

BARBARA BARANIAK, MAŁGORZATA KOSTECKA

*Hamowanie aktywności proteaz w preparacie białkowym z lucerny
i liści słonecznika poprzez poliaminy i regulatory wzrostu*

Inhibiting Protease Activity in Protein Preparations from Alfalfa and Sunflower
by Polyamines and Growth Regulators

Białka tkanek roślinnych występujące w chloroplastach niemal w równych częściach dzielą się na rozpuszczalne i nierozpuszczalne. Białka nierozpuszczalne połączone z chlorofilem i innymi barwnikami oraz z lipidami tworzą, wraz z fosforo- i galaktolipidami, błony tylakoidów. Białka rozpuszczalne klasyfikowane są na dwie frakcje: pochodzącą z chloroplastów tzw. frakcję I, identyfikowaną jako karboksylaza-oksigenaza rybulozo-1,5-bifosforanowa (E.C. 4.1.1.39), pełniącą istotną funkcję w procesie fotosyntezy i fotooddychania; oraz tzw. frakcję II, występującą jako mieszanina heterogennych białek chloro- i cytoplazmatycznych (8).

Tkanki wegetatywnych części roślin zawierają enzymy proteolityczne o różnym mechanizmie działania egzo- i endopeptydazy, karboksy- i aminopeptydazy. Funkcja tych wewnątrzkomórkowych proteaz polega na utrzymywaniu równowagi dynamicznej pomiędzy poziomem białek i produktów ich proteolizy. Podczas ontogenezy w trakcie wzrostu komórek szybkość biosyntezy białek jest znacznie większa od szybkości ich rozpadu, natomiast intensywność rozpadu wzrasta podczas starzenia się organów wegetatywnych roślin. Analogiczne przemiany zachodzą w procesie otrzymywania preparatów białkowych z zielonych części roślin. Proteoliza białek przebiega zarówno w trakcie macerowania zielonek, jak i w czasie frakcjonowania białek zawartych w soku roślinnym. Straty białka spowodowane tym procesem mogą sięgać aż do 50% (9, 10), gdyż niskocząsteczkowe produkty hydrolizy białek nie ulegają koagulacji.

Celem niniejszej pracy jest badanie procesu inhibicji aktywności enzymów proteolitycznych z soku lucerny i liści słonecznika wybranymi substancjami chemicznymi.

MATERIAŁY I METODY

Sok uzyskano poprzez tłoczenie prasą ślimakową zielonki lucerny i liści słonecznika wstępnie rozdrobnionych na prasie śrubowej. Materiał włóknisty usunięto z soku przy użyciu sita o średnicy oczek 0,15 mm = 100 mesh. Z soku lucerny i liści słonecznika wydzielono frakcje białkowe zawierające aktywne enzymy proteolityczne poprzez odwirowanie frakcji chloroplastów i następne trzykrotne wysycenie przesący do 50% siarczanem amonu w buforze Tris-HCl ($pH = 7,5$). Otrzymane preparaty liofilizowano porcjami i przechowywano w temp. 4°C . Rozdział białek preparatów enzymatycznych przeprowadzono metodą sączenia molekularnego na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-100. W otrzymanych frakcjach aktywność proteolityczną mierzono stosując jako substrat azoalbuminę.

Skład aminokwasowy białka preparatów enzymatycznych oznaczono metodą chromatografii jonowymiennej w automatycznym analizatorze aminokwasów Aminochrom II. Hydrolizę preparatów prowadzono 6 M HCl, po uprzednim utlenieniu próbek kwasem nadmanganowym (13).

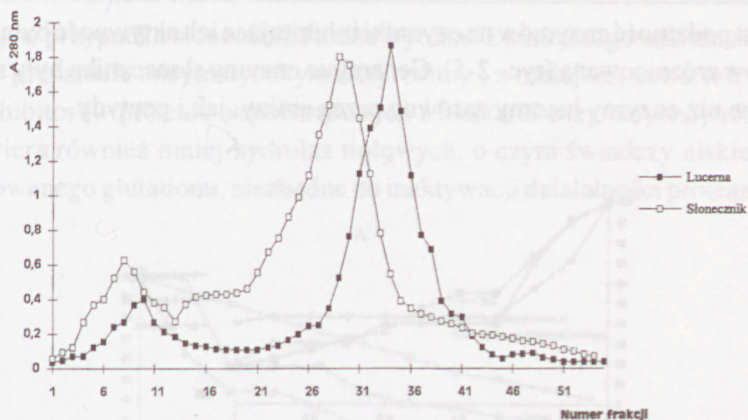
Aktywność proteolityczną mierzono spektrofotometrycznie wobec BAEE (ester etylowy $N\alpha$ -benzoilo-L-argininy) po odsoleniu preparatów na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-25. Testowano wpływ inhibicyjny następujących substancji: spermidyny, kadaweryny, sperminy, betainy, inhibitora tripsyny, zredukowanego glutationu, hydroksymetyloaminy, 1,4-diaminobenzolu, siarcznanu dicyjanodiamidyny i regulatorów wzrostu roślin – Flordimexu i CCC; stosując wzrastające stężenia od 0,1 do 1,0 mM.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W badaniach nad otrzymywaniem preparatów żywieniowych z soków zielonych części roślin poszukiwane są metody skutecznego frakcjonowania zawartych w nich białek. Jedną z przyczyn obniżenia wydajności procesu jest działalność enzymów proteolitycznych. Wcześniejsze badania (5) hamowania ich aktywności w wytłoczonym soku nie przyniosły korzystnych wyników z uwagi na obecność w soku związków o zróżnicowanych właściwościach.

W celu scharakteryzowania właściwości proteaz występujących w tkankach lucerny i liści słonecznika wyizolowano preparaty zawierające te enzymy. Dla obu preparatów otrzymano po sączeniu molekularnym na Sephadexie G-100 podobny obraz frakcji, wymywanych 0,05 M buforem Tris-HCl $pH=8,0$ (ryc. 1).

Na chromatogramie uzyskano dwa piki, różniące się znacznie wielkością absorbancji, mierzonej przy 280 nm. Najwyższą aktywność proteolityczną (mierzoną wobec azoalbuminy jako substratu) wykazały frakcje schodzące bezpośrednio po pikie o najwyższej absorbancji. Skład aminokwasowy białka obu preparatów był



Ryc. 1. Chromatogram otrzymany po rozdzieleniu białek preparatów enzymatycznych na żelu Sephadex G-100

Chromatograms obtained after protein distribution of enzymatic preparations on gel Sephadex G-100

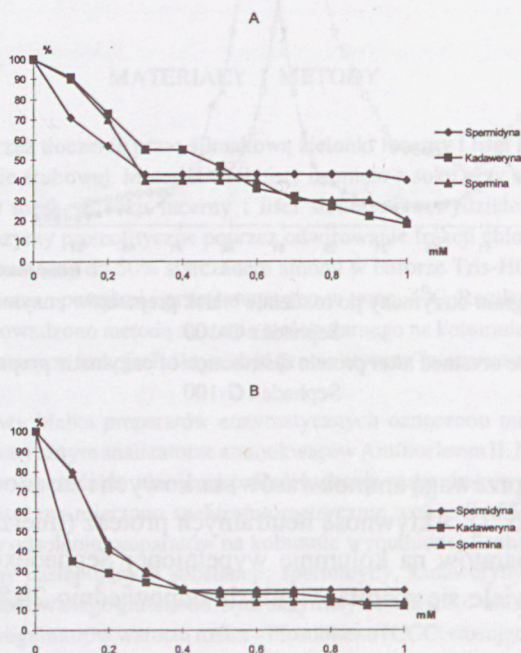
zbliżony – z lekką przewagą aminokwasów siarkowych i zasadowych w preparacie ze słonecznika (tab. 1). Aktywność neutralnych proteaz (mierzona wobec BAEE po odsoleniu preparatów na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-25) lucerny i słonecznika niewiele się różniła, wyniosła odpowiednio 28,83 U/l i 26,52 U/l.

Tabela 1. Zawartość aminokwasów w preparatach enzymatycznych otrzymanych z soku lucerny i liści słonecznika

The content of amino-acids in enzymatic preparations obtained from the juice of alfalfa and sunflower leaves

Aminokwas	g/100g białka		% sumy aminokwasów	
	lucerna	słonecznik	lucerna	słonecznik
Lys	2,58	3,00	10,12	10,77
Phe	1,74	2,04	6,84	7,31
Met	0,71	1,07	2,79	3,84
Cys	0,79	0,85	3,10	3,04
Thr	1,47	1,41	5,77	5,06
Leu	2,57	3,03	10,08	10,87
Ile	1,53	1,58	5,99	5,66
Val	1,31	1,20	5,15	4,31
Arg	1,09	1,58	4,30	5,66
Asp	3,26	3,17	12,80	11,38
Ser	2,67	2,42	10,48	8,69
Glu	2,93	3,33	11,53	11,94
Gly	1,38	1,62	5,44	5,83
Ala	1,43	1,57	5,61	5,64

Natomiast podatność enzymów na czynniki inhibitujące ich aktywność była dla obu preparatów zróżnicowana (ryc. 2-5). Generalnie enzymy słonecznika były szybciej hamowane niż enzymy lucerny zarówno przez aminy, jak i peptydy.

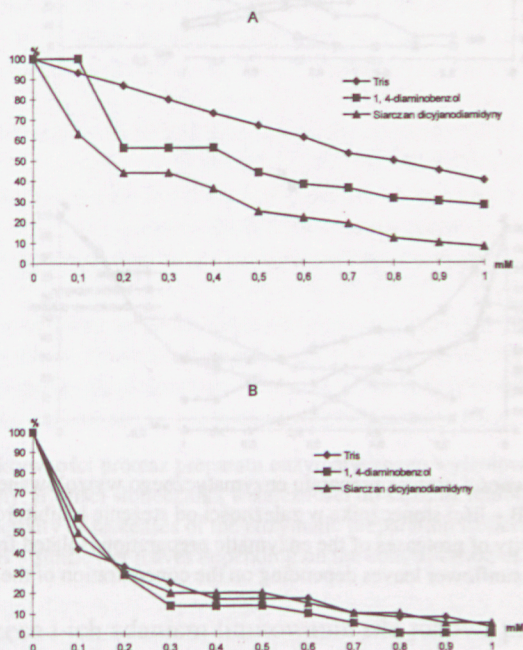


Ryc. 2. Inhibicja aktywności proteaz preparatu enzymatycznego wyizolowanego z soku A – lucerny; B – liści słonecznika w zależności od stężenia inhibitorów

Inhibition of the activity of proteases of the enzymatic preparation isolated from the juice of A – alfalfa, B – sunflower leaves depending on the concentration of the inhibitors

Poliaminom w roślinach przypisuje się wielorakie funkcje. Przypuszcza się, że są one niezbędnymi składnikami błon cytoplazmatycznych i ścian komórkowych (11, 15). Badano również ich funkcję regulatorową w procesie biosyntezy białka (1, 2, 6). Poprzez hamowanie degradacji błon cytoplazmatycznych (7) i opóźnianie procesu zanikania chlorofilu (12) przeciwdziałają starzeniu się organów roślinnych. Typowym objawem starzenia się roślin jest degradacja białek związana ze wzrostem aktywności proteaz. Przeprowadzone badania, jak i wyniki otrzymane przez B a l e s t r e r i i wsp. (3) wykazały skuteczność działania poliamin jako inhibitorów aktywności enzymów proteolitycznych. Przebieg procesu hamowania aktywności proteaz przez polikationy, będące naturalnymi składnikami tkanek roślinnych i syntetycznych związków (ryc. 2 i 3), wskazuje na kompetycyjny charakter procesu inhibitowania neutralnych proteaz roślinnych. Jego szybszy

przebieg w przypadku słonecznika może wynikać z mniejszego udziału aminopeptydaz w preparacie enzymatycznym z tej rośliny i z mniejszej zawartości naturalnych inhibitorów proteaz, współstrąconych z białkami enzymatycznymi. Preparat ten zawiera również mniej hydrolaz tiolowych, o czym świadczy niskie stężenie zredukowanego glutationu, niezbędne do inaktywacji działalności proteaz słonecz-

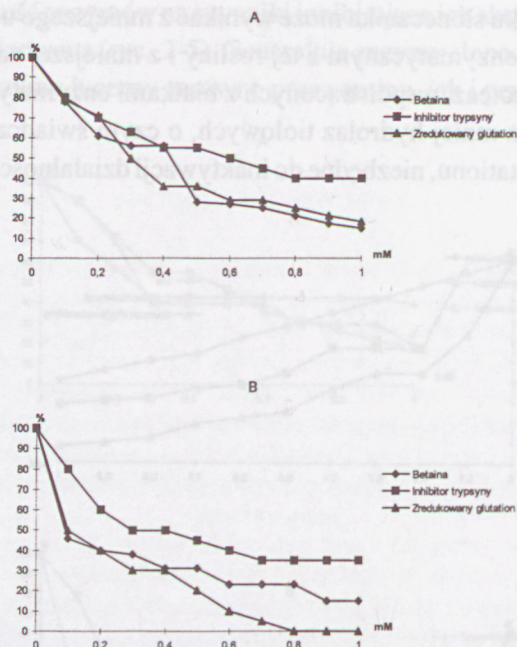


Ryc. 3. Inhibicja aktywności proteaz preparatu enzymatycznego wyizolowanego z soku A – lucerny; B – liści słonecznika w zależności od stężenia inhibitorów

Inhibition of the activity of proteases of the enzymatic preparation isolated from the juice of: A – alfalfa, B – sunflower leaves depending on the concentration of the inhibitors

nika (ryc. 4). Zbliżony przebieg krzywych hamowania przy zastosowaniu inhibitora trypsyny (ryc. 4) wskazuje na podobną zawartość w obu preparatach drobno-cząsteczkowych enzymów typu trypsyny, z przewagą ich obecności w preparacie z lucerny.

Stosowane w uprawie roślin regulatory wzrostu powodują zmiany w procesach metabolicznych, a więc wpływają także na aktywność enzymów. W przedstawionych badaniach testowano działanie inhibicyjne na proteazy roślinne CCC (chlorek 2-chloroetylotrimetyloamoniowy) i Flordimexu, którego substancją aktywną jest związek etylogenny, etefon (kwas 2-chloroetylofosfonowy). Zastosowanie tego drugiego związku wykazało największy efekt inhibicyjny ze wszystkich badanych

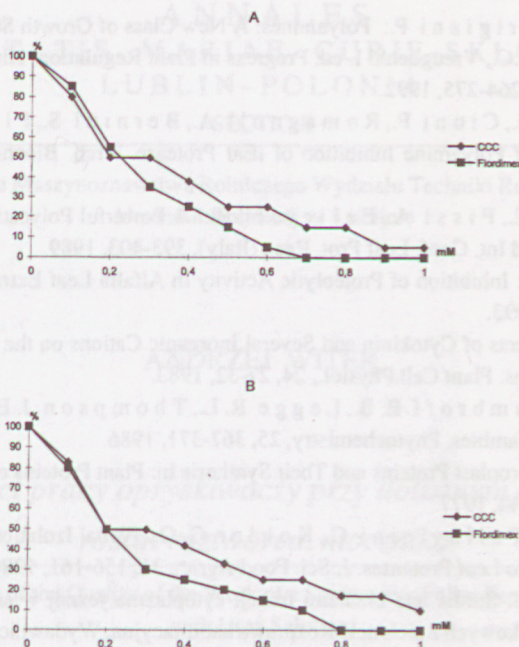


Ryc. 4. Inhibicja aktywności proteaz preparatu enzymatycznego wyizolowanego z soku A – lucerny; B – liści słonecznika w zależności od stężenia inhibitorów

Inhibition of the activity of proteases of the enzymatic preparation isolated from the juice of: A – alfalfa, B – sunflower leaves depending on the concentration of the inhibitors

substancji (ryc. 5). Proteazy ze słonecznika były nieco wolniej hamowane przez CCC niż proteazy lucerny.

Stopniowe wyhamowania aktywności badanych enzymów proteolitycznych, wzrastające w miarę zwiększania stężenia dodawanych w roli inhibitorów substancji, wskazują na kompetycyjny charakter procesu inhibicji. Nie można jednakże wykluczyć ich jednoczesnego działania jako czynników allosterycznych. Taki mieszany mechanizm działania inhibicyjnego poliamin na proteazy lucerny proponują Balestreri i wsp. (3, 4). Zdaniem tych autorów równolegle z inhibicją kompetycyjną może zachodzić elektrowalencyjne wiązanie wprowadzonych czynników z polianionowymi białkami enzymatycznymi. Prowadzi to do zmiany struktury białek enzymatycznych, ograniczając w efekcie ich aktywność. Procesowi temu zapobiega wzrost siły jonowej, bowiem w starzejących się liściach brak wody przeciwdziała wiązaniu występujących w tkankach poliamin lub polipeptydów, pozostawiając enzymy proteolityczne w niezmienionej konformacji, dającej im pełną aktywność. Cytowani autorzy nie stwierdzili podobnego efektu testując



Ryc. 5. Inhibicja aktywności proteaz preparatu enzymatycznego wyizolowanego z soku A – lucerny; B - liści słonecznika w zależności od stężenia inhibitorów

Inhibition of the activity of proteases of the enzymatic preparation isolated from the juice of: A – alfalfa, B – sunflower leaves depending on the concentration of the inhibitors

proteazy zwierzęce i ich zdaniem limitowanie siłą jonową procesu inhibitowania aktywności proteaz polikationami jest zjawiskiem charakterystycznym wyłącznie dla enzymów roślinnych.

PODSUMOWANIE

Proteazy izolowane z soku liści słonecznika są bardziej podatne na działanie czynników inhibitujących ich aktywność. Najskuteczniejsze w działaniu okazały się regulatory wzrostu roślin. W tym przypadku uzyskano analogiczne efekty oddziaływań dla obu badanych roślin. W celu wykorzystania otrzymanych zależności w technologii produkcji koncentratów liściowych należy przetestować wpływ badanych substancji w stosunku do całego soku roślinnego.

PIŚMIENNICTWO

1. Bagni N., Serafini-Fracassini D., Torrigiani P.: Polyamines and Growth in Higher Plants. In: Caldarera C.M., Zappia V., Bachrach U. ed. Adv. Polyamine Res. Raven Press, 377-388, New York 1981.

2. Bagnin, Torrigiani P.: Polyamines: A New Class of Growth Substances. In: Karssen C.M., van Loon L.C., Vreugdenhi I. ed. Progress in Plant Regulation, Kluwer Academic Press, The Netherlands, 264-275, 1992.
3. Balestreri E., Cioni P., Romagnoli A., Bernini S., Fissi A., Felicioli R.: Mechanism of Polyamine Inhibition of Leaf Protease. Arch. Biochem. Biophys., 225, 2, 460-463, 1987.
4. Balestreri E., Fissi A., Felicioli R.: A Powerful Polycationic Inhibitor of Leaf Protease. Proc. 3rd Int. Conf. Leaf Prot. Res., (Italy), 393-403, 1989.
5. Baraniak B.: Inhibition of Proteolytic Activity in Alfalfa Leaf Extracts. Acta Bioch. Pol., 40, 1, 106-108, 1993.
6. Cho S. C.: Effects of Cytokinin and Several Inorganic Cations on the Polyamine Content of Lettuce Cotyledons. Plant Cell Physiol., 24, 27-32, 1983.
7. Drolet G., Dumbroff E. B., Legge R. L., Thompson J. E.: Radical Scavenging Properties of Polyamines. Phytochemistry, 25, 367-371, 1986.
8. Ellis R. J.: Chloroplast Proteins and Their Synthesis In: Plant Proteins ed. Norton G., London, Butterworths, 25-40, 1977.
9. Finley J. W., Pallavicini C., Kohler G. O.: Partial Isolation and Characterisation of *Medicago sativa* Leaf Proteases. J. Sci. Food Agric., 31, 156-161, 1980.
10. Gwiazda S.: Studia nad białkami frakcji cytoplazmatycznej w aspekcie otrzymywania koncentratów białkowych z zielonek. Rozprawa habilitacyjna, Wydawnictwo SGGW-AR, Warszawa 1988.
11. Kaur-Sawhney R., Flores H. E., Galston A. W. Polyamine-induced DNA Synthesis and Mitosis in Oat Leaf Protoplast. Plant Physiol., 65, 368-371, 1980.
12. Kaur-Sawhney R., Galston A.: Physiological and Biochemical Studies on the Anti-Senescence Properties of Polyamines in Plants [In:] Slocum R.E., Flores H.E., (eds.) Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants, Raton CRC Press, 202-211, 1991.
13. Moore S.: On Determination of Cystine and Cysteic acid. J. Biol. Chem., 238, 2, 235-237, 1963.
14. Shah T., Prathapasenan G.: Effect of CCC on the Growth and Yield of Mung Bean (*Vigna radiata* L.) Wilczek var. Guj-2. J. Agronom. Crop Sci., 166, 40-47, 1991.
15. Twardowski T., Szczotka Z.: The Influence of Selected Polyamines on Elongation Binding Factor I Activity During the Stratification of Norway Maple Seeds. J. Plant Physiol., 134, 32-36, 1989.

SUMMARY

Inhibiting activity of some chosen factors on preparations with proteases isolated from alfalfa juice and sunflower leaves was studied. The following substances were examined: spermidine, spermine, cadaverine, betaine, trypsin inhibitor, reduced glutathione, hydroxymethylamine, 1,4-diaminobenzol, dicyanodiamidine sulphate, Flordimex and CCC. Inhibition of proteolytic activity of enzymes increased with the increase in the concentration of substances added; the process was quicker in the case of preparation from sunflower leaves. Flordimex was the most active inhibitor.