Aktywność arginazy i zawartość argininy w grochu i pszenicy

Arginase activity and arginine content in green peas and wheat

B. WIELGAT, G. MORAWSKA-MUSZYŃSKA, I. REIFER

W ostatnich latach stwierdzono powszechne występowanie cyklu ornitynowego w roślinach wyższych (Buraczewski, Kleczkowski, Reifer 1960; Fotyma, Kleczkowski, Reifer 1961; Morawska, Kleczkowski, Reifer 1963; Reifer, Kleczkowski, Klimowicz, Zielińska 1963). Między innymi wykazano obecność arginazy w 30 roślinach, należących do 12 rodzin botanicznych. (Morawska, Kleczkowski, Reifer 1963). Stwierdzono, że aktywność arginazy wykrytej w materiale roślinnym jest znacznie wyższa przy dodatku środków redukujących, jak np. cysteina i w związku z tym wprowadzono termin „arginaza wykrywalna“, w oznaczeniach bez dodatku cysteiny i „arginaza całkowita“ w oznaczeniach z dodatkiem cysteiny (Reifer, Morawska 1963).

W jednej z poprzednich prac (l.c.) opisano nowy, bardzo aktywny inhibitor, wykryty w nasionach słonecznika. Inhibitor ten hamował enzymatyczną aktywność arginazy. Czynność tego enzymu była w pełni przywrócona w obecności cysteiny. Przyjmując, że inhibitor arginazy występuje powszechnie w materiale roślinnym w większym lub mniejszym stopniu, postanowiono przebadać całkowitą i wykrywalną aktywność arginazy w pełnym okresie rozwoju dwóch roślin, a mianowicie grochu i pszenicy.

MATERIAŁ I METODY

Groch, odmiany 'Lincoln' i pszenicę jarą hodowano w krystalizatorach na piasku, w temperaturze pokojowej, dokarmiając pożywką Knoppa. Ponieważ po 15 dniach zaobserwowano zmiany degeneratywne u obu roślin, przeto dalsze badania prowadzono z roślinami rosnącymi w warunkach polowych.

Oznaczanie aktywności arginazy

Odważoną ilość nasion suchych (0,5—1,0 g), nasion podkiełkowanych (0,2—1,0 g) i zielonych części roślin (1,0—3,0 g) rozcierano dokładnie w moździerzu przez 30 minut w temperaturze pokojowej z 10 ml buforu

maleinowego. Następnie wyciąg sączono przez watę i do oznaczeń pobierano 0,5 lub 1,0 ml. Do oznaczeń arginazy całkowitej dodawano przed rozcieraniem 5—10 mg cysteiny. Aktywność arginazy oznaczano uprzednio opisaną metodą (Morawska, Kleczkowski, Reifer 1963). Otrzymany w wyniku enzymatycznej hydrolizy mocznik był rozkładany przez dodatek egzogennej ureazy i powstały amoniak oznaczano metodą Conwaya (1947).

Zawartość N-całkowitego rozpuszczalnego w wodzie

N-całkowity oznaczano przy pomocy odczynnika Folina, metodą opisaną przez Lowry i innych (1951).

Oznaczenie argininy

Argininę oznaczano zmodyfikowaną metodą Dubnoffa (Borsook, Dubnoff 1941). Opisana poniżej modyfikacja umożliwiła otrzymanie równoległych i powtarzalnych wyników.

Odczynniki:

1. Bufor fosforanowy do ekstrakcji argininy z materiału roślinnego. 2,721 g KH_2PO_4 , 5,224 g K_2HPO_4 i 14,912 g KCl rozpuszczono w wodzie destylowanej i uzupełniono do 1 litra. pH buforu = 7,0.

2. Odczynniki do odbiałczania wyciągu:

a) 26,2 g $3 \text{ CdSO}_4 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O}$ i 132 ml $1 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ dopełniono wodą do 1 litra,

b) 0,55 N NaOH do neutralizacji.

3. Odczynniki do oznaczania kolorymetrycznego:

c) 0,1% α -naftol w alkoholu absolutnym,

d) 10% roztwór mocznika w wodzie (bezpośrednio przed użyciem mieszano 5 ml c z 20 ml d.).

e) Roztwór podbrominu. 0,3 ml bromu dopełniano do 50 ml 5% roztworem KOH. Odczynnik ten przygotowano tuż przed użyciem i przechowywano w lodówce.

Wykonanie oznaczenia. Odważony materiał roślinny (0,25—5,0 g) rozdrabniano dokładnie w homogenizatorze firmy MSE z 30—70/ml buforu fosforanowego. Powstającą pianę usuwano przez dodatek jednej kropli alkoholu oktylowego i dopełniano buforem do 50 lub 100 ml w kolbie miarowej. Następnie wirowano przy 7000 obrotach/min. i sączono przez watę. Do odbiałczania pobierano 10 ml przesączu, dodawano 2 ml siarczanu kadmu, 1 ml ługu sodowego i ogrzewano na wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut. Po oziębieniu, sączono przez twardy sączek i uzupełniano w kolbie miarowej do 25 lub 50 ml. Do oznaczeń pobierano od 2—4 ml w kilku powtórzeniach. Do próbek z przesączem wlewano ostrożnie po ściankach 1 ml mieszaniny α -naftolu z mocznikiem i miesza-

jąc szybko, dodawano 0,4 ml podbrominu potasu. Po ponownym energicznym wymieszaniu, próby umieszczano w ciemnym miejscu w zlewce z lodem na 30 minut. Kolorymetrowano wobec próby ślepej (4 ml wody zamiast badanego przesączu) na fotokorymetrze Leitza przy filtrze C.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki podane w tablicach 1 i 2 wskazują, że zarówno czynna arginaza, jak i jej substrat arginina występują w całym okresie rozwoju grochu i pszenicy. Zaobserwowano znaczne różnice między aktywnością całkowitą i wykrywalną arginazy u obu roślin. Aktywność całkowita jest prawie zawsze kilka, a nawet kilkunastokrotnie wyższa od aktywności wykrywalnej, co świadczy o obecności inhibitora arginazy w materiale roślinnym. Różnice między aktywnością całkowitą i wykrywalną arginazy, należy traktować jako wypadkową stężenia inhibitora z jednej strony i obecności związków redukujących zawartych w danym okresie rozwoju roślin z drugiej. Rzeczywistym miernikiem aktywności arginazy są przeto oznaczenia, wykonane w obecności cysteiny i nazwane arginazą „całkowitą“ (tabela 1 i 2).

Jak widać z tabeli 2 w czasie kiełkowania nasion pszenicy, następuje trzykrotny wzrost aktywności arginazy. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami opisanymi w piśmiennictwie (Guitton 1957, 1959; Morawska, Kleczkowski, Reifer 1963). W grochu przyrost aktywności jest znacznie mniejszy (tabela 1). W miarę rozwoju obu roślin obserwowano stopniowy spadek aktywności arginazy. Gwałtowny przyrost aktywności enzymu następował w formujących się organach generatywnych zarówno w grochu, jak i w pszenicy. Tak np. badane oddzielnie kwiaty grochu (62 dzień wzrostu rośliny) wykazały 13-krotnie wyższą aktywność w porównaniu z częściami wegetatywnymi. W strąkach grochu aktywność nieco opadała i rosła ponownie w dojrzewających nasionach. Podobnie u pszenicy, aktywność arginazy wzrastała w czasie kłoszenia i była wysoka w kłosach i w ziarnie. Najwyższa była w czasie dojrzałości woskowej ziarna i opadała dwukrotnie w miarę dojrzewania nasion.

W grochu stwierdzono w kilku przypadkach, a mianowicie wyłącznie w nasionach, łuskach strąków i zarodkach bez liścieni, że dodatek cysteiny wbrew założeniom wywoływał zamiast przyrostu aktywności arginazy, jej spadek (tabela 1: nr 2, 7, 18, 21, 22, 23, 26). Niestety oznaczenia nie mogły być powtórzone ze względu na zmiany aktywności enzymatycznej w przechowywanych materiałach. Powyższe anomalie stwierdzono wyłącznie w organach generatywnych i w młodych zarodkach grochu. W pszenicy aktywność arginazy całkowitej była zawsze wyższa od aktywności arginazy wykrywalnej.

Tabela 1 - Table 1

Aktywność arginazy i zawartość argininy w okresie rozwoju grochu odmiany 'Lincoln'
 Arginase activity and arginine content in the green pea, variety 'Lincoln'

Nr No.	Wiek w dniach Age in days	Materiał Material	Aktywność arginazy w μM mocznika/mg N-całkowitego rozp. w wodzie Arginase activity in μM urea/total mg N soluble in water		%, II (I=100)	Arginina w μM /mg N-całkowitego, rozp. w wodzie Arginine in μM /total mg N soluble in water
			wykrywalna detectable	całkowita total		
1		suche nasiona dry seeds	3,115	4,803	154,2	0,600
2	1	zarodki bez liścieni embryos without cotyledones	7,050	4,637	-65,7	0,517
3	2	zarodki bez liścieni embryos without cotyledones	5,750	7,256	126,2	0,700
4	3	zarodki bez liścieni embryos without cotyledones	5,436	6,247	114,9	0,783
5	3	liścienie bez zarodków cotyledones without embryos	4,800	-	-	0,180
6	6	części nadziemne aerial parts	3,400	-	-	0,234
7	10	części nadziemne aerial parts	2,070	1,800	-86,9	0,140
8	28	części nadziemne aerial parts	0,158	-	-	0,045
9	35	części nadziemne aerial parts	0,168	-	-	0,041
10	42	części nadziemne aerial parts	0,075	0,094	125,3	0,024
11	49	części nadziemne aerial parts	0,078	0,125	160,2	0,020
12	56	części nadziemne aerial parts	0,109	0,243	225,7	0,024
13	62	rośliny bez kwiatów plants without flowers	0,112	0,180	160,7	0,030
14	62	kwiaty flowers	0,861	2,710	314,6	0,062
15	66	strąki, dług. 5 cm pods 5 cm long	0,664	1,462	220,2	0,040
16	71	rośliny bez kwiatów i strąków plants without flowers and pods	0,124	0,287	231,5	0,023
17	71	strąki, dług. 7-9 cm pods 7-9 cm long	0,500	0,621	164,2	0,249
18	77	młode nasiona young seeds	2,700	2,303	-85,3	0,160
19	77	łuski strąków hulls of pods	0,310	0,414	133,5	0,109
20	84	rośliny bez strąków plants without pods	0,133	0,184	133,3	0,013
21	84	młode nasiona young seeds	3,890	2,718	-69,9	0,544
22	84	łuski strąków hulls of pods	0,760	0,644	-84,7	0,109
23	95	nasiona żółknące yellowish seeds	3,432	2,486	-71,8	0,166
24	105	grochowiny stalks and pods	0,400	1,232	308,0	0,057
25	105	nasiona żółte yellow seeds	1,916	2,004	104,6	0,184
26	120	nasiona twarde ripe seeds	2,153	1,940	-90,1	0,200

T a b l i c a 2 - T a b l e 2

Aktywność i zawartość argininy, w okresie rozwoju pszenicy jarej, odmiany 'Opolska-elita'
 Arginase activity and arginine content in spring wheat, variety 'Opolska-elita'

Nr No.	Wiek w dniach Age in days	Materiał Material	Aktywność arginazy w μM mocznika/mg N-całkowitego rozp. w wodzie Arginase activity in μM urea/total mg N. soluble in water		%, II (I=100)	Arginina w μM /mg N-całkowitego, rozp. w wodzie Arginine in μM /total mg N soluble in water
			wykrywalna detectable	całkowita total		
1		suche nasiona dry seeds	2,000	5,320	266,0	0,112
2	1	kiełkujące nasiona germinating seeds	13,800	17,560	127,3	0,240
3	2	kiełkujące nasiona germinating seeds	3,328	5,888	176,9	0,100
4	3	części nadziemne aerial parts	0,752	2,265	301,2	0,047
5	6	części nadziemne aerial parts	0,575	-	-	0,042
6	10	części nadziemne aerial parts	0,422	2,300	545,0	0,053
7	21	części nadziemne aerial parts	0,113	-	-	0,026
8	28	części nadziemne aerial parts	0,060	0,535	691,6	0,028
9	35	części nadziemne aerial parts	0,102	0,715	701,0	0,034
10	42	części nadziemne aerial parts	0,076	0,920	1210,6	0,036
11	49	części nadziemne aerial parts	0,078	0,640	620,6	0,030
12	55	rośliny bez kłosów plants without spikes	0,300	1,180	393,3	0,023
13	55	kłosa spikes	1,280	2,130	166,4	0,026
14	60	kłosa kwitnące flowering spikes	1,047	2,300	219,7	0,024
15	68	rośliny bez kłosów plants without spikes	0,157	0,837	533,1	0,030
16	68	kłosa (dojrż. wodnoziarnista) spikes (water maturity)	0,734	2,140	291,5	0,030
17	80	ziarna (dojrż. mleczna) seeds (milky maturity)	3,960	3,960	100,0	0,040
18	89	ziarna (dojrż. woskowa) seeds (waxy maturity)	3,230	6,040	187,0	0,089

Zgodnie z wynikami Hyde'a (1954—5) stwierdzono w niniejszej pracy, że nasiona grochu zawierają znaczne ilości wolnej argininy. W miarę rozwoju ilość argininy stopniowo opada i tak np. w 62-dniowych łodygach grochu była 20-krotnie niższa niż w nasionach. W strąkach i młodych nasionach ilość argininy wzrastała ponownie. U pszenicy, podobnie jak w grochu, w początkowym okresie kiełkowania następował wzrost ilości argininy. Wiąże się to prawdopodobnie ze wzrostem aktyw-

Wykres 1. Aktywność arginazy całkowitej i zawartość argininy w grochu.

(Zawartość argininy i aktywność arginazy są znacznie wyższe w nasionach i w młodych kielkach, aniżeli w zielonych pędach rośliny. Z tego względu wykresy zaopatrzone są w dwie odpowiednie osie rzędnych)

1 — Aktywność arginazy całkowitej; 2 — zawartość argininy; 3 — części nadziemne; 4 — części nadziemne bez organów generatywnych; 5 — strąki; 6 — łuski strąków; 7 — nasiona; 8 — kwiaty

Total arginase activity and arginine content in the green pea.

(Arginine content and arginase activity are much higher in the seeds and in the young seedlings. For this reason, two ordinate axes were introduced).

1 — total arginase activity; 2 — arginine content; 3 — green parts; 4 — green parts without generative organs; 5 — pods; 6 — shelled pods; 7 — seeds; 8 — flowers

ności enzymów proteolitycznych i rozkładem białek zapasowych nasion. W częściach wegetatywnych pszenicy następował, podobnie jak w grochu, spadek zawartości wolnej argininy. Wzrost zawartości argininy zaobserwowano dopiero w czasie dojrzewania ziarna. Podobnie Kołbako-wa (1958) stwierdziła, że maksimum gromadzenia argininy w nasionach kukurydzy przypada w okresie dojrzałości młecznego ziarna.

W wykresach 1 i 2 podano zależności między zawartością argininy i całkowitą aktywnością arginazy w całym okresie rozwoju grochu i pszenicy, w przeliczeniu na świeżą masę roślin.

Jak wynika z wykresów, między zawartością argininy i aktywnością arginazy całkowitej istnieje ścisła zależność. Dotyczy to zarówno części

Wykres. 2. Aktywność arginazy całkowitej i zawartość argininy w pszenicy
Total arginase activity and arginine content in wheat.

Oznaczenia 1, 2, 3, 4, 7 — jak na wykresie 1; 5 = kłosa
Abbreviations 1, 2, 3, 4, 7 as in Fig. 1; 5 = ears

wegetatywnych, jak i generatywnych obu roślin. W początkowym okresie rozwoju enzym i jego substrat gwałtownie opadają. W częściach wegetatywnych utrzymują się na stałym poziomie, natomiast w częściach generatywnych następuje ponownie wzrost aktywności arginazy i przyrost ilości argininy.

Badając aktywność karbamoilotransferazy ornitynowej, Reifer i inni (1963a), stwierdzili podobną zależność między aktywnością tego enzymu a zawartością związków ureidowych występujących w okresie rozwoju grochu i pszenicy. Te podobne zależności między obu enzymami sugerują istnienie koordynacji w aktywności karbamoilotransferazy

ornitynowej i arginazy w okresach rozwojowych obu badanych roślin. Względne stosunki zmian aktywności obu enzymów są do siebie proporcjonalne, aczkolwiek niezależne od aktywności absolutnej każdego z enzymów.

Wykres 3. Aktywność arginazy i karbamoilotransferazy ornitynowej w grochu
Oznaczenia 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 jak na wykresie 1; 2 = aktywność karbamoilotransferazy ornitynowej

Arginase- and ornithine carbamoilotransferase activity in the green pea.
Abbreviations 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 as in Fig. 1; 2 = ornithine carbamoilotransferase activity

Wykres 4. Aktywność arginazy i karbamoilotransferazy ornitynowej w pszenicy
Oznaczenia 1, 3, 4, 7 jak na wykresie 1; 2 = aktywność karbamoilotransferazy ornitynowej; 5 = kłosa

Arginase- and ornithine carbamoilotransferase activity in wheat.
Abbreviations 1, 3, 4, 7 as in Fig. 1; 2 = ornithine carbamoilotransferase activity; 5 = ears

Aktywności obu enzymów opadają w miarę rozwoju organów wegetatywnych, a rosną ponownie w czasie formowania i dojrzewania nasion grochu oraz pszenicy. Pewne rozbieżności zaobserwowano tylko w usychających częściach wegetatywnych w końcowej fazie rozwoju. Bowiem zarówno w grochu, jak i w pszenicy opada aktywność karbamoiltransferazy ornitynowej, a aktywność arginazy wzrasta.

Zmiany aktywności obu enzymów były podobne w dwu botanicznie odległych od siebie roślinach: w grochu i w pszenicy, co sugeruje koordynację enzymów cyklu ornitynowego w roślinach wyższych i podkreśla znaczenie enzymów tego cyklu w rozwoju części generatywnych w badanych roślinach.

Katedra Biochemii SGGW

Warszawa

Instytut Biochemii i Biofizyki P.A.N.

(Wpłynęło: dn. 31.10.1964 r.)

SUMMARY

1. It was observed, that in plant macerates arginase activity is higher in presence of reducing agents, such as cysteine. Therefore, addition of cysteine is essential in order to determine total arginase activity.

2. Arginase activity grows during the period of germination, and rises again at the time of formation of generative organs.

3. A close relation between arginase activity and arginine content in the growing plant has been observed. A similar relation was observed between the activities of arginase and carbamoiltransferase of ornithine.

LITERATURA

- Borsook H., Dubnoff J. W. 1941, The conversion of citrulline to arginine in kidney, J.B.C. 141:717.
- Buraczewski S., Kleczkowski K., Reifer I., 1960, Argininosuccinase in the green pea, ryegrass and wheat, Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol. 8:93.
- Conway E. G., 1947, Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, London.
- Fotyma W., Kleczkowski K., Reifer I., 1961, Synthesis of arginine in plant homogenates, Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol. 9:61.
- Guitton Y., 1957, Sur la métabolisme azoté des Gymnospermes, Présence de l'arginase dans les graines, Compt. Rend., 245, 1157.
- Guitton 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 *Pinus sativum*, Proc. Roy. Soc. Edinburgh 65 B:229—316.

- Koľbakowa E. W., 1953, Azotystyi obmien szozrewajuszczich semian kukuruzy, Dokl. Akad. Nauk SSSR 120(4):907—910.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. Y., Farr A. L., Randall R. G., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, J.B.C. 193, 265.
- Morawska G., Kleczkowski K., Reifer I., 1963, Występowanie i aktywność arginazy w roślinach wyższych, Acta Soc. Bot. Pol. 32(1):191.
- Reifer I., Kleczkowski K., Klimowicz E., Zielińska K., 1963a, Ornithine carbamylotransferase in higher plants, Acta Bioch. Pol. 10(2):151.
- Reifer I., Morawska G., 1963b, An arginase inhibitor from sunflower seeds, Acta Bioch. Pol. 10(4):413.