

KÍSÉRLETEK NÖVÉNYI KATALÁZZAL

I. Módszertani kérdések

FELFÖLDY LAJOS és F. KALKÓ ZSUZSA

(Érkezett : 1956. május 15-én)

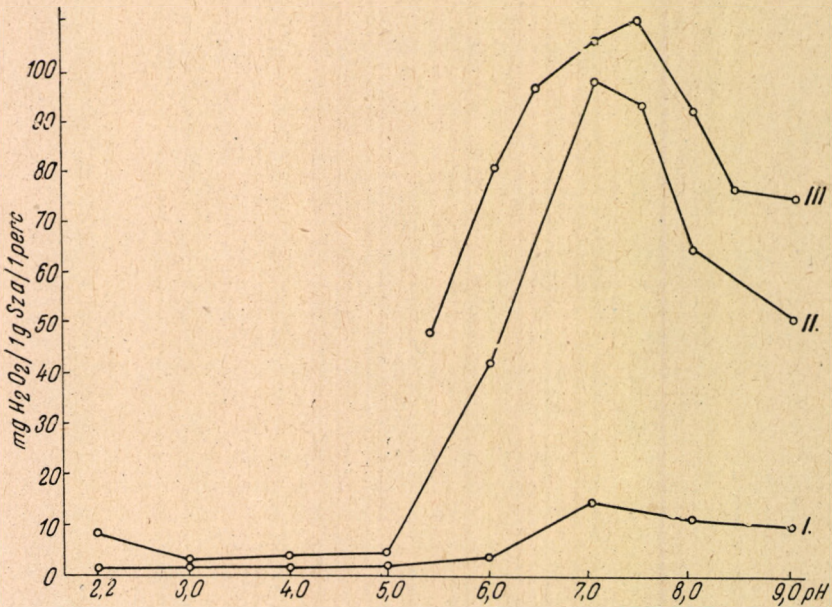
Az Intézet növényteni tematikájában szereplő kérdések vizsgálata során többször vált szükségessé különféle növényfajok, különböző kezelést kapott egyedek, sőt letépett szervek fiziológiai állapotának számszerű kifejezése. Ilyen természetű kísérleteink során olyan egyszerűbb módszert kerestünk, mely a kétségtelenül legpontosabb, de túl bonyolult oxigén-fogyasztás mérést pótolhatta volna.

Annak, hogy figyelmünk a kataláz enzim felé fordult, több oka van. Mindenekelőtt az a tény, hogy mondhatni minden élő sejtben jelen van, mely szabály alól a növényvilágban csupán egyes anaerob mikroorganizmusok (MOLLAND 1947), a Lactobacteriaceae család és a *Clostridium* genusz egyes tagjai (SUMNER és SOMERS 1953), hőforrásokban élő egyes kékoszatok (HARVEY 1924) képeznek kivételt. A magasabbrendű növények szervei közül csupán REED (1916) állapította meg hiányát az éretlen ananász termésében, de adata csak fenntartással fogadható el. A növényi sejtek kataláz aktivitása ugyan sokkal az állatoké alatt van, de azért jól mérhető mennyiségekről van szó, sőt ismerünk igen élénk kataláz-aktivitású növényeket is. LOEW (1899) dohánylevélben fedezte fel ezt az enzimet és már ő hangsúlyozza, hogy minden élő sejt alkotó része.

A másik ok az volt, hogy Intézetünk Állattani Osztályán már évek óta dolgoznak ezzel az enzimmel. FÁBIÁN GYULA és SZÉKY PÁL kartársak tapasztalataikat szívesen átadták, amivel igen sok meddő előkísérletezést takaríthattunk meg és amiért hálás köszönetünket kell kifejeznünk. A harmadik oknak azt a nagyszámú irodalmi adatot említjük meg, mely a növényi szövetek anyagsere- és kataláz-aktivitás intenzitása közti pozitív összefüggésről számol be (APPLEMAN 1916, 1918, AUCHTER 1923, BURGE 1923, BURGE és BURGE 1924, CORNS 1950, EZELL és CHRIST 1927, FORTINI és VENEZIAN 1950, GUSTAFSON et al. 1932, HEINICKE 1923, KING et al. 1934, KNOTT 1927, NELLER 1931, 1931a, SELL et al. 1948, SHULL és DAVIS 1923, STOUT 1949, TYSON 1930, YAMAFUJI 1936 stb.).

Végül, de nem utolsósorban csábító volt az a tény, hogy a kataláz meghatározása roppant egyszerű, hiszen elvileg nem kell mást tennünk, mint az enzim preparátumot, vagy az enzim tartalmú kivonatot hidrogén peroxid oldattal hozzuk össze és vagy a keletkező O_2 gázt mérjük manometrikusan,

vagy a visszamaradó H_2O_2 -t határozzuk meg permanganometriával, vagy jodometrikus úton. Hogy mindezek ellenére külön dolgozatban számolunk be a munkánk során felmerült módszertani kérdésekről, azt az indokolja, hogy egyrészt a zöld növényi részek enzimológiai vizsgálata legtöbbször különösen kényes feladat (HASSE és SPECHT 1952) és főképpen az, hogy a nem tiszta enzim preparátummal, hanem egyszerű szövet homogenizátummal dolgozó munkákban sem a módszer, sem a kataláz-aktivitás mértékének meg-



1. ábra. Virágos növények szövethomogenizátumában mért kataláz-aktivitás pH optimuma. I. mezei juharmag, II. cukorrépa levél, III. napraforgó szíklevél.

Fig. 1. pH optima of catalase activity measured in tissue-homogenizates of different angiosperms. I. *Acer campestre* seeds, II. Sugarbeet leaves, III. Sunflower cotyledons. — Ordinate: mg H_2O_2 /1 g dry matter/1 min.; abscissa: pH.

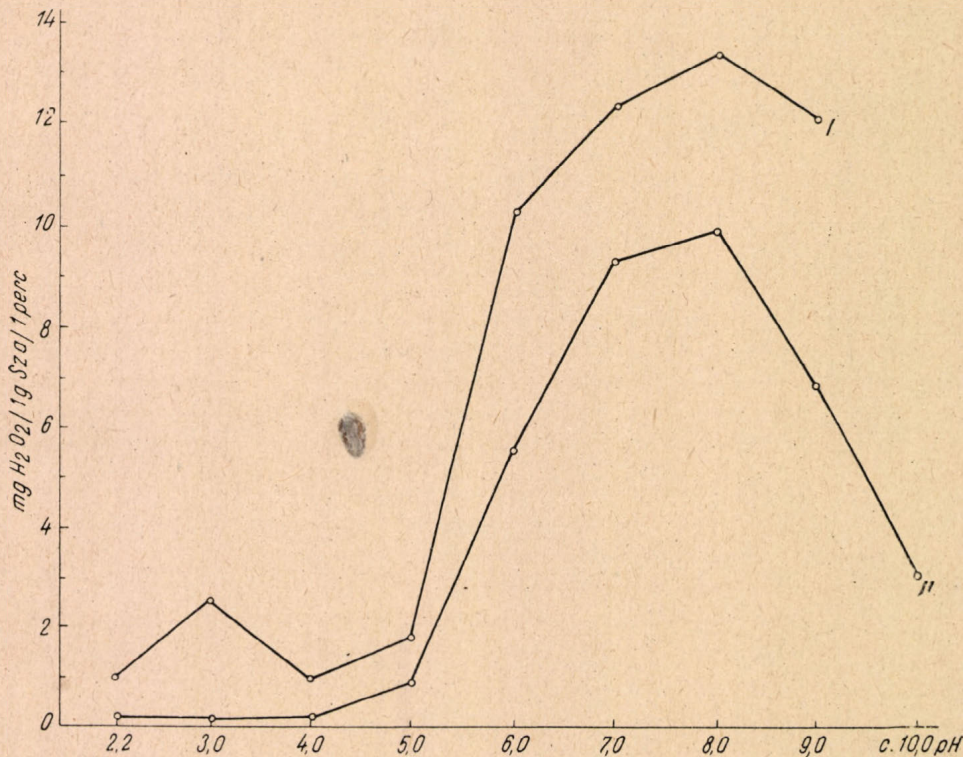
Рис. 1. pH-оптимум активности каталазы измеренный в тканевых гомогенизатах разных явиобратных растений. I. Семена полевого клена, II. Лист свекловицы, III. Семядоля подсолнуха.

adása nem egységes, így az egyes részleteredmények összehasonlítását csak az elvi alapokat is feltáró módszertani tájékoztatás teszi lehetségessé. Újabban hazánkban is többen fordultak figyelemmel a kataláz vizsgálatok felé, nemegyszer komoly gyakorlati kérdések eldöntésében (EIFERTNÉ 1955, FARKAS és RAJHÁTHY 1955), eredményeink közzététele ezért is helyesnek látszik.

A megtárgyalandó kérdések közül a homogenizálás módja, a kísérlet közben használt oldatok hidrogénion koncentrációja, az enzim- és a szubsztrátum koncentráció, kérdései a legfontosabbak.

1. A hidrogénion koncentráció problémája

Az 1. és 2. ábrán bemutatjuk néhány növényi szövethomogenizátum kataláz-aktivitásának pH optimumát. Mind a magasabbrendű (1. ábra) növények levele (répalevél), sziklevele (napraforgó), mind pedig magjának (mezei juhar) homogenizátumában, de ugyanígy az alacsonyabbrendű (2. ábra)



2. ábra. A *Rhytidiadelphus triquetrus* moha (I) és *Xanthoria parietina* zuzmó (II) szövet-homogenizátumának kataláz-aktivitás pH optimuma.

Fig. 2. pH optima of catalase activity, measured in tissue homogenizates of *Rhytidiadelphus triquetrus* (Bryophyta) (I) and of *Xanthoria parietina* (Lichenes) (II). Ordinate: mg H₂O₂ decomposed by 1 g dry matter per 1 min.; abscissa: pH.

Рис. 2. pH-оптимум активности каталазы в тканевых гомогенизатах (I) моха *Rhytidiadelphus triquetrus* и (II) лишаника *Xanthoria parietina*.

zuzmó (*Xanthoria*) és lombosmoha (*Rhytidiadelphus triquetrus*) esetében is az aktivitás meglehetősen lapos maximuma pH 7–8 között van. Ez nem mond ellen az irodalomban található adatok zömének. Igen fontos tudnunk, hogy a nagy hidrogénion koncentráció a katalázt irreverzibilisen károsítja (EULER et al. 1930, KINZEL és URL 1954), ezért különösen savanyú sejtnedvű szervek esetében (gyümölcsök, *Rumex*, *Berberis*, *Oxalis*, *Begonia*, *Tradescantia*, Crasulaceák, kaktuszok stb.) a homogenizálást nem végezhetjük vízben (FRIGGERI 1940), hanem vagy a pH optimumnak megfelelő 1/15 M foszfát pufferben

dörzsöljük el az anyagot, vagy kevés CaCO_3 hozzáadásával állítjuk be a pH-t (NIKOLAJEV és ŠIPIČINA 1936 és sokan mások). STOUT (1949) a H_2O_2 oldatba is tesz kevés CaCO_3 -ot. KINZEL és URL (1954) a kedvező lúgossági fokot 0,1 n NH_4OH permeáltatásával érik el. Az ő vizsgálataik szerint a savanyú sejt-nedv károsító hatása oly nagymértékű lehet, hogy az ellene való védekezést külön tanulmány tárgyává tettük a szétdörzsölésnél használt közeg pH-jának szerepét illetőleg (1. táblázat).

1. táblázat

Különböző módon eldörzsölt napraforgó sziklevel kataláz-aktivitás értékei

1. Eldörzsölés módja	2. Kataláz mg H_2O_2 /1 g Sza/1 perc
a) Desztillált vízben	148,5
b) pH 7,4 foszfát pufferben	179,3
c) 0,1 n NH_4OH kezelés után foszfát pufferben ..	185,5
d) Késhegynyi CaCO_3 hozzáadásával vízben	36,7
e) Késhegynyi CaCO_3 + pH 7,4 foszfát puffer	101,3

A táblázatból kétségtelenül kiviláglik a pH szerepének fontossága a homogenizálásnál. A *Helianthus* sziklevel nem túl savas sejt-nedve (az 1 : 10 arányú desztillált vizes szuszpenzió pH-ja 5,8—6,2 között van) esetén elégséges az optimális pH-jú foszfát pufferben való szuszpendálás. A KINZEL és URL által ajánlott ammóniás átítatás és a foszfát pufferes kezelés közt nincs szignifikáns differencia.

Más azonban a helyzet a közismerten alacsony pH értéket mutató *Zebrina pendula* levél esetében (2. táblázat), ahol a híg ammóniás kezelés messze felülmúlja a többi módszert.

2. táblázat

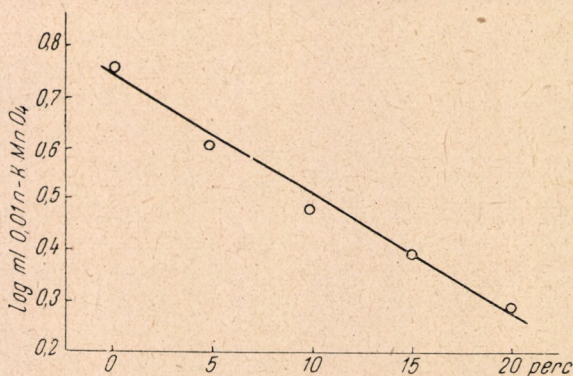
Zebrina pendula levél kataláz-aktivitása különféle hidrogénion koncentrációjú közegben végzett eldörzsölés esetén

1. Eldörzsölés módja	2. Kataláz mg H_2O_2 /1 g Sza/1 perc
a) Desztillált vízben	24,2
b) pH 7,4 foszfát pufferben	37,1
c) 0,1 n NH_4OH kezelés után foszfát pufferben	69,7
d) Késhegynyi CaCO_3 + víz	40,7

Igen feltűnő, hogy az irodalomban elterjedt CaCO_3 eldörzsölés milyen rossz és bizonytalan eredményt adott, különösen a napraforgó sziklevel esetében. Próbálkoztunk Calcium carbonicum praecipitatum pro anal. mellett közönséges krétaporral is (NIKOLAJEV és ŠIPIČINA 1936), de azzal sem sikerült megnyugtató értéket kapnunk.

Végeredményben meg kellett állapítanunk, hogy a legkielegítőbb módszernek a KINZEL és URL által ajánlott 0,1 n ammóniás kezelés mutatkozik, de nem túl savas kémhatású sejt-nedvet tartalmazó szövet esetében a pH 7,4 foszfát pufferben való eldörzsölés is jó eredményt ad. Tekintve, hogy az ammóniás kezelés elég nagy munkatöbbletet jelent, különösen nagy széria vizsgálatok előtt érdemes előkísérlettel anyagról anyagra eldönteni, hogy az egyszerű pufferes homogenizálás nem elégséges-e ?

Az ammóniás kezelést, mely végeredményben a káros hatású sejtmedvet *in vivo* semlegesíti, az alábbi módon végeztük: A vizsgálandó levelet, vagy abból kivágott korongot, pontos mérés után (élő súly meghatározása) 10 percig vákuuminfiltráljuk desztillált vízzel, hogy az ammónia bediffundálását elősegítsük, majd éles szikével vékony szeletekre vágjuk és annyi ideig tartjuk 0,1 n NH_4OH oldatban, míg a semlegesítés megtörténik (legjobb indikátornak az antociános sejtmedvű sejtek megkékülése bizonyult). Ez kb. fél óra hosszát tart. A túl hosszú kezelés nem kedvező. Ezután a szűrőpapírral leitatott mintát súlyának százszorosát kitevő pH 7,4 foszfátpufferben eldörzsölve készítjük el az alapszuspenziót. (KINZEL és URL 1954.)



3. ábra. Példa a kedvező szubsztrátum koncentráció grafikus megállapítására. A fogyott mérőoldat ml értékek logaritmusai az idő függvényében megközelítőleg egyenes vonal mentén helyezkednek el

Fig. 3. Example for the graphical control of the suitable concentration of the substrate. The logarithmic values of the consumed ml-s of the measuring solution fall approximately along a straight line, if represented in the function of time.

Рис. 3. Пример для графического определения положительной концентрации субстрата. Логарифмы мл-величин уменьшенного измерительного раствора расположатся в функции времени вдоль сравнительно прямой линии.

2. Az enzim és szubsztrátum koncentráció kérdései

A hidrogén peroxid bomlása kataláz hatására rövid ideig (mintegy 2 percig) megközelítőleg monomolekuláris reakcióként folyik le, de a reakció sebessége annak előrehaladásával csökken, mert a peroxid a katalázt károsítja. Éppen ezért minél alacsonyabb H_2O_2 koncentrációval dolgozunk, annál jobban kiküszöböljük a kataláz bomlását és eredményeink annál jobban közelítik meg az elsőrendű reakciók adatait. Az alacsony H_2O_2 koncentrációt, a gyors munkát és az alacsony hőmérsékletet mondhatni minden szakember hangsúlyozottan ajánlja (SMIRNOW és ALISSOWA 1924, DOYLE és CLINCH 1928, MORGULIS 1931, DERIBAS és KORNMANN 1936, GEORGE 1949, OVCSINNIKOV 1951, BEERS és SIZER 1952, 1953, hogy csak a szorosán ezzel a problémával foglalkozókat említsük).

A peroxid koncentráció helyességét FÁBIÁN tanácsára egyszerű grafikus módszerrel döntöttük el. Ha reakció-elegyünk (l. később) alikvot részeiben, meghatározott időközökben inaktíváljuk az enzimet és visszamérjük a maradék H_2O_2 -t, akkor a mérőoldat elfogyott ml-einek logaritmus értékei, az idő függvényében grafikusán ábrázolva, helyes koncentráció választás esetén

megközelítőleg egyenesben fekszenek. (3. ábra) OGURA et al. (1950) különböző inhibitorok hatását jellemzik hasonló grafikus módszerrel.

A helyes koncentráció még pontosabb megállapítási módja az, ha kiszámítjuk a bomlás sebességi állandóját a

$$k = \frac{2,303}{t} \log \frac{A_0}{x}$$

egyenlet segítségével, ahol t az inaktiválásig eltelt idő percekben, A_0 a kiindulási H_2O_2 koncentráció (a 0 perckor inaktivált alikvot rész H_2O_2 -tartalma) x pedig a t perc múlva kapott H_2O_2 érték. Tekintettel arra, hogy a képletben csak a két utóbbi szám hányadosa szerepel, nem kell a H_2O_2 mg-értékét kiszámítanunk, elég a fogyott mérőoldat ml értékeivel dolgoznunk. Helyesen megválasztott koncentráció esetén az egymás utáni időpontokban kapott k értékeknek közel konstansnak kell lenniök.

Mi, ha csak különleges növényanyag másképpen nem kívánta, 0,02%-os H_2O_2 koncentrációval dolgoztunk, melynek helyes voltát a fent vázolt grafikus módszerrel munka közben állandóan ellenőriztük.

Az enzim-tartalmú homogenizátum koncentrációjának megválasztásakor RICHARDSON et al. (1953) eredményei nyomán úgy jártunk el, hogy a különböző hígítású szövethomogenizátumok közül azt használtuk, mely a jelenlévő peroxid 20—80%-át bontotta el 10 perc alatt. Kutatásaik szerint ugyanis a túl lassú és a túl gyors bontás az eredményeket eltorzítja. Munkánk során pedig a legkülönbözőbb növények legkülönbözőbb szerveivel dolgoztunk, 1:100 vagy 1:200 arányú hígítást készítettünk. Az irodalom igen sok esetben szintén a minél nagyobb hígítást ajánlja (MORGULIS 1931, BEERS és SIZER 1953), mert egyrészt a közeg ozmotikus értéke (OVCSINNIKOV 1951), másrészt még a neutrális sók töményebb jelenléte is (SMIRNOW és ALISSOWA 1924) a kataláz károsítják, illetve gátolják. A nagy hígítás révén aránylag kevés szerves anyag jut az inaktivált mintába (1:100 hígítású alapsuszpenzió esetében 1:600 hígítás!) és ez lehetővé teszi a jóval kényelmesebb és olcsóbb permanganometriás peroxid meghatározást. A nagyobb mennyiségű szerves anyag $KMnO_4$ fogyasztása a jóval több manuális munkát kívánó jodometriát teszi szükségessé.

Itt említjük meg azt, hogy a homogenizálásnak a megfelelő pufferrel ellepett mintán kell történnie. A gondos, egyenletes felaprózás fontosságát több szerző hangsúlyozza (SCHMIDT 1926, MAKAREWSKAJA 1941), de a homogenizátum szűrése (EULER et al. 1930) vagy centrifugálása (HIBBARD 1937) nem engedhető meg, mert mind a szűrlet, mind pedig a centrifugátum tisztája csökkentett aktivitást mutat (Vö. KRÖSSING 1940, HAGEN és JONES 1952, McCLENDON 1953).

Az enzim és a szubsztrátum koncentrációjáról szóló eszme-futtatásunk végén ki kell emelnünk azt a tényt, hogy egyes növények különböző korú leveleiben oly nagymértékben különbözik a kataláz-aktivitás, hogy ugyanazzal a hígítási módszerrel nem dolgozhattunk. Ezért az enzim-tartalmú kivonat, a szubsztrátum, nagy mennyiségű puffer és desztillált víz keverékéből úgy állítottuk össze a reakciós elegyet, hogy abban a két legkényesebb részlet aránya változtatható, az alapvető fizikai kémiai tulajdonságok (pH-össz-só koncentráció stb.) lényeges változása nélkül.

3. Kataláz meghatározási módszerünk növényi anyagokban

A vizsgálandó szervből, a helyes átlagminta-vétel szempontjainak figyelembevételével, 80—500 mg-os mintát veszünk. Levelekből dugófúróval készített korongok összekeverésével biztosítjuk a helyes átlagot. A súlyt torziós mérlegen 0,1 mg pontossággal megállapítjuk (élő súly = És) és az előkísérletek szerint megállapított ammóniás előkezeléssel, vagy anélkül a minta súlyának százszorosát kitevő pH 7,4 foszfát pufferben tökéletes homogenizátumot készítünk, amit pár csepp toluollal tartósítunk. A szétdőrszölést kis mennyiségű pufferben kezdjük, vigyázva arra, hogy a sejtek roncsolásakor a sejtnedv közömbösítésére kellő mennyiségű puffer álljon rendelkezésre (1 : 100 alapszuspenzió).

A reakciós vagy inkubációs elegy összetétele legtöbbször a következő:

20 ml pH 7,4 foszfát puffer*
 26 ml desztillált víz
 2 ml alapszuspenzió
 2 ml 0,5%-os H_2O_2 .

Túl kicsi vagy túl nagy kataláz-aktivitás esetén az alapszuspenzió adagolásán is és a peroxid mennyiségen is változtathatunk, a víz térfogatának megfelelő változtatásával párhuzamosan. Az inkubációs elegy végső térfogata mindig 50 ml.

A kataláz-aktivitás nem független az elegy hőmérsékletétől. Legjobb egészen alacsony hőfokon, 0, + 2 C° között dolgozni, mert itt a H_2O_2 nem támadja meg az enzimet (MORGULIS 1931) és más zavaró anyagok, különösen a peroxidázok működése sem zavar (RICHARDSON et. al. 1953). Mi általában friss csapvíz hőmérsékletű vízfürdőben (10—12 C°) dolgoztunk: az alapszuspenziót, a peroxid oldatot és a puffert előre behűtöttük és utána hoztuk össze őket. Ha relatív értékekkel is megelégedhettünk, dolgoztunk laboratóriumi hőmérsékleten is (18—20 C°), de ekkor a hőfokot külön pontosan feljegyeztük.

A reakciós elegybe legutoljára a hidrogénperoxidot pipettázzuk és a beengedés utáni fél perc elmúltával 5 ml-t veszünk ki belőle, amit 10 ml kb. 10%-os kénsavban inaktíválunk. Ennek a mintának H_2O_2 -tartalma adja a 0 perces peroxid koncentrációt (FÁBIÁN és SZÉKY 1954). Ha a reakció sebességét is mérjük, akkor szabályos időközökben (mi öt percenként), ha csak a kataláz „mennyiségére” vagyunk kíváncsiak, a tizedik perc végén inaktíválunk 5 ml-t.

Mi minden esetben a maradék H_2O_2 -t mértük 0,01 n $Na_2S_2O_3$ oldattal jodometriásan, illetve 0,01 n $KMnO_4$ oldattal (ERDEY 1953, II, 113 és 162).

A kataláz-aktivitásának legpontosabb mértéke a 0°-on meghatározott reakciósebességi állandó (*k*). Az irodalomban igen gyakran használják azonban az elbontott H_2O_2 mennyiségét, vagy a keletkező O_2 gáz térfogatát, a vizsgált szövet egységnyi mennyiségére vonatkoztatva. Mi legtöbbször az 1 g szárazanyag által 1 perc alatt elbontott H_2O_2 mg értékét adjuk meg (mg H_2O_2 /1 g Sza/1 perc). Akkor használjuk ezt a viszonylag egyszerűbb és gyorsabb mód-

* pH 7,4 foszfát összetétele a következő: 8 rész 1/15 M szekundér nátrium foszfát (11,876 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ per liter) és 2 rész 1/15 M primér káliumfoszfát (9,078 g KH_2PO_4 per liter).

szert, ha nagyszámú kísérletet kell aránylag rövid idő alatt elvégeznünk. Néha, amikor a szárazanyag meghatározást valami megakadályozza, az 1 g élősúly által fogyasztott peroxid mennyiségét is kiszámíthatjuk (mg H_2O_2 /1 g És/1 perc). A kétféle kifejezőmód egymáshoz való viszonya nem egyszerű. Azonos anyag, pl. ugyanannak a növénynek különböző korú levelei esetében a H_2O_2 fogyasztás és a k érték egyértelműen változnak (3. táblázat).

3. táblázat

A reakciósebességi állandó (k) és az 1 g élősúlyú anyag által fogyasztott H_2O_2 mg értékek összehasonlítása ugyanazon *Chenopodium album* különböző korú levelei esetében

Levél száma alulról	H_2O_2 mg 1 g És/1 perc	$10^2 \cdot k_{10}^\circ$
6.	3,52	1,90
7.	8,96	5,38
8.	6,28	4,41
9.	7,76	5,65
10.	10,81	10,57
11.	10,20	9,41
14.	12,36	16,33
17.	12,24	18,36
19.	12,00	17,98
21.	18,16	26,94
23.	18,72	30,95
25.	19,04	38,34
26.	17,92	40,54

A különféle élettani kezelés kataláz-aktivitás módosító hatása azonban nem mutatkozik a két érték változásán ilyen egyértelműen, sőt különféle inhibitorok is okozhatnak eltérést a kétféle adat változásában. Így pl. a különböző vízellátással nevelt, különböző korú csiránövények sziklevel homogenizátumában mért értékeinkből az alábbiak olvashatók ki. (4. táblázat)

Mind a peroxid-bontóképeség (a kataláz „mennyisége”), mind pedig az aktivitásra inkább jellemző k érték a korról párhuzamosan csökken. Igen figyelemre méltó azonban az a tény, hogy az öntözött és szárazon felnevelt sorozatok közül az öntözött nagyobb H_2O_2 -bontó képességével tűnik ki, a száraz sorozatokban viszont a k érték nagyobb következetesen. E helyen csupán annak megállapítása fontos, hogy a kétféle kifejezőmód távolról sem egyértelmű és véleményünk szerint a kettő kombinációjával lehet anyagunk kataláz viszonyait legjobban jellemezni. A 4. táblázat tanulsága az irodalmi adatok értékelésénél is fontos szempontot nyújt.

4. táblázat

Különböző korú napraforgó csiránövények sziklevel homogenizátumában mért kataláz-értékek kétféle kifejezőmódjának összehasonlítása

	1. Fiatal		2. Középkorú		3. Öregedő		4. Elvénuilt	
	5. öntözött	6. száraz	5. öntözött	6. száraz	5. öntözött	6. száraz	5. öntözött	6. száraz
$\frac{\text{mg } H_2O_2}{1 \text{ g Sza/1 perc}}$	495,6	76,4	65,6	44,3	36,0	24,7	20,3	
$10^2 \cdot k_{10}^\circ$	10,69	1,32	1,78	0,72	1,02	0,32	0,59	

Összefoglalás

Növényi szövethomogenizátumban végzett kataláz-meghatározási módszer néhány elvi és gyakorlati kérdését tárgyaltuk irodalmi adatok és saját tapasztalataink felhasználásával, megállapítva, hogy

1. Különösen savanyú sejtnedvű növényekben a homogenizálást feltétlenül optimális pH-jú pufferben (tapasztalataink szerint legjobban a pH 7,4 foszfát pufferben) kell végeznünk.

A sejtnedv in vivo semlegesítése 0,1 n ammóniával mindig a legnagyobb aktivitás mérését eredményezi, de a nem túl savas szövetekben eltekinthetünk tőle. Vízben nem szabad homogenizálni és rossz tapasztalataink voltak a CaCO_3 -os eldörzsöléssel is.

2. Az irodalmi adatokkal megegyezően azt találtuk, hogy mind a szubsztrátum, mind az alapszuspenzió nagy hígításban ad jó eredményt. A kedvező szubsztrátum koncentrációt grafikus módszerrel munka közben ellenőrizhetjük.

3. Részletesen ismertettük az általunk használt módszert.

4. Felhívtuk a figyelmet arra, hogy a kataláz-aktivitás kifejezésére használt H_2O_2 fogyasztás és a reakció sebességi állandó értékei a különböző természetű kezelések hatására nem egyértelműen változnak.

IRODALOM

APPLEMAN, C. O. (1916): Relation of oxidases and catalase to respiration in plants. — *Amer. J. Bot.* **3**, 223–233.

APPLEMAN, C. O. (1918): Respiration and catalase activity in sweet corn. — *Amer. J. Bot.* **5**, 207–209.

AUCHTER, E. C. (1923): Is there normally a cross transfer of foods, water and mineral nutrients in woody plants? — *Md. Agr. Expt. Sta. Bull.* **257**, 33–60. (cit. ap. NELLER 1931.)

BEERS, R. F. jr. and I. W. SIZER (1952): Spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase. — *J. biol. Chem.* **195**, 133–140.

BEERS, R. F. jr. and I. W. SIZER (1953): Kinetics and thermodynamics of the steady state system of catalase with hydrogen peroxide. — *J. phys. Chem.* **57**, 290–293. (*Ber. ges. Phys.* **164**, 312. 1954.)

BURGE, W. E. (1923): The effect of high and low temperatures on the catalase content of *Paramecium* and *Spirogyra*. — *Amer. J. Physiol.* **65**, 527–533.

BURGE, W. E. and E. L. BURGE (1924): Effect of temperature and light on catalase content of *Spirogyra*. — *Bot. Gaz.* **77**, 220–224.

CORNS, W. G. (1950): Effects of 2,4-D and soil moisture on the catalase activity, respiration and protein content of bean plants. — *Canad. J. Res.* **28**, C, 393–405. (*Ber. wiss. Biol.* **72**, 43. 1951.)

DERIBAS, D. et J. KORNMAN (1936): Sur les propriétés de la catalase. — *Bull. Soc. Chim. biol. Paris* **18**, 414–417.

DOYLE, J. and P. CLINCH (1928): The catalase content of conifer leaves with notes on its measurement. — *Proc. R. Irish Acad.* **38**, Sect. B, 128–147. (*Bot. Cbl.* **14**, 78–79. 1929.)

EIFERTNÉ MILLNER A. (1955): Kataláz aktivitás változása citromfélék leveleiben. — *Agrokémia és Talajtan* **4**, 217–223.

ERDEY L. (1953): Bevezetés a kémiai analízisbe I–II. — 2. kiad., Tankönyvkiadó, Budapest, 1–278.

EULER, H. v., K. MYRBÄCK und S. MYRBÄCK (1930): Zur Bestimmung der Katalase in Pflanzenmaterial. — *Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.* **186**, 212–222.

EZELL, B. D. and J. W. CHRIST (1927): Effect of certain nutrient conditions on activity of oxidase and catalase. — *Agric. Expt. Sta. Michigan State Coll. Techn. Bull.* **78**, 1–24. (*Bot. Cbl.* **11**, 203. 1925.)

FARKAS, G. L. und T. RAJHÁTHY (1955): Untersuchungen über die xeromorphischen Gradienten einiger Kulturpflanzen. — *Planta* **45**, 535–548.

FÁBIÁN, Gy. and P. SZÉKY (1954) : Examination of blood catalase in hybridization experiment with rabbits. — *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **5**, 119—130.

FORTINI, S. and M. E. VENEZIAN (1950) : Some enzymatic systems of *Arachis hypogaea*. — *Ann. Staz. Chimico-Agraria Sperim. di Roma, Ser. 3.* **33**, 1—16. (*Biol. Abst.* **28**, 927, 1954.)

FRIGGERI, A. (1940) : Ricerche comparative sul comportamento della catalasi in animali e vegetali. — *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.* **15**, 442—444. (*Ber. wiss. Biol.* **56**, 35, 1941.)

GEORGE, P. (1949) : The effect of peroxide concentration and other factors on decomposition of hydrogen peroxide by catalase. — *Biochem. J.* **44**, 197—205.

GUSTAFSON, F. G., I. CLARK, D. A. SHAW and E. WARWEG (1932) : Catalase activity in tomato fruits at different stages of their development. — *Plant Physiol.* **7**, 155—160.

HAGEN, C. E. and V. V. JONES (1952) : Factors in the determination of the intracellular localization of enzymes. — *Bot. Gaz.* **114**, 130—134.

HARVEY, R. B. (1924) : Enzymes of thermal algae. — *Science* **60**, 481—482. (Cit. ap. EZELL and CHRIST 1927.)

HASSE, K. und M. SPECHT (1952) : Gestörte Dehydrase-Systeme in Extrakten grüner Blätter. — *Biochem. Z.* **322**, 502.

HEINICKE, A. J. (1923) : Factors influencing catalase activity in apple leaf tissue. — *N. Y. Cornell Agr. Expt. Sta. Mem.* **62**, 1—19. (cit. ap. POPE 1932.)

HIBBARD, A. D. (1937) : Photoperiodism and enzyme activity in the soybean plant. — *Res. Bull. Univ. Missouri* **271**, 1—48.

KING, C. J., E. D. EATON and C. HOPE (1934) : Catalase activity in relation to age and viability of sclerotia of the cotton root-rot fungus. — *J. agric. Res.* **49**, 897—902.

KINZEL, H. und W. URL (1954) : Katalasebestimmungen an grünen Blättern unter Berücksichtigung des Säurefehlers. — *Physiol. Plantarum* **7**, 835—850.

KNOTT, J. E. (1927) : Catalase in relation to growth and to other changes in plant tissue. — *N. Y. Cornell Agr. Expt. Sta. Mem.* **106**, 1—63. (cit. ap. NELLER 1931.)

KROSSING, G. (1940) : Versuche zur Lokalisation einiger Fermente in den verschiedenen Zellbestandteilen der Spinatblätter. — *Biochem. Z.* **305**, 359—373.

LOEW, O. (1899) : Catalase. — *U. S. Dept. Agr. Rept. Washington* **68**, 1—47. (cit. ap. SUMNER and SOMERS 1953.)

MAKAREWSKAJA, J. A. (1941) : Konstanz der Katalasenaktivität in zerkleinertem Pflanzenmaterial. — *Mitt. Georg. Abt. Akad. Wiss. SSR* **2**, 121—124. (*Ber. wiss. Biol.* **58**, 264, 1942.)

MCCLENDON, J. H. (1953) : The intracellular localization of enzymes in tobacco leaves. II. Cytochrome oxidase, catalase and polyphenol oxidase. — *Amer. J. Bot.* **40**, 260—266.

MOLLAND, J. (1947) : Bacterial catalase. A contribution to the discussion of the anaerobic respiration. — *Acta path. Scand. Suppl.* **66**, 1—165. (*Ber. wiss. Biol.* **65**, 425, 1949.)

MORGULIS, S. (1931) : Studies on the inactivation of catalase. III. Destruction of catalase by hydrogen peroxide. — *J. biol. Chem.* **92**, 377—383.

NELLER, J. R. (1931) : Relation of catalase activity to physiological breakdown in Jonathan apples. — *Plant Physiol.* **6**, 347—354.

NELLER, J. R. (1931a) : Effect of chlorates upon the catalase activity of the roots of bindweed. — *J. agric. Res.* **43**, 183—189.

NIKOLAJEV, K. A. und T. K. SPIZINA (1936) : Über Peroxydase und Katalase von Teeblättern. — *Arch. biol. Nauk* **43**, 115—123; 181—182. (*Ber. ges. Physiol.* **102**, 314, 1937.)

OGURA, Y., Y. TONOMURA, S. HINO and H. TAMAYA (1950) : Reaction between catalase molecule and various inhibitory substances. I. — *J. Biochem. Tokyo* **37**, 153—177. (*British Abst. A. III.* 1951, 1279.)

OVSINNIKOV, N. N. (1951) : Effect of loosely-bound water on the activity of catalase. — *Biochimija* **16**, 205—208. (*British Abst. A. III.* 1952, 1074.)

POPE, M. N. (1932) : Catalase activity in relation to the growth curve in barley. — *J. agric. Res.* **44**, 343—355.

REED, G. B. (1916) : The relation between oxidase and catalase in plant tissues. — *Bot. Gaz.* **62**, 409—412.

RICHARDSON, M., I. F. HUDDLESON and R. BETHEA (1953) : Study of catalase in erythrocytes and bacteria. I. Procedure for the determination of the catalase activity

of erythrocytes. — *Arch. Biochem. a. Biophys.* **42**, 114–123. (*Ber. ges. Physiol.* **163**, 133. 1954.)

SCHMIDT, W. (1926): Das Katalaseferment im Kiefernnsamen. Übersicht und Vorläufige Mitteilung. — *Forstarchiv Jg.* **1926**, 2–9. (*Ber. wiss. Biol.* **1**, 16.1926.)

SELL, H. M., A. H. BEST, W. REUTHER and M. DROSDOFF (1948): Changes in chemical composition and biological activity of developing tung fruit with reference to oil synthesis. — *Plant Physiol.* **23**, 359–372.

SHULL, C. A. and W. B. DAVIS (1923): Delayed germination and catalase activity in *Xanthium*. — *Bot. Gaz.* **75**, 268–281.

SMIRNOW, A. J. und F. S. PH. ALISSOWA (1924): Zur Frage über die Rolle der Aschenbestandteile in den Pflanzen. I. Mitt. Das Einwirken von Neutralsalzen auf die Katalase. — *Biochem. Z.* **149**, 63–78.

STOUT, M. (1949): Relation of oxidation-reduction potential, respiration and catalase activity of reproductive development in sugar beets. — *Bot. Gaz.* **110**, 438–449.

SUMNER, J. B. and G. F. SOMERS (1953): Chemistry and methods of enzymes — 3. ed. Acad. Press, New York, 1–462.

TYSON, J. (1930): Influence of soil conditions, fertilizer treatments and light intensity on growth, chemical composition and enzymic activities of sugar beets. — *Mich. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.* **108**, 1–44.

YAMAFUJI, K. (1936): Die Katalasetätigkeit des Seidenraupeneies im Zusammenhang mit seiner Vitalität. — *Enzymologia (Haag)* **1**, 268–270. (*Ber. wiss. Biol.* **42**, 423. 1937.)

ОПЫТЫ С РАСТИТЕЛЬНОМ КАТАЛАЗОМ

I. Вопросы методики

Л. Й. М. Фельфелди — Ф. Ж. Калько

Резюме

Излагается метод определения каталаза, применённый при работе Ботанической экспериментальной лаборатории Института. Опыт проводят не очищённым ферментативным препаратом, а простой гомогенизированной тканью, чтобы сравнить каталазовую активность различных растений и органов. Подробно рассмотренные здесь вопросы следующие: способ гомогенизации; концентрация водородных ионов растворов, применённых в опытах; концентрация энзиматического экстракта и субстрата.

На рисунках 1 и 2 представлен оптимум pH каталазовой активности, измеренной в гомогенизатах некоторых растений, являющихся далёкими родственниками.

Таблица I. рубрика 1: способ смешивания; рубрика 2: каталазовая активность, выраженная в мг-ах H_2O_2 на 1 г сухого вещества в 1 минуте показывает изменение каталазовой активности семядоли подсолнечника при смешивании в следующих средах: а) в дистиллированной воде; б) в фосфатном буфере с pH 7,4; в) после обработки 0,1 нормальным раствором NH_4OH (Кинцелл и Урлл, 1954) в фосфатном буфере; г) после прибавления крошечного количества $CaCO_3$ в воде; д) после прибавления крошечного количества $CaCO_3$ в фосфатном буфере с pH 7,4.

Таблица II содержит аналогичные данные относительно листа *Zebrina pendula*; рубрики таблицы следующие: 1. способ смешивания; 2. каталазная активность, выраженная в мг-ах H_2O_2 на 1 г сухого вещества в 1 минуте: а) в дистиллированной воде; б) в фосфатном буфере с pH 7,4; в) после обработки 0,01 нормальным раствором NH_4OH в фосфатном буфере; г) после прибавления крошечного количества $CaCO_3$ в воде.

Из этих таблиц явствует, что именно в случае *Zebrina pendula* (с кислой реакцией) наибольшая активность получается путём обработки 0,01 нормальным раствором NH_4OH , однако, в случае тканей с мало кислотным клеточным соком, как например семядоли *Helianthus*, достоверная разница (сигнификантная дифференция) между аммиачной обработкой и простым смешиванием в буфере с pH 7,4 не обнаруживается. Необходимость аммиачной нейтрализации следует решить путём предварительных опытов. Смешивание с $CaCO_3$ дало плохие и неуверенные результаты.

По литературным данным и по собственному опыту энзиматический экстракт и раствор субстрата следует применить в сильно разбавленном виде. Достаточную степень

разбавления перекиси водорода можно проверить при работе графическим методом. Если концентрация перекиси водорода является достаточной, то логарифмические значения мл-ов измерительного раствора расходуемых активированными в регулярных промежутках аликвотными частями инкубированной смеси (изображенные в зависимости от времени) размещаются приблизительно вдоль прямой линии (см. рисунок 3).

Применённый для определения каталазы метод следующий: был гомогенизирован — после обработки 0,1 нормальным раствором NH_4OH , или без обработки — образец 80—500 мг живого веса в стократном количестве фосфатного буфера с рН 7,4. Гомогенизированное вещество было консервировано путём прибавления нескольких капель толуола (= основная суспензия).

Инкубационная смесь:

20 мл фосфатный буфер с рН 7,4, по методу Сёрензен,

26 мл дистиллированной воды,

2 мл основной суспензии,

2 мл 0,5%-ной перекиси водорода.

К инкубационной смеси добавляют, в заключение, раствор H_2O_2 . Полминуты спустя инактивируют 5 мл в 10 мл приблизительно 10%-ном H_2SO_4 . Содержание перекиси этой пробы дает концентрацию перекиси в 0 мин. После этого, через 5—10—15—20 и т. д. минут инактивируют дальнейшие количества по 5 мл.

Каталазовую активность можно выразить ещё разложением H_2O_2 , относящимся к единому весу испытанной ткани; наилучшим же способом является применение скоростного коэффициента реакции (k). В случае единого вещества изменение двух значений — параллельное. Случай параллельного изменения представлен в таблице 3 на листьях различного возраста того же самого растения *Chenopodium album* когда расхождение H_2O_2 и скоростный коэффициент разложения изменяются параллельно (первая рубрика: число листьев снизу).

В таблице 4 приведен случай, когда результаты двоякого рода изменяются не параллельно (рубрики: семядоли растения 1. молодого; 2. среднего возраста; 3. стареющего; 4. устаревшего; 5. орошенного; 6. получившего сухую обработку). В семядоли всходов подсолнечника различного возраста как скоростный коэффициент реакции, так и степень расхождения перекиси уменьшаются параллельно с возрастом. Однако, в то время как получившие нормальную поливку растения имеют большую способность разложения перекиси, недостаточно орошенные растения содержат каталаз, показывающий более высокое значение «k».

EXPERIMENTS ON THE CATALASE ACTIVITY OF PLANTS

I. Problems of method

L. J. M. Felföldy and F. Zs. Kalkó

Summary

The methods for determining catalase activity applied in the Plant Physiological Laboratory of our Institute are discussed. The experiments were conducted with a homogenized plant material and not with purified enzyme prepartes, in order to compare the catalase activity of various plants and plant organs. Questions discussed in details are as follows: homogenization, hydrogen ion concentration of solutions used in the experiments, concentration of substrate and of the enzyme-containing extracts.

In Fig. 1. and 2. are shown the pH optima of catalase activities measured in the homogenized organs of some distantly related plant species.

In Table 1. (columns: 1. Method of grinding, 2. catalase activity, expressed in $\text{mg H}_2\text{O}_2/1 \text{ g dry matter}/1 \text{ min. units}$) are shown the changes in the catalase activity of *Helianthus* cotyledons when grinded in the following media: a) distilled water; b) phosphate buffer, pH 7,4; c) in phosphate buffer after treatment with 0,1 n NH_4OH solution (KINZEL and URL 1954); d) in water, after addition of a small quantity of CaCO_3 . e) in phosphate buffer after the addition of CaCO_3 .

Similar data pertaining to the leaves of *Zebrina pendula* are summed up in Table 2. (Columns: 1. Method of grinding; 2. Catalase activity expressed in $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ mg}/1 \text{ g dry matter}/1 \text{ min. units}$; a) distilled water; b) phosphate buffer, pH 7,4; c) phosphate buffer, after previous treatment with 0,1 n NH_4OH and d) water, after addition of CaCO_3 .)

These Tables clearly show that, especially in the case of *Zebrina pendula* leaves owing to high acidity in their cell sap, the NH_4OH treatment results in highest activity, whereas for tissues with lower acidity, e. g. sunflower cotyledons, there is no significant difference between NH_4OH treatment and simple grinding in buffer, pH 7.4. Previous experiments have to decide about the necessity of neutralization with ammonia. pH adjustment with CaCO_3 gave unsatisfactory and uncertain results.

Literary data and the author's experiences, too, show the importance of using highly diluted enzyme-containing extracts and substrate solution. The sufficient degree of H_2O_2 dilution can be controlled graphically during the experiment. In the H_2O_2 concentration is suitable, the logarithmic values of the ml-s of the measuring solution, consumed by aliquot amounts of the incubated mixture, inactivated at regular intervals, fall approximately along a straight line, when represented in the function of time (*Fig. 3.*).

The author's method for determining catalase activity was the following: Samples of 80—500 mg fresh weight were grinded in phosphate buffer, pH 7.4, amounting hundred times of their weight, after or without previous treatment with 0.1 n NH_4OH . The homogenizates were conserved with a few drops of toluol (= ground suspension).

The composition of the incubation mixture was as follows: 20 ml M/15 phosphate buffer pH 7.4 according to SÖRENSEN, 26 ml distilled water, 2 ml ground suspension and 2 ml 0.5% H_2O_2 solution.

The peroxide solution was put finally into the incubation mixture. After half a minute, counted from the addition of H_2O_2 , 5 ml of the incubation mixture was inactivated in 10 ml ca. 10 per cent solution of sulfuric acid. The hydrogen peroxide contents of this sample give the peroxide concentration at 0 Minute. Further samples from the incubation mixture were taken in the 5th, 10th, 15th, etc. minutes. The reaction velocity coefficient (k) was computed in the usual way.

Catalase activity can be expressed also by H_2O_2 decomposition of the unit weight of the tissue investigated, most exactly however by the reaction velocity coefficient (k) at 0° C. The changes of the two values are parallel in the case of homogeneous material. *Table 3* shows the case of parallel change of H_2O_2 decomposition and of the reaction velocity coefficient in leaves of different age of the same *Chenopodium album* plant. *Table 4*: Comparison involving the changes of H_2O_2 decomposition and of k values of catalase activity in homogenized cotyledons of sunflower seedlings of different age. Columns: 1. Young; 2. middle-aged; 3. growing old; 4. old; 5. watered plants; 6. dry-treated plants.

In the cotyledons of sunflower seedlings of different age the reaction velocity coefficient and the H_2O_2 decomposition of dry matter decrease with the age. In the case of regularly watered plants however the H_2O_2 decomposition is greater, whereas in the case of insufficiently watered plants, the k values point to a greater catalase activity.