

Katedra Biochemii i Chemii Żywności Akademii Rolniczej w Lublinie

BARBARA BARANIAK, MONIKA KARAŚ, URSZULA GAWLIK-DZIKI

*Wpływ wybranych substancji na aktywność kwaśnej fosfatazy
lucerny i liści słonecznika*

Effect of Chosen Substances on Alfalfa and Sunflower Acidic Phosphatase Activity

W tkankach roślinnych powszechne jest występowanie kwaśnej fosfatazy (EC 3.1.3.2), a jej rola biologiczna w wielu przypadkach nie jest wyjaśniona. Podobnie jak w organizmach zwierzęcych gromadzona jest obok innych enzymów trawienych w lizosomach. W komórkach zwierzęcych lizosomy uczestniczą w przemianach organelli komórkowych, w oczyszczaniu tkanki z martwych komórek oraz w odżywianiu podczas okresu głodu. Biorą również udział w procesach, które są odpowiedzią na różnorakie czynniki atakujące organizm. Organelle te są otoczone pojedynczą błoną białkowo-lipidową i zawarte w nich enzymy hydrolityczne wykazują aktywność po uszkodzeniu struktury tej błony. Roślinne lizosomy, do których zaliczane są sferosomy, ziarna aleuronowe i wakuole, spełniają istotną rolę w gromadzeniu i mobilizacji materiałów zapasowych oraz w procesach wewnątrzkomórkowego trawienia. Działanie kwaśnej fosfatazy, dla której substratem są monoestry o-fosforowe, jest konieczne podczas mobilizacji fosforanów (6).

W technologii otrzymywania preparatów białkowych z zielonych części roślin w pierwszym etapie prowadzona jest mechaniczna ekstrakcja soku ze zmacerowanego surowca. W procesie tym uwalniane są z lizosomów enzymy hydrolityczne, a ich działalność prowadzi do zmniejszenia wydajności koagulowanych preparatów.

Celem niniejszej pracy jest badanie procesu inhibicji aktywności kwaśnej fosfatazy w soku z lucerny i liści słonecznika wybranymi substancjami chemicznymi.

MATERIAŁ I METODY

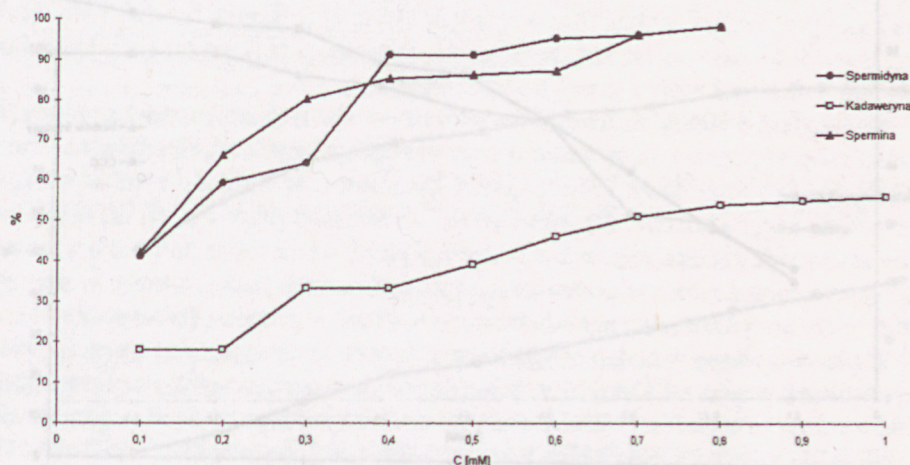
Sok uzyskano poprzez tłoczenie prasą ślimakową zielonki lucerny i liści słonecznika, wstępnie rozdrobnionych na prasie śrubowej. Materiał włóknisty usunięto z soku przy użyciu sita o średnicy oczek 0,15 mm = 100 mesh, a następnie frakcje chloroplastyczne odwirowano (4000 obr./min. 20 minut). Przesącz wysycano siarczanem amonu do 50% nasycenia poprzez dodawanie roztworu tej soli w buforze Tris-HCl ($pH = 7,5$) i pozostawiano go przy ciągłym mieszaniu mieszadłem magnetycznym na 12 godz. w temp. ok. 6°C. Następnie osad odwirowywano (4000 obr./min. 30 min.) i rozpuszczano w tym samym buforze. Procedurę tę powtarzano trzykrotnie. Otrzymane preparaty enzymatyczne liofilizowano porcjami i przechowywano w temp. ok. 6°C.

Aktywność kwaśnej fosfatazy (EC 3.1.3.2) oznaczano spektrofotometrycznie wobec PNP — soli sodowej kwasu p-nitrofenylofosforowego (10) po odsoleniu preparatów na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-25. Testowano wpływ inhibicyjny następujących substancji: spermidyny, kadaweryny, sperminy, betainy, inhibitora tripsyny, hydroksymetyloaminy i regulatora wzrostu roślin CCC, stosując wzrastające stężenia tych substancji od 0,1 do 1,0 mM.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

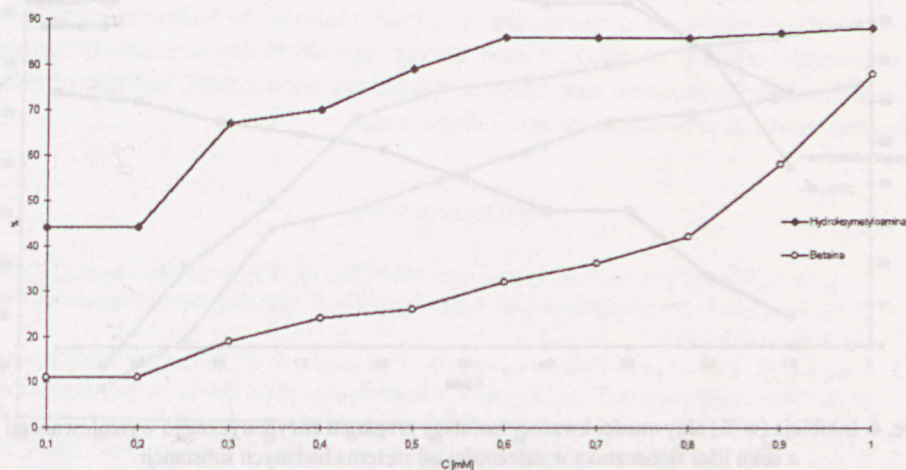
W procesie otrzymywania koncentratów białkowych istotną rolę odgrywa inhibitowanie aktywności enzymów hydrolitycznych, mające na celu podniesienie wydajności procesu. Badania skuteczności wprowadzenia do soków substancji chemicznych w charakterze inhibitorów enzymów (3) nie dały zadowalających rezultatów. Różnorodność interakcji pomiędzy składnikami soku, wprowadzonym związkiem i czynnikiem strącającym nie pozwoliły na jednoznaczne określenie parametrów limitujących aktywność enzymatyczną. W celu ograniczenia tych wpływów wyizolowano z soków preparat enzymatyczny. Aktywność kwaśnej fosfatazy w preparacie otrzymanym z soku lucerny wynosiła 42,01 U/l i była prawie siedmiokrotnie niższa od aktywności tego enzymu w preparacie z soku liści słonecznika, dla którego osiągnęła wartość 276,4 U/l. Tak duża różnica może świadczyć raczej o większej ilości lizosomów w tkankach słonecznika niż o mniejszej trwałości otaczającej je błony białkowo-lipidowej, bowiem komórki obu badanych roślin poddawane były takim samym drastycznym uszkodzeniom mechanicznym, a otrzymane preparaty enzymatyczne jednakowemu stresowi termicznemu.

Proces inhibitowania aktywności kwaśnej fosfatazy dla obu roślin przebiegał stopniowo wraz ze wzrostem stężenia dodawanych substancji, przy czym w przypadku lucerny, dla której aktywność tego enzymu była niższa, wyhamowanie jego działania następowało przy mniejszych ilościach inhibitorów (ryc. 1-3). Z testowanych substancji najskuteczniejsza w działaniu okazała się spermina i spermidyna — dla obu roślin zmniejszyła aktywność o ponad 80% już przy stężeniach 0,3-0,4 mM (ryc. 1, 4). Wpływ inhibicyjny poliamin badano z uwagi na wielorakie funkcje, jakie spełniają te związki w roślinach. Wykazano, że poliaminy mogą uczestniczyć jako regulatory w biosyntezie białka (1, 9, 12). Prawdopodobnie są niezbędnymi składnikami błon cytoplazmatycznych i ścian komórkowych, gdyż każde pobudzenie wzrostu fitohormonami (giberelinami, auksynami czy cytokini-



Ryc. 1. Inhibicja (w %) aktywności kwaśnej fosfatazy preparatu enzymatycznego wyizolowanego z soku lucerny w zależności od stężenia badanej substancji

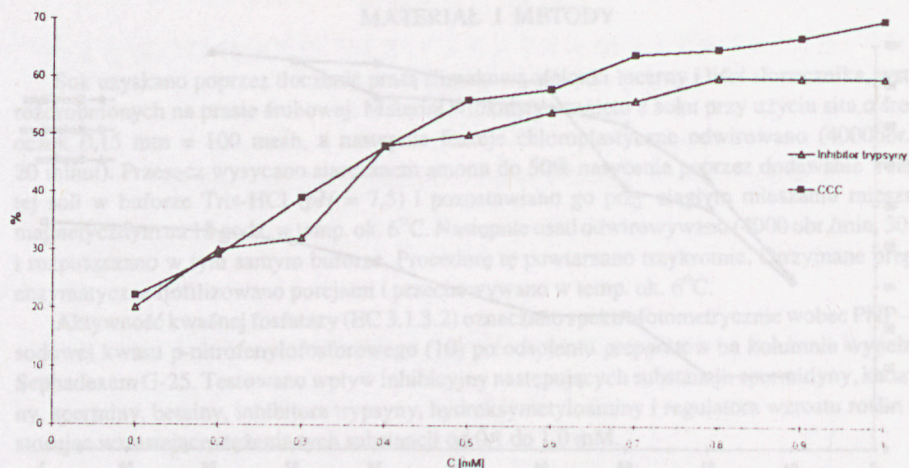
Inhibition (in %) of the activity of acidic phosphatase in enzymatic preparation isolated from alfalfa juice in relation to the concentration of the examined substances



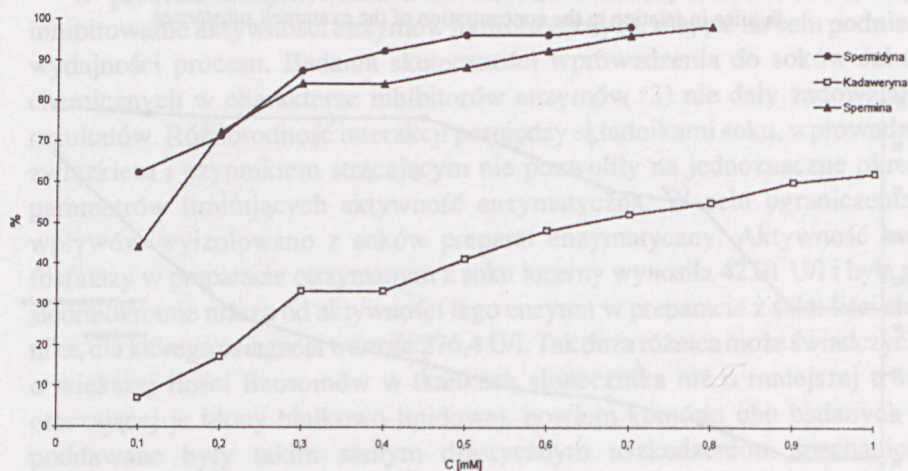
Ryc. 2. Inhibicja (w %) aktywności kwaśnej fosfatazy preparatu enzymatycznego wyizolowanego z soku lucerny w zależności od stężenia badanych substancji

Inhibition (in %) of the activity of acidic phosphatase in enzymatic preparation isolated from alfalfa juice in relation to the concentration of the examined substances

nami) pobudza powstawanie amin (2, 5). Obecność poliamin zapobiega starzeniu się organów roślinnych – opóźniają one degradację błon cytoplazmatycznych, sugeruje się, że poprzez wychwytywanie wolnych rodników – zwłaszcza nadtlenu (7) oraz zanikanie chlorofilu (8).

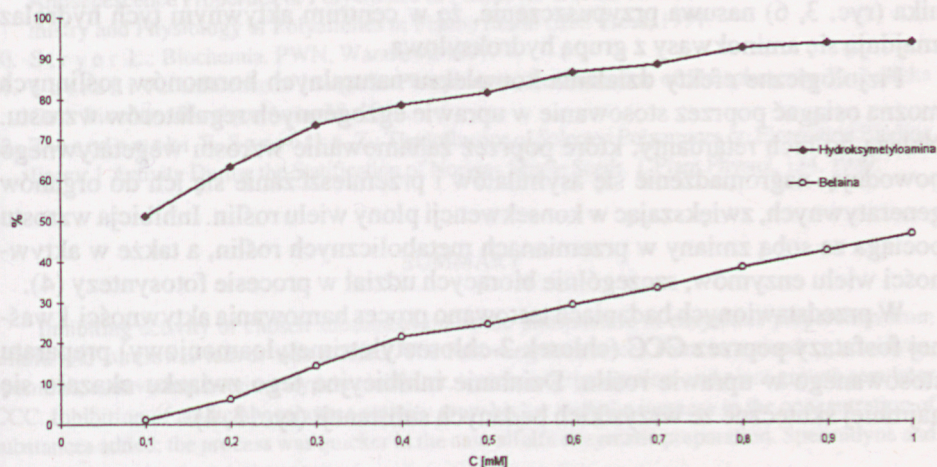


Ryc. 3. Inhibicja (w %) aktywności kwaśnej fosfatazy preparatu enzymatycznego wyizolowanego z soku lucerny w zależności od stężenia badanych substancji
Inhibition (in %) of the activity of acidic phosphatase in enzymatic preparation isolated from alfalfa juice in relation to the concentration of the examined substances



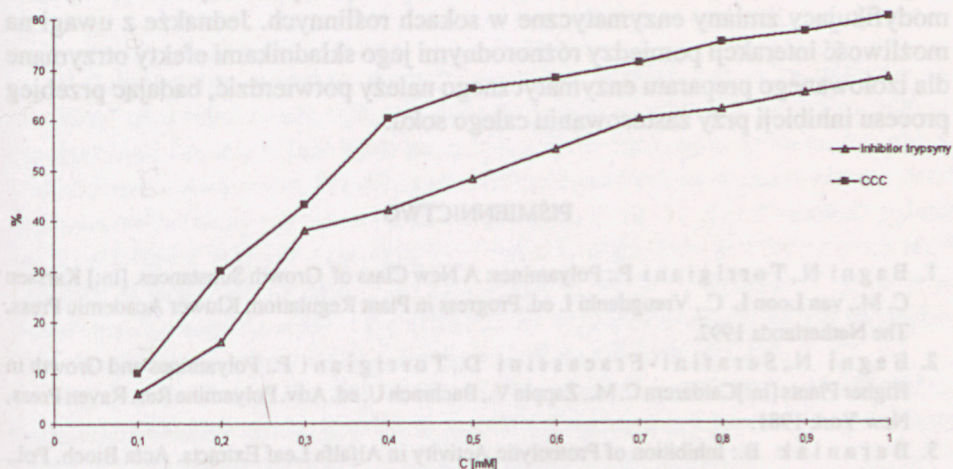
Ryc. 4. Inhibicja (w %) aktywności kwaśnej fosfatazy preparatu enzymatycznego wyizolowanego z soku liści słonecznika w zależności od stężenia badanych substancji
Inhibition (in %) of the activity of acidic phosphatase in enzymatic preparation isolated from the juice of sunflower leaves in relation to the concentration of the examined substances

Bezpośredni wpływ poliamin na aktywność enzymów polega między innymi na ich kowalencyjnym wiązaniu z białkami enzymatycznymi. Otrzymane w pracy wyniki efektywnego działania sperminy i spermidyny, amin posiadających oprócz grup $-NH_2$ również grupy $-NH$, wskazują na tworzenie dodatkowych elektrowalencyjnych połączeń. Fakt ten potwierdza także skuteczność hamowania aktywności kwaśnej fosfatazy



Ryc. 5. Inhibicja (w %) aktywności kwaśnej fosfatazy preparatu enzymatycznego wyizolowanego z soku liści słonecznika w zależności od stężenia badanych substancji

Inhibition (in %) of the activity of acidic phosphatase in enzymatic preparation isolated from the juice of sunflower leaves in relation to the concentration of the examined substances



Ryc. 6. Inhibicja (w %) aktywności kwaśnej fosfatazy preparatu enzymatycznego wyizolowanego z soku liści słonecznika w zależności od stężenia badanej substancji

Inhibition (in %) of the activity of acidic phosphatase in enzymatic preparation isolated from the juice of sunflower leaves in relation to the concentration of the examined substances

przez hydroksymetyloaminę (ryc. 2, 5). Połączenia te prowadzą do zmiany struktury białek enzymatycznych, ograniczając w efekcie ich aktywność.

Aktywność inhibitora trypsyny w stosunku do enzymów proteolitycznych polega na tworzeniu nieaktywnego kompleksu poprzez estrowe połączenie z resztą seryny, znajdującą się w centrum aktywnym proteinaz (10). Stwierdzony w przed-

stawionej pracy efekt inhibycyjny względem kwaśnej fosfatazy lucerny i słonecznika (ryc. 3, 6) nasuwa przypuszczenie, że w centrum aktywnym tych hydrolaz znajdują się aminokwasy z grupą hydroksylową.

Fizjologiczne efekty działania kompleksu naturalnych hormonów roślinnych można osiągać poprzez stosowanie w uprawie egzogennych regulatorów wzrostu. Należą do nich retardanty, które poprzez zahamowanie wzrostu wegetatywnego powodują nagromadzenie się asymilatów i przemieszczanie się ich do organów generatywnych, zwiększając w konsekwencji plony wielu roślin. Inhibicja wzrostu pociąga za sobą zmiany w przemianach metabolicznych roślin, a także w aktywności wielu enzymów, szczególnie biorących udział w procesie fotosyntezy (4).

W przedstawionych badaniach testowano proces hamowania aktywności kwaśnej fosfatazy poprzez CCC (chlorek 2-chloroetylotrimetyloamoniowy) preparatu stosowanego w uprawie roślin. Działanie inhibycyjne tego związku okazało się najmniej skuteczne ze wszystkich badanych substancji (ryc. 3, 4).

PODSUMOWANIE

Otrzymane wyniki sugerują, że spermina i spermidyna mogą być wykorzystane w procesie otrzymywania koncentratów białkowych jako czynnik korzystnie modyfikujący zmiany enzymatyczne w sokach roślinnych. Jednakże z uwagi na możliwość interakcji pomiędzy różnorodnymi jego składnikami efekty otrzymane dla izolowanego preparatu enzymatycznego należy potwierdzić, badając przebieg procesu inhibicji przy zastosowaniu całego soku.

PIŚMIENNICTWO

1. Bagni N., 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 1992.
2. Bagni N., Serafini-Fracassini D., Torrigiani P.: Polyamines and Growth in Higher Plants [in:] Calderera C. M., Zappia V., Bachrach U. ed. Adv. Polyamine Res. Raven Press, New York 1981.
3. Baraniak B.: Inhibition of Proteolytic Activity in Alfalfa Leaf Extracts. Acta Bioch. Pol., 40, 1, 1993.
4. Bode J., Bild A.: The Influence of (2-chloroethyl)trimethylammonium chloride (CCC) on Growth and Photosynthetic Metabolism of Young Wheat Plants (*Triticum aestivum* L.) J. Plant Physiol., 116, 1984.
5. Cho S. C.: Effects of Cytokinin and Several Inorganic Cations on the Polyamine Content of Lettuce Cotyledons. Plant Cell Physiol., 24, 1983.
6. Hall J. L., Flowers T. J., Roberts R. M.: Struktura i metabolizm komórek roślinnych. PWN, Warszawa 1982.
7. Drolet G., Dumbroff E. B., Legge R. L., Thompson J. E.: Radical Scavenging Properties of Polyamines. Phytochemistry, 25, 1986.
8. Kaur-Sawhney R., Flores H. E., Galston A. W.: Polyamine-induced DNA Synthesis and Mitosis in Oat Leaf Protoplast. Plant Physiol., 65, 1980.

9. Kaur-Sawhney R., Galston A.: Physiological and Biochemical Studies on the Antisenescence Properties of Polyamines in Plants. In: Slocum R. E., Flores H. E., eds. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, Raton CRC Press, 1991.
10. Stryer L.: *Biochemia*. PWN, Warszawa 1997.
11. Torrani A.: Influence of Inorganic Phosphate in the Formation of Phosphates by *Escherichia Coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 38, 1960.
12. Twardowski T., Szczotka Z.: The Influence of Selected Polyamines on Elongation Binding Factor 1 Activity During the Stratification of Norway Maple Seeds. *J. Plant Physiol*, 134, 1989.

SUMMARY

Inhibiting activity of chosen substances on acidic phosphatase in enzymatic preparation from alfalfa and sunflower leaves was studied. The following substances were examined: spermidyne, spermine, cadaverine, betaine, trypsin inhibitor, hydroxymethylamine, and plant growth regulator CCC. Inhibition of acidic phosphatase activity grew higher with the increase in the concentration of substances added; the process was quicker in the case alfalfa enzymatic preparation. Spermidyne and spermine were the most active ones.