	49	37	244	185	1122	851
38	0,408	9,4	45	42	110	103	1034	968
40	0,426	9,8	41	33	97	77	950	754
44	0,480	11,3	40	25	84	52	949	588

gwałtownie obniżało się przy równoczesnym wyraźnym wzroście stężenia frakcji „białkowej”, pomimo zatrzymania dopływu substancji odżywczych z rośliny. Synteza białka przebiega zatem kosztem polipeptydów. Materiał białkowy oznaczany metodą taninową w wyciągach chlorowych ziarniaków po 33 dniu rozwoju utrzymuje się na stałym poziomie, a zachodzące zmiany dotyczą jedynie obu badanych frakcji.

Przebieg narastania aktywności antytrypsynowej i antychymotrypsynowej w czasie rozwoju ziarniaka jest podobny do zachowania się frak-

cji polipeptydowej. Obie aktywności pojawiają się w białkach ziarniaków prawie równocześnie w bardzo wczesnym stadium rozwoju, osiągają maksimum w tym samym dniu co i polipeptydy i następnie wykazują tendencje zniżkowe. Ich dynamiczny wzrost, trwający do 33 dnia rozwoju ziarniaka, może być uważany za wstępny proces przygotowujący ziarniaki do okresu spoczynku, osiąganego zablokowaniem enzymów przez inhibitory. Spadek aktywności antyproteolitycznych po osiągnięciu przez ziarniaki dojrzałości morfologicznej nie oznacza zmniejszenia się ilości inhibitorów w białkach ziarniaka. Zjawisko to prawdopodobnie jest objawem łączenia się w tym okresie inhibitorów z odpowiednimi proteazami, co ujawnia się utratą aktywności zarówno inhibitorów, jak i enzymów. Wcześniejsze osiąganie maksimum przez aktywność antytrypsynową od aktywności antychymotrypsynowej, przy rozpatrywaniu tych aktywności w odniesieniu do białek, przechodzących do chlorku sodu i do białek strącających się kwasem sulfosalicylowym, zawartych w 1 g ziarniaków, świadczyłoby o wcześniejszym blokowaniu proteaz o aktywności trypsynowej od proteaz o aktywności antychymotrypsynowej, jak również o tym, że inhibitory te są różnymi białkami.

STRESZCZENIE

Zawartość białek w ziarniakach jęczmienia wykazuje dynamiczne zmiany w zależności od stadium rozwoju. Ilość białek ekstrahowanych chlorkiem sodu w pierwszych dniach rozwoju maleje, a następnie wzrasta i w okresie dojrzałości morfologicznej ziarniaków utrzymuje się na stałym poziomie. Zawartość białek rozpuszczalnych w kwasie sulfosalicylowym nie wzrasta do 9 dnia rozwoju, w następnym okresie ilość ich rośnie i od chwili dojrzałości morfologicznej ulega spadkowi. Natomiast poziom białek strącających się kwasem sulfosalicylowym ulega w czasie rozwoju ziarniaków periodycznym wahaniom.

Aktywność antytrypsynowa i antychymotrypsynowa białek ziarniaków pojawia się w pierwszych dniach rozwoju i dynamicznie wzrasta do chwili dojrzałości morfologicznej nasion, a potem spada.

Pani Profesor dr Wandzie Mejbau-Katzenellenbogen składam serdeczne podziękowanie za cenne wskazówki udzielane w czasie wykonywania i pisanja tej pracy.

*Katedra Biochemii
Uniwersytetu Wrocławskiego*

(Wpłynęło dn. 15.5.1969 r.)

SUMMARY

Dynamic changes occur in the protein content of barley caryopses in different stages of their development. In the first period a successive decrease of proteins extracted into NaCl has been observed followed by their increase in the next period. A constant level of these proteins appeared in the stage of morphologic ma-

turity. An increase of proteins soluble in sulphosalicylic acid was observed starting from the 9-th day of development but when the seeds reached their maturity a decrease of these proteins occurred. However, proteins precipitated with sulphosalicylic acid showed periodical fluctuations during development.

The anti-trypsin and anti-chymotrypsin activity of proteins from caryopses appeared in the first days of the development and rapidly increased up to the stage of morphologic maturity of the seeds. Then a successive decrease of these activities was observed.

LITERATURA

- Avery G. S., Berger J., Shalucha B., 1942, *J. Bot.* 9: 765.
Arutjunowa L. G., Gubanow G. J., 1950, *Agrobiologia* 6.
Britikow E. A., 1951, *DAN SSSR* 3: 1037.
Britikow E. A., 1954, *Trudy IFR AN SSSR* 2.
Ferenczy L., 1957, *Acta Biol. Hung.* 8: 31.
Grzesiuk St., 1961, *Zesz. Nauk. WSR w Olsztynie*, 104: 3.
Grzesiuk St., 1967, *Fizjologia nasion*, PWRiL, Warszawa.
Grzesiuk St., Rejowski A., 1960, *Roczn. Nauk. Roln.* 13: 137.
Lorenc-Kubis I., 1969, *Acta Soc. Bot. Pol.* 1: 166.
Mejbaum-Katzenellenbogen W., 1955, *Acta Biochim. Polon.* 2: 297.
Mejbaum-Katzenellenbogen W., Lorenc-Kubis I., 1967, *Acta Soc. Bot. Pol.* 36 (2): 285—293.
Mejbaum-Katzenellenbogen W., Marciniak H., 1969, *Acta Soc. Bot. Pol.* 38 (3): 535—545.
Mayer A. M. & Poliakoff-Mayber A., 1963, *The germination of seeds*, Pergamon Press Oxford, London—New York—Paris.
Modilewski J. S., 1950, *Izw. AN SSSR, Ser. Biol.* 2: 23.
Polakow I. M., Michajłowa P. W., 1951, *Izw. AN SSSR* 1: 31.
Rackis J. J. & Sasame H. A., 1962, *Archives Biochem. Biophys.* 98: 471.
Sumere C. F., 1960, *Phenolics in plants in health and disease*, Pergamon Press Oxford.
Reifer I., Muszyńska G., Ber E., 1968, *Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol.* 1: 9.