

BIĄŁKA I INHIBITORY TRYPSYNY W DOJRZEWAJĄCYM ZIARNIE PSZENICY OZIMEJ I JĘCZMIENIA JAREGO

S. Grzesiuk, A. Łogin, A. Rejowski

Instytut Biologi AR-T, Olsztyn

Cały proces rozwoju ontogenetycznego ziarna zbóż podzielić można na trzy, wyraźnie zróżnicowane pod względem anatomicznym, morfologicznym i fizjologiczno-biochemicznym etapy [4]:

- etap formowania bielma i prozarodka /faza dojrzałości zielonej/,
- etap zasadniczego formowania zarodka i częściowego gromadzenia materiałów zapasowych /faza dojrzałości mlecznej/,
- etap zasadniczego gromadzenia materiałów zapasowych, utrata wody i przejścia w stan spoczynku /faza dojrzałości woskowej i pełnej dojrzałości fizjologicznej/.

Poszczególne fazy dojrzałości ziarna charakteryzują się swoistym typem przemian fizjologicznych i biochemicznych. Uwidacznia się to w metabolizmie węglowodanów, kwasów nukleinowych i białek. W początkowym okresie formowania ziarna zbóż wśród związków azotowych dominuje azot niebiałkowy /głównie aminokwasy i amidy/ oraz albuminy i globuliny. W miarę dojrzewania ziarna maleje wyraźnie procentowy udział azotu niebiałkowego, zaś szybko wzrasta ilość prolamin i globulin [1-3, 8].

Przypuszcza się, że w częściowej przebudowie kompleksu białkowego dojrzewającego ziarna uczestniczą enzymy proteolityczne. W literaturze spotyka się pogląd, że we wczesnym okresie dojrzewania występujące w owocni białka są pod wpływem endopeptydaz rozkładane do aminokwasów, a następnie wykorzystywane do syntezy białek zapasowych bielma [6].

Okres wzmożonej biosyntezy białek zapasowych w ziarniakach zbóż jest poprzedzony z reguły intensywnym gromadzeniem inhibitorów proteaz. Prawdopodobnie zabezpieczają one tworzące się białka przed nieporządaną proteolizą [9-11].

Celem niniejszej pracy było zbadanie zmiany białek rozpuszczalnych w ziarniakach pszenicy ozimej i jęczmienia jarego, zachodzących w czasie dojrzewania. W wyodrębnionych frakcjach oznaczono także aktywność enzymów proteolitycznych /egzopeptydaz/ oraz poziom inhibitorów tripsyny.

MATERIAŁ I METODY BADAN

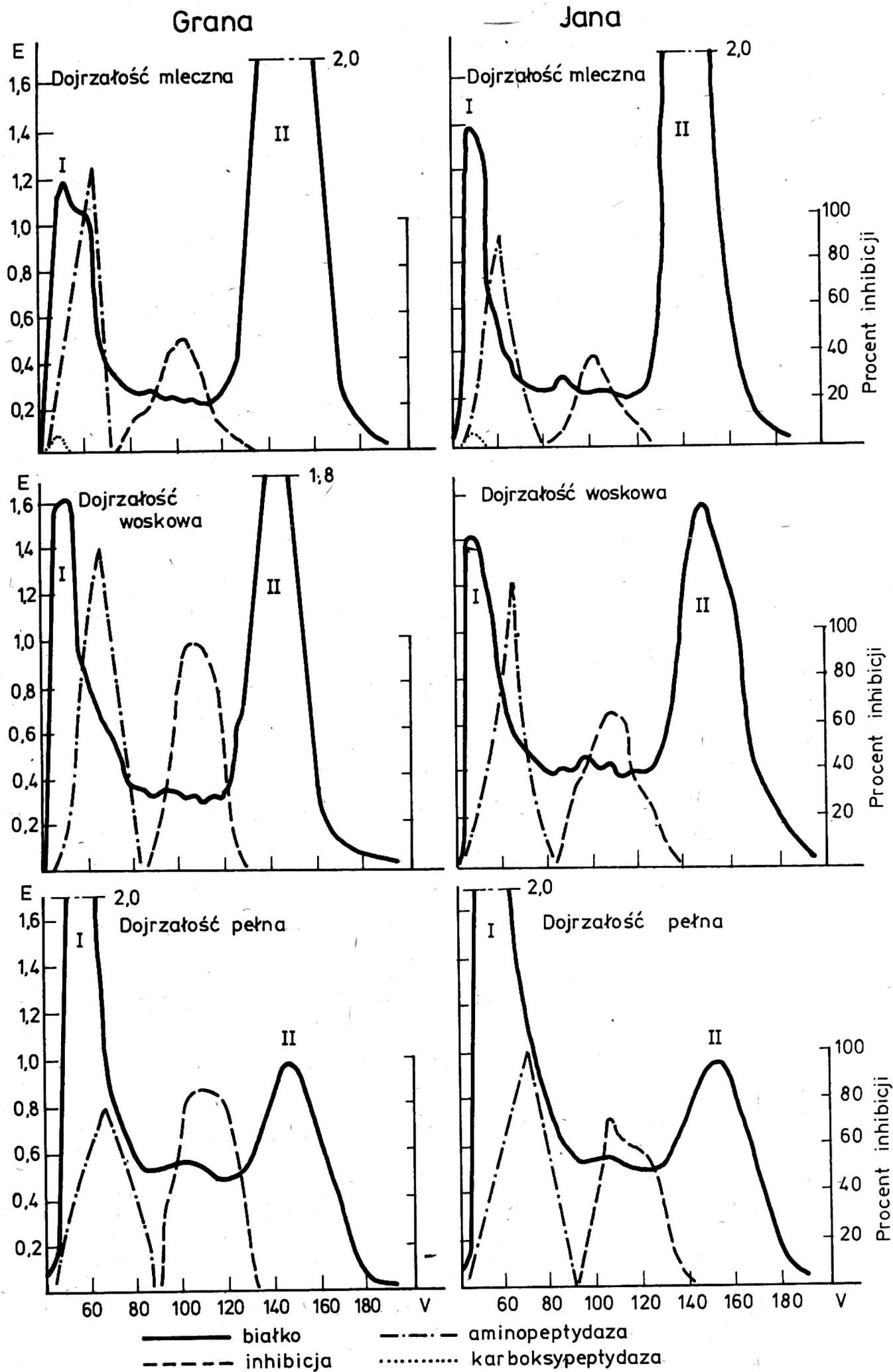
Badania przeprowadzono na ziarnie dwu odmian pszenicy ozimej /Grana, Jana/ oraz jęczmienia jarego /Piaś, Kosmos/. Ziarno do badań pochodziło z roślin uprawianych w latach 1976-1977 na polstkach doświadczalnych Instytutu Biologii Roślin w Tomaszkanie k.Olsztyna. Zbiorku ziarna dokonano w trzech fazach dojrzności: mleczonej, woskowej i pełnej. Analizy chemiczne wykonano natychmiast po zbiorze.

Białka rozpuszczalne z 3 g ziarna ekstrahowano 5 ml 0,2 M roztworu chlorku sodowego w 0,01 M buforze fosforanowym o pH 7,0. Homogenat wirowano przy 16 000 g, a supernatant zawierający albuminy i globuliny rozdzielano metodą sączenia molekularnego na sefadesie G-100 [7]. Zawartość białek we frakcjach oznaczono metodą spektrofotometryczną i na tej podstawie sporządzono wykresy zależności objętości eluatu od ilości białka /ekstynkcji/. Kalibracji kolumn dokonano za pomocą kilku czystych białek o znacznych masach cząsteczkowych: cytochromu c /13 000/, tripsyny /23 800/, albuminy jaja kurzego /45 200/ i albuminy krwi wołowej /64 000/.

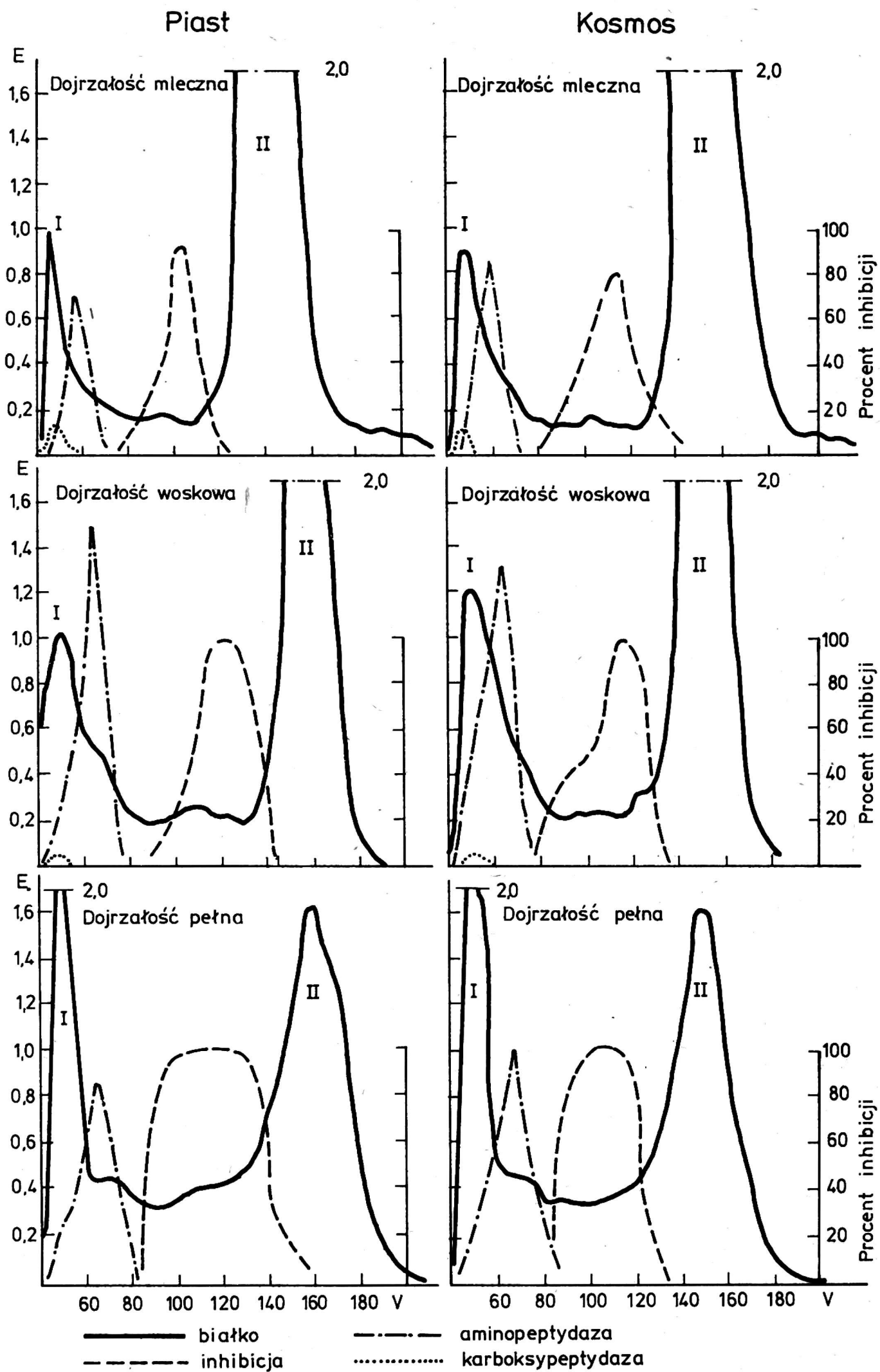
We frakcjach białek otrzymanych w wyniku sączenia molekularnego zbadano aktywność egzoproteolityczną oraz antytropsynową. Aktywność aminopeptydazy i karboksypeptydazy oznaczono przez pomiar ilości uwolnionego p-nitroanilidu z L-leucylo-p-nitroanilidu i α -N-benzoilo-DL-arginylo-p-nitroanilidu wg metody Siepena i wsp. [12]. Aktywność antytropsynową białek wyrażano procentem inaktywowanej tripsyny, działającej na sztuczny peptyd α -N-benzoilo-DL-arginylo-p-nitroanilid wg metodyki opisanej przez Grzesiuka [5].

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W wyniku sączenia molekularnego na żelu sefades G-100 białka ziarniaków rozpuszczalne w soli obu odmian pszenicy rozdzielono na dwie zasadnicze frakcje różniące się średnimi masami cząsteczkowymi /rys. 1/: frakcja I o masie około 90 000 daltonów i frakcja II - około 7 500 daltonów. W ziarnie zebranym w fazie dojrzności mleczonej zdecydowanie przeważały białka niskocząsteczkowe. W miarę dojrzewania ziarna zawartość białek o małej masie cząsteczkowej wyraźnie zmniejszała się, wzrastała natomiast ilość białek wysokocząsteczkowych. Frakcje białek i ich zmiany w czasie dojrzewania ziarna pszenicy były podobne u obu odmian.



Rys. 1. Frakcje białek ziarna pszenicy różnej dojrzałości oraz ich aktywność proteolityczna i antytrypsynowa



Rys. 2. Frakcje białek ziarna jęczmienia różnej dojrzałości oraz aktywność proteolityczna i antytrypsynowa

W ziarniakach jęczmienia jarego badanych odmian dominowały również dwie frakcje białek różniące się masą cząsteczkową /rys. 2/: I frakcja o masie około 100 000 i II frakcja - około 8 000 daltonów. Najwięcej białek niskocząsteczkowych zawierały ziarniaki zebrane w fazie dojrzałości mleczej. W trakcie dojrzewania frakcja ta ulegała zmniejszaniu, a zwiększała się poziom białek o dużej masie cząsteczkowej. Zmiany te były w porównaniu z pszenicą nieco mniejsze.

Z przytoczonych danych wynika, że skład jakościowy białek rozpuszczalnych uległ w ziarnie istotnym zmianom podczas dojrzewania. Zwiększanie się ilości białek o dużej masie cząsteczkowej zachodziło kosztem białek drobnocząsteczkowych, a jednocześnie absolutna ilość tych związków nie ulegała większym zmianom.

We frakcji białek o dużej masie cząsteczkowej wykryto znaczną aktywność aminopeptydazową. Aktywność aminopeptydaz już dość znaczna w fazie dojrzałości mleczej osiągała u obu gatunków maksimum w ziarnie zebranych w fazie dojrzałości woskowej, po czym w ziarnie w pełni dojrzałym nieznacznie zmniejszała się.

Frakcja białek o dużej masie cząsteczkowej charakteryzowała się także aktywnością karboksypeptydazową. Jednakże aktywność ta była nieznaczna i występowała tylko w ziarnie pszenicy zebranych w fazie dojrzałości mleczej, a w przypadku jęczmienia w fazie dojrzałości mleczej i woskowej. U obu gatunków nie stwierdzono aktywności karboksypeptydazy w ziarnie w pełni dojrzałym.

W białkach rozpuszczalnych dojrzewającego ziarna pszenicy i jęczmienia wykryto frakcję, wykazującą aktywność antytrypsynową, o masie cząsteczkowej około kilkunastu daltonów. Znaczną aktywność inhibitora białkowego trypsyny wykryto w ziarniakach badanych zbóż już w fazie dojrzałości mleczej. W czasie dojrzewania ziarna aktywność antytrypsynowa białek zwiększała się, osiągając maksimum w fazie dojrzałości pełnej. Ziarno jęczmienia na przestrzeni całego swego rozwoju charakteryzowało się nieco większą ilością inhibitora trypsyny niż ziarno pszenicy.

Inhibitory białkowe trypsyny są istotnym czynnikiem obniżającym wartość odżywczą ziarna zbóż, ponieważ białka w nich zawarte nie są w pełni wykorzystywane przez organizmy zwierzęce.

WNIOSKI

1. W czasie dojrzewania ziarna pszenicy i jęczmienia zwiększa się ilość białek wysokocząsteczkowych, a zmniejsza poziom białek o małej masie cząsteczkowej.
2. Frakcje białek o dużej masie cząsteczkowej charakteryzowały się dużą aktywnością aminopeptydazową, szczególnie w ziarnie obu gatunków zebranych w fazie dojrzałości woskowej.

3. Aktywność karboksypeptydaz była nieznaczna i występowała tylko we frakcji białek wysokocząsteczkowych ziarna pszenicy i jęczmienia nie w pełni dojrzałego.

4. Białka o masie cząsteczkowej około kilkunastu daltonów cechowała duża aktywność antytrypsynowa. Największą ilością inhibitora trypsyny cechowało się u obu gatunków ziarno zebrane w fazie dojrzałości woskowej i pełnej.

LITERATURA

1. Brandt A.: Endosperm protein formation during kernel development of wild type and a high-lisyl barley mutant. *Cereal Chem.* 1976, 53, 890-901.
2. Cagampang C. D., Pardon A. A., Juliano B. C.: Changes in salt-soluble proteins of rice during grain development. *Phytochem.* 1976, 15, 1425-1429.
3. Dexter J. E., Dronzek B. L.: Protein synthesis in triticale and its durum wheat rye parents. *Cereal Chem.* 1975, 52, 577-586.
4. Grzesiuk S.: Aktualne zagadnienia dojrzewania i spoczynku późniejszego ziarna zbóż. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 1972, z. 125, 401-415.
5. Grzesiuk S.: Enzymy proteolityczne i aktywność antytrypsynowa białek w starzejącym się sztucznie ziarnie żyta ozimego. 1978.
6. Kruger J. E.: Changes in the levels of proteolytic enzymes from hard red spring wheat during growth and maturation. *Cereal Chem.* 1973, 50, 122-131.
7. Kulka K.: Biochemiczne aspekty starzenia się ziarna owsa i jęczmienia. *Zesz. Nauk. WSR Cłsztyń* 1971, ser. 1, supl. 6, 3-89.
8. Pawłow A. N., Konariew W. G., Kolesnik T. F.: Gliadyny ziarnowate pszenicy w procesie jego rozkwitania. *Fizjol. Rast.* 1975, 22, 80-83.
9. Polanowski A.: Preparacja oraz charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna inhibitorów trypsyny z ziarniaków żyta (*Secale cereale*). *Acta Univer. Wratislaw.* 1976, 371, 1-66.
10. Ryan C. A.: Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1973, 24, 173-196.
11. Richardson M.: The proteinase inhibitors of plants and microorganism. *Phytochem.* 1977, 16, 159-169.
12. Siepen D., Yu P., Kula M.: Proteolytic enzymes of *Neurospora crassa*. Purification and some properties of five intracellular proteinases. *Eur. J. Biochem.* 1975, 56, 271-281.

С.Грзесік, А.Логін, А.Рейвскі

БЕЛКА, ПРОТЕАЗЫ І ІНГІБІТОРЫ ТРИПСИНА В СОЗРЕВАЮЩЕМ ЗЕРНЕ
ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ И ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

Резюме

По методу молекулярной фильтрации исследовали изменения растворимых белков в зерновках озимой пшеницы /Грана, Яна/ и ярового ячменя /Пиаст, Космос/ происходящие во время созревания. В выделенных фракциях белков определяли активность протеолитических энзимов и количество ингибиторов трипсина. Установлено, что в ходе созревания зерновок обоих видов хлебных злаков повышалось количество высокомолекулярных белков, а снижался уровень белков с низким молекулярным весом. В белках с высоким молекулярным весом была выявлена значительная активность протеолитических энзимов, особенно аминипептидаз. Эта активность была самой интенсивной в зерновках / пшеницы и ячменя/ собранных в фазе восковой зрелости. Белка с небольшим молекулярным весом характеризовались высокой антитрипсиновой активностью. Синтез белковых ингибиторов трипсина происходил уже в фазе молочной зрелости, а заканчивался практически в фазе восковой зрелости зерновок обоих видов хлебных злаков.

S.Grzesiuk, A.Łogin, A.Rejowski

PROTEIN, PROTEASES AND INHIBITORS OF TRYPSIN IN
RIPENING WINTER WHEAT AND SUMMER BARLEY GRAIN

Summary

Changes of soluble proteins in kernels of winter wheat /Grana, Jana/, and summer barley /Piast, Kosmos/ occurring in the ripening course were investigated by the method of molecular filtration. In separated protein fractions the activity of prototypic enzymes and the amount of trypsin inhibitors were determined. It has been found that in the ripening course of kernels of both cereal species increased the content of high-molecular proteins and decreased the level of proteins of low molecular weight. In proteins of high molecular weight considerable activity of proteolytic enzymes, particularly of aminopeptidases has been revealed. These enzymes showed the maximum activity in kernels / of wheat and barley/ collected in the wax ripening phase. Proteins of a low molecular weight distinguished themselves with a high antitrypsin activity. The synthesis of protein inhibitors of trypsin occurred as early as in the milk ripening phase and finished practically in the wax ripeness phase of kernels of both cereal species.