(A Magyar Biologiai Kutatóintézet közleménye).

OXIDÁLÓ ENZYMRENDSZEREK MEGHATÁROZÁSA NÖVÉNYEKBEN

Írták: Dr. Banga Ilona (Szeged) és
Dr. Győrffy Barna (Mosonmagyaróvár)

Mai ismereteink szerint a gének az élő szervezetek kialakulásának és életműködéseinek végső önálló alapegységei. Mivel pedig feltételezzük, hogy ezek a gének hatásukat a legnagyobb valószinűség szerint enzymes úton fejtik ki, érthető, hogy különösen jelentősek azok a biokémiai-genetikai kutatások, amelyek a genetikai viszonyok és bizonyos enzymek aktivitása közötti összefüggésekre igyekeznek további fényt deríteni. (Az errevonatkozó irodalmat l. Győrffy B.: Gének és enzymek c. összefoglalásában. 1943, Magyar Biol. Kut. Munk. *15.*, 450—461.)

Ebből az alapgondolatból kiindulva nagyon érdekesnek látszik megvizsgálni, hogy a növényekben előforduló különböző oxidásék milyen gén hatására fejlődnek ki és miért van az, hogy egyes növényekből bizonyos oxidásék teljesen hiányoznak, míg mások nagy aktivitással működnek. Vajjon az oxidáció, mely a növényekben sokkal kisebb szerepet játszik, mint az állatoknál, egy és ugyanazon oxidáló rendszeren megy-e végbe az összes növényeknél, vagy itt is fellelhetők olyan különbségek, mint amilyenekkel a különböző állati szervek sejtjeiben találkozunk. Mindezekre a kérdésekre végső fokon azok a genetikai vizsgálatok fognak felelni, melyek megállapítják, hogy egy bizonyos gén hatására milyen oxidáló rendszer tud kialakulni, s ezzel egyidejűleg milyen oxidáló enxymek és katalyzátorok lépnek fel.

Hogy ezeket a vizsgálatokat el lehessen végezni, ahhoz szükség van olyan quantitativ eljárásra, melynek alapján meg lehessen mondanunk, hogy az egyes növényekben az oxidásék egymáshoz viszonyítva milyen mennyiségben fordulnak elő. Ez a munka egy ilyen eljárás leírását adja meg. Két dolgot tartottunk szem előtt: 1.) hogy a különböző oxidásékat egymás mellett lehetőleg kis mennyiségű anyagban tudjuk quantitative meghatározni és 2.) hogy ez a meghatározás gyors legyen, mert a genetikai vizsgálatoknál mindíg nagyszámú anyag feldolgozásáról van szó. Eddig is ismeretesek voltak módszerek, me-

lyekkel az egyes oxidásékat mint pl. peroxidáset, vagy polyphenoloxidáset quantitative mérni lehetett. Ennek a munkának létjogosultságát azonban az adja meg, hogy mi egymás mellett mérjük quantitative nemcsak az egyes enzymek aktivitását, hanem méréseink útmutatást adnak arra nézve is, hogy milyen oxidáló rendszer működik az egyes vizsgálandó növényekben. Igy pld. a növények peroxidáse tartalmát 25 év óta úgy nézik, hogy a vizsgálandó enzympreparátumhoz peroxidot és egy polyphenolt, pyrogallolt vagy benzidint, adnak. Ezen polyphenol eloxidálásának sebességéből számítják ki a növény peroxidáse tartalmát. Mármost ha olyan növényről van szó, mely peroxidáse mellett polyphenoloxidásét is tartalmaz, akkor ezzel a módszerrel a két enzym aktivitásának az összegét mérik, s a kettőt nem lehet egymástól elválasztani.

Mi éppen ezért, hogy az egyes növények oxidáló rendszereit egymástól jobban elkülönítsük, oxidáló substrátumként nem polyphenolokat használtunk, melyek kísérői lehetnek úgyis a növénynek, hanem, hogy egyúttal ezeknek a jelenlétét vagy hiányát is megállapíthassuk, ascorbinsavat alkalmaztunk oxidábilis anyagként. A három legelterjedtebb oxidásét határozzuk így meg egymás mellett: az ascorbinsavoxidásét (ASO), a polyphenoloxidásét (PPO) és a peroxidásét (PO) ill. ennek két fajtáját a PO I.-et és a PO II.-t.

A meghatározási módszer lényege tehát az, hogy mindíg az ascorbinsavat oxidáltatjuk és ennek mérjük a sebességét, de aszerint, hogy milyen közti katalyzátort adunk még a rendszerhez, mérni tudjuk egymás mellett az ASO-t, a PPO-t, PO I. és PO II.-t. Az ascorbinsavat csak azok a növények oxidálják mérhető mértékben, minden egyéb közvetítő anyag hozzáadása nélkül is, melyek ASO-t tartalmaznak A növények PPO tartalmának a megállapításánál az ascorbinsavon kívül egy polyphenolt (pyrocatechint) is adunk, mivel a PPO aktivitását csak a saját substrátumának a polyphenolnak a jelenlétében mérhetjük. A peroxidáse tartalmat úgy határozzuk meg, hogy mérjük az ascorbinsav oxidációjának sebességét peroxid jelenlétében. Ez a PO I., mely THEORELL szerint azonos a BANGA és SZENT-GYÖRGYI,[1] valamint BANGA és PHILLIPOT[2] által leírt dioximaleinsav oxidáséval. Ha a peroxid mellett még hydrochinont is adunk, akkor mérni tudjuk a THEORELL[3] szerint feltételezett PO II.-t mely peroxid mellett csak

[1] Z. f. physiol. Chem. 255, 57, 1938.
[2] Z. f. physiol. Chem. 258, 147, 1939.
[3] Ark. Kemi Mineral. Geol. Ser. B. 14, 1—3, 1940.

hydrochinon hozzáadására oxidálja az AS-t és HCN-re nem érzékeny, szemben a PO I.-el melyet már M/100.000 HCN legátol.

Az egyes növények oxidáse tartalmát egységben fejezzük ki. Egy egységnek vettük azt az enzymmennyiséget, mely 1 perc alatt 1 mg ascorbinsavat teljesen oxidál. A növények levéből különböző higításokat készítve könnyen megállapíthatjuk, hogy a növény 1 ccm-re a különböző oxidásékból hány egységet tartalmaz.

Hogy az egyes oxidáló enzymek milyen pontossággal határozhatók meg az általunk leírt eljárással egymás mellett, arra nézve szolgáljon példának az I. táblázat, ahol először külön külön az egyes

I. TÁBLÁZAT.

Növénykivonat	ASO		PPO		PO I.		PO II.	
	számit.	talált	számit.	talált	szám.	talált	szám.	talált
1943. VIII 6.								
uborka		0.33		0.31		0.073		0.355
retek		0.00		0.00		0.072		0.42
uborka + retek	0.33	0.35	0.31	0.31	0.145	0.180	0.77	0.83
1943 VIII. 9.								
burgonya		0.00		0.65		0.00		0.20
retek		0.00		0.15		0 00		0 58
burgonya + retek	0.00	0 00	0.80	0.75	0.00	0.00	0 78	0.70
1943. VIII. 10.								
uborka		0.75		0.65		0.12		0.35
retek		0.00		0.05		0.04		0.68
burgonya		0.00		0.80		0.14		0.14
uborka + retek + burgonya	0.75	0.71	1.62	1.50	0.30	0.37	1.17	1.03
1943. VIII. 11.								
uborka		0.61		0.70		0.00		0.29
retek		0.00		0.00		0.00		0.81
burgonya		0.00		0.61		0.00		0.14
uborka + retek + burgonya	0.61	0.65	1.31	1.45	0.00	0.00	1.24	1.17

tipusnövényeknél meghatároztuk a különböző enzym aktivitásokat, azután összeöntve a különböző növénykivonatokat, egymás mellett állapítottuk meg az enzymaktivitásokat. Ezek a tipusnövényeink voltak: a nagy ASO tartalmú uborka; a magas PPO tartalmú burgonya és a retek, mely tudvalevőleg igen sok peroxidását tartalmaz. Mint az eredményeink mutatják eljárásunkkal valóban lehetséges az ASO, PPO és PO aktivitásának megállapítása anélkül, hogy az egyes oxidásék egymás aktivitását lényegesen befolyásolnák.

A II. táblázat mutatja, hogy néhány növénynél alkalmazva az ismertetett egyszerű meghatározási módszert, pontosan megadhatjuk számokban kifejezve egy-egy növény oxidáse tartalmát.

II. TÁBLÁZAT.

Egynéhány növénykivonatban meghatározott oxydáló enzym aktivitások egységekben kifejezve.

Növénykivonat	ASO	PPO	PO I.	PO II.
paradicsom:				
Lycop. racemifl.	0.40	0.24	1.95	2.00
„ racemiger	0 37	0 41	0.69	3.00
paprika:				
elefántcsont	0.30	0 57	5.10	9.80
fehér óriás	0 39	2.53	8.45	11.00
tojásgyümölcs	1 50	6.25	2 56	8 32
alma	0.15	0 23	0.14	0 52
körte	0 10	0.20	0.32	0.60

Kísérleti rész:

Növénykivonat készítése: 5-10 g magjától megtisztított növényi részt annak megfelelő mennyiségű homokkal jól eldörzsölünk, úgy hogy az egész homogén legyen. Gézen átnyomjuk, hogy a homoktól és a

növénystruktura részeitől megszabadítsuk és jég között tároljuk. Ennek 1 ccm-ére számítjuk a különböző oxidások mennyiségét a már fent ismertetett egységekben kifejezve. Ha pld. egy növénykivonat 0.25 ccm-e még teljesen eloxidálja 1 perc alatt az 1 mg ascorbinsavat, de 0.125 ccm már csak 0.5 mg ascorbinsavat oxidál el 1 perc alatt, akkor a növénykivonat 4 egység oxidását tartalmaz, mivel 1 ccm összesen 4 mg ascorbinsavat tudna 1 perc alatt eloxidálni.

Szükséges oldatok.

Puffer oldatok: pH 4.7 ecetsav puffert moláris ecetsav és Na-acetat 1:1 arányú összeöntésével kapunk. pH 7 Sörensen-féle phosphát puffer elkészítésénél 4 rész M/15 KH_2PO_4-hoz 6 rész M/15 Na_2HPO_4-t adunk.

Ascorbinsav oldat: 10 mg ascorbinsavat (AS) 10 ccm deszt. vízben oldunk. Mivel az AS gyorsan oxidálódik, az AS-oldat óránként frissen készítendő.

M/50 pyrocatechin oldat: 0.66 gr pyrocatechin (PK). 50 ccm deszt. vízben feloldunk. Az oldat sötét üvegben, jégszekrényben sokáig eláll.

M/50 hyrochinon oldat: 0.66 g hydrochinont (Hy) 50 ccm deszt. vízben feloldunk. Az oldat sötét üvegben, jégszekrényben sokáig eláll.

M/100 peroxid oldat: 0.69 ccm peroxigenolt (Richter) adunk 100 ccm deszt. vízhez.

Benzidin oldat: 0.18 g benzidint oldunk 20 ccm 96%-os alkoholban.

M/100 jódoldat titráláshoz: 3-4 g KJ-t 100 ccm deszt. vízben feloldunk, majd pedig 0.0346 g jódot mérünk bele, s az egészet 500 ccm-re egészítjük ki.

10% metaphosphorsav oldat.

Eljárás: 100 ccm-es Erlenmeyer lombikba beletesszük a megfelelő higítású növénykivonatot + 3 ccm puffert + 1 ccm = 1 mg ascorbinsavat és aszerint, hogy milyen oxidását vizsgálunk pyrocatechint vagy peroxidot adunk, ill. a PO II. esetében peroxidot+hydrochinont adunk. Az elegytérfogatát 6 ccm-re egészítjük ki deszt. vízzel. Az egészet 1 percig szobahőn egyenletesen rázzuk. Az enzymműködést 1 ccm 10 % metaphosphorsav hozzáadásával megszüntetjük és az el nem oxidálódott ascorbinsavat M/100 jóddal keményítő jelenlétében visszatitráljuk. Szükséges mindig a 0 értéknek a meghatározása, amikor a metaphosphorsav előzetes hozzáadása után adjuk az ascorbinsav oldatot. Ezt a 0 értéket a kísérleti értékből le kell vonnunk.

Ascorbinsavoxidáse aktivitásának meghatározása: 100 ccm Erlenmeyer lombikba beleteszünk 1 ccm higítatlan vagy higított növénykivonatot, 3 ccm pH 7 phosphát puffert és 1 ccm = 1 mg AS-t+1 ccm H_2O-t. Egy perces rázás után 1 ccm metaphosphorsavat adunk és az el nem oxidálódott AS-t visszatitráljuk. (A jódoldatot kristályos AS-el előzőleg úgy állítjuk be, hogy 1 mg AS egyenlő legyen 1 ccm jódoldattal.)

Polyphenoloxidáse aktivitásának meghatározása: Először is meggyőződünk arról, hogy a vizsgálandó kivonat egyáltalában tartalmaz-e PPO-t. Ezért a ccm kivonathoz 2 ccm pyrocatechint és 3 csepp benzidint adunk. Ha PPO van jelen, akkor az oldat 1-2 percen belül rázás közben elkékül.

A quantitativ meghatározásnál 1 ccm növénykivonathoz adunk 3.6 ccm pH 4.7 acetat puffert+1 ccm M/50 PK-t és 1 ccm AS-t. 1 percnyi rázás után metaphosphorsavval megszüntetve az enzymműködést a visszamaradt AS mennyiséget megtitráljuk.

Peroxidáse meghatározása: 1 ccm növénykivonathoz 3 ccm pH 4.7 acetatpuffert+1 ccm peroxidot és 1 ccm (1 mg) ascorbinsavat adunk. Egy percnyi rázás után 1 ccm metaphosphorsav hozzáadása után jóddal visszatitráljuk az el nem oxidálódott AS mennyiséget. A PO II. esetében még 1 ccm M/50 hydrochinont is adunk.

(From the Hungarian Biological Research Institute).

ESTIMATION OF OXIDASE ACTIVITIES IN PLANTS

By I. Banga (Szeged) and B. Győrffy. (Mosonmagyaróvár).

In this paper we are giving a method for the estimation of the different oxidation systems in plants. We estimate side by side the ascorbic acid oxidase, polyphenol oxidase and peroxidase. We used ascorbic acid as oxidating substance for the three enzymes and measured the velocity of oxidation of ascorbic acid by plant extracts, giving the suitable catalysators for the different oxidases. So for instance ascorbic acid oxidase activity can be estimated by measuring the velocity of oxidation of ascorbic acid without adding any activators. Polyphenoloxidase activity can be estimated by adding pyrocatechine and ascorbic acid and peroxidase by giving peroxide and ascorbic acid.