

## AKTYWNOŚĆ PROTEAZ I INHIBITORÓW TRYPSYNY W STARZEJĄCYM SIĘ ZIARNIE ŻYTA O RÓŻNYM STOPNIU DOJRZAŁOŚCI

B. Sobieraj, K. Kulka

Instytut Biologii Roślin AR-T w Olsztynie

### WSTĘP

Badania dotyczące zachowania przez nasiona żywoności wskazują, że pełnowartościowe ziarno zbóż przechowywane w nieklimatyzowanych pomieszczeniach na ogół zachowuje swą wartość siewną przez kilka lat [6]. Zaobserwowano jednak, że poszczególne gatunki zbóż, a nawet odmiany, różnią się pod tym względem. Żyto na przykład, w porównaniu z pszenicą, owsem i jęczmieniem żywoność traci najszybciej [6].

Postępujące w czasie przechowywania starzenie się ziarna /przejawiające się obniżeniem zdolności kiełkowania czy też wzrastającą liczbą kiełków nienormalnych/ jest następstwem różnorodnych zakłóceń w przebiegu procesów metabolicznych w komórkach. Natura biochemiczna tych zakłóceń poznana została w niewielkim stopniu. Szczególnie interesujące, a dotychczas prawie niezbadane, jest zagadnienie regulacji aktywności enzymatycznej w starzejącym się ziarnie. Sygnalizowany w literaturze ujemny wpływ procesu starzenia się ziarna na aktywność proteaz związany jest, być może, w jakiś sposób ze zmianami poziomu inhibitorów tych enzymów.

### PRZEGLĄD LITERATURY

Zmiany w metabolizmie komórkowym ziarna, zachodzące podczas starzenia się, zostają zapoczątkowane przez uszkodzenie genomu i aberracje chromosomowe [5]. Dalsze zmiany dotyczą aktywności układów enzymatycznych i funkcji membran komórkowych. Obserwuje się skurczenie i częściowy zanik plazmolemy, połączone z wyraźnym odstawaniem protoplastu od ścian komórkowych [5]. Grzesiuk i Łuczyńska [2] wspominają o powstawaniu swoistych szczelin fizjologicznych

w membranach komórkowych, co pozostaje w związku z utlenianiem fosfolipidów i końcowych, hydrofobowych reszt kwasów tłuszczowych.

Na uwagę zasługuje nieharmonijny przebieg procesów oddechowych w starzejącym się ziarnie. Z jednej strony obserwuje się nasilenie oddychania i związany z tym spadek ilości cukrów rozpuszczalnych [4], z drugiej zaś - zmniejszenie ilości ATP wytwarzanego w mitochondriach, jako wynik zahamowania aktywności enzymów łańcucha oddechowego i rozkojarzenia fosforylacji oksydacyjnej [2, 10].

Postępujące starzenie się ziarna znajduje również swój wyraz w zmianie aktywności enzymów proteolitycznych, szczególnie w bielmie [7]. Nasuwa to przypuszczenie, że proces ten ma związek z działaniem naturalnych inhibitorów proteaz. W literaturze brak danych na ten temat. Celem pracy stało się więc porównanie aktywności endopeptydaz oraz inhibitorów trypsyny w kiełkującym ziarnie żyta po rocznym i trzyletnim okresie przechowywania. Podjęto też próbę uchwycenia ewentualnej zależności między aktywnością endopeptydaz oraz inhibitorów trypsyny w ziarnie różnego wieku a stopniem jego dojrzałości w momencie zbioru.

#### MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Do analiz użyto ziarna żyta ozimego odmiany Dańkowskie Złote i Pancerne, uprawianego na polstkach doświadczalnych AR-T w Tomaszkanie w latach 1974/75 i 1976/77. Ziarno zebrano w trzech fazach dojrzałości: mlecznej, woskowej i pełnej. Bezpośrednio po zbiorze ziarno zostało wymłócone, a następnie przechowywane w warunkach laboratoryjnych do roku 1978, tj. przez okres 1 roku i 3 lat. Po upływie tego czasu sprawdzono zdolność i energię kiełkowania ziarna /zgodnie z przepisami podanymi przez ISTA/ oraz badano aktywność inhibitorów trypsyny oraz endopeptydaz w bielmie pęczniejącego i kiełkującego ziarna. W badaniach tych wzorowano się na metodzie opisanej przez Polanowskiego [8] oraz Fursowa [1]. Ekstrakty z ziarna otrzymywano w następujący sposób: 1 g ziarna poddano pęcznieniu oraz kiełkowaniu w czasie 12, 24, 48 h w temperaturze 300 K (27°C). Jako kontroli użyto ziarna pęczniejącego 12 h w temp. 273-277 K /0-4°C/.

Po wyizolowaniu zarodków wraz z tarczką bielmo rozcierano w moździerzu z 10 ml buforu octanowego o pH 4,5 i mieszano w ciągu 1 h. W tych warunkach, jak podaje Polanowski [8], prawie połowa białek ulega wytrąceniu /w porównaniu z ekstrakcją w wodzie/, zaś frakcja inhibitorów pozostaje niemal bez zmian.

Ekstrakt pozostawiano przez 12 h w temp. 273-277 K /0-4°C/. W tym czasie zachodziła dysocjacja kompleksu proteaza - inhibitor; wytrącała się też część białek osadowych. Po odwirowaniu ekstraktu przy 10 000 g w ciągu 15 min przeprowadzano wysalanie supernatantu 50%

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  w ciągu 2 h w celu osadzenia frakcji inhibitora trypsyny. Dalsze wysalanie /do 100%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / prowadziło do uzyskania frakcji proteaz. Po odwirowaniu /10 000 g, 15 min/ inhibitor rozpuszczano w 3 ml 0,9% NaCl, zaś proteazy - w wodzie destylowanej i poddawano dializie w wodzie bieżącej /2 h/, a następnie w wodzie destylowanej /16 h/.

Aktywność inhibitorów trypsyny oznaczano, stosując L-N-benzoyl-D-L-arginyl-p-nitroanilid /BAPA/ firmy Merck /6 mM roztwór w dwumetylosulfotlenku/ oraz trypsynę krystalizowaną 3 razy, firmy Fluka /roztwór zawierał 0,25 mg trypsyny w 1 ml 1 mM HCl/.

Ekstrakt z bielma żyta ogrzewano w temp. 353 K /80°C/ przez 0,5 h. Następnie 0,2 ml tego ekstraktu preinkubowano przez 5 min z 0,025 ml trypsyny w temp. 293 K /20°C/, po czym dodawano 1 ml buforu Tris-HCl o pH 7,6 oraz 0,1 ml substratu /BAPA/ i poddawano 30-minutowej inkubacji w temp. 310 K /37°C/. Wykonano 2 próby kontrolne, mające na celu sprawdzenie aktywności wyjściowej trypsyny / $K_I$ / oraz ewentualnej aktywności trypsynowej ekstraktu z bielma żyta / $K_{II}$ / . Stopień inhibicji wyznaczano przez porównanie aktywności trypsyny w środowisku bez ekstraktu z bielma /kontrola I/ oraz po dodaniu ekstraktu zawierającego inhibitory /próba właściwa W/, korzystając ze wzoru:

$$I = \frac{K_I - (W - K_{II}) \times 0,006 \times 15}{K_I}$$

gdzie:

- I - aktywność inhibitorów trypsyny,
- W -  $E_{405 \text{ nm}}$  próby właściwej,
- $K_I$  -  $E_{405 \text{ nm}}$  próby kontrolnej I,
- $K_{II}$  -  $E_{405 \text{ nm}}$  próby kontrolnej II,
- 0,006 - ilość  $\mu\text{g}$  trypsyny w roztworze,
- 15 - współczynnik przeliczeniowy w warunkach doświadczenia.

Wyniki podano w  $\mu\text{g}$  zinaktywowanej trypsyny w przeliczeniu na 1 g świeżej masy i na bielmo 100 ziarniaków.

Aktywność endopeptydaz oznaczano we frakcji uzyskanej /jak wspomniano wyżej/ po wysalaniu ekstraktu z bielma żyta 100%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Jako substratu użyto kazeiny /1% roztwór w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6/. 1 ml kazeiny po dodaniu 1 ml ekstraktu z bielma inkubowano przez 24 h w temp. 310 K /37°C/. Reakcję przerywano przez dodanie 3 ml 10% TCA /do próby kontrolnej TCA dodawano od razu/. Następnie próbki wstawiano na 15 min do temp. - 15°C, a po wytrąceniu się drobnocząsteczkowych produktów rozpadu kazeiny wirowano przy 5 000 g przez 15 min. Pomiaru ekstynkcji

dokonano na spektrofotometrze przy 280 nm, wobec wody. Uzyskane wyniki wyrażono w jednostkach enzymatycznych, określających różnicę między próbą właściwą a kontrolną w warunkach doświadczenia.

### WYNIKI I ICH OMOWIENIE

W celu dokonania wstępnej charakterystyki badanego materiału określono energię i zdolność kiełkowania ziarna żyta o różnej dojrzałości i po różnym okresie przechowywania /tab. 1/.

Tabela 1

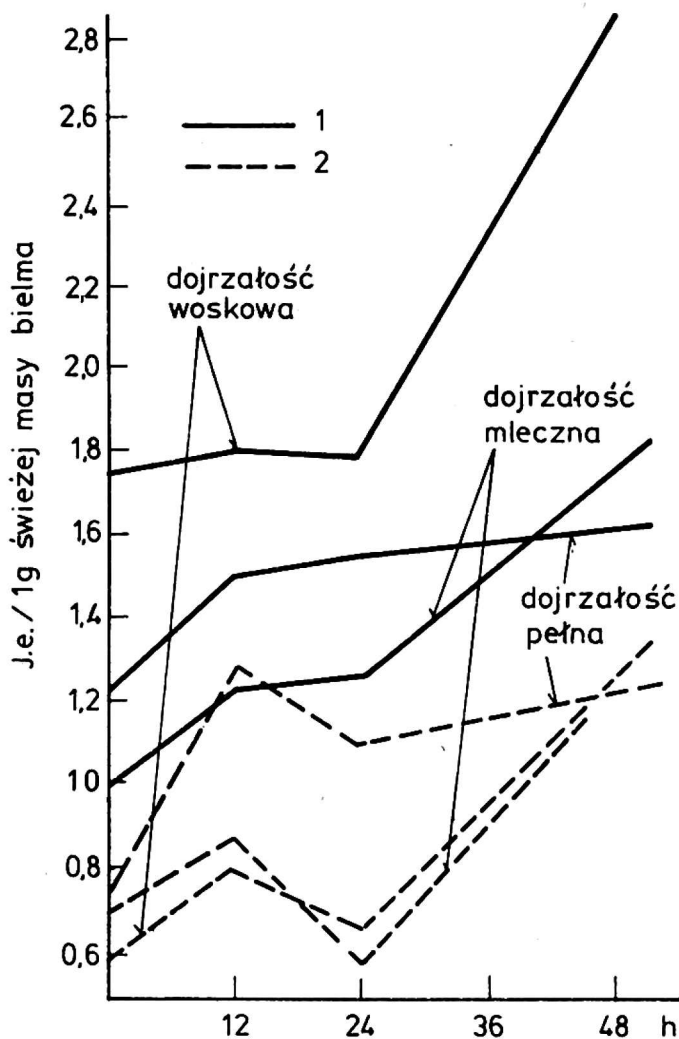
Zdolność i energia kiełkowania ziarna żyta o różnej dojrzałości /ze zbioru w latach 1975 i 1977/ po różnym okresie przechowywania

Odmiana	Dojrzałość	Energia kiełkowania		Zdolność kiełkowania		Procent kielków nienormalnych	
		z 1977 r. przechowywane 1 rok	z 1975 r. przechowywane 3 lata	z 1977 r. przechowywane 1 rok	z 1975 r. przechowywane 3 lata	z 1977 r. przechowywane 1 rok	z 1975 r. przechowywane 3 lata
Pancerne	mleczna	20	0	50	0	9	0
	woskowa	43	23	98	56	0	42
	pełna	72	53	81	66	3	12
Dańkow- skie	mleczna	28	3	43	10	8	3
	woskowa	33	19	98	53	1	40
Złote	pełna	70	56	87	78	3	10

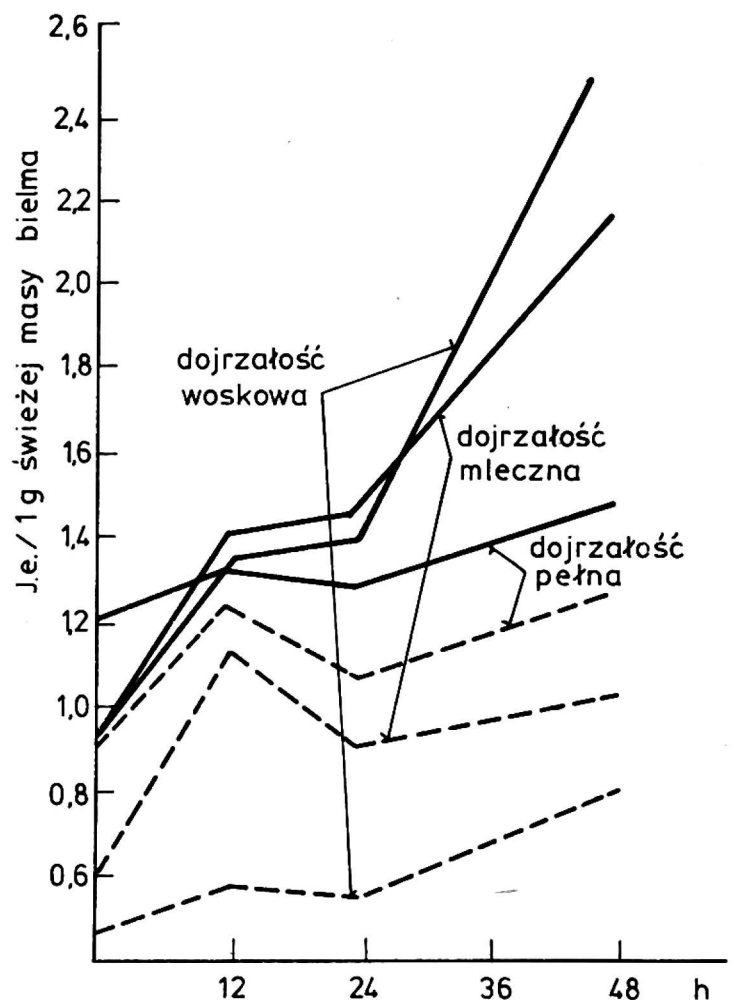
Ziarno zebrane w 1977 r., jak już wspomniano, przechowywane było w warunkach laboratoryjnych przez 1 rok, zaś zebrane w 1975 r. - 3 lata. U obu badanych odmian żyta /Pancerne i Dańkowskie Złote/ stwierdzono znaczne obniżenie energii i zdolności kiełkowania po trzyletnim okresie przechowywania w porównaniu z ziarnem przechowywanym przez rok. Malejącej żywotności ziarniaków towarzyszyło pojawianie się coraz większej liczby kielków nienormalnych. Najszybciej traciło żywotność ziarno o dojrzałości mlecznej. Po 3 latach przechowywania kiełkowało ono bardzo słabo albo /jak w przypadku odmiany Pancerne/ wcale nie kiełkowało.

Aktywność endopeptydaz w starzejącym się ziarnie żyta obu badanych odmian przedstawiono na rysunku 1 i 2. Aktywność tę wyrażano w jednostkach enzymatycznych w przeliczeniu na 1 g świeżej masy bielma. Najbardziej widoczne są różnice w aktywności endopeptydaz między ziarnem przechowywanym 3 lata i rok, co jest zgodne z danymi spotykanymi w literaturze [4, 5, 7]. Wspomniany spadek aktywności endopeptydaz w ziarnie starym nie zawsze był proporcjonalny do stopnia utraty przez nie żywotności. Na przykład aktywność endopeptydazy w ziarnie o dojrzałości mlecznej jest dość wysoka, mimo, że ziarno to nie kiełkowało wcale. Podobne obserwacje poczynili również Nowak i Mierzwińska [7].

Stosunkowo najmniejsze zmiany zarówno w czasie kiełkowania, jak też będące wynikiem niejednakowego okresu przechowywania, nastąpiły w bielmie ziarna o dojrzałości pełnej. Natomiast w bielmie ziarna niezupełnie dojrzałego /dojrzałość woskowa czy mleczna - głównie w roku 1977/aktywność endopeptydaz rosta wielokrotnie podczas kiełkowania, zwłaszcza po upływie 24 h /rys. 1 i 2/. Podobne wyniki uzyskaliśmy w roku 1977 w pracy dotyczącej aktywności proteaz w bielmie kiełkującego ziarna jęczmienia [11]. Wspomniany wzrost aktywności endopeptydaz w miarę kiełkowania w ziarnie przechowywanym 3 lata zaznaczył się o wiele słabiej, lecz również dotyczył /szczególnie w ziarnie odmiany Dańkowskie Złote/ ziarna nie w pełni dojrzałego.



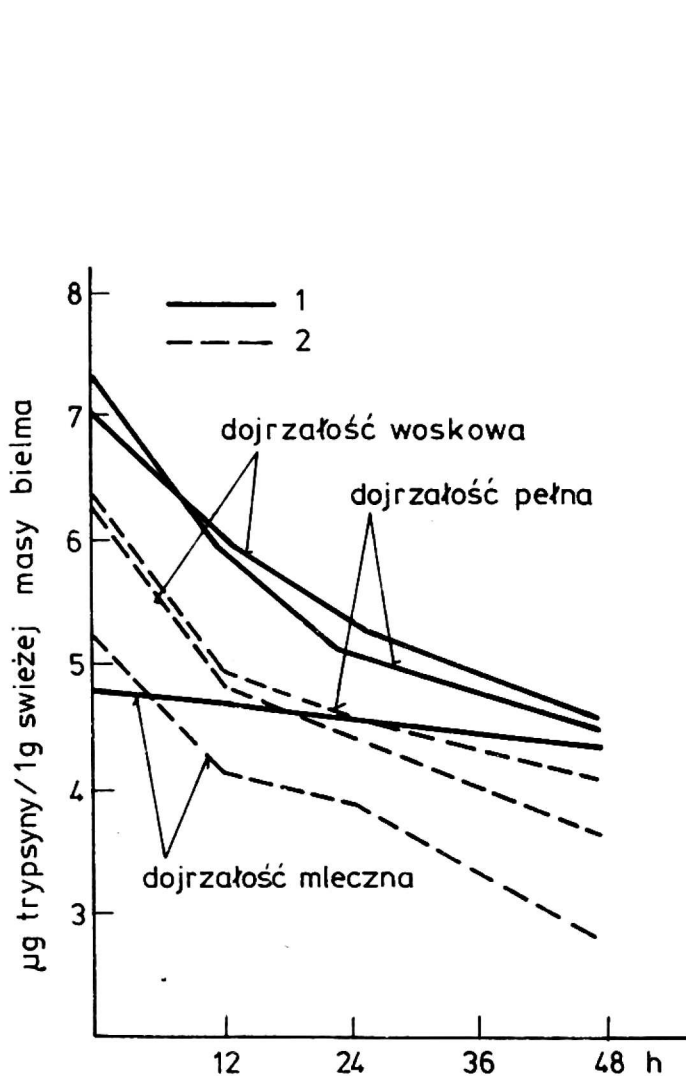
Rys. 1. Aktywność endopeptydazy w starzejącym się ziarnie żyta ozimego Dańkowskie Złote podczas pęcznienia i kiełkowania: 1 - ziarno z 1977 r. /przechowywane 1 rok/, 2 - ziarno z 1975 r. /przechowywane 3 lata/



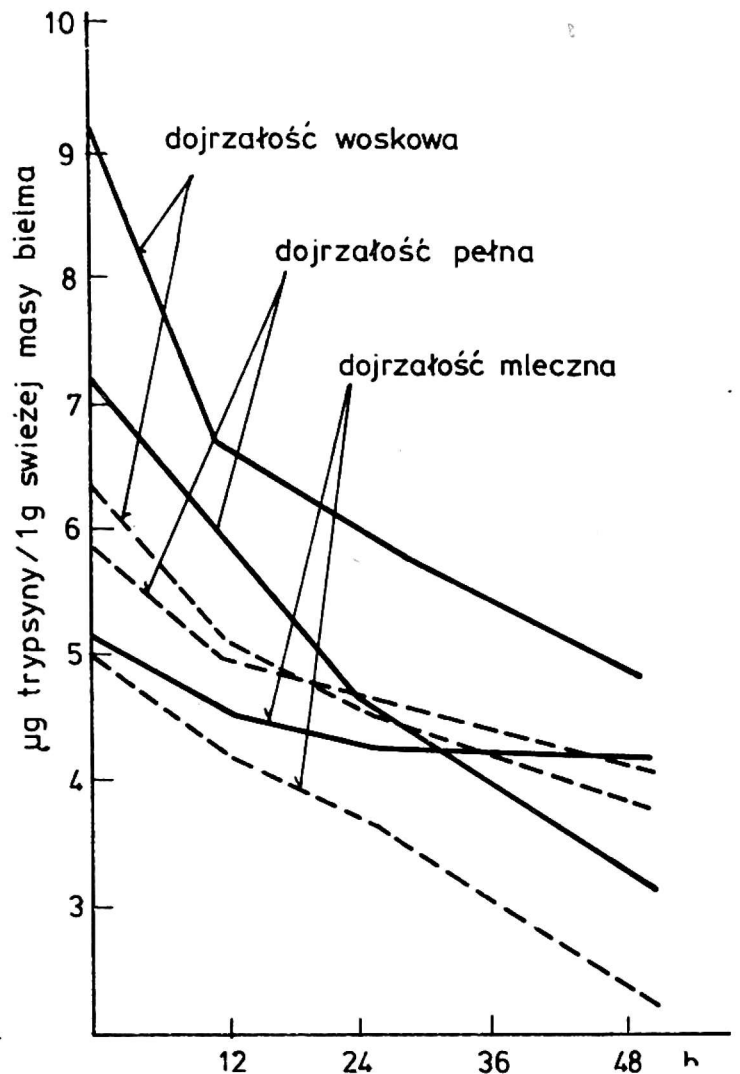
Rys. 2. Aktywność endopeptydazy w starzejącym się ziarnie żyta ozimego Pancerne podczas pęcznienia i kiełkowania: 1 - ziarno z 1977 r. /przechowywane 1 rok/, 2 - ziarno z 1975 r. /przechowywane 3 lata/

Poziom inhibitorów trypsyny w starzejącym się ziarnie żyta przedstawiają rysunki 3 i 4. Aktywność inhibitorów, podobnie jak endopeptydaz, wyrażono w przeliczeniu na 1 g świeżej masy bielma. W ziarnie starszym, po 3 latach przechowywania, poziom inhibitorów trypsyny był wyraźnie niższy w porównaniu z ziarnem po rocznym przechowywaniu. Niezależnie jednak

od długości okresu przechowywania ziarna poziom wyjściowy inhibitorów najmniejszy był w dojrzałości mleczonej. Jest to zgodne z danymi literatury, gdyż, jak podają Kirsi [3] oraz Polanowski [3], najbardziej intensywne gromadzenie inhibitorów trypsyny w ziarniakach zbóż ma miejsce dopiero między 20 a 30 dniem po kwitnieniu.



Rys. 3. Aktywność inhibitorów trypsyny w starzejącym się ziarnie żyta Pancerne podczas pęcznienia i kiełkowania: 1 - ziarno z 1977 r. /przechowywane 1 rok/, 2 - ziarno z 1975 r. /przechowywane 3 lata/



Rys. 4. Aktywność inhibitorów trypsyny w starzejącym się ziarnie żyta Dańkowskie Złote podczas pęcznienia i kiełkowania: 1 - ziarno z 1977 r. /przechowywane 1 rok/, 2 - ziarno z 1975 r. /przechowywane 3 lata/

W miarę upływu czasu kiełkowania koncentracja inhibitorów w przeliczeniu na 1 g świeżej masy bielma obniżała się, co również znajduje potwierdzenie w literaturze [9]. Dane te są podobne u żyta obu badanych odmian.

Warto również zwrócić uwagę, że w ziarnie o dojrzałości mleczonej zebranym w 1977 r. poziom inhibitorów trypsyny nie ulega prawie zmianom w czasie kiełkowania. Odmiennosć pod tym względem ziarna o dojrzałości mleczonej w porównaniu z bardziej dojrzałym zaobserwowana została także w badaniach inhibitorów trypsyny w bielmie kiełkującego ziarna jęczmienia, prowadzonych przez nas w roku 1977 [11]. W czasie pierwszych dwu dni kiełkowania stwierdzono



nawet w niedojrzałym ziarnie jęczmienia szybkie i znaczne nagromadzenie się inhibitorów w bielmie, widoczne jeszcze w okresie 48-96 h kiełkowania, jakkolwiek już w mniejszym stopniu.

Otrzymane wyniki wskazują, że w czasie pierwszych 24 h kiełkowania nie uchwycono korelacji między aktywnością proteaz oraz inhibitorów trypsyny. Zależność taka uwidoczniła się dopiero w okresie 24-48 h kiełkowania, kiedy postępującemu spadkowi koncentracji inhibitorów w tkankach bielma towarzyszył wzrost aktywności endopeptydazy. Wyraźniej zaznaczyła się wspomniana zależność w ziarnie przechowywanym przez rok, które zachowało znacznie większą żywotność niż ziarno po 3 latach przechowywania.

#### LITERATURA

1. Fursow C.W.: Proteazy i sistema "proteaza - inhibitor" rodielskich linii i gibridow kukuruzy. Fizjologia i biochemija kulturnych rastienij 1975, 7/4 , 424-428.
2. Grzesiuk St., Łuczyńska J.: Przemiany fizjologiczno-biochemiczne w nasionach podczas spoczynku i przechowywania. Zesz Probl. Post. Nauk Roln. 1971, 113, 69-96.
3. Kirsi M.: Formation of Proteinase Inhibitors in Developing Barley Grain. *Physiol. Plant.* 1973, 29, 141-144.
4. Koźmiana N. P.: Biochemija ziarna i produktow jego piererabotki. *Fermenty ziarna.* 6, 213-224, Kołos, Moskwa 1976.
5. Kulka K.: Fizjologiczna i biochemiczne mechanizmy starzenia się nasion. *Biuletyn IHAR* 1973, 5-6, 37-44.
6. Mazurek J.: Biologia kiełkowania i porastania ziarna odmian zbóż jarych. IUNG, Puławy, 1975.
7. Nowak J., Mierzwińska T.: Activity of Proteolytic Enzymes in Rye Seeds of Different Ages. *Zeitschrift Plant Physiologie*, 1978, 86, 15-22.
8. Polanowski A.: Trypsin Inhibitor From Rye Seeds. *Acta Biochemica Polonica* 1967, 14/4; 389-395.
9. Polanowski A.: Preparacja oraz charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna inhibitorów trypsyny z ziarniaków żyta. Warszawa, PWN, 1976.
10. Roberts E.H.: Loos of Seed Viability. Chromosomal and Genetical Aspects. *Seed Sci. Technol.* 1973, 1-3, 515-547.
11. Sobieraj B., Kulka K., Tomaszewska B.: Aktywność enzymów proteolitycznych oraz inhibitorów trypsyny w dojrzewającym i kiełkującym ziarnie jęczmienia jarego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* /w druku/.

Б.Соберай, К.Кулька

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАЗ И ИНГИБИТОРОВ ТРИПСИНА В СТАРЕЮЩЕМ  
ЗЕРНЕ РЖИ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ СПЕЛОСТИ

Р е з ю м е

Зерно ржи собранное /в 1975 и 1977 гг./ в фазе молочной, восковой и полной спелости хранили в лабораторных условиях в течение одного года и трех лет, а затем сравнивали активность ингибиторов трипсина и эндопептидазы в эндосперме этого зерна после его набухания и прорастания во время 12, 24 и 48 часов.

В зерне ржи собранном в 1975 г. /после 3-летнего периода хранения/ наблюдалось ослабление жизнеспособности, а также снижение активности как эндопептидазы так и ингибиторов трипсина в сравнении с зерном хранимым в течение одного года. Указанные изменения проявлялись наиболее сильно в зерне собранном до достижения полной спелости.

Зависимость между активностью эндопептидазы и ингибиторов трипсина наблюдалось только через 24-48 часов прорастания. Продвигающееся снижение концентрации ингибиторов в тканях эндосперма сопровождалось в то время ростом активности эндопептидазы. Указанная зависимость была более заметной в зерне хранимом в течение одного года, жизнеспособность которого была сильнее, чем зерна хранимого в течение трех лет.

B. Sobieraj, K. Kulka

ACTIVITY OF PROTEASES AND OF TRYPSIN INHIBITORS  
IN AGEING RYE GRAIN WITH DIFFERENT RIPENESS DEGREE

Summary

Rye grain collected in 1975 and 1977 in the milk, wax and full ripeness phase was stored under laboratory conditions in the period of 1 year and 3 years and then the activity of trypsin inhibitors and endopeptidase in the endosperm of this grain subjected to swelling and germination during 12, 24 and 48 hours was compared.

In the rye grain harvested in 1975 a vitality drop and a weakening of the activity of endopeptidases and trypsin inhibitors was observed after its 3-year storage compared with the



grain stored for 1 year. These changes occurred more strongly in the grain collected before reaching its full maturity.

The relationship between the activity of endopeptidase and of trypsin inhibitors was observed only after 24-48 hours of germination. A progressing drop of the concentration of inhibitors in endosperm tissues was accompanied then with a growth of the endopeptidase activity. This relationship occurred more distinctly in the grain stored for 1 year, which appeared to be more vital than the grain after its 3-year storage.