Występowanie i aktywność arginazy w roślinach wyższych

The occurrence and activity of arginase in higher plants

G. MORAWSKA, K. KLECZKOWSKI i I. REIFER

Odkrycie w ostatnich latach powszechnego występowania cyklu ornitynowego nie tylko w organizmach zwierzęcych, lecz także w drobnoustrojach i roślinach wyższych rozszerzyło i pogłębiło nasze pojęcia o uniwersalnym znaczeniu enzymatycznego rozkładu argininy w żywych organizmach. Arginaza, jako jeden z enzymów tego cyklu, katalizujący rozkład argininy do ornityny i mocznika była szczegółowo badana w narządach organizmów zwierzęcych, (P. P. Cohen i G. W. Brown 1960). Natomiast prace nad tym enzymem w roślinach wyższych są nieliczne. W piśmiennictwie znajduje się niewiele danych dotyczących występowania arginazy w roślinach rodziny motylkowych, sosnowatych, psiankowatych i pojedynczych przedstawicieli kilku innych rodzin. Biorąc pod uwagę powszechne występowanie innych enzymów cyklu ornitynowego w roślinach wyższych, jak np. transkarbamyłazy ornitynowej (E. Klimowicz 1961) i zależność między aktywnością arginazy i syntezą alkaloidów (Jindra i inni 1959), przeprowadzono badania nad występowaniem tego enzymu u kilkudziesięciu roślin 12 rodzin botanicznych w nasionach suchych, nasionach podkiełkowanych i w młodych kiełkach.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem doświadczalnym były nasiona z Centrali Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa. Arginazę oznaczano w nasionach powietrznie suchych, w nasionach kiełkowanych w temp. 18° na sączkach z równomiernym dopływem wody, wykazujących pierwsze wzrokowo dostrzegalne objawy kiełkowania i w zielonych kiełkach o wieku 6—21 dni, rosnących w piasku bez pożywki.

Zasada metody: arginaza wyciągów z materiału roślinnego katalizuje hydrolizę argininy dodanej z zewnątrz do ornityny i do mocznika. Mocznik za pomocą ezogennej ureazy ulega rozkładowi do amoniaku i do dwutlenku węgla, po czym amoniak oznacza się mikrometodą dyfuzyjną wg Conwaya (1947).

Odczynniki:

1. Bufor maleinowy. 1,16 g kwasu maleinowego rozpuszczono w około 50 ml wody redestylowanej, doprowadzono do $\text{pH} = 9,7-9,8$ za pomocą 0,1 N NaOH i rozcieńczono wodą do około 100 ml. Do 5 ml 2 M MnSO_4 wlano powoli cienkim strumieniem roztwór kwasu maleinowego, mieszając nieprzerwanie, aby uniknąć wytrącenia osadu MnO_2 . Mieszaninę uzupełniano wodą redestylowaną do 200 ml w kolbce miarowej. Tak sporządzony bufor ma $\text{pH} = 6,6$. Bezpośrednio przed użyciem, 2 ml podstawowego buforu zadano 5 ml 0,005 N NaOH i uzupełniono w kolbce miarowej wodą redestylowaną do 100 ml; pH rozcieńczonego buforu wynosi 7,0.

2. 0,5 M roztwór L (+) argininy firmy Hoffmann-La Roche. 8,71 g argininy rozpuszczono w wodzie redestylowanej, doprowadzono za pomocą 0,2 N HCl do $\text{pH} = 10,0$ i uzupełniono w kolbce miarowej do 100 ml.

600 mg nasion suchych bądź też podkiełkowanych rozcierano w moździerzu przez 30 minut z 10 ml rozcieńczonego buforu maleinowego. Analizy wykonano na 2 poziomach w celu uchwycenia optymalnego stężenia enzymu. Do 1 ml lub też do 0,5 ml przesączu (uzupełnionego do 1 ml buforem maleinowym) w małej probówce dodano 0,5 ml roztworu argininy i inkubowano w temp. 38° przez 2 godziny. Następnie zakwaszano do $\text{pH} = 6,6$ za pomocą 1 ml 0,2 N HCl, dodano 2 ml roztworu preparatu ureazy i mocznik oznaczano w 4 powtórzeniach metodą Conway'a, stosując 1 ml próby do każdego oznaczenia. Próbę kontrolną wykonano w identyczny sposób, z tym że 1 ml, bądź też 0,5 ml przesączu zawierającego arginazę inaktywowano termicznie na łaźni wodnej przez 5 minut.

Obliczenie:

$$\text{Aktywność arginazy w mg mocznika na 1 g suchej masy} = \frac{a \cdot 137250}{c \cdot d}$$

gdzie: a = ml 0,01017 N HCl w próbie pełnej minus próba ślepa,

c = mg materiału w próbie badanej,

d = sucha masa w %.

Aktywność arginazy zielonych kiełków oznaczono w proszkach acetonowych sporządzonych w następujący sposób: zważone zielone kiełki zamrożono w moździerzu umieszczonym w naczyniu z suchym lodem i denaturatem i rozbito następnie tłuczkiem na proszek. Szybko przeniesiono do uprzednio chłodzonego homogenizatora i homogenizowano z zimnym acetonem o temp. około -18° (150 ml acetonu na 10 g roślin) przez 30 sekund. Aceton odsączono na sączku Büchnera, a homogenizowanie i sączenie powtórzono jak wyżej. Otrzymany proszek rozłożono w cienkiej warstwie na bibule w celu szybkiego odparowania acetonu.

Suchy i zważony proszek umieszczono w eksykatorze nad CaCl_2 i po wypowietrzeniu przechowywano w zamrażarce.

200 mg proszku mieszano za pomocą mieszadła elektrycznego z 10 ml buforu maleinowego i aktywność arginazy badano na 2 poziomach w 1 ml płynu, odpowiadającemu 10 mg lub też 20 mg proszku. Dalszy tok postępowania był identyczny jak w materiale z nasion.

Obliczenie:

Aktywność arginazy w mg mocznika na 1 g suchej masy =
$$\frac{a \cdot 137250 \cdot b}{c \cdot d}$$

gdzie: a , c i d jak wyżej, b = mg proszku acetonowego z 1 g świeżej masy.

WYNIKI I DYSKUSJA

W tablicy 1 przedstawione są wyniki dotyczące występowania i aktywności arginazy w nasionach suchych, nasionach kiełkujących i w zielonych młodych kiełkach 30 roślin należących do 12 rodzin botanicznych.

Zgodnie z pracami Guittona (1957, 1959), który badał aktywność tego enzymu w nasionach roślin nagozalążkowych, wykazano, że we wszystkich badanych roślinach, które zawierają arginazę w nasionach suchych, następuje bardzo szybki przyrost aktywności w początkowych okresach kiełkowania. Już po upływie jednej doby od namoczenia nasion przyrosty te są bardzo znaczne i tak w przypadku grochu lub żyta stwierdzono koło 8-krotnie większą aktywność aniżeli w nasionach suchych. Najwyższą aktywność arginazy wykazano w roślinach rodziny *Papilionaceae* zarówno w nasionach suchych, jak i podkiełkowanych. Nasiona roślin zbożowych rodziny *Graminae* mają również bardzo aktywną arginazę w nasionach podkiełkowanych, natomiast aktywność w nasionach suchych jest znacznie niższa aniżeli w nasionach rodziny *Papilionaceae*. W maku i słoneczniku nie wykryto albo prawie nie wykryto aktywności arginazy w nasionach suchych i podkiełkowanych. Interpretacja tego zgoła nieoczekiwanego wyniku obserwacji nie jest chwilowo możliwa, ponieważ być może w pewnych okresach rozwoju roślin specyficzne inhibitory mogą hamować czynność arginazy *in vitro*. Brak aktywności tego enzymu w pewnych okresach rozwoju roślin nie jest więc jednoznaczny z jego nieobecnością, szczególnie że np. w nasionach maku nie wykazano żadnej aktywności, natomiast w 12-dniowych kiełkach stwierdzono znaczną czynność arginazową. Na odwrót w nasionach sałaty gruntowej pewna wprawdzie nieznaczna aktywność arginazy zanika zupełnie w kiełkach 14-dniowych.

Niespodziewanie wysoką aktywność wykazały młode kiełki szpinaku, w których przyrost w porównaniu z suchymi nasionami był blisko 100-krotny. Kiełki szpinaku będą mogły służyć w przyszłości jako materiał

Tabela 1 — Table 1

Aktywność arginazy w nasionach suchych, kiełkujących i częściach zielonych roślin, wyrażona w mg mocznika na 1 g suchej masy

Arginase activity in dry seeds, germinating seeds and seedlings, expressed in mg urea per 1 g of dry matter

Nazwa rodziny	Nazwa rośliny	Aktywność nasion suchych	Nasiona kiełkowane		Rośliny zielone	
			czas kiełkowania w dobach	aktywność	wiek roślin w dobach	aktywność
1	2	3	4	5	6	7
<i>Papilionaceae</i>	Groch (Majowy)	1,97	1	17,60	6	9,98
	Fasola (Zielonostrączkowa)	19,15	2	56,57	15	59,62
	Łubin słodki wąskolistny	3,84	1	35,00	15	47,18
	Bielak					
	Łubin gorzki wąskolistny	5,63	1	29,48	15	48,22
	Bielak					
	Koniczyna biała	14,13	1	33,93	nie oznaczono	
	Lucerna chmielowa	2,82	2	9,00	nie oznaczono	
<i>Chenopodiaceae</i>	Szpinak Gaudry	1,36	2	5,30	14	128,21
<i>Umbeliferae</i>	Marchew	1,72	7	3,60	17	9,28
	Lenka					
	Pietruszka	6,57	2	14,57	15	34,37
	Lenka					
	Kminek	0,81	1	1,44	15	22,90
	Koper ogrodowy	1,54	8	12,48	14	44,29
	Seler korzeniowy Praski	2,96	8	4,08	16	11,16
<i>Cucurbitaceae</i>	Ogórek Przybyszewski	1,07	2	7,70	15	49,65
	Dynia Ogrodowa olbrzymia	3,56	3	9,14	23	30,07
<i>Cruciferae</i>	Kapusta					
	Amager	1,36	4	2,46	14	13,33
	Rzodkiewka	3,99	1	5,16	10	27,87
<i>Liliaceae</i>	Cebula Wolska	2,95	2	16,09	17	18,42

(c.d. tabeli 1)

1	2	3	4	5	6	7
<i>Graminae</i>	Pszenica jara					
	Opolska	0,32	1	1,86	9	10,26
	Żyto	1,56	1	15,69	10	21,18
	Owies	1,79	2	14,09	10	16,53
	Rajgras włoski	1,06	7	1,62	17	6,38
	Kukurydza					
	Złota Karłowa	3,61	2	14,79	13	0,00
<i>Solanaceae</i>	Pomidor Boun-					
	ty Original	21,19	5	28,98	25	1,70
	Tytoń ozdobny	1,14	2	4,13	nie oznaczono	
	Ziemniaki	nie oznaczono			20	48,61
<i>Tiliaceae</i>	Lipa omszona	zerwane 4.VI.1962				
	liście					6,42
<i>Papaveraceae</i>	Mak	0,03	1	0,18	12	8,84
<i>Poligonaceae</i>	Szczaw	0,00	4	1,01	18	0,00
<i>Compositae</i>	Salata grunto-					
	wa Królowa					
	majowych	0,96	3	0,96	14	0,00
	Słonecznik					
	ogrodowy	0,00	7	0,00	14	0,00

wyjściowy do otrzymania wysoko oczyszczonych preparatów arginazy, ponieważ ich aktywność obliczona na 1 g suchej masy jest 15 razy wyższa aniżeli aktywność mączki z *Canavalia ensiformis* do tej pory uznanej w piśmiennictwie jako najbogatsze źródło tego enzymu z materiału roślinnego.

Rośliny tych samych rodzin botanicznych wykazują znaczne rozpiętości w zawartości arginazy zarówno w nasionach, jak i w kielkach. Tak na przykład nasiona grochu wykazują 10 razy niższą aktywność aniżeli nasiona fasoli i podobnie nasiona pszenicy jarej i kukurydzy.

Wreszcie należy zaznaczyć, że w niektórych roślinach aktywność arginazy w zielonych kielkach gwałtownie opada lub nawet zupełnie zanika, np. w pomidorze i kukurydzy. Obniżenie aktywności enzymu z wiekiem rośliny zaznacza się szczególnie wcześniej i wyraźniej w młodych kielkach pszenicy. 11-dniowe kielki zawierają zaledwie 40% aktywności wykrytej w kielkach 9-dniowych (Tabela 2).

Jak już zaznaczono, aktywność arginazy w zielonych kielkach badana była w preparowanych proszkach acetonowych, a nie bezpośrednio na wyciągach jak w przypadku nasion suchych i podkiełkowanych. Mimo że aktywność proszków acetonowych jest około 20—25% niższa aniżeli

Tabela 2 — Table 2

Aktywność arginazy w proszkach acetonowych z kielków pszenicy, wyrażona w mg mocznika na 1 g suchej masy

Arginase activity in acetone powder from wheat blades, expressed in mg urea per 1 g of dry matter

Materiał	Wiek w dniach	Aktywność w mg mocznika/g s.m.	Wiek w dniach	Aktywność w mg mocznika/g s.m.	Różnica w %
Kielki pszenicy (jara Opolska)	9	10,27	11	4,03	39,2

wyciągów ze świeżego materiału roślinnego (Tabela 3), to jednak w opisanej pracy stosowano proszki acetonowe. Można je bowiem przechowywać w niskich temperaturach przez dłuższy okres czasu bez straty aktywności i ponadto można na nich również oznaczać ornitynę jako drugi produkt hydrolizy argininy, bez uciekania się do uciążliwego chromatograficznego rozdzielania aminokwasów (Reifer i Buraczewska 1959), co jest wykluczone na materiale świeżym ze względu na

Tabela 3 — Table 3

Aktywność arginazy w świeżej masie i w proszkach acetonowych kielków pszenicy, wyrażona w mg mocznika na 1 g suchej masy

Arginase activity in fresh weight and acetone powder from wheat blades, expressed in mg urea per 1 g of dry matter

Materiał	Aktywność w mg mocznika na 1 g s.m.	
	9-dniowe kielki	11-dniowe kielki
Świeża masa	13,08	5,38
Proszek acetonowy	10,27	4,03
Proszek acetonowy przechowany 26 dni w temp. —18°	—	3,96

zawartość znacznych ilości wolnych aminokwasów przeszkadzających w oznaczeniu ornityny. Ornitynę oznaczono obok mocznika i uzyskano wyniki w granicach 95—110%, co jednoznacznie wskazuje na enzymatyczną reakcję hydrolizy egzogenego substratu za pomocą arginazy zawartej w badanych roślinach.

Znaczne różnice w aktywności arginazy w nasionach i kielkach roślin tych samych rodzin botanicznych, różnice w aktywności enzymu w różnych okresach rozwoju tej samej rośliny, wreszcie zupełny brak aktywności u niektórych przedstawicieli świata roślinnego, jak słonecznik (Tabela 1) lub *Sterratia mercescens* (Glasz i u 1956) są do tej pory zupełnie nie wyjaśnione. Nieliczne dane z piśmiennictwa wskazują na to, że rośliny zawierające znaczne ilości wolnej argininy wykazują niską aktywność arginazy i na odwrót rośliny o wysokiej aktywności arginazy zawierają mało wolnej argininy. Nasiona grochu zawierają dużo argininy (Hyde 1954) i wykazują niską aktywność arginazy (Tabela 1). Podobnie kalafior hodowany na glebie z niedoborem Mn^{++} gromadzi znaczne ilości argininy (Hewitt 1949), a *Datura stramonium* po dodaniu soli manganu do gleby wykazuje spadek zawartości wolnej argininy i przyrost aktywności arginazy (Jindra i inni 1959). Ta zależność między enzymem i substratem jest ciekawa i godna uwagi i chociaż nie tłumaczy ona szerokiej rozpiętości wspomnianych zjawisk, to jednak może stanowić punkt wyjściowy do dalszych badań.

Katedra Biochemii SGGW

Warszawa

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

(Wpłynęło dn. 6.10.1962 r.)

SUMMARY

1. Arginase activity was determined in dry seeds, in germinating seeds and in young seedlings of 30 plant species belonging to 12 botanical families.
2. Germinating seeds show invariably much higher arginase activity than dormant seeds.
3. No arginase activity could be detected in sunflower and poppy seeds. Young spinach seedlings have shown highest arginase activity of all investigated plants.
4. Arginase activity in seeds of plants belonging to the same family may be widely different.
5. Extracts from acetone powders show 20—25% less activity than extracts prepared directly from fresh material.
6. A possible relation between the arginine level and arginase activity in the plant is tentatively suggested.

Department of Biochemistry,
Central College of Agriculture, Warsaw
Institute of Biochemistry and Biophysics,
Polish Academy of Sciences

LITERATURA

- Cohen P. P., Brown G. W., 1960, Ammonia Metabolism and Urea Biosynthesis. Comparative Biochemistry, 2:161—244, Edited by Marcel Florkin and Howard S. Mason. Academic Press.
- Conway E. G., 1947, Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, London.
- Glasziou K. T., 1956, The Metabolism of Arginine in *Serratia marcescens* I. Pathways of Synthesis and Degradation, Austral. J. Biol. Sci. 9(1):117.
- Guillon Y., 1957, Sur la métabolisme azoté des Gymnospermes, Presence de l'arginase dans les graines. Compt. Rend., 245, 1157.
- Guillon Y., 1959, Sur le métabolisme azoté des Gymnospermes. Variations de l'activité arginasique et de la teneur en certains aminoacides au cours de la germination des graines de *Pinus pinaster*, Compt., Rend. 248, 590.
- Hyde T. G., 1954—5, Nitrogen Metabolism in *Pisum sativum*, Proc. Roy., Soc., Edinburgh 65 B:299—316.
- Jindra A., Zadrazil S., Jiraček V., Srovní I., 1959, Biosynthesis of Alkaloids. III. Influence of Manganese ions on Arginase Activity, Alkaloid content and Nitrogen Metabolism in Jimson Weed (*Datura stramonium*), Planta Med., 174—84.
- Klimowicz E., 1961, Praca magisterska. Katedra Biochemii SGGW.
- Reifer I., Buraczewska L., 1959, Mikrometoda oznaczania ornityny, Acta Bioch. Pol. 6(2):219—226.