Aktywność syntetazy karbamoilofosforanu w roślinach

Carbamoyl phosphate synthetase activity in higher plants

K. KLECZKOWSKI, I. REIFER

Syntetazę karbamoilofosforanu, dla której donorem azotu jest grupa amidowa L-glutaminy wykrył poraz pierwszy Levenberg (1962) u grzybów *Agaricus bisporus*. Ten sam mechanizm stwierdziliśmy później u roślin wyższych (Kleczkowski 1965). Ostatnio Kalman i inni (1966) oczyścili i scharakteryzowali ten enzym wyizolowany z *E. coli*, szczep B.

Enzym ten różni się od kinazy karbaminianowej (EC 2.7.2.2.), występującej u *Streptococcus faecalis* (Jones i inni 1955) i od syntetazy karbamolifosforanu (EC 2.7.2.2) występującej u ssaków (Marshall i inni 1958). Dla obu wyżej wymienionych enzymów donorem azotu w syntezie karbamoilofosforanu są nieorganiczne sole amonowe, a poza tym synteza karbamoilofosforanu ssaków wymaga obecności N-acetyloglutaminianu. Natomiast syntetaza karbamoilofosforanu grzybów, roślin i *E. coli* nie wymaga obecności N-acetyloglutaminianu i najlepszym donorem azotu w syntetazie karbamoilofosforanu dla tego enzymu jest L-glutamina.

Założeniem niniejszej pracy było przebadanie szeregu roślin w celu znalezienia materiału o najwyższej aktywności syntetazy karbamoilofosforanu i następnie wykorzystanie tej rośliny do otrzymania oczyszczonego preparatu i charakterystyki tego enzymu.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na powietrznie suchych nasionach oraz zielonych i etiolowanych kielkach w wieku do 34 dni, hodowanych na podłożu z waty w tacach winiokowych.

Odczynniki:

ATP—NA₂ — Reanal Węgry

L-ornityna HCl — Merck NRF

Sól barowa kwasu 3-fosfoglicerynowego — Boehringer NRF. (sól barową przed użyciem przeprowadzano w sól potasową).

Pozostałe odczynniki były krajowego pochodzenia z Biura Obrotu Odczynnikami, Gliwice.

Wykonanie oznaczenia:

Suche nasiona mielono uprzednio na drobną mączkę, z której przygotowywano wyciągi. Kielki rozdrabniano w szklanym homogenizatorze typu Pottera w lodzie z 0,1 M buforem Tris-HCl pH 7,6 + merkaptoetanol w końcowym stężeniu $3 \times 10^{-4} M$. Stosunek objętości buforu do masy kielków wynosił 5 : 1. Homogenat sączono przez watę i używano natychmiast do doświadczenia.

System regenerujący ATP otrzymano z mięśni królika według metody Racker (1947).

Aktywność syntetazy karbamoilofosforanu oznaczano według metody opisanej poprzednio (Kleczkowski 1965).

WYNIKI I DYSKUSJA

Przebadano w sumie 33 rośliny należące do 13 rodzin botanicznych. Stwierdzono znaczną aktywność w różnych fazach wzrostu tylko u 5 roślin, z których 4 należą do rodziny motylkowych (Tab. 1). U dalszych 5 roślin: *Lupinus angustifolius* (lubin

Tablica 1 — Table 1

Aktywność syntetazy karbamoilofosforanu u różnych roślin

Aktywność w μ molach/mg białka/45 min./37°

Carbamoyl phosphate synthetase activity in various plants

Activity in μ moles/mg protein/45 min./37°

Wiek roślin w dniach Age of plants in days	Groch Perła szlachetna <i>Pisum sativum</i> kielki seedlings		Fasola Biała wyborowa <i>Phaseolus vulgaris</i> kielki seedlings		Soja <i>Glicine hispida</i> kielki seedlings		Łędwian <i>Lathyrus tingit- tanus</i> kielki seedlings		Dynia Melonowa żółta <i>Cucurbita</i> kielki seedlings	
	zie- lone green	etiolo- wane etio- lated	zie- lone green	etiolo- wane etio- lated	zie- lone green	etiolo- wane etio- lated	zie- lone green	etiolo- wane etio- lated	zie- lone green	etiolo- wane etio- lated
3—4	8	9	8	13	6	0	0	0	0	0
6	16	—	—	—	—	0	0	0	—	0
8	20	17	16	29	12	0	0	4	7	10
12	46	20	16	36	27	23	0	4	17	10
14	60	20	19	21	28	25	12	5	7	15
16	114	20	22	10	28	28	27	6	7	10
18	114	16	22	0	—	—	—	0	10	10
20	114	0	—	0	—	28	20	0	—	—
22	114	0	26	0	26	30	16	0	0	0
24	—	—	26	0	60	35	19	0	0	0
27	100	—	34	—	80	—	16	0	0	0
30	86	—	—	—	—	—	20	0	0	0
34	50	—	0	—	0	—	—	0	0	0

gorzki i słodki), *Vicia sativa*, *Triticum vulgare* i *Cucumis sativus* znaleziono zaledwie wykrywalną aktywność. U pozostałych 23 roślin nie stwierdzono w ogóle aktywności syntetazy karbamoilofosforanu. Należą do nich:

Secale cereale, *Lolium perenne*, *Panicum miliaceum*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Zea mays*, *Rheum*, *Rumex acetosa*, *Trifolium pratense*, *Beta vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Citrullus vulgaris*, *Melo*, *Allium cepa*, *Allium porum*, *Anethum graveolens*, *Fragaria vesca*, *Brassica oleracea*, *Lactuca*, *Helianthus annuus*, *Spinacia oleracea*, *Raphanus*, *Thuia*.

Najbardziej aktywnym materiałem okazały się zielone kielki grochu w wieku 16–22 dni. Dużo niższą aktywność miały kielki soi. Kielki fasoli i lędzwanu miały zbliżoną aktywność ale niższą od soi, najniższą aktywność miały kielki dyni (Tabl. 1).

Etiolowane kielki roślin wykazywały aktywność tylko w tym przypadku, jeśli występowała ona również w kielkach zielonych (tab. 1). Aktywność ta była jednak niższa niż w kielkach zielonych, z wyjątkiem fasoli do 14 dnia i dyni do 18 dnia wzrostu.

W kielkach grochu najwyższa aktywność występowała w wieku 16–22 dni, w fasoli 16–27 dni, u soi 24–27 dni. W lędzwanie aktywność syntetazy karbamoilofosforanu utrzymywała się mniej więcej na jednakowym poziomie w wieku od 14–30 dni, a w dyni tylko w wieku 8–16 dni (Tab. 1).

W łubinie gorzkim śladową aktywność stwierdzono tylko w wieku 3–6 dni. W słodkim łubinie natomiast wyłącznie w wieku 11–16 dni.

W homogenatach wykazano, że jony amonowe mogą również być donorem azotu w syntezie karbamoilofosforanu. Jednak we wszystkich przypadkach nieorganiczne źródło azotu dawało zaledwie 15–20% tej syntetazy jaką wykrywano w obecności L-glutaminy.

Reasumując omówione wyniki można stwierdzić, że wykryta aktywność syntetazy karbamoilofosforanu w badanych roślinach jest stosunkowo niska.

Z dalszych naszych badań nad tym enzymem u roślin wyższych, dotąd nie publikowanych, wynika, że enzym ten w homogenatach roślinnych jest bardzo labilny, co jest prawdopodobnie związane z jego inaktywacją przez związki towarzyszące homogenatom. Bowiernie frakcjonowanie homogenatów siarczanem amonowym w odpowiednim środowisku w znacznym stopniu stabilizuje aktywność enzymu.

Praca nad oczyszczaniem syntetazy karbamoilofosforanu z kielków grochu, jako rośliny wykazującej najwyższą aktywność tego enzymu jest w toku.

Autorzy składają serdeczne podziękowanie Pani Jadwidze Konaszewskiej za pomoc techniczną w wykonaniu tej pracy.

Niniejsza praca była częściowo finansowana z funduszy Ministerstwa Rolnictwa USA, Nr umowy FG-PO-170.

STRESZCZENIE

Badano aktywność syntetazy karbamoilofosforanu, dla której donorem azotu jest L-glutamina, u 33 roślin należących do 13 rodzin botanicznych. Stwierdzono aktywność tego enzymu tylko u 5 roślin. U dalszych 5 roślin znaleziono tylko wykrywalną aktywność. W pozostałych 23 roślinach nie stwierdzono aktywności badanego enzymu.

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Zakład Biochemii Roślin
Warszawa*

SUMMARY

L-glutamine dependent carbamoyl phosphate synthetase activity was determined in 33 various plants belonging to 13 families.

Activity of this enzyme was found only in 5 plants. In other 5 plants only traces of activity were detected. In remaining 23 plants no activity could be found.

LITERATURA

- Levenberg B., 1962, Role of Glutamine as Donor of Carbamyl Nitrogen for the enzymatic Synthesis of Citrulline in *Agaricus bisporus*, J.B.C. 237: 2590.
- Kleczkowski K., 1965, L-Glutamine as Donor of Carbamoyl Group Nitrogen for the Enzymatic Synthesis of Citrulline in Green Pea Seedlings, Acta Biochim. Polon., 12: 243.
- Kalman S. M., Duffield P. H., Brzozowski T., 1966, Purification and Properties of a Bacterial Carbamyl Phosphate Synthetase, J.B.C. 241: 1871.
- Jones M. E., Spector L., Lipman F., 1955, Congr. intern. Biochim. 3 Congr. Brussels, 278.
- Marshall M., Metzenberg R. L., Cohen P. P., 1958, Purification of Carbamyl Phosphate Synthetase from Frog Liver, J.B.C. 233: 102.
- Racker E., 1947, Spectrophotometric Measurement of Hexokinase and Phosphohexokinase Activity, J.B.C. 167: 843.