

AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW AMYLOLITYCZNYCH
W KIEŁKUJĄCYM ZIARNIE ZBÓŻ O RÓŻNEJ DOJRZAŁOŚCI *

Stanisław Grzesiuk, Teresa Mierzwińska

Instytut Biologii Roślin AR-T w Olsztynie

WSTĘP

Szybki i regularny przyrost aktywności enzymów amyloリティcznych w kiełkujących ziarniakach zbóż jest obecnie uważany przez niektórych badaczy [3, 7, 13] za wskaźnik prawidłowego kiełkowania, na podstawie którego można też sądzić o żywotności ziarna.

Główną rolę wskaźnika spełnia α -amylaza. W pierwszym tygodniu kiełkowania udział tego enzymu stanowi 70-90% sumarycznej aktywności amyloリティcznej (por. 4). Według Gaspara i wsp. [3] istnieje ścisła zależność pomiędzy rozwojem zarodka a aktywnością α -amylazy w ziarnie. Każda inhibicja lub stymulacja wzrostu zarodka powoduje równoległą zmianę w aktywności tego enzymu. W związku z tym można przypuszczać, że aktywność enzymów amyloリティcznych w procesie kiełkowania ziarna będzie zależała zarówno od gatunku, jak i od jakości biologicznej nasion, uwarunkowanej wpływem środowiska oraz stopniem dojrzałości.

Porównanie istniejących na ten temat danych jest jednak utrudnione ze względu na niejednakowe metody analiz oraz bardzo różny materiał badawczy.

W pracy obecnej zbadano dynamikę α - i β -amylazy w kiełkującym ziarnie trzech podstawowych gatunków zbóż o różnej dojrzałości. Wzrost zbóż oraz dojrzewanie ziarna odbywało się w ujednoliconych warunkach. Jednakowy był również sposób pobierania prób i wstępne przygotowanie materiału. Umożliwiło to porównanie aktywno-

*Praca została wykonana w ramach problemu badań podstawowych II/7, koordynowanego przez Zakład Fizjologii Roślin PAN w Krakowie.

ści obu enzymów amyloolitycznych w różnych gatunkach oraz jej zmian w zależności od dojrzałości kiełkującego ziarna.

MATERIAŁ I METODYKA

Obiektem badań było żyto ozime - odmiany Dańkowskie Złote i Pancerne, pszenica ozima - odmiany Grana i Jana oraz jęczmień jary - odmiany Piast i Kosmos.

Zboża te były uprawiane na polu doświadczalnym w okolicach Olsztyna, na glebie brunatnej, wytworzonej z lekkiej gliny. Nawożenie i uprawę przeprowadzono zgodnie z ogólnie przyjętymi zaleceniami agrotechnicznymi.

Próby ziarna przeznaczonego do analiz pobierano:

- 1) w fazie dojrzałości mleczonej, która u żyta przypadała na 6 VII, pszenicy - 12 VII oraz jęczmienia - 15 VII,
- 2) w dojrzałości woskowej - odpowiednio 16 VII, 23 VII oraz 26 VII,
- 3) w dojrzałości pełnej - 15 VIII, 18 VIII oraz 19 VIII 1976 r.

Pobrane próby młócono ręcznie, odrzucając w każdym kłosie dwa górne i dwa dolne piętra kłosek. Ziarno suszono w warunkach laboratoryjnych do wilgotności równowaznej i następnie umieszczano w szklanych słojach, hermetycznie zamykanych, gdzie przechowywano je przez 6 miesięcy do rozpoczęcia analiz.

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI ENZYMÓW AMYLOLITYCZNYCH

Aktywność α - i β -amylazy oznaczano w ziarnie pęczniejącym i kiełkującym na szalkach Petriego w ciemności, w temperaturze 20°C w ciągu 12, 24, 48, 72 oraz 96 godzin. Do analiz brano oddzielnie zarodki i bielma. Zarodki wraz z tarczką izolowano ręcznie za pomocą igły preparacyjnej.

W celu uzyskania wyciągu enzymatycznego rozcierano po 100 bielm i zarodków oddzielnie w każdej próbie, w moździerzu w ciągu 30 min z 0,9% NaCl. Otrzymany ekstrakt sączono przez gazę i następnie odwirowywano przy 3000 g. W supernatancie oznaczano aktywność obu typów amylaz. Analizę powtarzano czterokrotnie.

Aktywność α -amylazy oznaczano metodą jodowo-skrobiową, szeroko stosowaną w różnych modyfikacjach [6]. Podstawą tej metody jest zmniejszanie się intensywności zabarwienia kompleksu jodowo-skro-

biowego w wyniku rozkładu skrobi przez α -amylazę. Do mieszaniny reakcyjnej, zawierającej 1 ml skrobiowego substratu, dodawano wyciąg enzymatyczny w ilości zależnej od aktywności enzymu (0,2-0,05 ml). Po 5 min inkubacji w temperaturze pokojowej reakcję przerywano przez dodanie 1 ml odczynnika jodowego (60 mg KJ + 8 mg J₂ w 100 ml 0,05 N HCl), uzupełniano 7 ml wody i następnie kolorymetrycznie mierzono absorpcję światła o długości fali 620 nm przez barwny roztwór. W próbie kontrolnej zamiast enzymu wprowadzano do mieszaniny reakcyjnej wodę. Aktywność enzymu wyznaczano z różnicy absorpcji pomiędzy próbą kontrolną a doświadczalną i podawano w mg α -amylazy, stosując przelicznik, uzyskany za pomocą kontrolnego testu z preparatem czystej α -amylazy (Fluka AG).

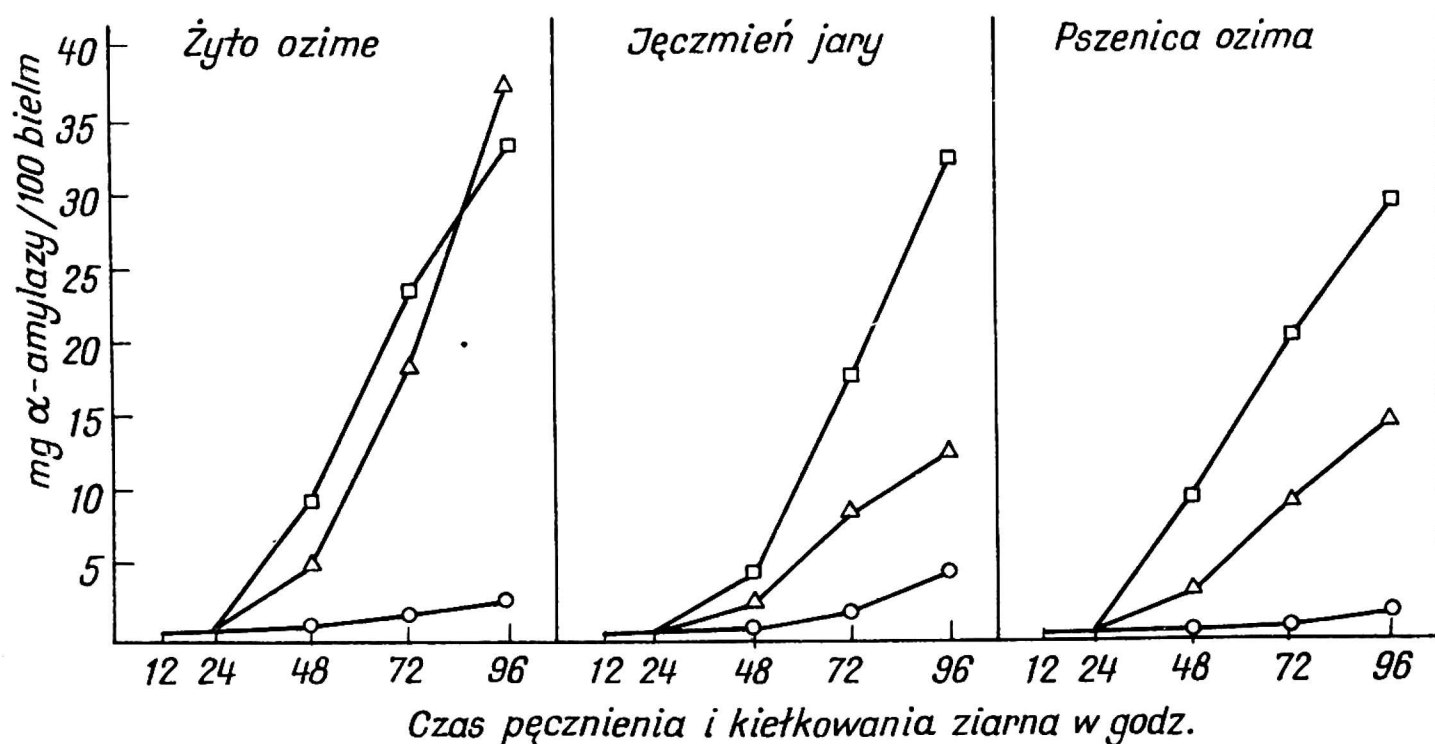
Aktywność β -amylazy określano za pomocą metody polegającej na jodometrycznym oznaczaniu maltozy uwalnianej w wyniku hydrolyzy substratu, tj. skrobi rozpuszczalnej. Reakcję enzymatyczną przeprowadzano w ściśle określonym pH, eliminującym działanie α -amylazy. Do 10 ml 2% skrobi rozpuszczalnej (amylozy), przygotowanej na buforze octanowym o pH 4,3, dodawano 1 ml wyciągu enzymatycznego i następnie inkubowano przez 30 minut w temperaturze 25°C. Po inkubacji reakcję przerywano 1 ml N NaOH i dodawano 10 ml 0,07 N roztworu jodu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiano na 20 min w ciemności, po czym dodawano 2,5 ml 1 N H₂SO₄ i miareczkowano 0,04 N roztworem tiosiarczanu sodowego do momentu odbarwienia. Próbę kontrolną wykonano analogicznie, alkalizując ją jednak NaOH przed wprowadzeniem enzymu. Aktywność enzymu wyrażono w μ molach uwolnionej maltozy.

Ponieważ różnice pomiędzy badanymi odmianami zbóż okazały się bardzo małe, to w dalszej części pracy przytoczono wyniki, dotyczące tylko jednej odmiany z każdego gatunku, a mianowicie: żyto ozime - Dańkowskie Złote, jęczmień jary - Piast oraz pszenica ozima - Grana.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki, otrzymane w niniejszej pracy, tylko częściowo potwierdzają tezę o ścisłej zależności pomiędzy przebiegiem kiełkowania a dynamiką α -amylazy.

Jak widać z wykresów przedstawionych na rysunku 1, aktywność tego enzymu w bielmach ziarna w dojrzałości pełnej i woskowej rów-



Rys. 1. Aktywność α -amylazy w bielmach kiełkującego ziarna zbóż o różnej dojrzałości: o - mleczna, Δ - woskowa, \square - pełna

nomiennie i szybko zwiększała się już po 24 godz. pęcznienia, jednak tempo zwiększenia u różnych gatunków i w różnej dojrzałości było niejednakowe. W ziarnie jęczmienia i pszenicy najbardziej intensywny wzrost aktywności α -amylazy stwierdzono dla dojrzałości pełnej. Po 4 dniach kiełkowania poziom badanego enzymu w ziarnie całkowicie dojrzałym był dwukrotnie wyższy w porównaniu z dojrzałością woskową, chociaż procent ziaren kiełkujących był w tym czasie bardzo zbliżony (por. tab. 1).

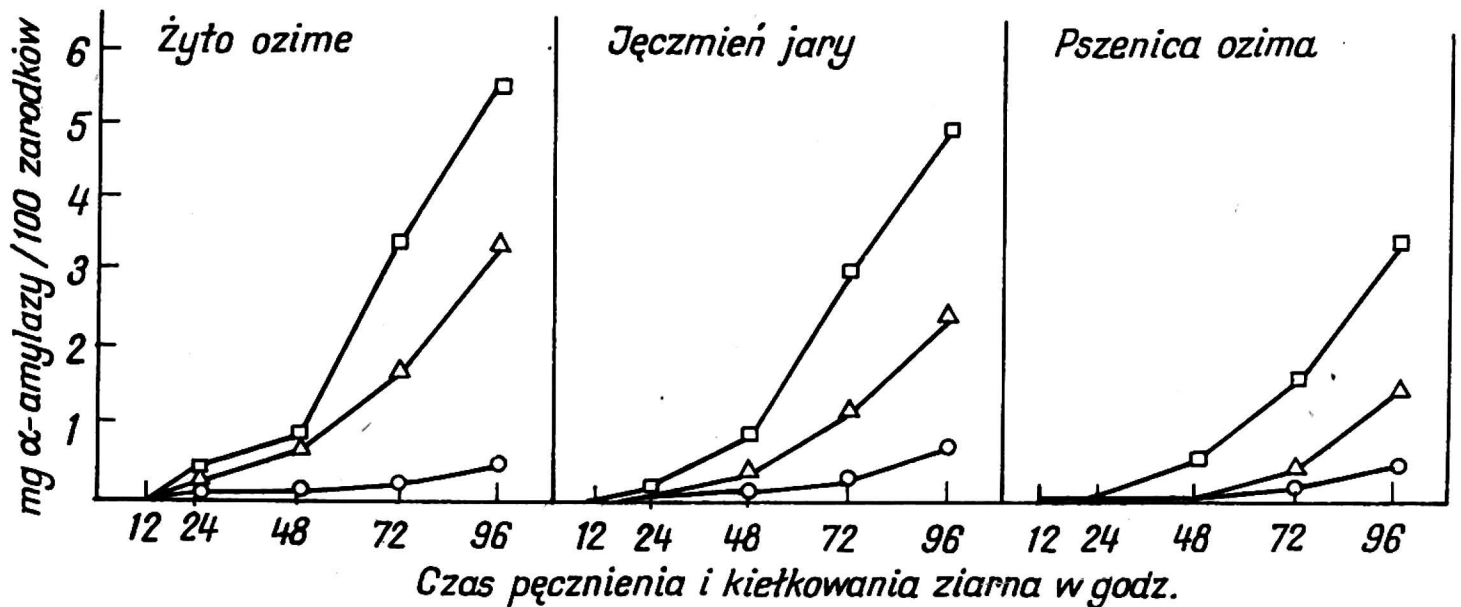
Inaczej przedstawiała się dynamika α -amylazy w życie. Ziarno z dojrzałości pełnej i woskowej niewiele różniło się pod tym względem, przy czym na 4 dzień aktywność α -amylazy w ziarnie dojrzałości woskowej była nawet nieco wyższa od ziarna o dojrzałości pełnej.

Odmienne kształtowanie się aktywności amylolitycznej w życie niż u innych zbóż było już zasygnalizowane przez kilku autorów [7, 12, 13]. Intensywne zwiększenie się poziomu α -amylazy w ziarniakach żyta o dojrzałości woskowej ma niewątpliwie związek z podatnością ziarniaków tego gatunku do porastania nawet na wczesnych etapach dojrzewania.

W odróżnieniu od bielma, w zarodkach ziarna wszystkich gatunków aktywność α -amylazy kształtowała się w sposób zbliżony, z tym że dla pszenicy uzyskane wartości były niższe. Związane to było

prawdopodobnie ze słabszą energią kiełkowania tego gatunku (por. tab. 1).

Poziom α -amylazy w zarodkach, w porównaniu z bielkami, był wielokrotnie niższy (por. skalę rys. 1-2).



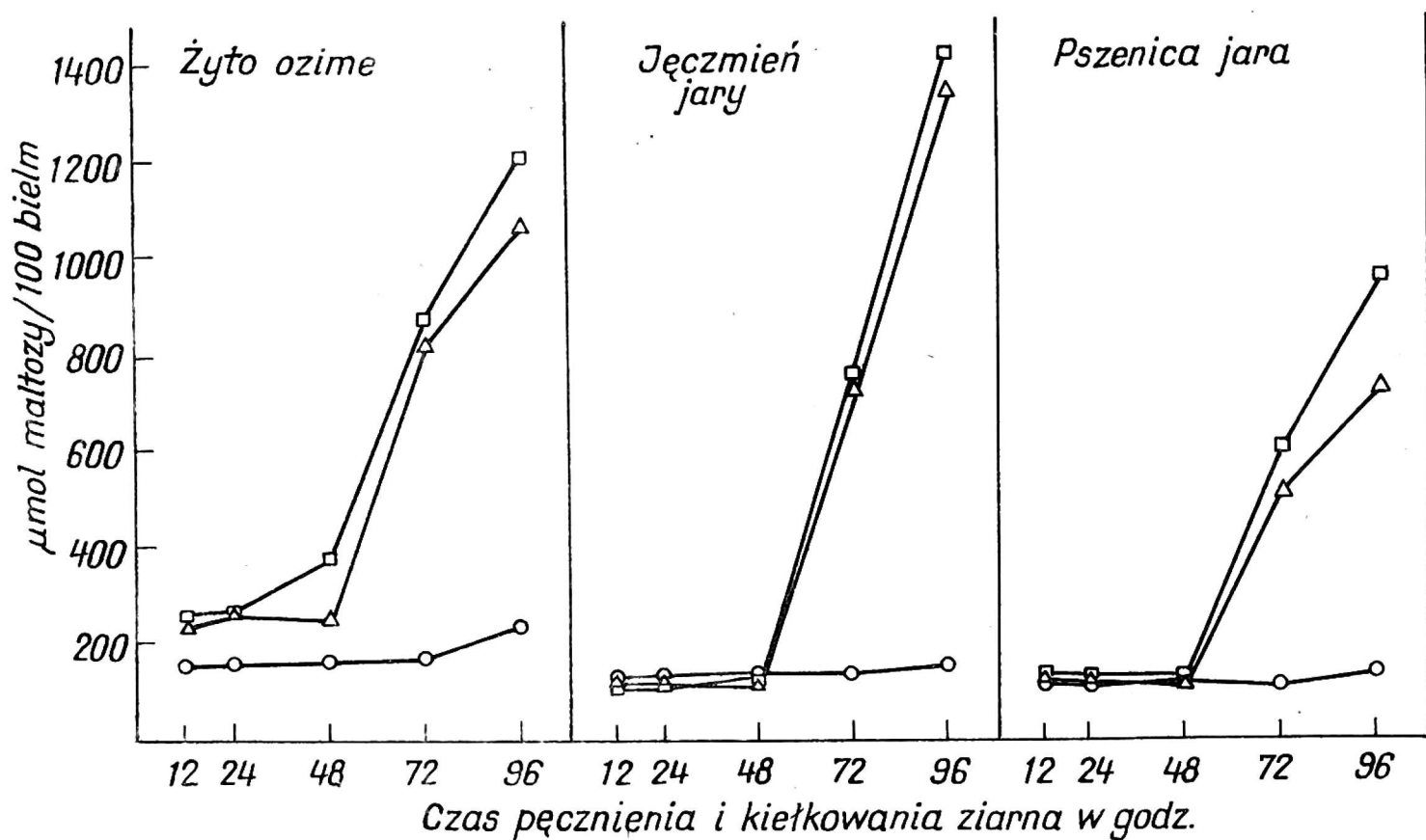
Rys. 2. Aktywność α -amylazy w zarodkach kiełkującego ziarna zbóż o różnej dojrzałości: oznaczenia jak na rys. 1

Koźmina i Woronowa [7] zaznaczają, że w zarodkach w ogóle nie wykrywa się α - i β -amylazy, jednak inni autorzy, którzy badali rozmieszczenie α -amylazy w różnych częściach ziarniaka, przytaczają wartości zbliżone do uzyskanych w toku niniejszej pracy lub nawet wyższe [2, 14].

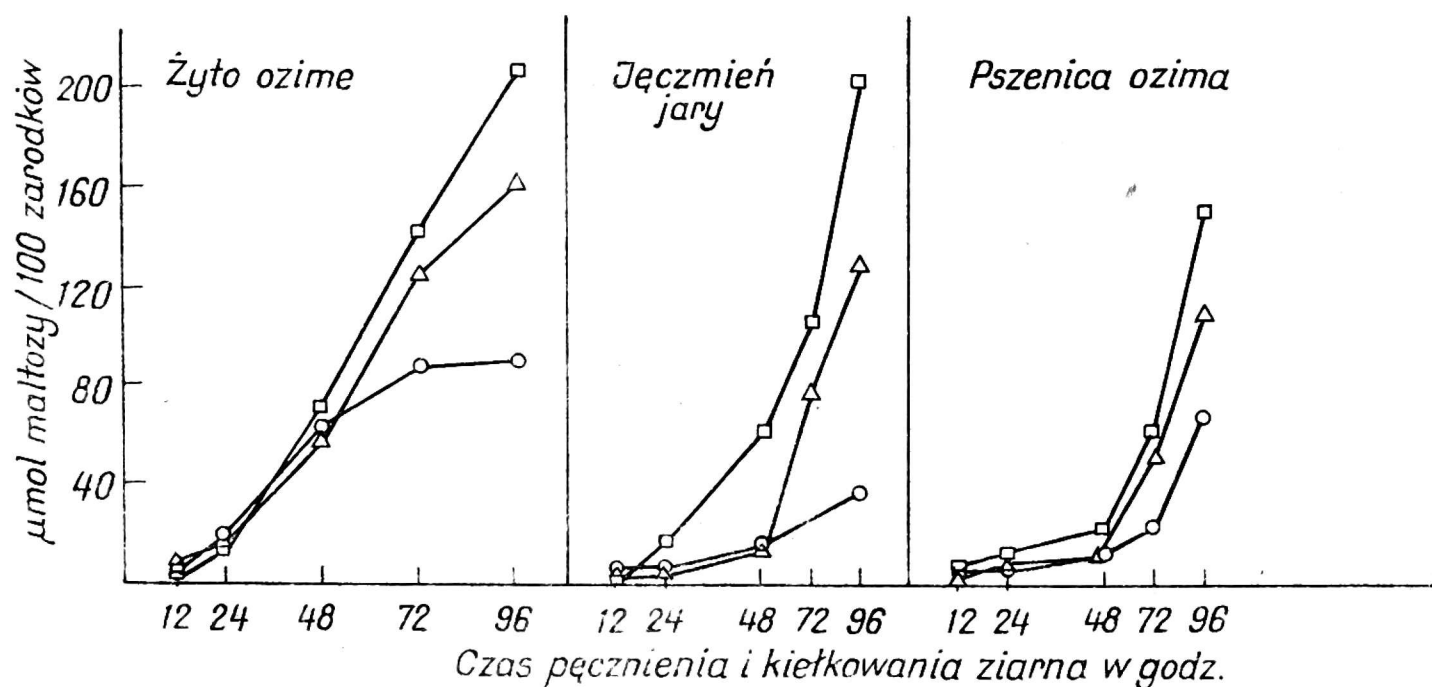
Aktywność β -amylazy w kiełkujących ziarniakach kształtowała się nieco inaczej niż α -amylazy (rys. 3 i 4).

Przez pierwsze dwie doby poziom β -amylazy praktycznie nie zmieniał się. Zgodnie z piśmiennictwem (por. 4) w tym czasie wykrywa się tę frakcję enzymu, która przy dojrzewaniu ziarna pozostaje w stanie wolnym (nie związanej z białkami zapasowymi bielma), natomiast intensywny wzrost aktywności β -amylazy po 48 godz. inkubacji tłumaczy się uwolnieniem jej latentnej formy pod wpływem proteaz.

Dane o dynamice β -amylazy w procesie kiełkowania są dość rozbieżne. Według Rohrlicha [13], aktywność β -amylazy w kiełkującym ziarnie pszenicy i żyta zmienia się nieznacznie, a w owsie nawet całkowicie zanika. Kruger [9] natomiast, posługując się metodą elektroforetyczną, udowodnił pojawianie się nowych frakcji β -amylazy w drodze uwolnienia i modyfikacji form latentnych. Kilkakrotne zwiększenie aktywności β -amylazy przy kiełkowaniu owsa i jęczmienia różnego wieku obserwował również Kulka [10].



Rys. 3. Aktywność β -amylazy w białkach kiełkującego ziarna zbóż o różnej dojrzałości; oznaczenia jak na rys. 1



Rys. 4. Aktywność β -amylazy w zarodkach kiełkującego ziarna zbóż o różnej dojrzałości; oznaczenia jak na rys. 1

Ziarniaki w dojrzałości pełnej i woskowej prawie nie różniły się pod względem aktywności β -amylazy. Nieco mniejsze wartości obserwowano tylko w przypadku pszenicy.

Zastanawiająca była bardzo niska przez cały czas kiełkowania

T a b e l a 1

Kiełkowanie ziarna zbóż z różnej dojrzałości

Gatunek	Dojrzałość	Sucha masa 100 zia- ren w g	Procent skiełkowanych ziaren		
			po 48 godz.	po 72 godz.	po 96 godz.
Zyto ozime	mleczna	1,32	2	17	29
	woskowa	2,83	49	93	100
	pełna	3,55	54	89	100
Jęczmień jary	mleczna	1,54	12	34	45
	woskowa	3,14	65	76	99
	pełna	3,81	72	88	96
Pszenica ozima	mleczna	1,74	6	23	35
	woskowa	3,59	54	67	85
	pełna	4,37	78	86	90

aktywność obu badanych enzymów w ziarnie o dojrzałości mlecznej. Uzyskane w tym przypadku wartości bynajmniej nie korelowały z energią kiełkowania tego ziarna, która średnio sięgała do 35% (tab. 1). Prawdopodobnie niska aktywność amylolityczna ziarna o dojrzałości mlecznej związana była z małą zawartością skrobi w badanym materiale [1].

Stwierdzony w obecnej pracy niski poziom ogólnej α -amylazy w kiełkujących niedojrzałych ziarniakach, w porównaniu z wykazaną przez wielu autorów [5, 8, 10] znaczną jej zawartością w dojrzewającym zielonym ziarnie, sugeruje, że chociaż niektóre frakcje tej pierwotnej α -amylazy pozostają nadal w suchym ziarnie [8, 9], jednak rola ich w procesie kiełkowania jest prawdopodobnie niewielka.

PODSUMOWANIE

Niniejsze badania potwierdziły regularny i intensywny wzrost aktywności α - oraz β -amylazy w ciągu 4 dni pęcznienia i kiełkowania ziarna trzech podstawowych gatunków zbóż: żyta ozimego, psze-

nicy ozimej i jęczmienia jarego. Tempo tego wzrostu różniło się w zależności od gatunku oraz od dojrzałości ziarna. Dla żyta ozimego największą aktywność α -amylazy stwierdzono w ziarnie dojrzałości woskowej, natomiast dla pszenicy i jęczmienia - w dojrzałości pełnej, mimo że energia kiełkowania ziarna z obu dojrzałości była praktycznie jednakowa. Ziarno w dojrzałości mleczonej, kiełkujące średnio w 35%, odznaczało się bardzo niskim poziomem badanych enzymów. Nasuwa to wniosek, że aktywność enzymów amylolytycznych w znacznym stopniu zależy od zawartości skrobi w analizowanym materiale. Zależność podobnego rodzaju, w połączeniu ze stwierdzoną wyżej tylko częściową korelacją pomiędzy kiełkowaniem ziarna pszenicy i jęczmienia w dojrzałości pełnej i woskowej a aktywnością w tym ziarnie α -amylazy, wydaje się świadczyć na korzyść poglądu, że wysoka aktywność amylolytyczna jest tylko jednym z symptomów kiełkowania, które uruchomione zostaje przez cały kompleks czynników natury wewnętrznej i zewnętrznej.

LITERATURA

1. Aistowa L. W., Pleszkow B. P.: Chemiczeskij sostaw i amilaznaja aktivnost' siemian ozimej rzi w processie ich prorostanija i sozriewanija pri raznych usłowijach pitanija. Izwiestija TSHA, 1975, 1: 114-120.
2. Briggs D. S., Clutterbuck V. J.: Generation of α -amylase in germinating *Hordeum distichon*. *Phytochemistry* 1973, 12: 1047-1050.
3. Gaspar T., Wyndaele R., Bouchet M., Ceulemans E.: Peroxidase and α -amylase activities in relation to germination of dormant and non-dormant wheat. *Physiol. Plant.* 1977, 40: 11-14.
4. Grzesiuk S., Kulka K.: Fizjologia i biochemia nasion, PWRiL, Warszawa 1979, (w druku).
5. Hagberg A., Olered R.: Studies on starch properties and alfa-amylase activity in rye. *Hod. Rośl. Aklim.* 1975, 19: 581-592.
6. Jones R. L., Varner J. E.: The bioassay of gibberellins. *Planta* 1967, 72: 155-167.
7. Koźmina N., Woronowa E.: Aktywność α -amylazy jako wskaźnik biologicznego stanu i technologicznych właściwości ziarna pszenicy. *Biul. IHAR* 1973, 5-6: 45-51.
8. Kruger J. E.: Changes in the amylases of hard red spring wheat during growth and maturation. *Cereal Chem.* 1972, 49: 379-390.
9. Kruger J. E.: Changes in the amylases of hard red spring wheat during germination. *Cereal Chem.* 1972, 49: 391-398.
10. Kulka K.: Biochemiczne aspekty starzenia się ziarna owsa i jęczmienia. *Zesz. Nauk. WSR Olsz. ser. A., suppl.* 1971, 6, 3-90.
11. Meredith P., Jenkins L. D.: Amylases of developing wheat, barley and oat grains. *Cereal Chem.* 1973, 50: 243-254.
12. Mierzwińska T.: Aktywność α -amylazy w rozwijającym się ziarnie zbóż. *Biul. IHAR* 1978, (w druku).
13. Rohrllich M.: *Getreideenzyme*. Berlin 1969.

14. Rohrlich M., Hitze W.: Aktivität und Verteilung der Amylase im reifenden Weizen und Roggen. Zeitschrift f. Pflanzenzüchtung, 1969, 61: 141-158.

Станислав Гжесюк, Тереса Межвиньска

АКТИВНОСТЬ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ В ПРОРАСТАЮЩЕМ ЗЕРНЕ
ХЛЕБНЫХ ЭЛАКОВ В РАЗНОЙ СТЕПЕНИ СПЕЛОСТИ

Р е з ю м е

Исследовали активность α - и β -амилазы в зерне разной степени спелости, прорастающем после 6-месячного хранения. Исследования охватывали следующие виды и сорта: озимую рожь сортов Даньковске злотэ и Панцерне, озимую пшеницу сортов Грана и Яна и яровой ячмень сортов Пяст и Космос. В ходе 4-суточного набухания и прорастания уровень исследуемых энзимов быстро и систематически повышался, однако темпы этого повышения были разными, в зависимости от вида и степени спелости зерна. В зерне озимой ржи наивысшая активность α -амилазы была установлена в фазе восковой спелости, а для зерна пшеницы и ячменя - в полной спелости, хотя энергия прорастания зерна в обеих фазах была практически одинаковой. Зерно собранное в молочной спелости, со средней всхожестью 35%, характеризовалось очень низким уровнем исследуемых энзимов. В связи с этим можно заключать, что активность амилолитических энзимов связана только частично с актуальной всхожестью зерна.

Stanisław Grzesiuk, Teresa Mierzwińska

ACTIVITY OF AMYLOLYTIC ENZYMES IN GERMINATING
CEREAL GRAIN OF DIFFERENT RIPENESS

S u m m a r y

The α - and β -amylase activity in grain of different ripeness, germinating after 6 months of storage was investigated. The investigations comprised the following species: winter rye of Dańkowskie Złote and Pancerne varieties, winter wheat of Grana and Jana varieties and summer barley of Piast and Kosmos varieties. The level of the enzymes investigated grew quickly and systematically in the course of 4-day swelling and germination, yet the rate of this growth was different, depending on species and ripeness of

the grain. In winter rye grain the highest α -amylase activity was found at the wax ripeness stage for wheat and barley - at full ripeness, although the grain germination degree at either stage was practically the same. Grain harvested at the milk ripeness stage, germinating on the average in 35%, showed a very low level of the enzymes investigated. Therefore, it can be concluded that the activity of amylolytic enzymes could be related only partly to the different germination ability of grain.