

Jan Załęski

AKTYWNOŚĆ FOSFORYLAZY W ZIELONYM GROSZKU PRZEZNACZONYM DO KONSERWOWANIA

Zakład Badania Żywności i Przedm. Użytku PZH w Warszawie
Kierownik Zakładu: prof. dr Stanisław Krauze

i Zakład Warzywnictwa Szkoły Gł. Gosp. Wiejsk. w Skierniewicach
Kierownik Zakładu: prof. dr Emil Chroboczek

WSTĘP

1. WARTOŚĆ PRZEMYSŁOWA ZIELONEGO GROSZKU

W czasie kontroli higieny procesów technologicznych w przemyśle owocowo-warzywnym spotkałem się ze znacznymi trudnościami, jakie ma przemysł przy przerobie groszku na konserwy puszkowe¹. Trudności te związane są głównie ze spiętrzeniami nietrwałego surowca, które powstają na skutek konieczności dokonywania zbioru groszku natychmiast, gdy dojdzie on do dojrzałości przemysłowej. W czasie dojrzewania groszku zachodzi w ziarnie szybka przemiana cukrów na skrobię. Groszek młody, w którym ten proces przemiany cukrów na skrobię jest mało zaawansowany, daje słodką delikatną konserwę o klarownej zalewie, groszek starszy daje konserwę mączystą, mniej słodką, o zalewie mętnej². Ustalenie właściwego momentu sprzętu jest trudne, gdyż obok dążności do otrzymania konserw wysokiej jakości z surowca możliwie młodego, odgrywa rolę aspekt ekonomiczny, wobec zwiększającej się równolegle z dojrzewaniem wydajności ziarna z danej powierzchni plantacji. Wspomniana przemiana cukrów na skrobię zachodzi szybko; groszek przez okres optymalnej dojrzałości przemysłowej przechodzi w czasie od kilku godzin do trzech dni zależnie od odmiany i warunków atmosferycznych. Prace nad doborem korzystnych w przetwórstwie odmian groszku prowadzone są w Polsce od lat przez kilka zakładów naukowych, przy czym nie tylko w produkcji, lecz także w badaniach naukowych właściwy moment sprzętu groszku z pola określa się zazwyczaj „na oko“, wobec braku szybkiej i obiektywnej metody³.

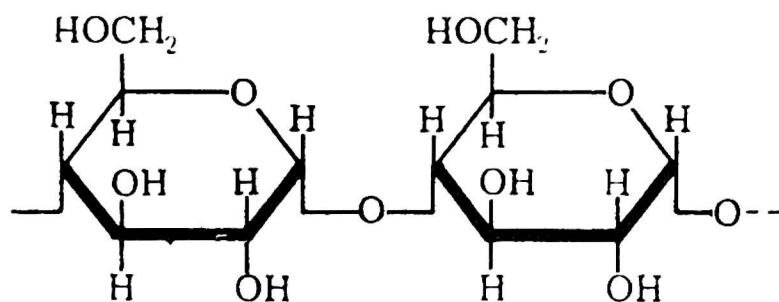
Metoda określania optymalnej dojrzałości technicznej była i jest przed-

miotem wielu prac i sporów w piśmiennictwie krajowym i obcym^{3, 4 5, 6}. Dotychczas stosowanymi miernikami dojrzałości są: zawartość suchej masy, zawartość skrobi, wartość stosunku skrobia : cukry, zawartość składników nierozpuszczalnych w etanolu, zawartość wapnia w skórce, ciężar właściwy ziarna (próby flotacyjne), jędrność ziarna (oznaczana tenderometrem) i kilka jeszcze innych metod chemicznych i fizycznych — obszernie omówionych w pracy Makowera⁷, a częściowo w pracy Kaniugi⁸. Poszczególne mierniki dojrzałości są ze sobą mniej lub więcej skorelowane, jednak przy przeważającej większości metod wartości optymalne danego wskaźnika dojrzałości zmieniają się nieco w każdym okresie wegetacyjnym. Metodą odniesienia jest ostatnio metoda tenderometryczna, jednak brak tego typu aparatów w kraju pozbawia możliwości jej stosowania, a więc możliwości sprowadzenia wyników licznych badań do jakiegoś wspólnego mianownika.

Ponieważ przemiana cukrów na skrobię ma w roślinie charakter enzymatyczny, wydawało się możliwe poszukiwanie nowego biologicznego testu dojrzałości, przez zwrócenie uwagi na enzymy przemiany cukrowo-skrobiowej. W szczególności enzym fosforylaza, uważany za podstawowy biologiczny katalizator tych przemian, wydawał się najbardziej godny uwagi. Oczekiwano wyraźnej zmiany w aktywności fosforylazy w okresie zapoczątkowania odkładania substancji zapasowych w ziarnie. Prześledzenie ewentualnych zmian w aktywności fosforylazy miało nie tylko praktyczny cel wykorzystania nowego testu biologicznego do oceny surowca w przemyśle spożywczym, lecz wydawało się szczególnie interesujące, wobec znacznych luk w wiadomościach na temat tego niedostatecznie jeszcze poznanego enzymu roślinnego.

2. BUDOWA SKROBI; TYPY WIĄZAŃ W ŁAŃCUCHACH WIELOCUKROWYCH AMYLOZY I AMYLOPEKTYNY

Poglądy na budowę skrobi stale ulegają ewolucji w miarę jak ogłaszane są wyniki badań chemicznych, fizycznych i enzymatycznych zmierzających do pełnego wyświetlenia sprawy. Skrobie naturalne mogą być rozdzielone na dwie frakcje, różniące się własnościami fizycznymi, a także budową chemiczną. Jedna frakcja — amyloza — zbudowana jest z długich łańcuchów jednostek glikopyranozy, podczas



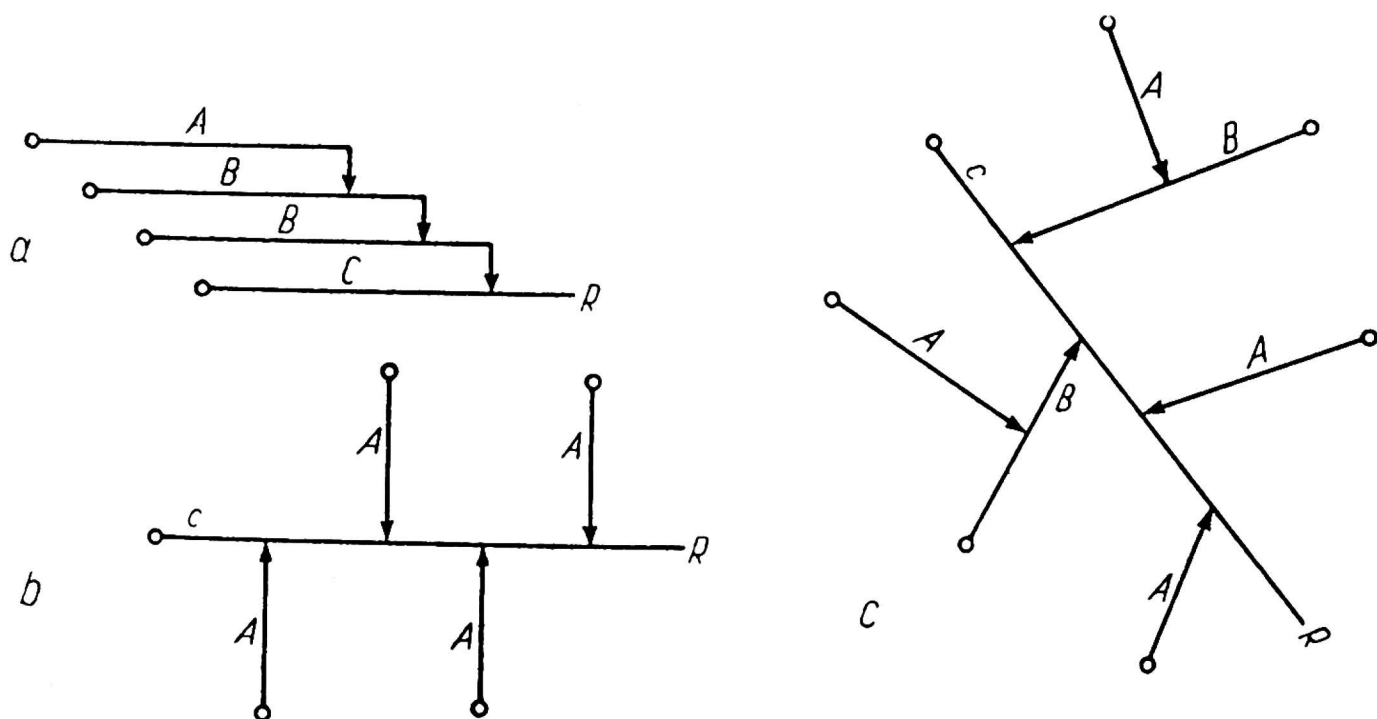
Rys. 1. Wiązanie alfa glikozydowe (maltozowe) w amylozie. Fragment łańcucha amylozy

gdy frakcja druga — amylopektyna — składa się ze stosunkowo krótkich i silnie rozgałęzionych łańcuchów.

W amylozie jednostki glikozowe połączone są ze sobą wiązaniami α -glikozydowymi pomiędzy pierwszym i czwartym węglem (rys. 1). Oprócz tych najczęściej spotykanych w amylozie wiązań, dających długie, proste łańcuchy wielocukru, występuje w cząsteczce niewielka ilość wiązań rozgałęziających⁸, przy czym wiele danych wskazuje, że są to wiązania β -glikozydowe^{9, 10}.

W amylopektynie występują dwa typy wiązań między jednostkami glikopyranozy. Typ pierwszy to identyczne jak w amylozie wiązanie maltozowe (α -1,4-glikozydowe), drugi rodzaj wiązań to rozgałęziające wiązanie α -1,6-glikozydowe. Znane są w piśmiennictwie trzy propozycje struktury amylopektyny: a) Hawortha^{11, 12} — płytkowa, b) rozwidlona — Staudingera^{13, 14} i c) rozgałęziona — Meyera¹⁵ (rys. 2).

W schematach tych widzimy trzy typy łańcuchów: łańcuch A jest dowiązany przez wiązanie przy pierwszym węglu, łańcuch C z innymi łańcuchami wiąże się tylko przez węgiel szósty, a w łańcuchu B mamy jedno wiązanie przy węglu



Rys. 2. Struktura amylopektyny: a — wg Hawortha, b — wg Staudingera, c — wg Meyera.

- o — nieredukujący koniec łańcucha,
- — wiązanie alfa — 1,6,
- R — redukujący koniec łańcucha.

pierwszym oraz jedno lub więcej wiązań przy szóstym węglu. Każda z podanych struktur ma tylko jeden łańcuch C z wolną grupą redukującą, a różnią się między sobą ilością łańcuchów A i B w cząsteczce (struktura Staudingera w ogóle nie ma łańcuchów B). Łańcuchy są krótkie — zawierają ok. 25 jednostek glikozowych w łańcuchu lub między sąsiednimi wiązaniami. Boczne wiązania 1,6 występują mniej więcej w środku łańcucha. W odróżnieniu od skrobi zbóż, amylopektyny z bulw, korzeni i sago zawierają drobne ilości kwasu fosforowego związanego z szóstym atomem węgla. Wg Posternaka¹⁶ grupy fosforanowe są związane estrowo z tymi jednostkami glikozy, które są odległe zarówno od grup redukujących jak i od roz-

gałęzi, czyli są ulokowane na prostych odcinkach zewnętrznych łańcuchów. Zawartość fosforu nie wywiera żadnego wyraźnego wpływu na własności skrobi*.

Wiele danych doświadczalnych, szczególnie z badań enzymatycznych, przemawia za tym, że słuszna jest struktura Meyera¹⁷. Rozgałęzienia w łańcuchu wielocukrów (skrobi, glikogenie) występują jedynie przy szóstym węglu. Rozgałęzienia w strukturze wielocukrów można wykazać badając stosunek ilościowy wolnych grup aldehydowych do niealdehydowych końcowych grup łańcuchów. Jeżeli ten stosunek wynosi 2 lub więcej, należy przyjąć istnienie rozgałęzień: na N końcowych grup nieredukujących jest jedna wolna grupa redukująca i $N-1$ rozgałęzień łańcucha. Gdy N jest dużo wyższe od jedności, można przyjąć, że jest ono praktycznie równe $N-1$, dlatego ilość (%) wolnych nieredukujących grup jest praktycznie miarą stopnia rozgałęzienia. Dla większości amylopektyn procent ten wynosi 5%, dla amylopektyny ziemniaczanej 4%, a dla większości glikogenów 9—10%.

3. UDZIAŁ ENZYMÓW W PROCESACH BUDOWY I ROZKŁADU SKROBI ZE SZCZEGÓLNYM OMÓWIENIEM ROLI FOSFORYLAZY; NOMENKLATURA I ZAKLASYFIKOWANIE FOSFORYLAZ

Amyloliza skrobi jest jedną z najdawniej poznanych reakcji enzymatycznych. W reakcji tej skrobia ulega hydrolizie na dekstryny i maltozę. Ponieważ reakcje enzymatyczne są z reguły odwracalne, szukano możliwości syntezy skrobi *in vitro* w obecności amylazy. Nie osiągnięto jednak rezultatów — co więcej — stwierdzono, że ani maltoza, ani dekstryny nie występują w komórce roślinnej. Nowe światło na to zagadnienie rzuciły badania Parnasa i Baranowskiego¹⁸⁻²¹, którzy pierwsi wykazali, że w tkankach zwierzęcych glikogen jest estryfikowany z kwasem fosforowym, dając monofosforan glikozy. Proces ten Parnas z Baranowskim w odróżnieniu od hydrolizy nazwali fosforolizą. Ostern i inni²² wykazali, że wśród produktów degradacji glikogenu występuje fruktozo-6-fosforan. Cori i jego współpracownicy^{23, 24} stwierdzili, że najpierw powstaje glikozo-1-fosforan, nazwany *estrem Cori* oraz że reakcja ta zachodzi pod wpływem specyficznego enzymu nazwanego fosforylazą (P-enzym). Hanes^{25, 26} wykazał, że podobna reakcja zachodzi ze skrobią pod wpływem fosforylasy roślinnej, znalezionej przez niego w bulwach ziemniaka i dojrzałym ziarnie grochu. Reakcja fosforolizy wielocukrów jest odwracalna, tzn. wielocukier pod działaniem fosforylasy może być budowany i rozkładany. Dalsze badania wykazały, że w procesach budowy i degradacji wielocukrów biorą udział także inne enzymy. Meyer, Bernfeld²⁷ w drożdżach, Cori²³ w wyciągu z serca i wątroby, a inni^{29, 30, 31} w produktach roślinnych znaleźli inny towarzyszący fosforylase enzym, dla którego przyjęto nazwę Q-enzym, lub nadaną przez Bernfelda nazwę izofosforylaza. Ostatnio wykazano istnienie nowego enzymu, nazwanego przez Peata^{9, 10} enzymem Z, który występując jako zanieczyszczenia preparatów β -amylazy dość długo uchodził uwadze.

Gdy na cząsteczkę amylopektyny działa β -amylaza, rozkładane są tylko zewnętrzne łańcuchy do wiązań α -1,6. W ten sposób, w postaci maltozy, można wydzielić z amylopektyny najwyżej $\frac{2}{3}$ jednostek glikozy. Reszta pozostaje jako tzw. dekstryny resztowe, o ciężarze cząsteczkowym ok. 20 razy mniejszym niż ciężar cząsteczki amylopektyny. Wnioskuje się, że zewnętrzne łańcuchy muszą być o wiele dłuższe niż odcinki między rozgałęzieniami. Zgodne to jest z obserwacją, że dekstryny

* W przytoczonej opinii Meyera (Meyer H. K., Gibbons G. C., *Advances in Enzymology*, 1951, t. 12, str. 353) chodzi o właściwości biochemiczne. W technologii znany jest wpływ obecności grup fosforanowych na wartość klejową skrobi.

resztowe mają zwartą budowę β -amylaza atakuje końce łańcuchów wielocukru i zatrzymuje się w odległości 1—3 cząsteczek glikozowych od wiązań rozgałęziających³². α -amylaza może rozkładać także łańcuchy wewnętrzne między wiązaniami α — 1,6 toteż rozkłada skrobię prawie całkowicie do maltozy, pozostawiając nierozłożone rozgałęzienia (częstokroć w formie trójcukrów).

Fosforylaza także atakuje zewnętrzne łańcuchy, odszczepiając kolejno od końca sfosforylowane cząsteczki glikozy. Podobnie jak β -amylaza zatrzymuje się ona na wiązaniach rozgałęziających. Meyer i Bernfeld²⁷ wykazali, że fosforylaza ziemniaczana rozkłada tyle wiązań 1,4- α -glikozydowych, ile jest w cząsteczce wielocukru zewnętrznych nieredukujących grup.

Izofosforylaza atakuje wiązania rozgałęziające cząsteczkę amylopektyny (wiązania α -1,6-glikozydowe), przy czym podobnie jak fosforylaza nie atakuje wiązań wewnątrz cząsteczki. Dekstryny resztowe poddane działaniu izofosforylasy stają się podatne na działanie β -amylazy i fosforylasy.

Cząsteczka amylopektyny powstaje pod wpływem fosforylasy* przy jednoczesnym działaniu izofosforylasy, która odrywa odcinki łańcucha linearnego rozkładając wiązanie 1,4 i tworząc rozgałęzienia łańcucha wiązaniem 1,6. Ponieważ dowiązywanie jednostek glikozy odbywa się kolejno i zaczyna od końca aldehydowego przyszej makrocząsteczki, starsze części łańcucha pozostają dłużej pod działaniem izofosforylasy niż łańcuchy bardziej zewnętrzne. To częściowo tłumaczy dlaczego cząsteczka amylopektyny jest wewnątrz silniej rozgałęziona. Ponieważ izofosforylaza może działać dopiero wtedy, gdy łańcuch wielocukru zawiera co najmniej 42 jednostki glikozy³³ nie może ona tworzyć wiązań rozgałęziających w krótkich łańcuchach zewnętrznych. Ta obserwacja Baileya dodatkowo tłumaczy silniejsze rozgałęzienie wewnątrz cząsteczki amylopektyny.

Enzym Z tworzy i rozrywa wiązania rozgałęziające w amylozie. Budowa wiązań rozgałęziających nie jest jeszcze wyjaśniona; wydaje się pewne, że występują one także przy szóstym węglu.

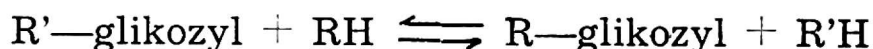
Czyste preparaty β -amylazy hydrolizują amylozę tylko w 70%, a czyste preparaty fosforylasy rozkładają ten wielocukier w 89—93%.

Terminologia enzymów działających na związki fosforowe jest trochę przypadkowa i do dziś utrzymuje się z uwagi na tradycję, a nie z uwagi na pełne jej uzasadnienie. W szczególności pewnej rewizji wymaga nomenklatura fosforylaz. Parnas wprowadzając określenie fosforoliza zwrócił uwagę na podobieństwo tego rozkładu do rozkładu hydrolitycznego i od jego pionierskiej nazwy „fosforolizy“ utworzono nazwy fosforylaz. Podobieństwo tych dwóch procesów nie jest może tak istotne jak różnice między nimi. O ile bowiem przy hydrolizie estrów fosforowych np. pod działaniem fosfataz wiązanie pęka między tlenem i fosforem $C-O^+P$ i odszczepiona zostaje grupa fosforylowa $-PO_3H_2$, to przy działaniu fosforylaz pęka wiązanie między węglem i tlenem $O+O-P$ (ogólnie $X+O-P$) i wydzielona zostaje grupa fosforanowa $-OPO_3H_2$ ³⁴. Reakcje pierwszego typu są trudnoodwracalne, natomiast fosforylasy i grupa enzymów pokrewnych katalizują reakcje łatwoodwracalne. Przy dotychczasowej wadliwej termi-

* Znany jest już inny schemat powstawania amylopektyny (patrz G. J. Walker, W. J. Whelan; Nature 1959, t. 183 s. 46), w którym pierwszy etap kondensacji zachodzi przy udziale D-enzymu. J. Z.

nologii Q-enzym, niewątpliwie blisko spokrewniony z fosforylazami, nie powinien być z nimi łączony, gdyż fosforan nie jest konieczny przy przeniesieniu łańcucha wielocukru w inne miejsce makrocząsteczki. Co więcej, okazuje się, że typowe fosforylasy mogą działać bez obecności fosforanu nieorganicznego, który może być zastąpiony arsenianem.

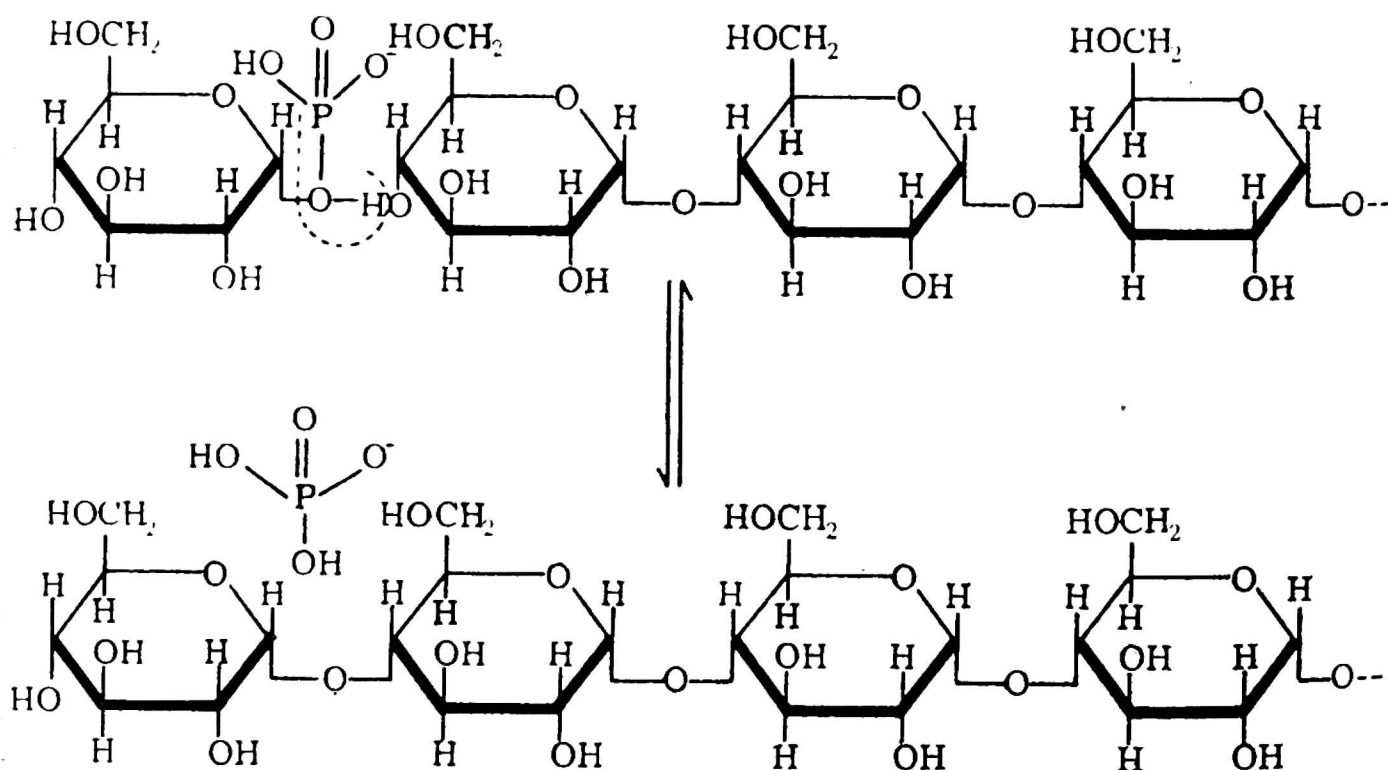
Najbardziej istotnym momentem w reakcjach budowy i rozkładu wielocukrów jest przeniesienie grupy glikozyłowej wg schematu:



przy czym R może być fosforanem jak i resztą węglowodanową. Takie ujęcie pozwala zaklasyfikować fosforylasy łącznie z enzymami, przy których fosforan nie może być akceptorem — do jednej wspólnej grupy enzymów przenoszących odwracalnie grupę glikozyłową. Pociągające wydaje się przejęcie od szkoły wiedeńskiej³⁵ nazwy „transglikozylazy“, jako dobrze oddającej działanie enzymów tej grupy. W tej pracy pozostaniemy przy nazwie fosforylaza.

4. REAKCJA FOSFOROLIZY WIELOCUKRU

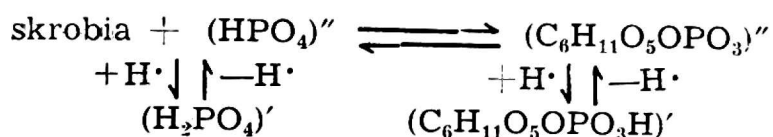
W procesie fosforolitycznego rozkładu skrobi elementy kwasu fosforowego dodawane są do każdego rozkładanego wiązania heksozohexozowego i oddzielane są cząsteczki glikozo-1-fosforanu.



Rys. 3. Fosforolityczny rozkład wielocukru

Reakcja ta jest odwracalna, tzn. fosforylaza może także syntezować wielocukier z estru Corich. W reakcji ustala się pewien stan równowagi między zawartością fosforu nieorganicznego i fosforu estrowego. Stan równowagi nie wiele zmienia się przy zmianach stężeń wielocukru i glikozo-1-fosforanu, natomiast zmienia się znacznie przy zmianach pH. Znaczny wpływ pH tłumaczy się tym, że stan równowagi

zależy nie od całkowitej koncentracji fosforanu nieorganicznego i estru Corich, lecz od stosunku stężeń jonów dwuwartościowych kwasów ortofosforowego i glikozo-1-fosforowego. Można to dla pH od 5 do 7 zobrazować następująco (pominięto formy nie grające roli w tym zakresie pH):



Hanes i Maskel³⁶ stwierdzili, że przy zmianie pH z 5 na 7 przy stanie równowagi reakcji stosunek P nieorganiczny: P estrowy zmieniał się od 10,8:1 do 3,1:1, podczas gdy stosunek jonów dwuwartościowych pozostawał stałe na tym samym poziomie. W reakcji syntezy wielocukru następuje nieznaczny wzrost pH, gdyż ester Corich, który zanika, jest bardziej kwaśny niż ortofosforan, który powstaje.

Konsekwencją peryferycznego, jeśli chodzi o cząsteczkę wielocukru, działania fosforylasy jest konieczność wprowadzenia pewnej początkowej ilości wielocukru dla wyzwolenia reakcji syntezy wielocukru z estru Corich. Wielocukier taki uważany jest za źródło krótkich łańcuchów glikozydowych, do których glikoza z estru Corich może być kolejno dowiązywana pod wpływem fosforylasy. Wielocukry takie noszą nazwę aktywatorów lub wyzwalaczy (ang. „primer“). Dobrym wyzwalaczem dla fosforylasy roślinnej okazała się amylopektyna skrobi zbożowej³⁷, dla fosforylasy zwierzęcej — glikogen. Amyloza, jako wielocukier o mniejszej ilości grup końcowych, jest wyzwalaczem mniej aktywnym. Hydroliza amylopektyny i amylozy pod wpływem β -amylazy lub fosforylasy zmniejsza ich wartość jako aktywatorów reakcji syntezy. Częściowa hydroliza kwasowa zwiększa wartość wyzwalającą amylozy i amylopektyny, przy czym najkorzystniej mają wpływać łańcuchy pięcioglikozydowe. Rolę wyzwalacza reakcji syntetycznej mogą spełniać różne dekstryny, za wyjątkiem dekstryn Schardingera* i dekstryn resztowych, o ile mają one tylko po jednej cząsteczce glikozowej w łańcuchach bocznych³². Wielocukier, aby dobrze spełniał tę rolę, musi zawierać w cząsteczce nie mniej niż 5 cząsteczek glikozy. Wo Posternak¹⁶ fosforylaza ziemniaczana może dobudowywać sfosforylowane jednostki glikozowe także do mniejszej cząsteczki, składającej się tylko z czterech jednostek glikozy, a mianowicie może ona wbudować w cząsteczkę skrobi czterocukier zestryfikowany fosforanem przy szóstym węglu drugiej lub trzeciej cząsteczki glikozy. Im więcej tego czterocukru a mniej estru Corich w mieszaninie poddanej działaniu fosforylasy ziemniaczanej tym więcej fosforu zostaje związane wewnątrz cząsteczki skrobi. Jest prawdopodobne, że właśnie ta zdolność wpływa na obecność fosforu w skrobiach z bulw. Nieznaczna aktywność wyzwalająca ma także wg niektórych autorów maltotrioza^{38, 39}.

Skrobia syntetyczna w budowie swej jest podobna do amylozy; składa się z długich łańcuchów jednostek glikopyranozowych. Daje bardziej intensywny niebieski kolor z jodem niż skrobie naturalne. Jest całkowicie rozkładana pod działaniem β -amylazy i fosforylasy. Tworzona w mieszaninie reagującej skrobia syntetyczna nie wpływa autokatalitycznie na przyspieszenie reakcji syntezy, co dobitnie świadczy o jej nierozgałęzionej budowie i peryferycznym działaniu fosforylasy.

Po osiągnięciu pewnego niezbędnego poziomu zawartości wyzwalacza szybkość syntezy wielocukru nie jest wyraźnie zmieniana przy dalszym wzroście stężenia wyzwalacza. Wydaje się to wskazywać, że efektywna koncentracja skrobi nie jest

* Dekstryny Schardingera powstają z pasty skrobiowej pod działaniem *Bacillus macerans*; charakteryzują się krótkimi łańcuchami (6—8 jednostek glikopyranozowych) zamkniętymi cyklicznie swymi końcami (tzw. cyklodekstryny).

równoznaczna z bezwzględną koncentracją. Być może faza systemu koloidowego, w jakim reakcja zachodzi, jest utrzymywana w stanie nasycenia przez skrobię zawartą w roztworze. Przy niższych stężeniach wyzwalacza (poniżej wartości nasycającej) im więcej wyzwalacza zostało wprowadzone, tym krótsze powstają łańcuchy sztucznego wielocukru i odwrotnie, gdy wyzwalacza jest mało powstają długie łańcuchy. Różnice te wyrównują się po dłuższym czasie działania fosforylasy, która chętniej przedłuża łańcuchy krótsze i kończy ten proces, gdy długość łańcucha wielocukru dojdzie do ok. 200 jednostek.

W reakcji syntezy sztucznego wielocukru przy udziale fosforylasy ester Corich nie może być zastąpiony glikozą, fruktozą, glikozo-6-fosforanem, fruktozo-1-fosforanem ani 1,6-dwufosforanem fruktozy. Reakcja jest wyraźnie swoista dla estru glikozowego z grupą fosforanową przy pierwszym węglu.

Przemiana wolnej energii w reakcji syntetycznej wynosi od —1000 do —1460 cal/mol, zależnie od pH i pochodzenia enzymu; tzn. reakcja syntezy może zachodzić samorzutnie.

5. WYSTĘPOWANIE ENZYMU W ŚWIECIE ZWIERZĘCYM I ROŚLINNYM I JEGO ZNACZENIE

Fosforylaza jest szeroko rozpowszechniona w tkankach ssaków, np. w mięśniach, wątrobie, sercu, mózgu. Enzym zawarty w wątrobie spełnia ważną rolę regulatora poziomu cukru we krwi. W mięśniu szkieletowym fosforylaza stanowi 2% masy rozpuszczalnego białka. Zawartość jej waha się od 40 do 80 mg w 100 g mięśnia. Fosforylaza w mięśniu występuje co najmniej w dwóch formach. Forma „a” łatwo krystalizująca działa *in vitro* bez dodatku kwasu adenilowego. Forma „b” bardziej rozpuszczalna wymaga dodatku kwasu adenilowego. Proces przemiany czynnej formy fosforylasy w formę nieczynną, zachodzący pod wpływem mięśniowego enzymu PR*), tworzy prawdopodobnie mechanizm regulujący zużywanie glikogenu w czasie zmęczenia mięśnia⁴⁰. Obserwacja Mochnańskiej⁴¹ (efekt fluorkowy), że tylko do 30% fosforylaz w mięśniu występuje w formie rozpuszczalnej (a albo b) w znacznym stopniu osłabia takie tłumaczenie.

Fosforylaza towarzyszy reakcjom budowy i rozpadu glikogenu, jest więc obecna we wszystkich tkankach, w których procesy te zachodzą, przy czym wyższą aktywność stwierdza się tam, gdzie intensywniej zachodzą przemiany węglowodanów.

Wśród drobnoustrojów obecność fosforylasy stwierdzono w drożdżach, niektórych paciorkowcach, laseczkach zgorzeli gazowej⁴² i maczugowcach błonicy⁴³, a wśród roślin wyższych szczególnie dużą aktywność enzymu znaleziono w nasionach roślin strączkowych i bulwach ziemniaka. Występuje ona także w ziarnie zbóż, sago, kłączach zapasonośnych, kasztanach, bananach i wielu innych owocach, a także w większości warzyw. Z reguły fosforylaza występuje w tkankach skrobionośnych (zapasonośnych) oraz w liściach^{44, 45}. W tkance liścia enzym zlokalizowany jest prawdopodobnie na błonie plastydów, gdyż — jak stwierdzili Peach i Krech⁴⁶ — w pobliżu błony plastydów tworzy się skrobia. Sądzi się, że fosforylaza odgrywa rolę zarówno w tworzeniu skrobi asymilacyjnej jak i zapasowej.

Czynność fosforylasy w procesach oddechowych polega na sprawnym regulowaniu w tkankach poziomu fosforylowanej glikozy, która — jako labilny ester fosforanowy (o potencjale energetycznym ok. 3 tys. cal) — jest ogniwem w licznych

* Enzym PR występuje w mięśniu i przekształca fosforylazę „a” w fosforylazę „b” (Prostetic group Removing factor).

procesach biologicznych. Estry fosforanowe heksoz są szeroko rozpowszechnione w tkankach w odróżnieniu od glikozy i fruktozy, które w formie wolnej występują tylko sporadycznie. Ester Corich zajmuje centralną pozycję w przemianach węglowodanów, a skrobia może być uważana za nagromadzenie estru w pozycji podatnej na fosforylację (refosforylację — gdyż odłożone cząsteczki glikozy były już fosforylowane).

6. CHARAKTERYSTYKA ENZYMU

Nie wiele wykonano badań dla wyjaśnienia budowy chemicznej fosforylasy roślinnej i do dziś trudno osądzić, w jakim stopniu budowa jej jest odmienna od budowy lepiej zbadanej fosforylasy zwierzęcej. Jeżeli chodzi o fosforylazę mięśniową to po szeregu prac^{49, 50} ogólnie charakteryzujących enzym i kinetykę jego reakcji, poznana została ostatnio jej budowa chemiczna. Wiadomo, że jest to euglobulina o punkcie izoelektrycznym przy pH 5,8, zawierająca w cząsteczce 18 wolnych grup sulfhydrylowych⁵¹, 4 grupy fosforanu 5' pirydoksalu⁵² i znanym składzie aminokwasowym⁵³. Przypuszcza się, że fosforan pirydoksalu jest koenzymem fosforylasy, podobnie jak to ma miejsce przy transaminazach i dekarboksylazach bakteryjnych⁵⁴.

Fosforylaza roślinna jest prawdopodobnie enzymem o budowie nieco odmiennej⁵⁴. Optymalną temperaturą dla działania fosforylasy roślinnej jest 55°, a już 58° powoduje spadek aktywności w ciągu trzech minut o 61%. Ogrzewanie przez 3 minuty w temp. 68° daje spadek aktywności o 97%⁵⁴, stąd wielu autorów przyjmuje 65° jako temperaturę inaktywacji enzymu. Optimum pH dla fosforylasy roślinnej z rozmaitych źródeł waha się od 5,6 do 6,7⁵⁵, przy czym większość autorów uogólniając zważa te granice i podaje zakres optymalny od 6,4 do 6,7. Wzrost kwasowości poniżej pH 5,5 powoduje szybką inaktywację fosforylasy.

Stała Michaelisa fosforylasy ziemniaczanej wyznaczona dla estru Corich wynosi $1,5 \times 10^{-3}$ moli estru, podobnie dla fosforylasy ze słodkich ziemniaków $2,5 \times 10^{-3}$ moli estru Corich w temp. inkubacji 38° i w optymalnych warunkach działania enzymu. Ogólnie dla fosforylasy roślinnej Whelan⁵⁶ podaje następujące wartości stałej Michaelisa: fosforylaza: ortofosforan $6,2 \times 10^{-2}$ mola, fosforylaza: ester Corich $2,6 \times 10^{-3}$ mola, fosforylaza: skrobia 0,97 g/l. Według innego autora⁵⁵ ilość wyzwalacza wielocukrowego, jaka daje połowę maksymalnej szybkości reakcji wynosi 41,1 mg (skrobi rozpuszczalnej) w 100 ml mieszaniny reagującej.

Green i Stumpf⁵⁴ (1942 r.) zagęścili fosforylazę ziemniaczaną 370 razy w stosunku do aktywności świeżego wyciągu, a Sumner, Chou i Bever⁵⁷ (1950 r.) zagęścili fosforylazę ziarn strączkowych ponad 900 razy. Najczystsze uzyskane przez nich preparaty wykazywały aktywność ok. 3 jednostki (ich jednostki) na mg białka. W warunkach doświadczenia Greena i Stumpfa 1 mg białka (oczyszczonego enzymu) katalizował wyzwolenie 6,16 mg nieorganicznego fosforu w ciągu godziny, co odpowiada utworzeniu 32 mg skrobi w czasie 1 godz. przy 36°.

Stałą sedymentacji dla fosforylasy roślinnej $S_{20} \times 10^{-13} = 9,2$ jest niższa niż formy „a” fosforylasy mięśniowej⁵⁸, a wyższa niż formy „b”.

Oba dotychczas uzyskane preparaty fosforylasy roślinnej pochodziły z ziemniaków (Fischer, Hilpert 1953 r., Baum, Gilbert 1953 r.)^{59, 60}.

Większe stężenia glikozy działają hamująco (inhibicja przez współzawodnictwo) na reakcję syntezy wielocukru. Hamujące działanie niekonkurencyjne wykazuje w niewielkim stopniu florydzyina, która wprowadzona do nieoczyszczonych soków roślinnych przechodzi pod działaniem β -glikozydazy w floretynę, a ta już wybitnie hamująco działa na fosforylazę⁴⁷.

W reakcji rozkładu wielocukru ortofosforan może być zastąpiony arsenianem, jednak odmiennie niż przy fosforolizie — przy arsenolizie — arsenianu glikozy nie znajduje się wśród produktów reakcji, gdyż ulega on spontanicznej hydrolizie na arsenian i glikozę⁶¹.

Średnia energia aktywacji w reakcji syntezy wielocukru w granicach temperatury 17—42° wynosi 12 600 cal/mol, czyli współczynnik temperatury reakcji (Q_{10}) w tym zakresie temperatur wynosi ok. 2.

BADANIA WŁASNE

METODYKA

Potrzebną do adaptacji i sprawdzenia metodyki fosforylaze uzyskiwałem z ziemniaków lub suchego ziarna grochu, wysalając enzym siarczanem amonu z cyjankowego wyciągu — wg metodyki Hidy i Daya⁶² oraz Katza i Hassida⁶¹, opartej na pierwotnej metodzie Hanesa^{25,26}. Oczyszczone preparaty przechowywałem pod toluenem w lodówce. Przy pH 6,1 trwałość preparatów enzymu sięgała 4 tygodni; po upływie tego czasu następował spadek aktywności.

1. Dobór metody oznaczania aktywności fosforylazy

W piśmiennictwie opisano wiele metod oznaczania aktywności fosforylazy. Prawie wszystkie polegają na oznaczeniu nieorganicznego fosforu powstającego w reakcji:



Różnią się one między sobą warunkami, jak np.: czasem, odczynem i temperaturą, w jakich zachodzi reakcja, albo jakością wprowadzonego do mieszaniny reagującej buforu i wyzwalacza reakcji syntetycznej, bądź sposobem przerywania reakcji enzymatycznej. Dążyłem do wyboru metody prostej i na tyle popularnej, aby wynikające z doboru metody jednostki aktywności fosforylazy były możliwie dobrze porównywalne z jednostkami używanymi przez innych autorów.

Aktywność oznaczałem w warunkach reakcji stopnia zerowego, tzn. tak doбираłem warunki syntezy sztucznego wielocukru z glikozo-1-fosforanu, aby cała ilość enzymu pozostawała wysycona substratem, a o aktywności preparatu fosforylazy wnioskowałem z ilości fosforu nieorganicznego wydzielonego w czasie reakcji.

W skład mieszaniny reagującej wchodziły: 1 ml płynu zawierającego fosforylaze (w ilości nie większej niż zdolna do związania w czasie inkubacji 70% wprowadzonego fosforanu glikozy); 1 ml 3% roztworu skrobi

rozpuszczalnej; 1 ml 0,5-m buforu cytrynianowego o pH 6,4. Zazwyczaj w skład mieszaniny inkubacyjnej wchodziły także inhibitory (patrz rozdział następny). Płyny mieszano i ogrzewano w kąpeli wodnej ultratermostatu Hoepplera, nastawionego na 38°. Po czterech minutach dodawano 1 ml doprowadzonego do tej samej temperatury 0,03-m roztworu estru Corich w buforze bursztynianowym o pH 6,4. Płyny mieszano i trzymano w kąpeli wodnej często mieszając. Dokładnie po upływie trzech minut lub ich wielokrotności przerywano reakcję dodatkiem 5 ml 10% kwasu trójchlorooctowego.

Dla ustalenia pH mieszaniny reagującej stosowałem bufor cytrynianowy i bursztynianowy (wprowadzany z estrem). Bufor cytrynianowy 0,1-m źle utrzymywał stałe pH: już przy trzykrotnym rozcieńczeniu wodą dawał zmianę pH o 0,3. Bufor 0,5-m zachowywał odczyn przy stosowanym rozcieńczeniu, a w czasie inkubacji zbuforowanej mieszaniny reagującej następował jedynie nieznaczny wzrost pH z 6,4 co najwyżej do 6,6. Tak więc nawet przy wyższej aktywności preparatu fosforylasy i związanym z tym znacznym zaniku estru Corich w czasie inkubacji, pH mieszaniny reagującej pozostawało w granicach optimum dla działania fosforylasy roślinnej.

Jako wyzwalacza reakcji syntezy wielocukru używałem 3% roztworu skrobi rozpuszczalnej. O ile drobne różnice objętości wprowadzanego do mieszaniny reagującej buforu nie wpływały wcale na odczyt, o tyle roztwór skrobi musiał być pipetowany dokładnie, gdyż stężenie wyzwalacza wpływało na wynik — szczególnie przy krótkim (3 min.) czasie inkubacji.

Badając aktywność częściowo oczyszczonych preparatów fosforylasy stosowałem czas inkubacji 3 minuty, oznaczając aktywność w surowych sokach roślinnych inkubowałem w I roku badań 30 minut, a II roku 15 minut.

W celu przerwania reakcji enzymatycznej stosowałem dodatek kwasu trójchlorooctowego, co okazało się praktyczniejsze niż stosowanie znacznych stężeń molibdenianu, inaktywacji termicznej lub innych środków odbiałczających. Sposób przerwania reakcji musiał być szybki, a użyty odczynnik nie powinien przeszkadzać w późniejszym oznaczeniu fosforu i w jak najmniejszym stopniu wpływać na hydrolizę labilnych estrów fosforanowych. Po dodaniu kwasu trójchlorooctowego zawartość kolbki dopełniałem zaraz wodą do 50 ml, co zapobiegało częściowej hydrolizie kwasowej estru Corich w czasie przygotowania próby do oznaczenia fosforu nieorganicznego.

Jako jednostkę aktywności przyjęto taką aktywność fosforylasy, która w warunkach oznaczenia wyzwoli 0,01 mg fosforu nieorganicznego w przeliczeniu na 3 minuty inkubacji. Jest to jednostka ok. dziesięciokrotnie niższa od jednostki H i d y i D a y a ⁶².

2. Inhibicja enzymów towarzyszących fosforylacji

Wiele wykonano prac na temat inhibicyjnego oddziaływania rozmaitych związków na fosforylazę oraz na inne enzymy towarzyszące fosforylacji w wyciągach z tkanek⁶³⁻⁶⁶. Praktyczne znaczenie ma oczywiście inhibicja tych enzymów towarzyszących, których działanie w trakcie oznaczania aktywności fosforylazy może wpłynąć na wynik tego oznaczenia. Będą to enzymy działające na ester Corich, czyli enzymy rozkładu i konwersji fosfoglikozy oraz enzymy zmieniające stężenie wyzwalacza wielocukrowego i rozkładające tworzony wielocukier — głównie amylazy.

W badaniach swoich oparłem się na wynikach pracy Bailey a, Thomas a i Whelana⁶⁷, którzy zalecają użycie dwóch tylko inhibitorów: HgCl_2 i molibdenianu. Oprócz prostoty postępowania, do zastosowania ich procedury zachęcało też stosowanie jej w pracy Rozenfelda i Szubinej⁶⁸, co razem wskazywało na pewną popularność metody i zwalniało od trudnego obowiązku jej dokładnego sprawdzenia. HgCl_2 w stężeniu $1,54 \times 10^{-8}$ mola hamuje aktywność amylaz, fosfoglikomutazy i izofosforylazy. Molibdenian amonu w stężeniu $1,02 \times 10^{-4}$ mola hamuje aktywność fosfataz. Obydwa inhibitory w stężeniach czterokrotnie wyższych wprowadziłem do innych płynów wchodzących w skład mieszaniny reagującej: HgCl_2 do roztworu skrobi, a molibdenian do buforu.

Kontrolę działania inhibitorów przeprowadziłem jedynie w małym, czysto praktycznym zakresie. Mianowicie oznaczałem aktywność fosforylazy w soku surowym i w oczyszczonych preparatach raz przy użyciu inhibitorów, a drugi raz równoległe bez inhibitorów. Zgodnie z oczekiwaniem stwierdziłem, że dodatek inhibitorów nie wpływa na wynik oznaczenia aktywności oczyszczonych preparatów, natomiast powoduje znaczne obniżenie wyzwolenia fosforu nieorganicznego przez zespół enzymów soku surowego. Z obserwacji tej można wnosić, że głównym efektem działania enzymów towarzyszących jest rozkład estru Corich z wydzieleniem nieorganicznego fosforanu. Ponieważ jednak możliwe są inne interpretacje niż przypisywanie tego efektu zahamowaniu działania fosfataz, przez drugi rok badań prowadziłem równoległe oznaczenia z dodatkiem i bez dodatku inhibitorów. Ułatwi to ewentualne porównanie wyników tej pracy z pracami innymi.

3. Dobór metody oznaczania fosforu nieorganicznego

Fosfor nieorganiczny oznaczałem w części klarownego płynu uzyskanego przez odwirowanie osadu wytrąconego kwasem trójchlorooctowym z mieszaniny inkubowanej w momencie inaktywowania enzymu. Przy

każdym oznaczeniu aktywności fosforylasy konieczne było wykonanie co najmniej trzech oznaczeń fosforu nieorganicznego. Dlatego też szukałem metody możliwie prostej i szybkiej i zwróciłem uwagę na metody kolorymetryczne. Z tych metod należało wybrać taką modyfikację, w której na wynik oznaczenia nie wywierałyby wpływu odczynnikowi uprzednio do mieszaniny reagującej wprowadzone.

Metodę kolorymetrycznego oznaczania fosforu opartą na redukcji kwasu fosfomolibdenowego wprowadzili w 1920 r. Bell i Doisy. Z licznych ulepszeń metody pierwotnej przyjęły się szczególnie modyfikacje Fiske i Subbarowa⁶⁹ oraz Allena⁷⁰ i Sheela. Wszystkie te modyfikacje wymagają znacznego stężenia kwasu siarkowego, który wg Hanesa hydrolizuje w trakcie oznaczenia drobną część zawartego w mieszaninie fosforanu glikozy. Do celów biochemicznych dogodniejsza jest metoda Kinga⁷¹, pozwalająca pracować w obecności soli baru. Modyfikacje Kuttnera i Youngburgów opierały się na zastosowaniu chlorku cynawego jako środka redukującego; niestety Bodan'sky wykazał, że obecność kwasu trójchlorooctowego powoduje przy tej modyfikacji odchylenie od prawa Beera. Sumner⁷² pracując nad możliwością oznaczania P nieorganicznego w obecności labilnych estrów fosforowych zastosował siarczan żelazawy. Ten związek redukujący dodany w małym nadmiarze całkowicie redukuje kwas fosfomolibdenowy w ciągu kilku sekund, przy czym obecność kwasu trójchlorooctowego nie wpływa na wynik oznaczenia, a kontakt z kwaśnymi odczynnikami jest o tyle krótszy, że nie zachodzi obawa hydrolizy estru Corich. Szybkość przeprowadzenia oznaczenia jest o tyle pociągająca, że przeważa niedogodność wynikająca z konieczności przygotowywania roztworu siarczanu żelazawego *ex tempore*. W całej swej pracy stosowałem metodę Sumnera, aczkolwiek już po rozpoczęciu doświadczeń znalazłem doniesienie Lowry'ego i Lopez'a⁷³, którzy stosując kwas askorbinowy jako środek redukujący bardzo znacznie obniżyli kwasowość, w jakiej zachodzi rozwinięcie barwy.

Oznaczenie przeprowadzałem następująco. Część (10 ml w 1955 r. a 20 ml w 1956 r.) klarownego płynu po odwirowaniu osadu strąconego kwasem trójchlorooctowym przenosiłem pipetą do kolby na 50 ml. Dodawałem 5 ml 6,6% roztworu molibdenianu amonu $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ i wody do ok. 40 ml. Następnie dodawałem 5 ml 7,5-n H_2SO_4 i po dokładnym zmieszaniu 4 ml roztworu siarczanu żelazawego (5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ w 50 ml wody z dodatkiem 1 ml 7,5-n H_2SO_4). Po dopełnieniu wodą i wymieszaniu oznaczałem ekstynkcję na kolorymetrze Pulfricha przy użyciu czerwonego filtra (M 72 = S 72). Do ślepej próby wprowadzałem te same ilości molibdenianu, kwasu siarkowego i siarczanu żelazawego. Zawartość fosforu odczytywałem z wykresu sporządzonego wg wzorców KH_2PO_4 ; otrzy-

wałem linię prostą, świadcząca o tym, że roztwory fosforanu podlegają prawu Lamberta-Beera.

Wprawdzie ze sposobu preparowania estru wynika, że zimny kwas siarkowy nie powoduje przy tym stężeniu hydrolizy estru Corich (co potwierdziłem także w doświadczeniach wstępnych) — z uwagi jednak na możliwość wprowadzenia do mieszaniny reagującej innych labilnych związków fosforowych zawartych w soku roślinnym badanym na aktywność fosforylazy we wszystkich oznaczeniach starano się zachować jednaki czas oznaczania fosforu nieorganicznego, a w szczególności we wszystkich etapach identyczny jak w równoległej ślepej próbie.

4. Przygotowanie roztworu estru Corich

Preparaty estru Corich otrzymuje się ze skrobi i nieorganicznego fosforanu pod działaniem fosforylazy. Jeżeli preparat fosforylazy jest czysty, obojętne jest jego pochodzenie. Z zanieczyszczonych preparatów enzymu najlepsze okazały się cyjankowe wyciągi z ziemniaków, które zawierają jedynie drobne ilości enzymów konwersji fosfoheksoz. Preparatykę estru Corich prowadziłem wg metodyki Sumnera i Somersa⁷⁴, opartej w znacznej mierze na wcześniejszych doniesieniach Hanesa oraz Greena i Stumpfa.

8 g skrobi rozpuszczalnej miesza się i gotuje ze 100 ml wody. Po ostudzeniu dodaje się 12 g Na_2HPO_4 (bezw.) i 5 g KH_2PO_4 (bezw.) rozpuszczone w 500 ml wody. Dodaje się 100 ml cyjankowego (0,005-m) ekstraktu z obieranych ziemniaków, dopełnia wodą do 1000 ml, dodaje (10 ml) toluenu, miesza i wstawia na 24 godz. do termostatu o temp. 25°. Przebieg reakcji fosforolitycznego rozkładu skrobi bada się oznaczając ubytek fosforu nieorganicznego w płynie. Fosforylazę inaktywuje się dodawaniem 0,1-n roztworu jodu do otrzymania brunatnoczerwonego zabarwienia (20—40 ml), utrzymującego się po wymieszaniu. Jod usuwa się następnie dodając z pipety 0,1-n tiosiarczan, aż kolor brązowy całkowicie ustąpi (25—50 ml). W celu rozłożenia dekstryn zanieczyszczających późniejszy produkt, dodaje się 10—20 ml 2% wodnego roztworu pankreatyny i pozostawia płyn w temp. pokojowej przez 4 godz. albo do czasu aż 1 ml roztworu z 4 kroplami 0,01-n jodu nie da już reakcji na dekstryny. Teraz dodaje się 40 g octanu baru i 10 ml 25% amoniaku, tj. tyle aby roztwór był wyraźnie alkaliczny wobec czerwieni fenolowej. Po dobrym wymieszaniu wiruje się i odrzuca osad fosforanu baru. Płyn filtruje się przez płótno, gdyż częstokroć na powierzchni pozostaje nieodwirowana piana. Następnie na każdą objętość klarownego płynu dodaje się 2 objętości 95% alkoholu (etylowego lub metylowego) i po wymieszaniu odwirowuje się sól barową 1-fosforanu glikozy. Uzyskany osad miesza się z 2-n kwasem siarkowym, dodaje 50 ml wody i tyle kwasu siarkowego, aby dawał goździkowe zabarwienie z papierkiem błękitu tymolowego. W ten sposób rozkłada się sól barową estru. Następnie płyn zubojeźnia się ostrożnie nasyconym roztworem KOH dopóki zawiesina nie zacznie dawać niebieskiego lub brązowego zabarwienia z papierkiem Kongo. W celu odbiałczenia dodaje się 6 g kwasu trójchlorooctowego i dokładnie miesza. Do każdej objętości białej zawiesiny dodaje się 2 objętości 95% alkoholu i odwirowuje substancje zawieszane. Do zdekantowanego klarownego płynu macierzystego dodaje się nasyconego roztworu KOH, aż roztwór stanie się wyraźnie alkaliczny wobec papierka czerwieni fenolowej. Sól⁷⁵ dwupotasowa 1-fosforanu - α -d-glikozy wytrąca się w ciągu nocy w lodówce — zazwyczaj

w formie żółtobrunatnego osadu oleistego, krystalizującego przy potarciu bagietką o dno naczynia. Kryształy $C_6H_{11}O_9PK_2 \cdot 2H_2O$ odsąca się, przemywa kilkakrotnie etanolem, następnie acetonem i suszy przy 40° . Wydajność do 3,5 g — zazwyczaj ok. 2 g. Produkt zanieczyszczony jest siarczanem potasu i małą ilością fosforu nieorganicznego. Rekrystalizację prowadzi się z wody dodając etanol (1:1). Wg danych z piśmiennictwa produkt rekrystalizowany ma skręcalność właściwą w świetle sodowym od $+77$ do $+79^\circ$ i zawiera ok. 8,33% fosforu, jako fosfor estrowy.

W celu łatwego sprawdzenia czystości preparatów oznaczałem fosfor nieorganiczny i fosfor całkowity (po 7-minutowej hydrolizie w 1-n kwasie nadchlorowym przy 100°) — różnica daje fosfor estrowy w preparacie. Kryształki estru rozpuszczałem w małej ilości wody (do 10 ml), zobojętniałem rozcieńczonym H_2SO_4 wobec czerwieni fenolowej i dodawałem buforu bursztynianowego o pH 6,4, w takiej ilości aby otrzymać roztwór estru Conich o stężeniu 0,03-m. Zbuforowany roztwór przechowywałem w lodówce pod toluenem. W doświadczeniach wstępnych stwierdziłem, że roztwór w tych warunkach jest trwały ponad 8 tygodni, a w temp. pokojowej ok. 6 tygodni, tzn. w ciągu tego czasu nie ma przyrostu zawartości fosforu nieorganicznego w roztworze.

BADANIA W I OKRESIE WEGETACYJNYM (1955 r.)

1. Materiał

Oznaczanie aktywności fosforylasy w ziarnie groszku przeprowadzałem w Skierniewicach, korzystając z materiału uzyskanego z doświadczalnych wysiewów i analizowanego — niezależnie od mojej pracy — przez zespół pracowników Zakładu Warzywnictwa SGGW, w ramach prac badawczych nad przydatnością odmian warzyw dla przetwórstwa, prowadzonych od lat pod kierunkiem prof. dra Emila Chroboczka. Groszek zbierano z pola w trzech kolejnych terminach zbioru co 2 dni, przy czym terminy starano się dobrać tak, aby zbiór I był przedwczesny, zbiór II przypadał w okresie optymalnej dojrzałości przetwórczej, a zbiór III dawał groszek za stary do przerobu na konserwy. Właściwy moment sprzętu określany był na podstawie próby organoleptycznej ziarna, oraz zewnętrznych cech dojrzałości strąków, bez stosowania chemicznych bądź fizycznych metod określania dojrzałości. Dopiero uzyskane po zbiorze wyniki analizy chemicznej ziarna pozwalały wnioskować o prawidłowości obranego terminu zbioru. Przy opisie pracy przyjąłem, że wszystkie terminy zbioru ustalono właściwie.

Aktywność fosforylasy oznaczałem zaraz po wyłuskaniu ziarna ze strąków w średniej próbie ziarna niesortowanego a także po rozdzieleniu groszku na sitach na frakcje wielkości — w każdej frakcji oddzielnie.

W innych częściach roślin grochu oznaczałem aktywność w czasie między II i III zbiorem. Oznaczenia aktywności fosforylasy w ziarnie groszku sześciu odmian przeprowadziłem w 1955 r. i powtórzyłem w ziarnie czterech odmian w roku następnym.

2. Aktywność fosforylazy w ziarnie groszku zależnie od terminu zbioru

10 g ziarna średniej próby, pobranego natychmiast po wyłuskaniu ze strąków, ucierano w moździerzu porcelanowym wraz z 10 ml 0,005-m świeżego roztworu KCN. 1 ml odcisniętego przez gazę soku (uważany za ilość reprezentującą 1 g ziarna) pobierano do oznaczenia aktywności fosforylazy metodą wyżej opisaną, przy użyciu inhibitorów. Wobec niskiej aktywności enzymu — po kilku początkowych oznaczeniach — przedłużono czas inkubacji do 30 minut. Wyniki oznaczeń aktywności (w przyjętych jednostkach) dla niesortowanego ziarna kilku odmian zebrano w tabeli I, w której dla zobrazowania stopnia dojrzałości groszku podano jednocześnie zawartość suchej masy i wartość stosunku skrobia: cukry, wg oznaczeń zespołu asystentów Zakładu Warzywnictwa SGW. Suchą masę oznaczano przez wysuszenie 10 g utartego ziarna średniej próby na 2 szal-

Tabela 1

Aktywność fosforylazy w niesortowanym groszku różnych odmian zależnie od terminu zbioru (dojrzałości ziarna). Rok 1955

Odmiana, zbiór		Sucha masa %	Skrobia: cukry	Aktywność z inhibit.
Alaska	I	23,98	1,51	0,30
	II	27,50	1,51	0,50
	III	30,67	2,21	1,30
Cud Ameryki	I	20,54	0,90	0,30
	II	22,29	0,45	0,40
	III	25,21	0,55	1,90
Delikates	I	20,33	0,41	0,00
	II	22,97	0,63	0,58
	III	26,25	1,08	1,40
Szlachetna Perła	I	18,47	0,38	0,00
	II	20,72	0,47	0,20
	III	22,60	0,70	0,50
Foli	I	19,56	—	0,00
	II	21,27	—	0,06
	III	21,33	—	0,85
Lincoln	I	19,70	0,21	0,55
	II	21,83	0,39	0,20
	III	25,25	0,75	0,28
Średnio	I	20,43	0,68	0,19
	II	22,76	0,69	0,32
	III	25,21	1,06	1,04

kach Petriego początkowo na łaźni wrzącej do pozornej suchości, a następnie w suszarce o temp. ok. 98° w ciągu 1 godz. + X (15 min.). Cukry jako cukry ogółem po inwersji oznaczano met. Bertranda, a skrobię oznaczano pośrednio także met. Bertranda po długiej hydrolizie wg Lintnera.

Aktywność fosforylasy wyraźnie wzrasta w miarę dojrzewania groszku, co potwierdza się wyraźnie przy dalszym pozostawieniu groszku na polu. Na przykład w groszku odmiany Alaska w 2 dni po III zbiorze aktywność wzrosła do 1,9 jednostek, a po dalszych 5 dniach — do 4,25 jednostek. Także w groszku przejrzalym odmiany Szlachetna Perła aktywność fosforylasy wielokrotnie wzrosła w porównaniu z okresem przydatności przetwórczej, uzyskując w 6 dni po III zbiorze poziom 2,95 jednostek aktywności.

3. Aktywność fosforylasy w ziarnie groszku zależenie od wielkości ziarna

Ziarno groszku rozsortowano wg wielkości przesiewając na sitach i oznaczono aktywność w poszczególnych frakcjach. Konieczność wielokrotnego przedłużenia czasu inkubacji, ponad pierwotnie projektowany czas trzech minut, ograniczyła możliwości dokonania dużej liczby oznaczeń w trudnych warunkach laboratorium terenowego. Dlatego też w zestawieniu wyników oznaczania aktywności dla różnych frakcji wielkości ziarna brak danych dla niektórych zbiorów poszczególnych odmian. Wyniki obrazuje tabela 2.

Wyniki tabeli 2 są gorsze od oczekiwanych. Oczekiwano, że ziarno grubsze, zawierające więcej suchej masy i skrobi, każdorazowo wykaże wyższą aktywność niż ziarno drobniejsze. Okazało się, że prawidłowość ta utrzymuje się przez trzy pierwsze frakcje wielkości, a we frakcjach najdrobniejszych zostaje wyraźnie zakłócona. Wydawało się prawdopodobne, że na wynik wpływa tu wielokrotnie większa ilość ziarn w próbce; można by sądzić, że w młodych zawiązkach istnieje pewna wyjściowa aktywność fosforylasy, niezmienna w pierwszym okresie przyrostu masy poszczególnych ziarn. Jednak brak aktywności w młodym groszku średniej próby podważa takie rozumowanie. Bardziej prawdopodobne jest przypuszczenie, że warstwy zewnętrzne, których w ziarnie drobnym jest stosunkowo dużo, zawierają więcej fosforylasy niż środkowe części ziarna.

Zaobserwowano pewną zmienność zawartości fosforu nieorganicznego w ziarnie, mianowicie dla ziarna drobniejszego zabarwienie ślepej próby było bardziej intensywne, nie uchwycono tego jednak liczbowo. Na bliższe wyjaśnienie wspomnianej nieprawidłowości i uchwycenie liczbowe zmienności zawartości fosforu nieorganicznego trzeba było poczekać do następnego okresu wegetacyjnego.

Tabela 2

Aktywność fosforylasy w groszku zależnie od wielkości ziarna
2 a — odmiana Alaska

Zbiór \ Wielkość	9—10 mm	8—9 mm	7—8 mm	6,5—7 mm
II	0,80	0,35	0,35	0,70
III	1,30	0,90	1,30	1,05

2 b — Odmiana Cud Ameryki

Zbiór \ Wielkość	ponad 10 mm	9—10 mm	8—9 mm	7—8 mm	6,5—7 mm
I	0,20	—	—	—	—
II	0,60	—	—	—	—
III	1,40	1,30	0,85	0,90	1,00

2 c — Odmiana Delikates

I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
II	0,62	0,50	0,22	0,70	0,90
III	1,48	1,52	1,55	1,30	1,25

2 d — Odmiana Szlachetna Perła

I	0,00	—	—	—	—
II	0,20	—	—	—	—
III	0,20	0,20	0,06	0,50	0,30

2 e — Odmiana Foli

I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
II	0,06	—	—	—	—
III	0,75	0,60	0,50	0,50	0,25

2 f — Odmiana Lincoln

II	0,30	0,10	0,20	0,15	0,58
III	0,40	0,25	0,06	0,30	0,20

4. Aktywność fosforylasy w innych tkankach rośliny

Zbadano rozmieszczenie fosforylasy w tkankach roślin grochu. Stosując tę samą metodykę, nie stwierdzono aktywności fosforylasy w łodygach ani strączynach, natomiast w liściach groszku znaleziono wyższą aktywność enzymu niż w zielonym ziarnie. Wyniki oznaczeń, przeprowadzonych

w czasie między II i III zbiorem, obrazuje tabela 3. Aktywność oznaczano tu przy użyciu inhibitorów. Wyniki tabeli 3 potwierdzają udział fosforylasy w budowie skrobi asymilacyjnej.

Tabela 3

Aktywność fosforylasy w liściach różnych odmian groszku w okresie pełnej dojrzałości przemysłowej ziarna 1955 r.

Odmiana	Alaska	Cud Ameryki	Delikates	Szlachetna Perła	Foli	Lincoln
Aktywność z inhib.	1,65	1,30	1,90	2,20	2,15	1,50

5. Spadek aktywności fosforylasy w ziarnie po wyłuskaniu go ze strąków

Na skutek dość szybkiego zaniku cukru, jaki zachodzi w czasie po wyłuskaniu ziarna ze strąków, przerób przemysłowy groszku na konserwowy prowadzony jest możliwie sprawnie. Każdy przestój w procesie produkcji lub spiętrzenie surowca powoduje wyraźne obniżenie jakości groszku, w którego smaku zanika słodycz, a ujawnia się mączystość. Istnieje nawet wśród technologów mało prawdopodobne przekonanie, że w tym czasie cukier jest przemieniany na skrobię. Gdyby tak było, przemiana powinna zachodzić pod wpływem fosforylasy, a więc aktywność tego enzymu powinna się po wyłuskaniu utrzymywać. Gdyby natomiast zachodziły zmiany w aktywności w tym okresie, znaczenie porównawcze mogłyby mieć jedynie wyniki oznaczeń, wykonanych w tym samym czasie po wyłuskaniu ziarna ze strąków. Zakładając możliwość zmian aktywności enzymu, oznaczenia wykonywano zaraz po wyłuskaniu, a dla prześledzenia ewentualnych zmian aktywności wykonano specjalne serie oznaczeń.

Ziarno groszku odmiany Alaska, frakcji 9—10 mm, rozdzielono na cztery próbki. W jednej oznaczono aktywność zaraz po wyłuskaniu, drugą przechowywano w całości na sucho, trzecią przechowywano w całości pod roztworem 0,005-m KCN, a z czwartej przechowywano wyciąg cyjankowy przygotowany tak jak do każdego oznaczenia aktywności. Czas przechowywania próbek do trzech godzin, temperatura ok. 20°. Wyniki tych doświadczeń obrazuje tabela 4.

Wyniki tabeli 4 wskazują, że słuszną była zasada oznaczania aktywności zaraz po wyłuskaniu. Zastosowanie cyjankowego wyciągu eliminowało błędy mogące powstać przy różnicach w czasie przygotowywania mieszanin inkubacyjnych.

Jednocześnie wyniki te wskazują, że fosforylaza jest nietrwała w groszku młodym, a trwałość jej wzrasta w miarę dojrzwania ziarna. Wprawdzie nie zbadano bezpośrednio udziału fosforylasy w procesie zanikania cukru w ziarnie wyłuskanym, zwrócono jednak uwagę na fakt, że

Tabela 4

Spadek aktywności fosforylazy w czasie przechowywania wyłuskanego ziarna groszku odmiany Alaska o różnym stopniu dojrzałości

Dojrzałość	Aktywność zaraz po wy- łuszkaniu	Aktywność po 3 godz. przechowywania		
		suchego ziarna	ziarna zalanego 0,005—m KCN	wyciągu cyjan- kowego 0,005-m
I zbiór	0,80	0,06	0,09	0,80
III zbiór	1,30	0,45	0,55	1,30
4 dni po III zbiorze	1,90	1,90	1,90	1,90

w groszku najdrobniejszym, w którym zanikanie cukru zachodzi najszybciej, aktywność fosforylazy była niewielka a jednocześnie trwałość enzymu najmniejsza. Pozwala to sądzić, że jedynie procesy oddechowe tkanki — niezależne przy katabolizmie cukrów prostych od czynności fosforylazy — są powodem spadku słodczy po wyłuszkaniu groszku ze strąków. Jednocześnie ujawnia się posmak mączysty, dotychczas zamaskowany słodczą.

6. Wpływ blanszowania na aktywność fosforylazy w groszku mrożonym

Rosoff i Cruess⁷⁵ oraz Guyer i Holmquist⁷⁶, a później szereg innych autorów amerykańskich stwierdzali reaktywację enzymów — głównie peroksydazy — w groszku, kalafiorach i innych warzywach mrożonych, poddanych uprzednio blanszowaniu (obgotowaniu) lub krótko sterylizowanych. Inaktywacja enzymu, obserwowana zaraz po zabiegu termicznym, okazywała się niezupełna i aktywność pojawiała się ponownie po pewnym okresie przechowywania konserw.

Na marginesie swej pracy sprawdziłem czy inaktywacja fosforylazy w czasie blanszowania groszku przeznaczonego do zamrożenia jest całkowita. Stwierdziłem, że w czasie blanszowania przez trzy minuty w wodzie o temp. 100° aktywność fosforylazy całkowicie zanika i nie pojawia się ponownie ani po zamrożeniu groszku, ani w czasie jego chłodniczego przechowywania.

Dotychczas omówione wyniki badań były już w skrócie referowane w doniesieniu tymczasowym⁷⁷.

BADANIA W II OKRESIE WEGETACYJNYM (1956 r.)

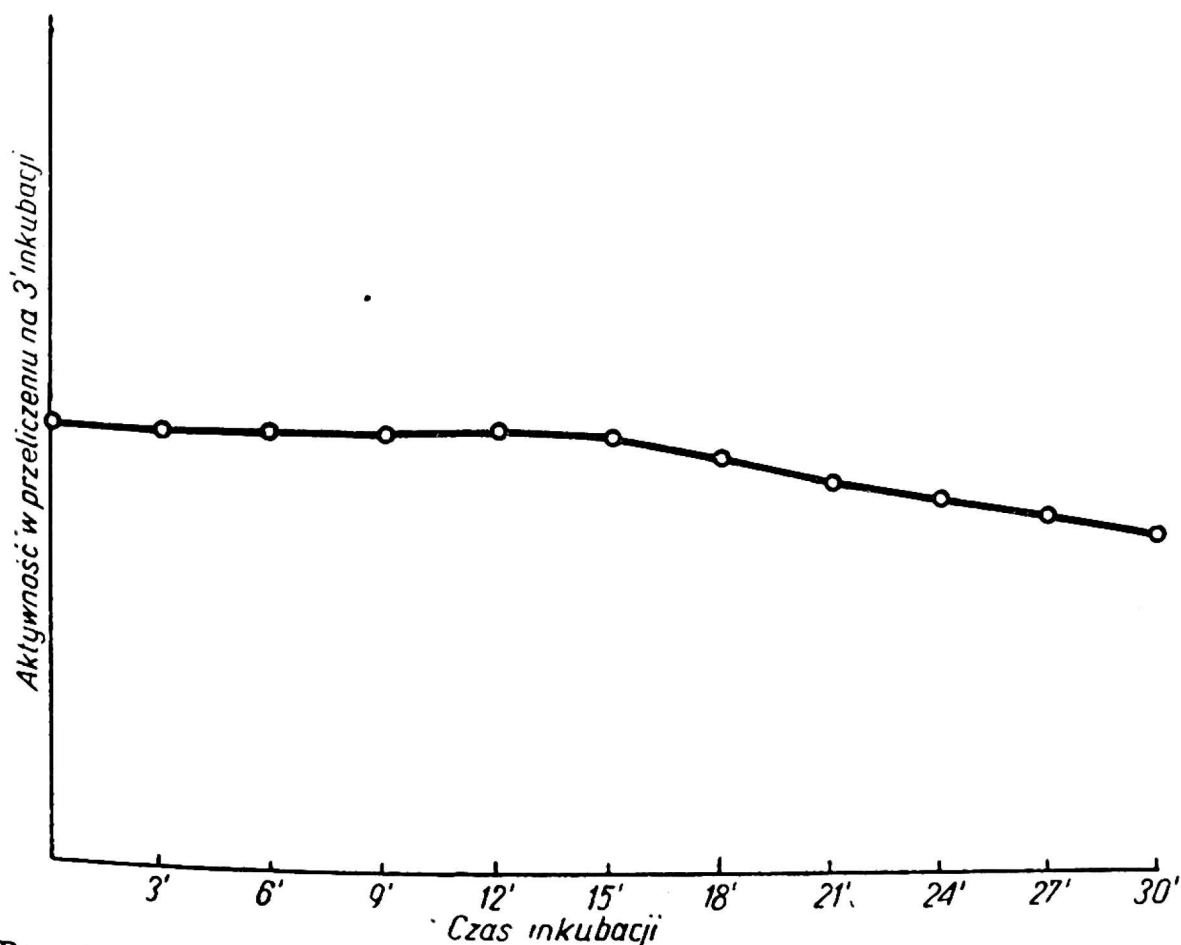
1. Zmiana w metodyce oznaczania aktywności

W doświadczeniach wstępnych przed I okresem wegetacyjnym zaobserwowano, że wynik oznaczenia aktywności fosforylazy przeliczony na trzy minuty inkubacji pozostaje na stałym poziomie, gdy czas inkubacji przedłuża się do 6, 9 lub 12 minut. W praktyce okazało się konieczne przedłu-

zenie czasu inkubacji do 30 minut, wobec niskiej aktywności enzymu. Kontrolę przebiegu reakcji w czasie dłuższym od 12 minut wykonano dopiero po zakończeniu badań polowych.

Gdyby reakcja stale zachodziła w stopniu zerowym, na wykresie — na którego osi odciętych odłożono czas w trzyminutowych odstępach, a na osi rzędnych aktywność w przeliczeniu na trzy minuty inkubacji — powinno się uzyskać linię prostą. Wyniki doświadczenia kontrolującego przebieg reakcji w czasie obrazuje rys. 4.

Wykres wskazuje, że reakcja przebiega zgodnie ze schematem dla reakcji stopnia zerowego przez pierwsze 15 minut inkubacji, a następnie odbiega od tego schematu. Aktywność fosforylasy nieznacznie, ale stale spada w zakresie czasów inkubacji od 18 do 30 minut. Z doświadczenia tego wyciągnięto wniosek, że wszystkie wyniki I okresu wegetacyjnego są nieco niższe od faktycznej aktywności enzymu, jaką otrzymano by przy założonych w ustaleniu jednostki aktywności trzech minutach inkubacji. Na podstawie tych wyników zmieniono metodykę dalszych oznaczeń aktywności w ten sposób, że czas inkubacji skrócono do 15 minut, a dwukrotnie zwiększono objętość płynu pobieranego po odwirowaniu do oznaczenia uwolnionego fosforu nieorganicznego. Rozwiązanie tego typu nie było możliwe w I okresie wegetacyjnym, gdyż nie dysponowano wtedy wirówką o odpowiednio dużych naczyniach.



Rys. 4. Zależność wyniku oznaczania aktywności fosforylasy grochowej (przeliczonego na 3') od czasu inkubacji

2. Aktywność fosforylasy w ziarnie zależnie od terminu zbioru

W badaniach drugiego okresu wegetacyjnego wszystkie oznaczenia aktywności przeprowadzono równolegle: raz z dodatkiem inhibitorów tak jak w roku poprzednim i drugi raz bez dodatku do mieszaniny inkubacyjnej inhibitorów enzymów towarzyszących fosforylase. Za poziom aktywności w każdej wersji oznaczenia każdorazowo przyjęto średnią z dwóch równoległych oznaczeń, nie różniących się odczytem więcej niż o 15% wartości odczytu.

Wyniki oznaczania aktywności fosforylasy w trzech kolejnych terminach zbioru (co 2 dni) dla 4 odmian zebrano w tabeli 5.

Tabela 5

Aktywność fosforylasy w niesortowanym groszku kilku odmian zależnie od terminu zbioru (dojrzałości ziarna). Rok 1956

Odmiana, zbiór	Sucha masa %	Aktywność fosforylasy w jednostkach		
		z dodatkiem inhib.	bez dod. inhibit.	
Alaska	I	20,11	0,30	0,65
	II	20,26	0,40	0,80
	III	22,45	1,00	1,65
Szlachetna Perła	I	18,70	0,50	0,75
	II	19,76	0,55	0,80
	III	21,55	0,95	1,05
	I	19,67	0,70	1,05
	II	19,22	0,25	0,70
	III	20,31	0,80	1,00
Foli	I	19,18	0,00	0,50
	II	20,12	0,55	1,00
	III	22,06	0,80	1,10
	I	19,32	0,50	0,70
	II	19,94	0,65	1,15
	III	21,28	0,95	1,65
Daisy	I	19,99	0,65	0,80
	II	21,09	0,85	1,10
	III	21,43	1,10	1,45
	II	20,38	0,60	0,95
	III	21,82	0,70	0,80
Średnio	I	19,50	0,44	0,74
	II	20,11	0,55	0,93
	III	21,56	0,90	1,24

Dla niektórych odmian serie oznaczeń powtórzono przy zbiorze z innego poletka doświadczalnego, na którym groszek był wysiany później o kilkanaście dni.

Podobnie jak w tabeli 1 obrazującej wyniki z 1955 r., w tabeli 5 daje się zaobserwować wyraźny wzrost aktywności enzymów w miarę dojrzewania groszku, równoległe ze wzrostem w ziarnie zawartości suchej masy.

3. Aktywność fosforylasy w ziarnie posortowanym wg wielkości

Dla potwierdzenia wyników zebranych w tabeli 2, zbadano także w II okresie wegetacyjnym aktywność fosforylasy w ziarnie różnej wielkości. Do oznaczeń wzięto groszek odmiany Szlachetna Perła, jako najczęściej uprawianej do celów przetwórczych, a jednocześnie badanej przez nas uprzednio w innej pracy⁷⁸. Groszek z trzech kolejnych zbiorów rozdzielono na sitach wg wielkości i w każdej frakcji oznaczono aktywność obydwoma wariantami metody. W tabeli 6, obrazującej wyniki tych ozna-

Tabela 6

Zawartość suchej masy i aktywność fosforylasy w groszku odmiany Szlachetna Perła w zależności od wielkości ziarna dla trzech kolejnych terminów zbioru (co 2 dni). Rok 1956

Wielkość ziarna	Sucha masa			Aktywność z inhib.			Akt. bez inhib.		
	I zbiór	II zbiór	III zbiór	I	II	III	I	II	III
ponad 10 mm	—	—	—	—	—	0,85	—	—	1,40
9—10 mm	—	—	21,19	0,65	0,50	0,70	1,30	1,40	0,90
8—9 mm	20,18	19,81	20,52	0,45	0,20	0,55	1,15	0,65	0,95
7—8 mm	19,72	18,57	19,93	0,40	0,15	0,25	0,80	0,65	0,60
6,5—7 mm	19,49	19,13	19,47	0,20	0,30	0,25	0,70	1,05	0,60

czeń, podano także zawartość suchej masy wg oznaczeń zespołu pracowników Zakładu Warzywnictwa.

Przeglądając pionowe rubryki tabeli 6 widzimy, że przy każdym zbiorze aktywność spada w miarę zmniejszania się wielkości ziarna i to zarówno, gdy była oznaczana w obecności inhibitorów, jak i w ich nieobecności.

Podobnie jak w I roku badań ziarno najdrobniejsze (frakcja 6,5—7 mm) odchyła się od tej reguły. Sprawdzone czy na wynik nie wpływa tu stosunkowo wyższa zawartość skórki. Okazało się jednak, że w skórce ziarna wcale nie ma fosforylasy; całość enzymu prawdopodobnie zlokalizowana jest w liścieniach. Rozkładu enzymu w liścieniach nie zbadano, tym samym nie znaleziono wytłumaczenia, dlaczego w ziarnie najdrobniejszym zda-

⁷⁸ — Roczn. techn. i chem. żywności

rzają się wyniki aktywności nadspodziewanie wysokie. Wracając do omówienia tabeli 6 można powiedzieć, że nie widać żadnej prawidłowości w rubrykach poziomych; nieuporządkowanym wahaniom podlega zarówno sucha masa jak i aktywność. Można by z tego wyciągnąć wniosek, że żadna z rozpatrywanych frakcji wielkości nie jest tak miarodajna przy ocenie dojrzałości jak średnia próba ziarna niesortowanego.

4. Wartość odczytów tzw. „ślepej próby“ w przeliczeniu na zawartość fosforu nieorganicznego i fosforu związków łatwohydrolizujących

Już w I roku badań zaobserwowano zmienność w zawartości fosforu nieorganicznego w ziarnie groszku. W celu sprawdzenia czy zmiany te zachowują jakąś prawidłowość, w II okresie wegetacyjnym przy każdym oznaczeniu aktywności fosforylasy notowano wartość „ślepej próby“ w kolorymetrycznym oznaczeniu fosforu metodą Sumnera. Od wartości tej odejmowano odczyt, jaki dawały same odczynniki (głównie preparat estru Corich) bez wprowadzenia soku roślinnego. Wyniki wyrażone w mg% zestawiono w tabelach 7 i 8. W tabeli 7 podano średnie wyniki z trzech oznaczeń — każde w 2 powtórzeniach. W tabeli 8 podano średnie wyniki z czterech oznaczeń — każde w 2 powtórzeniach.

Tabela 7

Zawartość fosforu nieorganicznego i fosforu związków łatwo hydrolizujących w ziarnie różnych odmian zależnie od stopnia dojrzałości groszku.

Wyrażono w mg% w zielonej masie

Odmiana	Zbiór	I	II	III
Alaska		27,6	21,8	20,0
Szlachetna Perła		16,8	17,9	14,0
Folij		18,9	11,4	9,7
Daisy		12,5	14,0	13,9
Średnio		18,9	16,3	14,4

Wyniki tabel 7 i 8 wskazują, że w miarę dojrzewania groszku zmniejsza się w ziarnie ilość fosforu nieorganicznego, a właściwie sumy fosforu nieorganicznego (As, Si) i fosforu tych związków łatwo hydrolizujących, które ulegają rozkładowi w warunkach oznaczenia fosforu metodą Sumnera. Ta zmiana zawartości fosforu nieorganicznego ciekawa jest, gdy rozpatruje

się stany równowagi w procesach fosforylacji cukrów i następnie ich defosforylacji w czasie wiązania skrobi.

Obserwacja ta nakazuje dużą ostrożność w ocenie stwierdzanych niekiedy wyższych poziomów aktywności fosforylasy w bardzo drobnym ziarnie i tłumaczy większe rozproszenie wyników pojedynczych oznaczeń aktywności, jakie obserwowano przy ziarnie drobnym. Dla ziarna drobnego

Tabela 3

Zawartość fosforu nieorganicznego w groszku zależnie od wielkości ziarna
Wyrażono w mg% w zielonej masie. Rok 1956

Odmiana	Wielkość ziarna mm					
	> 10	9-10	8-9	7-8	6,5-7	niesortowane
Alaska	—	10,3	15,6	18,0	21,6	22,2
Szlachetna Perła	10,0	10,0	15,5	17,0	19,2	15,9
Daisy	8,9	11,7	13,8	15,6	18,0	13,7
Średnio	8,5	10,7	15,0	16,9	19,6	17,3

bowiem wartość odczytu ślepej próby jest kilkakrotnie wyższa od wartości odczytu reprezentującej aktywność fosforylasy.

Schwimmer i Weston⁶⁶ w swoich badaniach nad procesem tworzenia amylozy przez fosforylazę ziemniaczaną zaobserwowali, że prócz wielu inhibitorów pewien wpływ na przebieg reakcji wywiera stężenie ortofosforanu. Wyszuli oni przypuszczenie, że fosforan w reakcji fosforylasy może mieć inne znaczenie niż tylko wpływ na stan równowagi reakcji syntetycznej. Przyjęcie ich wniosku ułatwia interpretację wyników tej pracy.

Uzyskane we wcześniejszych badaniach⁷⁸ porównywalne wyniki wskazują, że poziom zawartości fosforu ogólnego jest około 5-krotnie wyższy niż znajduwane tu ilości fosforu nieorganicznego i przeciwnie niż poziom fosforu nieorganicznego, wzrasta on w miarę dojrzewania groszku. Podobny przyrost zawartości fosforu ogólnego w ziarnie fasoli znalazł Loewenberg⁷⁹.

Można przypuszczać, że z chwilą wzrostu aktywności fosforylasy roślina zmniejsza ilość „obiegowego“ ortofosforanu w tkance ziarna, który nie jest tu już konieczny w tej ilości, gdyż obieg zachodzi znacznie szybciej. Badania porównawcze nad poszczególnymi tkankami rośliny muszą być — jak w tej pracy — prowadzone stale w tej samej porze dnia, gdyż wg Hansona i Bidulpha ilość fosforu w liściu znacznie wzrasta, gdy zachodzi fotosynteza, istnieje więc obawa międzykankowego obiegu ortofosforanu.

STATYSTYCZNA OCENA WYNIKÓW

1. Ocena istotności różnicy wyników oznaczania aktywności fosforylazy po wprowadzeniu do mieszaniny inkubacyjnej inhibitorów enzymów towarzyszących fosforylaze

Jak już wyżej wspomniano w II roku badań oznaczanie aktywności fosforylazy prowadzono równoległe dwiema metodami. W celu stwierdzenia

Tabela 3

x_1	x_2	$x_1 - x_2$	$(x_1 - x_2)^2$
0,50	0,00	0,50	0,25
0,60	0,20	0,40	0,16
0,60	0,25	0,35	0,1225
0,65	0,20	0,45	0,2025
0,65	0,15	0,50	0,25
0,65	0,30	0,35	0,1225
0,70	0,20	0,50	0,25
0,70	0,25	0,45	0,2025
0,70	0,50	0,20	0,04
0,74	0,44	0,30	0,09
0,75	0,50	0,25	0,0625
0,80	0,40	0,40	0,16
0,80	0,40	0,40	0,16
0,80	0,55	0,25	0,0625
0,80	0,65	0,15	0,0225
0,80	0,70	0,10	0,01
0,90	0,70	0,20	0,04
0,93	0,55	0,38	0,1444
0,95	0,55	0,40	0,16
0,95	0,60	0,35	0,1225
1,00	0,80	0,20	0,04
1,00	0,55	0,45	0,2025
1,05	0,30	0,75	0,5625
1,05	0,95	0,10	0,01
1,10	0,80	0,30	0,09
1,10	0,85	0,25	0,0625
1,15	0,45	0,70	0,49
1,24	0,90	0,34	0,1156
1,30	0,65	0,65	0,4225
1,40	0,85	0,55	0,3025
1,40	0,50	0,90	0,81
1,45	1,10	0,35	0,1225
1,65	0,95	0,70	0,49
1,65	1,00	0,65	0,4225
32,51	18,74	13,77	6,7775

nia czy różnica w metodyce daje wyniki znamienne różne, w tabeli 9 zestawiono parami wyniki tych oznaczeń. Są to wyniki z tabeli 5 i 6 uporządkowanie wg wzrastającej wartości odczytu bez inhibitorów (x_1); (x_2 — odczyt z inhibitorami).

Obliczenia do tabeli 9:

$$\text{Standard różnicy } S_r = \sqrt{\frac{(x_1 - x_2)^2 - \frac{(x_1 - x_2)^2}{N}}{N - 1}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{6,7775 - \frac{(32,51 - 18,74)^2}{34}}{33}} = 0,6031$$

$$\text{Błąd różnicy} = \frac{S_r}{\sqrt{N}} = \frac{0,6031}{\sqrt{34}} = 0,103$$

$$\text{Średni odczyt bez inhibitorów } \bar{x}_1 = \frac{32,51}{34} = 0,956$$

$$\text{Średni odczyt z inhibitorami } \bar{x}_2 = \frac{18,74}{34} = 0,551$$

$$\text{Liczba Studenta } t = \frac{0,956 - 0,551}{0,103} = 3,932$$

Wartość graniczna liczby Studenta przy liczbie stopni swobody równej w tym przypadku $2N = 68$ i prawdopodobieństwie 0,01 wynosi 2,66.

Ponieważ znaleziona wartość liczby Studenta jest wyższa od wartości granicznej, można twierdzić z dużym prawdopodobieństwem, że różnica między wynikami oznaczania aktywności w obecności i w nieobecności inhibitorów jest istotna. W równoległych oznaczeniach wynik bez inhibitorów stanowi średnio 173,4% wyniku otrzymanego przy użyciu inhibitorów dla enzymów towarzyszących fosforylase.

2. Ocena zmienności aktywności fosforylasy

Stwierdzona zmienność aktywności fosforylasy podlega pewnym regułom. Widoczne to jest już na pierwszy rzut oka, przy rozpatrywaniu średnich wyników zestawionych w tabelach 1, 2, 5 i 6.

Pełniejszy obraz tej zmienności może dać statystyczna ocena wszystkich indywidualnych wyników oznaczeń. Oceny tej dokonano zestawiając tablice korelacyjne. Sposób obliczenia korelacji przedstawiono przy omó-

wieniu tabeli 12. Tabela 10 przedstawia korelację między aktywnością fosforolazy (z inhibitorami) i czasem sprzętu dla wszystkich odmian i obu okresów wegetacyjnych łącznie. Cechy wykazują dodatnią korelację. Współczynnik korelacji $r = +0,475$.

Tabela 10

Tablica korelacji między aktywnością fosforolazy (oznaczoną przy użyciu inhibitorów) i czasem sprzętu dla 6 odmian z r. 1955 i 4 odmian z r. 1956 łącznie

Zbiór \ Aktywność	0-0,30	0,30-0,60	0,60-0,90	0,90-1,20
I	6	5	3	1
II	4	6	4	2
III	2	1	4	9
				N=47

Tabela 11 przedstawia korelację między aktywnością (bez inhibitorów) i czasem sprzętu dla 4 odmian z 1956 r. Podobnie, cechy wykazują dodatnią korelację, przy współczynniku korelacji $r = +0,576$.

Sprawdzono dalej, czy istnieje korelacja między zawartością suchej masy i aktywnością fosforolazy. Tabela 12 obrazuje tę korelację dla wszystkich odmian i 2 lat. Obliczenia wskazują, że średnia zawartość suchej

Tabela 11

Tablica korelacji między aktywnością fosforolazy (oznaczoną bez inhibitorów) i czasem sprzętu dla 4 odmian z r. 1956

Zbiór \ Aktywność	0,30-0,60	0,60-0,90	0,90-1,20	1,20-1,50
I	1	4	1	
II		4	5	
III		2	4	3
				N=24

masy wynosi 21,235%, przy odchyleniu standardowym 1,40. Średnia aktywność (z inhibitorami) wynosi 0,56 jednostek, przy odchyleniu standardowym 0,402. Korelacja między cechami jest dodatnia, współczynnik korelacji $r = +0,479$.

Obliczenia korelacji, przy których rozpatruje się łącznie wszystkie odmiany groszku, dają współczynniki korelacji mniejsze, niż można by otrzymać dla jednej odmiany lub kilku odmian podobnych (np. oddzielnie dla odmian o ziarnie gładkim i pomarszczonym). Jednak dla zwiększenia ogólnej liczebności rozpatrywanych oznaczeń wzięto tu do oceny wszystkie zgromadzone w ciągu 2 lat wyniki, obejmujące wszystkie badane odmiany.

Tablica korelacji między aktywnością fosforylazy (oznaczoną przy użyciu inhibitorów) i zawartością suchej masy w ziarnie wszystkich odmian w latach 1955 i 1956

Sucha masa przedział	Aktywność przedział						n_v	Sumy $n_v \cdot u_i$ wg wierszy	Iloczynny $n_v \cdot u_i \cdot v_i$	$n_v \cdot v$	$n_v \cdot v^2$				
	0,00-0,30		0,30-0,60		0,60-0,90							0,90-1,20		1,20-1,50	
	x	y	x	y	x	y						x	y	x	y
18-19	1		1				3	5	3	3					
19-20	2		6	4			19	47	38	76					
20-21	11		7	3	1		22	54	66	198					
21-22	7		6	8	4	2	27	111	108	432					
22-23	1		4	2	2	2	11	55	55	275					
23-24	4		2	3	3	7	16	94	96	576					
n_u	34		26	17	10	11	N=98	366	1544	366	1560				
Sumy $n_u \cdot v_i$ wg kolumn	110		90	59	47	60	366	Obliczenia do tabeli 12a							
Iloczynny $n_u \cdot v_i \cdot u_i$	110		270	295	329	540	1544	$v = x - 17,5$	$x = 17,5 + v$						
$n_u \cdot u$	34		78	85	70	99	366	$u = \frac{y}{0,15}$	$y = 0,15 u$						
$n_u \cdot u^2$	34		234	425	490	891	2074	$\bar{u} = \frac{\sum n_u \cdot u}{N} = \frac{366}{98} = 3,735$							
							$\sum n_u \cdot u^2$	$\bar{y} = 0,56$							

$$\bar{v} = \frac{\sum n_v \cdot v}{N} = \frac{366}{98} = 3,735$$

$$\bar{x} = 21,235 \quad \text{Wariancja } u = \sigma_u^2 = \frac{1}{N} \sum n_u \cdot u^2 - \bar{u}^2 = \frac{2074}{98} - 13,95 = 21,16 - 13,95 = 7,21$$

$$\text{Standard } u = \sigma_u = \sqrt{7,21} = 2,68 \quad \text{Standard } y = \sigma_y = 0,15 \sigma_u = 0,402 \quad \text{Wariancja } v = \sigma_v^2 = \frac{1}{N} \sum n_v \cdot v^2 - \bar{v}^2 = \frac{1560}{98} - 13,95 = 1,97$$

$$\text{Standard } v = \sigma_v = \sqrt{1,97} = 1,40 \quad \text{Standard } x = \sigma_x = \sigma_v = 1,40 \quad \text{Kowariancja } C_{uv} = \frac{1}{N} \sum n_{uv} \cdot u \cdot v - \bar{u} \cdot \bar{v} = \frac{1544}{98} - (3,735 \cdot 3,735) = 15,75 - 13,95 = 1,80$$

$$\text{Kowariancja } C_{xy} = 0,15 C_{uv} = 0,27 \quad \text{Współczynnik korelacji } r = \frac{C_{uv}}{\sigma_u \cdot \sigma_v} = \frac{C_{xy}}{\sigma_x \cdot \sigma_y} = \frac{1,80}{2,68 \cdot 1,40} \text{ albo } \frac{0,27}{0,402 \cdot 1,40} = + 0,479$$

3. Ocena zmienności zawartości fosforu nieorganicznego

Zbadano korelację między zawartością fosforu nieorganicznego i wielkością ziarna wg liczebności zestawionych w tabeli 13. Dla trzech odmian

Tabela 13

Tablica korelacji między zawartością fosforu nieorganicznego a wielkością ziarna dla 3 odmian z r. 1956

P nieorg. mg % mm średnicy	10—12	12—14	14—16	16—18	18—20
> 10	3	1			
9—10	7	2			
8—9		3	5	2	
7—8			4	4	3
6,5—7				3	8

N=45

z 1956 r. średnia zawartość fosforu nieorganicznego wynosi 15,22 mg%, z odchyleniem standardowym 2,96. Korelacja w stosunku do wielkości ziarna jest ujemna, współczynnik korelacji $r = -0,893$.

Korelację między zawartością suchej masy i zawartością fosforu nieorganicznego dla trzech odmian o ziarnie pomarszczonym z 1956 r. obrazuje tabela 14. Średnia zawartość suchej masy wynosi 20,41, odchylenie stan-

Tabela 14

Tablica korelacji między zawartością suchej masy a zawartością fosforu nieorganicznego dla 3 odmian o ziarnie pomarszczonym r. 1956

P nieorg. mg % % s. m.	10—12	12—14	14—16	16—18	18—20
19—20	1		4	5	4
20—21		1	3	2	2
21—22	6	2	3		

N=33

dardowe 0,87. Średnia zawartość fosforu 15,12 mg%, odchylenie standardowe 2,74. Korelacja jest ujemna, współczynnik korelacji $r = -0,634$.

Oddzielnie obliczono korelację dla odmiany Alaska, charakteryzującej się średnią zawartością suchej masy 21,29% i wyższą też średnią zawartością fosforu = 19,57 mg%. Współczynnik korelacji wypadł prawie identyczny, a mianowicie $r = -0,614$.

Wreszcie zbadano, czy zachodzi korelacja między zawartością fosforu nieorganicznego i aktywnością fosforylazy. Obliczenia dokonano na pod-

stawie wyników zebranych w tabeli 15. Dla 58 oznaczeń obejmujących 4 odmiany z 1956 r. średnia zawartość fosforu wynosiła 16,14 mg %, przy odchyleniu standardowym 4,07. Średnia aktywność fosforylasy (z inhibit.) 0,53 jednostek. Korelacja ujemna, współczynnik korelacji $r = -0,641$.

Tabela 15

Tablica korelacji między zawartością fosforu nieorganicznego i aktywnością fosforylasy (oznaczoną przy użyciu inhibitorów) dla 4 odmian z r. 1956

Aktywność P nieorg. mg %	0—0,30	0,30—0,60	0,60—0,90	0,90—1,20
8—10		1	1	2
10—12		1	3	3
12—14		1	4	2
14—16	2	6	2	2
16—18	3	3	2	
18—20	5		1	1
20—22	5	2	1	
22—24	4	1		

N=58

4. Ocena dwóch nowych wskaźników dojrzałości groszku na konserwy

Jeżeli zestawi się średnie dzienne przyrosty zawartości suchej masy i aktywności fosforylasy oraz średni dzienny spadek zawartości fosforu nieorganicznego w ziarnie, można powiedzieć, że zawartość suchej masy ulegając najmniejszym zmianom jest najgorszym wskaźnikiem dojrzałości groszku.

Średni dzienny przyrost zawartości suchej masy w 18 próbkach ziarna niesortowanego w 1955 r. wynosił 1,20 %, a w 1956 r. dla 20 próbek ziarna niesortowanego wynosił 0,52 % dziennie, co po uwzględnieniu różnej liczebności daje średni przyrost za dwa lata o 0,84 % na dzień. Ponieważ średnia zawartość suchej masy wg tabeli 12 wynosiła 21,24 %, dzienny przyrost stanowił tylko 3,95 % wartości tego wskaźnika. W tym samym czasie przy średniej aktywności fosforylasy 0,56 jednostek, dzienny przyrost aktywności wynosił 0,11 jednostek, co stanowi przyrost wartości wskaźnika o 19,6 % dziennie. Na tej podstawie można twierdzić, że aktywność fosforylasy jest prawie pięciokrotnie czulszym wskaźnikiem dojrzałości groszku niż zawartość suchej masy w ziarnie. Ten wzrost aktywności staje się szybszy w miarę dojrzewania groszku. Jeżeli aktywność w optymalnym czasie zbioru (zbiór II) przyjąć za 100, wtedy aktywność na dwa dni przed zbiorem wynosi 80 %, a w dwa dni po zbiorze wzrasta do 163,6 %.

Podobnie zawartość fosforu nieorganicznego spadała dziennie o 1,125 mg % (patrz tabela 7), co przy średniej zawartości fosforu nieorganicznego

15,12 mg% stanowi dzienny spadek o 7,3% wartości wskaźnika. Średni wzrost zawartości suchej masy w tych samych próbkach wynosił 0,52%, przy średniej zawartości suchej masy 20,41%, co stanowi tylko 2,5% wartości wskaźnika. Można przypuszczać, że spadek zawartości fosforu nieorganicznego w ziarnie jest czulszym (około 3 krotnie) wskaźnikiem dojrzewania niż wzrost zawartości suchej masy.

Obserwacje te stają się jeszcze ciekawsze, gdy uwzględnimy fakt, że obydwie nowo proponowane wskaźniki dojrzałości dają wartości lepiej skorelowane z czasem zbioru niż zawartość suchej masy. Znacznie też lepiej skorelowane z czasem zbioru niż wartość stosunku skrobia: cukry.

WNIOSKI

1. Stwierdzono obecność i określono aktywność enzymu fosforylasy w ziarnie groszku w okresie jego dojrzałości przetwórczej. Aktywność pojawia się, gdy zawartość suchej masy w ziarnie osiągnie poziom co najmniej 16,6%. (Wyliczono przez ekstrapolację prostą wg wyników zebranych w tabeli 12). Przeciętnie w okresie dojrzałości przemysłowej aktywność wynosi 0,56 jednostek i wzrasta o 0,11 jednostek dziennie. Ten wzrost aktywności staje się szybszy w miarę dojrzewania groszku. Jeżeli aktywność w optymalnym czasie zbioru (zbiór II) przyjąć za 100, wtedy aktywność na dwa dni przed zbiorem wynosi 80%, a w dwa dni po zbiorze wzrasta do 163,6%. Aktywność jest dodatnio skorelowana z czasem; na podstawie wyników dokonanych oznaczeń znaleziono współczynnik korelacji $r = +0,576$.

2. Aktywność fosforylasy w ziarnie w czasie zbioru jest różna w różnych frakcjach wielkości posortowanego ziarna. Ziarno grubsze wykazuje znacznie wyższą aktywność enzymu niż ziarno drobniejsze. Żadna z przebadanych pięciu frakcji wielkości ziarna nie dawała tak prawidłowych zmian aktywności w czasie dojrzewania groszku jak średnia próba ziarna niesortowanego.

3. Aktywność fosforylasy zanika po wyłuskaniu ziarna ze strąków. Ten zanik aktywności jest szybszy w groszku młodszym, a wolniejszy w bardziej dojrzałym; podobnie — szybszy w ziarnie drobniejszym a wolniejszy we frakcjach ziarna grubszego. Aktywność utrzymuje się dłużej w cyjankowym (0,005-m) wyciągu z ziarna, szybko oddzielonym od tkanki.

4. Aktywność fosforylasy całkowicie zanika w czasie blanszowania groszku i nie pojawia się ponownie po zamrożeniu ani też w czasie chłodniczego przechowywania mrożonki.

5. Znaczną aktywność fosforylasy (wyższą niż w ziarnie przemysłowo dojrzałym) znaleziono także w liściach groszku; nie stwierdzono natomiast aktywności w łodygach, strączynach ani w skórce ziarna.

6. Wprowadzenie inhibitorów (molibdenian i HgCl_2) do mieszaniny inkubacyjnej hamuje aktywność enzymów towarzyszących fosforylacji w wyciągu z groszku i wpływających na wynik oznaczenia aktywności fosforylasy. Różnica w aktywności określonej przy użyciu i bez użycia inhibitorów jest istotna. W równoległych oznaczeniach wynik bez inhibitorów wynosił 173,4% wyniku otrzymanego przy użyciu inhibitorów.

7. Stwierdzono znaczną zmienność zawartości fosforu nieorganicznego w ziarnie groszku. W miarę dojrzewania groszku zawartość fosforu nieorganicznego spada, mimo jednoczesnego wzrostu zawartości fosforu całkowitego. Przy średniej zawartości fosforu nieorganicznego w ziarnie ok. 15 mg%, spadek zawartości fosforu nieorganicznego wynosił 1,125 mg% dziennie.

Zawartość fosforu nieorganicznego ulega zmianom w różnych frakcjach wielkości ziarna. W ziarnie drobnym znajdowano częstokroć dwukrotnie więcej fosforu nieorganicznego niż w ziarnie grubszym, pochodzącym z posortowania wg wielkości tej samej średniej próby ziarna. Wyraźna ujemna korelacja charakteryzuje się tu współczynnikiem korelacji $r = -0,893$.

8. Aktywność fosforylasy jest w pewnym stopniu skorelowana z zawartością suchej masy. Korelacja jest dodatnia; współczynnik korelacji $r = +0,479$.

9. Zawartość fosforu nieorganicznego jest skorelowana z zawartością suchej masy. Korelacja jest ujemna; współczynnik korelacji $r = -0,634$.

10. Aktywność fosforylasy jest dobrze skorelowana z zawartością fosforu nieorganicznego. Korelacja jest ujemna; współczynnik korelacji $r = -0,641$.

11. Aktywność fosforylasy może być dobrym wskaźnikiem przemysłowej dojrzałości groszku; ulegając znacznym zmianom w czasie jest wskaźnikiem prawie pięciokrotnie czulszym niż zawartość suchej masy. Z uwagi na złożoną metodykę wskaźnik ten może być stosowany głównie w pracach badawczych.

Podobnie, czulszym (ok. 3-krotnie) niż zawartość suchej masy wskaźnikiem dojrzałości może być zawartość fosforu nieorganicznego. Metoda oznaczania jest tu szybka i prosta.

LITERATURA

1. J. Załęski: Przemysł Spożywczy, 1956, nr 10, s. 312.
2. J. Załęski: Roczniki PZH, 1959 — w druku.
3. Z. Kaniuga: Postępy Nauk Roln., 1956, t. 5, nr 2, s. 132.
4. Z. Kaniuga: Przemysł Rolny i Spożywczy, 1952, t. 6, nr 8, s. 307.
5. H. Woyke: Postępy Nauk Roln., 1955, t. 4, nr 2, s. 147.
6. H. Woyke: Przegląd Ogrodniczy, 1955, t. 6.
7. R. U. Makower: Food Technology, 1950, t. 4, s. 403.

8. E. F. Neufeld, W. Z. Hassid: *Arch. Bioch.*, 1955, t. 59, nr 2, s. 405.
9. S. Peat, S. J. Pirt, W. J. Whelan: *J. Chem. Soc.*, 1952, s. 705.
10. S. Peat, G. J. Thomas, W. J. Whelan: *J. Chem. Soc.*, 1952, s. 722.
11. W. N. Haworth: *Chem. et Ind.*, 1939, t. 17, s. 917.
12. W. N. Haworth, E. L. Hirsten, F. A. Ischerwood: *J. Chem. Soc.*, 1937, s. 577.
13. H. Staudinger: *Deutsche Chem. Ber.*, 1936, t. 69, s. 819.
14. H. Staudinger, E. Husemann: *Annalen*, 1937, t. 527, s. 195.
15. K. H. Meyer, P. Bernfeld: *Helv. Chim. Acta*, 1940, t. 23, s. 875.
16. T. Posternak: *J. Biol. Chem.*, 1951, t. 188, s. 145.
17. S. Peat, W. J. Whelan, G. J. Thomas: *J. Chem. Soc.*, 1952, s. 4546.
18. J. K. Parnas: *Ergeb. Enzymforsch.*, 1937, t. 6, s. 57.
19. J. K. Parnas, T. Baranowski: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1935, t. 120, s. 307.
20. Idem: *Ibidem*, 1936, t. 121, s. 282.
21. J. K. Parnas, P. Ostern: *Biochem. Z.*, 1935, t. 279, s. 94.
22. P. Ostern, E. Holmes: *Nature*, 1939, t. 144, s. 34.
23. C. F. Cori, S. P. Colowick, G. T. Cori: *J. Biol. Chem.*, 1937, t. 121, s. 465.
24. C. F. Cori, G. T. Cori, G. Schmidt: *J. Biol. Chem.*, 1939, t. 129, s. 629.
25. C. S. Hanes: *Proc. Roy. Soc. London*, 1940, seria B, t. 128, s. 421.
26. Idem: *Ibidem*, 1940, B, t. 129, s. 174.
27. K. H. Meyer, P. Bernfeld: *Helv. Chim. Acta*, 1942, t. 25, s. 404.
28. G. T. Cori, C. F. Cori: *J. Biol. Chem.*, 1943, t. 151, s. 57.
29. W. N. Haworth, S. Peat, E. J. Bourne: *Nature*, 1944, t. 154, s. 236.
30. P. Bernfeld, A. Meutemedian: *Nature*, 1948, t. 162, s. 297.
31. Idem: *Ibidem*, 1948, t. 162, s. 618.
32. R. L. Whistler, C. L. Smart: *Polysaccharide Chemistry*, s. 264, AP, New York, 1953.
33. J. M. Bailey, S. Peat, W. J. Whelan: *Bioch. J.*, 1952, t. 51, s. XXXIV.
34. T. Baranowski: *Postepy Biochemii*, 1958, t. 4, nr 1, s. 121.
35. O. Hoffman-Ostenhof: *Enzymologie*, s. 378, Springer V., Wien, 1954.
36. C. S. Hanes, E. J. Maskell: *Bioch. J.*, 1942, t. 36, s. 76.
37. E. C. Proehl, H. G. Day: *J. Biol. Chem.*, 1946, t. 163, s. 667.
38. J. M. Bailey, W. J. Whelan, S. Peat: *J. Chem. Soc.*, 1950, s. 3692.
39. D. French, G. M. Wild: *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, t. 75, s. 4490.
40. G. T. Cori, A. A. Green: *J. Biol. Chem.*, 1943, t. 151, s. 31.
41. I. Mochacka: *Prace Wrocł. Tow. Nauk.*, 1953, seria B, s. 63.
42. A. K. Wołczok, W. J. Iwanow, A. W. Łobanowa: *Biochimja*, 1955, t. 20, s. 522.
43. J. B. Sumner, K. Myrbäck: *The Enzymes. Chemistry and Mechanism of Action*, New York, 1951.
44. Michinori Nakamura, Hisaaki Toda: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1951, t. 24, s. 248, wg C. A., 1952, t. 46, 11265f.
45. Michinori Nakamura, Kyoji Yamasaki, Hisaaki Toda: *ibidem*, 1951, t. 24, s. 119, wg C. A., 1952, t. 46, 11265f.
46. K. Peach, E. Krech: *Planta*, 1952, t. 41, s. 391, wg C. A. 1952, t. 47, 7600f.
47. C. F. Cori, G. T. Cori, A. A. Green: *J. Biol. Chem.*, 1943, t. 151, s. 39.
48. A. A. Green, G. T. Cori: *J. Biol. Chem.*, 1943, t. 151, s. 21.
49. P. J. Keller, G. T. Cori: *Bioch. Bioph. Acta*, 1953, t. 12, s. 239.
50. M. Cohn, G. T. Cori: *J. Biol. Chem.*, 1948, t. 175, s. 89.
51. N. B. Madsen, R. N. F. Guard: *J. Biol. Chem.*, 1956, t. 223, s. 1057.
52. T. Baranowski, B. Illingworth, D. H. Brown, C. F. Cori: *Bioch. Bioph. Acta*, 1957, t. 25, s. 16.

53. S. F. Velick, L. F. Wicks: *J. Biol. Chem.*, t. 190, s. 741.
54. D. E. Green, P. K. Stumpf: *J. Biol. Chem.*, 1942, t. 142, s. 355.
55. Michinori Nakamura: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1952, t. 26, s. 260, *wg C. A.*, 1954, t. 48, 757e.
56. W. J. Whelan: w *Methods in Enzymology I*, S. P. Colowick, N. O. Kaplan, A. P. New York, 1955.
57. J. B. Sumner, T. C. Chou, A. T. Bever: *Arch. Bioch.*, 1950, t. 26, s. 1.
58. C. Weibull, A. Tiselius: *Arkiv. Kemi, Mineral. Geol.*, 1945, seria A, t. 19, s. 19, *wg poz.* 56.
59. E. H. Fischer, H. M. Hilpert: *Experientia*, 1953, t. 9, s. 176.
60. H. Baum, G. A. Gilbert: *Nature*, 1953, t. 171, s. 983.
61. J. Katz, W. Z. Hassid: *Arch. Bioch.*, 1951, t. 30, s. 272.
62. P. H. Hidy, H. G. Day: *J. Biol. Chem.*, 1945, t. 160, s. 273.
63. Michinori Nakamura: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1950, t. 24, s. 5, *wg C. A.*, 1953, t. 47, 1758c.
64. Idem: *Ibidem* 1952, t. 26, s. 267, *wg C. A.*, 1954, t. 48, 758.
65. H. K. Porter: *J. Exptl. Botany*, 1953, t. 4, s. 44, *wg C. A.*, 1954, t. 48, 196i.
66. S. Schwimmer, W. J. Weston: *J. Biol. Chem.*, 1956, t. 220, s. 143.
67. J. M. Bailey, G. J. Thomas, W. J. Whelan: *Bioch. J.*, 1951, t. 49, s. 1vi.
68. E. L. Rozenfeld, A. J. Szubina: *Biochimja*, 1954, t. 19, nr 3, s. 289.
69. C. H. Fiske, Y. Subbarow: *J. Biol. Chem.*, 1925, t. 66, s. 375.
70. R. J. L. Allen: *Bioch. J.*, 1940, t. 34, s. 858.
71. E. King: *Bioch. J.*, 1932, t. 26, s. 292.
72. J. B. Sumner: *Science*, 1944, t. 100, s. 413.
73. O. H. Lowry, J. A. Lopez: *J. Biol. Chem.*, 1946, t. 162, s. 421.
74. J. B. Sumner, G. F. Somers: *Arch. Bioch.*, 1944, t. 4, s. 11.
75. H. Rosoff, W. V. Cruess: *Quick Fr. Foods*, 1949, t. 12, nr 4, s. 52.
76. R. B. Guyer, J. W. Holmquist: *Food Techn.*, 1954, t. 8, s. 547.
77. J. Załęski: *Roczniki PZH*, 1955, t. 6, s. 443.
78. C. Hiszpańska, J. Załęski, E. Rutczyńska-Skonieczna, B. Chojnicka, I. Ardyn: *Roczniki PZH*, 1956, t. 7, s. 43.
79. J. R. Loewenberg: *Plant Physiol.*, 1955, t. 30, s. 244.

АКТИВНОСТЬ ФОСФОРИЛАЗЫ В ПРЕДНАЗНАЧЕННОМ К КОНСЕРВИРОВАНИЮ ЗЕЛЕНОМ ГОРОШКЕ

Государственный Институт Гигиены Отделение Исследования
Пищевых Продуктов

Исследована активность фосфорилазы в зерне шести сортов горошка по методу Greena и Stumpfa в модификации Hidy и Daya, применяя ингибиторы для сопутствующих энзимов по Bailey, Thomas и Whelan, Сбор каждого сорта проводился три раза с промежутком двух дней. Принятая единица соответствует той активности фосфорилазы, которая освобождает из эфира Co_2 0,01 мг неорганического фосфора в течение 3 минут при первоначальном $\text{pH} = 6,4$ и в темп. 38° .

1. Констатировано присутствие и определено активность фосфорилазы в зерне горошка во время его промышленной зрелости. Активность появляется, когда содержание сухой массы в зерне достигнет уровень не менее 16,6%.

Во время промышленной зрелости активность равняется в среднем 0,56 единиц и возрастает на 0,11 единиц в сутки. Этот возраст активности происходит быстрее по мере созревания горошка. Если активность в самое соответствующее время сбора принять как 100%, тогда активность на два дня до сбора составляет 80%, а в два дня после сбора возрастает до 163,6%. С составления результатов с полученных определений исчислено коэффициент корреляции активности и времени $r = + 0,576$.

2. Во время сбора активность фосфорилазы в сортированном зерне зависит от размера зерна. В зерне более крупном активность выше, чем в мелком зерне. Несортированное зерно во время созревания давало изменения активности более правильные, нежели какой либо размер сортированного зерна.

3. Активность фосфорилазы исчезает после вылущивания зерна из стручков. Это исчезновение активности в более молодом горошке происходит быстрее, чем в более зрелом; и тоже в более мелком быстрее, чем в более крупном зерне. Активность продолжается дольше в цианистом (0,005-M) экстракте зерна, быстро отделенном от ткани.

4. Активность фосфорилазы совершенно исчезает во время блянширования горошка и не появляется опять после замарживания, ни во время холодильного хранения.

5. Большую активность фосфорилазы (выше, чем в промышленно зрелом зерне) найдено также в листьях горошка; но не констатировано активности в стеблях, стручках, ни в оболочке зерна.

6. Прибавление ингибиторов (молибденный амон, $HgCl_2$ /к реагирующей смеси укрощает активность энзимов, сопутствующих фосфорилазе в экстракте горошка и влияющих на результат определения активности фосфорилазы. Разница в активности в присутствии ингибиторов статистически знаменательна. В параллельных определениях результат без ингибиторов равнялся 173,4% результата, полученного при употреблении ингибиторов.

7. Содержание неорганического фосфора в зерне горошка не постоянное. Оно уменьшается по мере созревания горошка несмотря на одновременный рост содержания полного фосфора. Среднее содержание неорганического фосфора в зерне состояло около 15 мг% и уменьшалось на 1,125 мг% в сутки.

Содержание неорганического фосфора зависит от размера зерна. В мелком зерне оно больше (иногда в два раза) чем в зерне более крупном. Содержание неорганического фосфора отрицательно скоррелировано с размером сортированного зерна; коэффициент корреляции $r = -0,893$.

8. Активность фосфорилазы коррелирована с содержанием сухой массы. Корреляция положительная, $r = + 0,470$.

Содержание неорганического фосфора тоже коррелировано с содержанием сухой массы. Корреляция отрицательная, $r = - 0,634$.

Активность фосфорилазы хорошо коррелирована с содержанием неорганического фосфора. Корреляция отрицательная, $r = - 0,641$.

9. Активность фосфорилазы может быть хорошим показателем промышленной зрелости горошка; изменяется во время созревания почти пятикратно скорее, чем содержание сухой массы.

Так как метод определения активности фосфорилазы сложный, этот показатель может быть в практике применен к научным испытаниям.

Подобным образом, содержание неорганического фосфора может быть более тщательным (около три раза) показателем зрелости, чем содержание сухой массы. Метод определения фосфора несложный и скорый.

PHOSPHORYLASE ACTIVITY IN GREEN PEAS (*PISUM SATIVUM* L.)

State Institute of Hygiene, Department of Food Research

Summary

Phosphorylase activity in seeds of six varieties of green peas was investigated by the Green and Stumpf's method as modified by Hidy and Day, with accompanying enzymes inhibited according to Bailey, Thomas and Whelan. Each variety was harvested three times every 2 days. The results are expressed in units of phosphorylase activity about ten times lower than Hidy and Day units. The accepted units correspond to phosphorylase activity which will liberate 0.01 mg of inorganic phosphorus from the Cori ester in 3 minutes with the initial pH = 6.4 and at 38° C.

1. The presence of phosphorylase in green peas seeds reaching industrial maturity was ascertained and its activity was determined. The activity appears when the dry weight content of seeds reaches at least 16.6% (extrapolated from results shown in table XII). In industrially matured seeds activity amounts to an average of 0.56 unit and increases as the peas mature. Assuming the activity at the optimal harvest time (harvest II) to be 100%, the activity of seeds harvested 2 days earlier amounts to 80%, while that of seeds collected 2 days after harvest time is 163.6%. There is a positive correlation between phosphorylase activity and plant age ($r = +0.576$).

2. Phosphorylase activity of seeds depends also on their size. Larger seeds are characterized by a much higher enzyme activity than smaller ones.

3. Phosphorylase activity of seeds begins to disappear soon after shelling. This decrease of activity is greater in younger peas, and smaller in mature ones, similarly -- it is greater in smaller seeds than in larger ones. The activity is retained much longer in cyanide (0.005 M) seed extract rapidly separated from remaining seed tissue.

4. Phosphorylase activity disappears completely on blanching and does not reappear after freezing or cold storage.

5. Leaves of green peas showed much greater phosphorylase activity than industrially mature seeds; however, no activity was found in stalks, husks nor seed peelings.

6. The green peas extract may contain other enzymes which interfere with phosphorylase activity determination. In order to counteract this effect, inhibitors known not to affect phosphorylase (molybdate, $HgCl_2$) were introduced. The difference in activity determined with and without inhibitors is statistically significant. The activity obtained without inhibitors equals 173.4% of the activity in presence of inhibitors.

7. It was observed that the amount of inorganic P in the seeds is not constant. As the peas mature the amount of inorganic P decreases, although the amount of total P increases. The average amount of inorganic P in the seeds amounts to about 15 mg% and its daily decrease is 1.125 mg%.

8. The amount of inorganic P depends on the size of seeds. Small seeds contain much more (sometimes twice as much) inorganic P than larger ones. Negative correlation between inorganic P and size of seeds is expressed by $r = -0.893$.

9. Phosphorylase activity is correlated with the dry weight. The correlation is positive; $r = +0.479$.

The amount of inorganic P is also correlated with the dry weight. The correlation is negative; $r = -0.634$.

Phosphorylase activity is well correlated with the amount of inorganic P. The correlation is negative; $r = -0.641$.

10. Phosphorylase activity may serve as a good index of industrial maturity of green peas. On account pronounced change in activity with time it appears to be almost five times more sensitive an index than the change in dry weight. However, because of the complicated method of activity determination, the use of this index is in practice limited to research work.

Similarly, the amount of inorganic P may also serve as an index of maturity. It is about three times more sensitive than the corresponding change in dry weight. In case of inorganic P the determination is rapid and simple.