

»Mladi za napredek Maribora 2016«

33. srečanje

**FOSFATAZNA AKTIVNOST V KALEČIH SEMENIH NAVADNEGA
FIŽOLA (*Phaseolus vulgaris*), LAŠKEGA FIŽOLA (*Phaseolus coccineus*)
IN SOJE (*Glycine max* (L.) Merr.)**

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: ŠPELA BUT
Mentor: BERNARDA DEVETAK,
ANDREJA URBANEK KRAJNC
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, februar 2016

»Mladi za napredek Maribora 2016«

33. srečanje

**FOSFATAZNA AKTIVNOST V KALEČIH SEMENIH NAVADNEGA
FIŽOLA (*Phaseolus vulgaris*), LAŠKEGA FIŽOLA (*Phaseolus coccineus*)
IN SOJE (*Glycine max* (L.) Merr.)**

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Maribor, februar 2016

Kazalo vsebine

Kazalo vsebine	3
Kazalo slik.....	4
Kazalo tabel.....	5
Kazalo grafov	6
POVZETEK	7
ZAHVALA.....	8
1. UVOD.....	9
1.1. Raziskovalno vprašanje	12
1.2. Hipoteze	13
1.3. Spremenljivke	14
2. MATERIALI IN METODE DELA	15
2.1. Kemikalije.....	15
2.2. Pripomočki in aparature	15
2.3. Rastlinski materiali in pogoji za kalitev semen	17
2.4. Postopek.....	20
2.4.1. Priprava raztopin	21
2.4.2. Tehtanje semen	22
2.4.3. Ekstrakcija encima	24
2.4.4. Analiza fosfataznih ekstraktov.....	25
3. ZBIRANJE IN OBDELAVA PODATKOV	28
3.1.1. Spektrofotometrična analiza	31
3.1.2. Kolorimetrična analiza.....	32
3.2. Primerjava obeh eksperimentov.....	33
4. REZULTATI IN DISKUSIJA	34
4.1. Eksperiment 1	34

4.1.1. Vpliv inkubacijske temperature na fosfatazno aktivnost	34
4.1.2. Vpliv pH vrednosti na fosfatazno aktivnost.....	35
4.1.3. Vpliv trajanja kalitve na fosfatazno aktivnost	35
4.2. Eksperiment 2: Spektrofotometrična analiza	36
4.2.1. Fosfatazna aktivnost v različnih kultivarjih fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i>), laškega fižola (<i>Phaseolus coccineus</i>) in soje (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>)	36
4.2.2. Vpliv trajanja kalitve na fosfatazno aktivnost	36
4.3. Eksperiment 2: Kolorimetrična analiza	37
4.3.1. Fosfatazna aktivnost v različnih kultivarjih fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i>), laškega fižola (<i>Phaseolus coccineus</i>) in soje (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>)	37
4.3.2. Vpliv trajanja kalitve na fosfatazno aktivnost	37
4.4. Primerjava spektrofotometra in kolorimetra	37
4.5. Primerjava obeh eksperimentov	38
5. DRUŽBENA ODGOVORNOST	38
6. ZAKLJUČEK	39
7. VIRI IN LITERATURA	40
8. PRILOGE.....	42
Priloga 1: Kalibracija spektrofotometra Varian Cary® 50 Bio UV-Visible.....	42
Priloga 2: Kalibracija kolorimetra Vernier	43

Kazalo slik

Slika 1: Seme fižola (Vir slike: http://pefprints.pef.uni-lj.si/2059/1/Kalitev_12-15.pdf).....	9
Slika 2: Hidroliza fosfatnih estrov (Vir slike: http://worthington-biochem.com/AP/images/reaction.jpg)	10
Slika 3: Fitična kislina (Vir slike: http://mudrepredaje.com/?page_id=493).....	11
Slika 4: Fosfataza v rdečem fižolu (Vir slike: http://www.actabp.pl/pdf/4_2003/1245.pdf)...	11

Slika 5: 'Laški' v vermikulitu (lastni vir).....	18
Slika 6: 'Češnjevec' v vermikulitu (lastni vir)	18
Slika 7: 'Jeruzalemski' v vermikulitu (lastni vir).....	18
Slika 8: 'Ptujski maslenec' v vermikulitu (lastni vir).....	18
Slika 9: Fižol 'Laški' (lastni vir)	19
Slika 10: Kultivar 'Češnjevec' (lastni vir).....	19
Slika 11: Kultivar 'Jeruzalemski'(lastni vir)	19
Slika 12: Kultivar 'Ptujski maslenec' (lastni vir)	19
Slika 13: Soja (lastni vir).....	20
Slika 14: Primerjava semen vseh kultivarjev, ki so bili uporabljeni v raziskavi (lastni vir)....	20
Slika 15: Kaleča semena fižola 'Laški' (po spiranju z vodo in preden so bile odstranjene semenske lupine) (lastni vir)	23
Slika 16: Kaleča semena fižola 'Laški' po odstranitvi semenske lupine (lastni vir).....	23
Slika 17: Kaleča semena kultivarja 'Češnjevec' po odstranitvi semenske lupine (lastni vir)...	23
Slika 18: Kultivarji, ki so bili uporabljeni v drugem eksperimentu in so kalili 5 dni (lastni vir)	26
Slika 19: Encimski ekstrakti kultivarjev iz drugega eksperimenta (lastni vir)	27
Slika 20: Mešanice pufra, fenoltalein fosfata in encimskega ekstrakta kultivarjev drugega eksperimenta pred inkubacijo (lastni vir).....	27
Slika 21: Sprememba barve mešanic v epruveh iz drugega eksperimenta; po inkubaciji in dodatku Na ₂ CO ₃ (lastni vir)	28

Kazalo tabel

Tabela 1: Čas, datum in povprečne vrednosti temperature kaljenja pri katerih so uspevali kultivarji obeh eksperimentov	17
Tabela 2: Prikaz raziskovanja v obeh eksperimentih	21
Tabela 3: Količine natrijevega fosfata in citronske kisline, ki jih moramo zmešati, da dobimo pufre s pH vrednostmi pH 4, pH 5 in pH 6 (vir tabele: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html) ...	21
Tabela 4: Masa in število semen vsakega kultivarja po petih in treh dneh kalitve (prvi eksperiment)	22

Tabela 5: Dejanske pH vrednosti pufrov in pH vrednosti mešanice pufra, fenolftalein fosfata in encimskega ekstrakta semen fižola 'Laški'	24
Tabela 6: Dejanske pH vrednosti pufrov in pH vrednosti mešanice pufra, fenolftalein fosfata in encimskega ekstrakta semen kultivarja 'Češnjevec'	24
Tabela 7: Masa in število semen vsakega kultivarja, po petih in treh dneh kalitve (drugi eksperiment)	26
Tabela 8: Legenda o signifikantnosti razlik	28
Tabela 9: Srednje vrednosti absorbance, standardna deviacija in signifikantnost razlik za fižol 'Laški'	29
Tabela 10: Srednje vrednosti absorbance, standardna deviacija in signifikantnost razlik za kultivar 'Češnjevec'	30
Tabela 11: Povprečne vrednosti absorbance štirih kultivarjev navadnega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i>) in enega kultivarja soje (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>) po petih dneh kalitve.....	31
Tabela 12: Povprečne vrednosti absorbance štirih kultivarjev navadnega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i>) in enega kultivarja soje (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>) po treh dneh kalitve	31
Tabela 13: Povprečne vrednosti absorbance vseh preučevanih kultivarjev po petih in treh dneh kalitve	31
Tabela 14: Vse vrednosti absorbance in povprečne vrednosti absorbance obeh ponovitev vseh preučevanih kultivarjev drugega eksperimenta (absorbanca izmerjena s kolorimetrom).....	32
Tabela 15: Povprečne vrednosti absorbance kultivarjev 'Laški' in 'Češnjevec' v obeh eksperimentih	33

Kazalo grafov

Graf 1: Povprečne vrednosti absorbance ekstraktov dveh kultivarjev, ki sta bila preučevana v prvem eksperimentu in razmerje med preučevanima kultivarjema, trajanjem kalitve, pH-jem pufra ter inkubacijsko temperaturo	30
Graf 2: Povprečna vrednost absorbance vseh preučevanih kultivarjev po petih in treh dneh kalitve (absorbanca izmerjena s spektrofotometrom)	32
Graf 3: Vrednosti absorbance vseh preučevanih kultivarjev po petih in treh dneh kalitve (absorbanca izmerjena s kolorimetrom).....	33

POVZETEK

Raziskovala sem aktivnost encima fosfataze v kalečih semenih kultivarjev navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*), laškega fižola (*Phaseolus coccineus*) in soje (*Glycine max (L.) Merr.*). Ugotavljala sem ali se količina fosfataz v kalečih semenih povečuje in kako na encimsko aktivnost vplivata pH ter temperatura. Semena sem kalila tri in pet dni, ekstrakte pa pripravila v fosfatnem pufri. Naredila sem dva eksperimenta. Pričakovala sem, da bodo fosfataze najbolj aktivne v ekstraktih semen, ki so kalila pet dni, pri pH 5 in temperaturi 55 °C. Metodo sem povzela po Meatyardu (1999) in jo nekoliko modificirala. Aktivnost encima sem določala z merjenjem absorbance s spektrofotometrom (495 – 575 nm) in kolorimetrom (565 nm). Fosfatazna aktivnost kalečih semen je bila najvišja po treh dneh kalitve, pri pH 5 in temperaturi 35 °C. Glede na rezultate zaključujem, da so optimalni pogoji za fosfatazno aktivnost verjetno specifični za vsak kultivar; na aktivnost pa vpliva tudi temperatura kalitve.

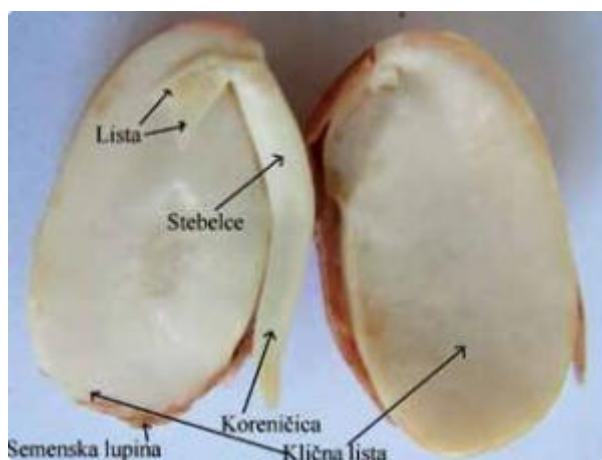
ZAHVALA

Za pomoč, nasvete in dodatne predloge pri izvajanju eksperimentov ter pisanju naloge se iskreno zahvaljujem svojima mentoricama, ki sta mi bili ves čas na voljo. Zahvaljujem se jima tudi za pomoč pri iskanju literature.

Zahvalila bi se rada tudi vsem delavcem fakultete, ki so mi priskočili na pomoč pri laboratorijskem delu, pa tudi sami ustanovi, da mi je omogočila uporabo svojih pripomočkov in aparatur.

1. UVOD

V raziskovalni nalogi sem preučevala semena navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*), laškega fižola (*Phaseolus coccineus*) in soje (*Glycine max (L.) Merr.*). Fižol in soja spadata sta dvokaličnici, njuno seme pa je sestavljeno iz dveh kličnih listov, koreničice, stebelca, dveh pravih listov in semenske lupine. Pri rastlinski embriogenezi se oblikuje embrio, ki je na začetku enoceličen. Po kalitvi se razvije v novo rastlino. Razvoj zarodka v semenu poteka v petih stopnjah, ki sledijo zlitju haploidnega jajčeca in spermalne celice. Prva faza (1), ki se imenuje zigotna faza temelji na delitvi in diferenciaciji celic zigote, kjer se oblikujeta apikalni in bazalni del celic. V (2) se razvije osemcelični embrio in protoderm (površinska plast), v (3) pa se začnejo hitre celične delitve na obeh straneh kasnejšega vršička poganjka, kar povzroči izrastke, ki se razvijejo v klične liste. Potem sledi (4) v kateri se celice podaljšajo, klični listi pa nadalje razvijejo. Zadnja (5) faza embriogeneze se zaključi s koncem celičnih delitev (ko embrio končno dozori) in z izsušitvijo semena. Izguba vode je precejšnja in znaša 90 % vode, ki jo seme prvotno vsebuje. Embrio postane presnovno neaktiven (Taiz, Zeiger, 2002; Campbell, Reece, 2008).

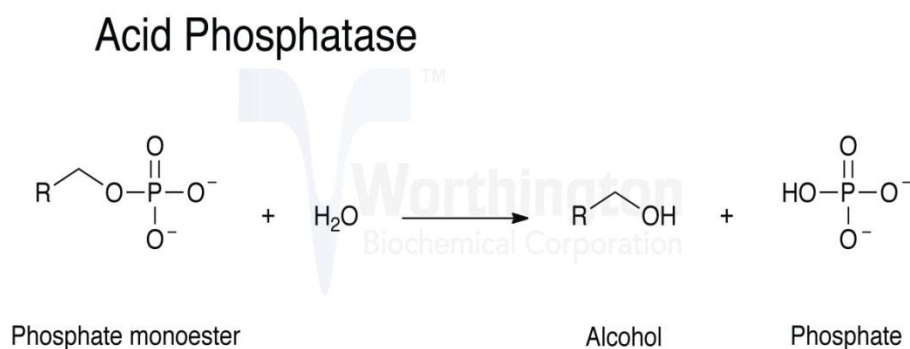


Slika 1: Seme fižola (Vir slike: http://pefprints.pef.uni-lj.si/2059/1/Kalitev_12-15.pdf)

Za kalitev semen so potrebni specifični hormoni, kot je na primer giberelin, ki uravnava rast in razvoj rastline; in encimi, kot je na primer fosfataza. "Encimi so biološki katalizatorji, ki lajšajo pretvorbo substratnih molekul v produkte, vendar sami z reakcijo niso trajno spremenjeni." (Hopkins, Norman, 2009, str. 146). Sodelujejo pri številnih biokemičnih reakcijah, z razumevanjem njihovega delovanja pa lahko pojasnimo številne biološke koncepte, kot sta na primer prebava ali homeostaza. Ker je njihova ekstrakcija iz rastlinskih

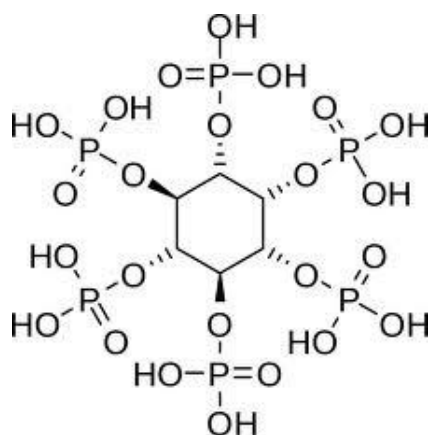
ali živalskih virov dokaj preprosta, so izredno uporabni v raziskovalne namene (Meatyrd, 1999).

Encimi, ki smo jih preučevali v sklopu te raziskave so kisle fosfataze, ki katalizirajo hidrolizo fosfatnih estrov. Najdemo jih lahko v številnih rastlinskih tkivih, npr. v semenih stročnic (soja, rdeči fižol, kitajski fižol, itd.), listih paradižnika, ekstraktih cvetnega prahu in koreninah žit. Ena izmed glavnih nalog fosfataz je sproščanje anorganskega fosfata. So ključnega pomena za normalno delovanje rastlin, saj je razvoj rastline odvisen od razpoložljivosti fosfatov (ti so sestavni del nukleinskih kislin, lipidov in beljakovin), fosfate pa sprošča encim fosfataza. Kisle fosfataze so še posebej pomembne v procesu kalitve semen in rasti rastline. Ker se med kalitvijo oziroma kakršnokoli hitro celično delitvijo ali rastjo potreba po fosfatu poveča, se takrat poveča tudi fosfatazna aktivnost (Nicanuzia dos Prazeres, Ferreira, Aoyama, 2004).



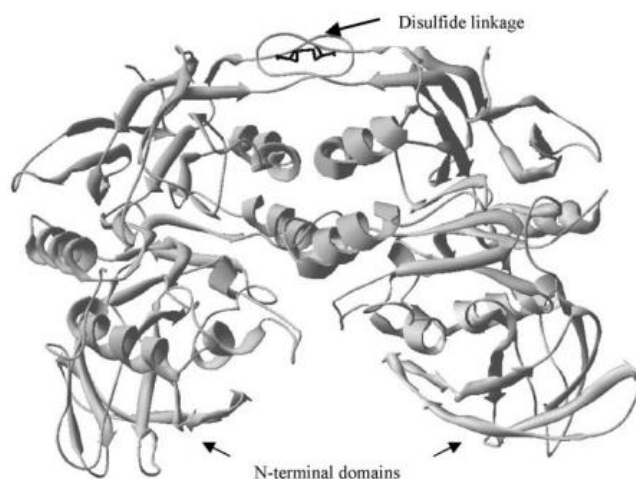
Slika 2: Hidroliza fosfatnih estrov (Vir slike: <http://worthington-biochem.com/AP/images/reaction.jpg>)

Med razvojem semen sta »približno dve tretjini vsega razpoložljivega fosforja v obliki fitata oziroma fitične kisline.« (Nicanuzia dos Prazeres, Ferreira, Aoyama, 2004, str. 17). Zaradi njegove strukture, fitat ima namreč šest fosfatnih skupin (Slika 3), za rastlino predstavlja glavni vir fosforja. Fitaza je encim (tip fosfataze), ki katalizira hidrolizo fitične kisline. (Nicanuzia dos Prazeres, Ferreira, Aoyama, 2004).



Slika 3: Fitična kislina (Vir slike: http://mudrepredaje.com/?page_id=493)

Slika 4 prikazuje 3D obliko encima kisle fosfataze v rdečem fižolu. Encim ima 432 aminokislin, vidimo lahko N-konec in disulfidne vezi. Poleg tega »C-konec vsebuje α vijačnice in β plošče ter zanke.» (Olczak, Morawiecka B., Watorek W., 2003, str. 1247).



Slika 4: Fosfataza v rdečem fižolu (Vir slike: http://www.actabp.pl/pdf/4_2003/1245.pdf)

Pred začetkom laboratorijskega dela sem prebrala kar nekaj člankov na temo kisljih fosfataz (Meatyard, 1999; Asaduzzaman s sod., 2011; Nicanuzia s sod., 2004; Olczak s sod., 2003) in se odločila, da bo moja raziskava temeljila na metodi Barryja Meatyarda (Univerza v Warvicku). Preučeval je vpliv različnih inkubacijskih temperatur in pH vrednosti na fosfatazno aktivnost v mungo fižolu (*Phaseolus aureus*). Aktivnost fosfataz je določil s kolorimetrično analizo; z merjenjem absorbance. Da lahko vzorčkom, ekstraktom izmerimo vrednosti absorbance, morajo biti slednji obarvani. Meatyard je kot substrat uporabil fenolftalein fosfat. Fosfataze razgradijo fenolftalein fosfat, barvilo se sprosti, intenziteto barve

pa merimo. Po pripravi ekstraktov je slednje inkubiral, po inkubaciji pa dodal raztopino natrijevega karbonata. Meatyard je v sklopu svojega raziskovanja določil optimalne pogoje v katerih so fosfatarni encimi v mungo fižolu najbolj aktivni. Kot optimalni je navedel pripravo ekstraktov s pufrom v vrednosti pH 5 (pufer pripravljen z mešanjem citronske kisline in natrijevega hidrogen fosfata) in inkubacijsko temperaturo 55 °C (Meatyard, 1999). Njegove ugotovitve se ujemajo z ugotovitvami Asaduzzaman s sod.; slednji so preučevali fosfataze v *Vigna mungo L.* in kot optimalni zabeležili pH 5 ter inkubacijo pri 55 °C (Asaduzzaman, Rahman, Yeasmin, 2011).

Meatyardovo metodo sem prilagodila svoji raziskavi in jo nekoliko modificirala. V sklopu te raziskave sta bila narejena dva eksperimenta. V prvem smo analizirani vpliv pH-ja (pH 4, 5, 6) in vpliv temperature (35 °C, 55 °C) na fosfatarno aktivnost kalečih semen kultivarja navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*); 'Češnjevec' in kalečih semen laškega fižola (*Phaseolus coccineus*), ki sta oba kalila pet in tri dni. V prvem eksperimentu smo določili optimalne pogoje v katerih so bile fosfataze v kalečih semenih najbolj aktivne (pufer v vrednosti pH 5 in inkubacija pri 35 °C); drugi eksperiment pa smo pod temi optimalnimi pogoji izpeljali. V slednjem smo želeli ugotoviti, če se fosfatarna aktivnost med kalečimi semeni treh kultivarjev navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*); 'Češnjevec', 'Jeruzalemski', 'Ptujski maslenec'; laškega fižola (*Phaseolus coccineus*) in soje (*Glycine max (L.) Merr.*) razlikuje ter kako na tovrstno encimsko aktivnost vpliva trajanje kalitve (tri ali pet dni). Absorbanco ekstraktov semen smo merili s kolorimetrom (565 nm) in spektrofotometrom (495 – 575 nm).

1.1. Raziskovalno vprašanje

V prvem eksperimentu so bili določeni optimalni pogoji v katerih je bila aktivnost fosfataz najvišja. Raziskovalno vprašanje se je glasilo:

- Kako različni pufri (pH 4, pH 5, pH 6), različne inkubacijske temperature (35 °C, 55 °C) in različno trajanje (pet in tri dni) kalitve semen kultivarja navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*); 'Češnjevec' in laškega fižola (*Phaseolus coccineus*) vplivajo na aktivnost fosfatarnega encima v teh kalečih semenih?

Zgornje raziskovalno vprašanje ni bilo glavno raziskovalno vprašanje moje raziskave, vendar je vseeno pomembno, saj je služilo kot vodilo pri izpeljavi prvega eksperimenta.

Rezultati prvega eksperimenta so bili v pomoč pri pripravi drugega, glavnega eksperimenta, saj smo encimske ekstrakte slednjega obravnavali pod optimalnimi pogoji (ki pa so bili določeni v prvem eksperimentu).

Glavno raziskovalno vprašanje moje naloge je bilo:

- Kako različno trajanje (pet in tri dni) kalitve semen treh kultivarjev navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*); 'Češnjevec', 'Jeruzalemski', 'Ptujski maslenec'; laškega fižola (*Phaseolus coccineus*) in enega kultivarja soje (*Glycine max (L.) Merr.*) vpliva na aktivnost fosfataznega encima v teh kalečih semenih?

1.2. Hipoteze

(0) Ničelna hipoteza: Niti pH pufra, niti inkubacijska temperatura in niti čas kaljenja ne bodo vplivali na aktivnost fosfataznega encima v kalečih semenih preučevanih kultivarjev fižolov in soje. Povrh tega se aktivnost encima fosfataze med posameznimi kultivarji ne bo signifikantno razlikovala.

(1) Temperaturni optimum inkubacije pri katerem bo aktivnost fosfataz najvišja bo pri 55 °C.

Aktivnost preiskovanega encima bo najvišja v ekstraktih kalečih semen, ki bodo inkubirana pri 55 °C, saj takšno vrednost kot optimalno navajajo številni drugi viri, med njimi Meatyrd (1999) in Asaduzzaman s sod. (2011).

(2) pH optimum pri katerem bo aktivnost fosfataz najvišja bo pri pH 5.

Richardson s sod. (1999); Meatyrd (1999) in Asaduzzaman s sod. (2011) navajajo, da je preiskovani encim najbolj aktiven v pufri z vrednostjo pH 5. Zaradi tega sklepam, da bodo ugotovitve moje raziskave enake.

(3) Aktivnost fosfataz bo najvišja v ekstraktih semen, ki so kalila daljši čas, torej pet dni.

Tudi ta hipoteza je podprta z literaturnimi podatki, med drugim z ugotovitvami Gibbins s sod. (1963); Asaduzzaman s sod. (2011) in Nicanuzia dos Prazeres s sod. (2004), ki navajajo, da je fosfatazni encim najbolj aktiven v semenih, ki kalijo pet ali celo šest do devet dni.

(4) Med posameznimi kultivarji se aktivnost fosfataz ne bo signifikantno razlikovala.

Preučevani kultivarji navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*) in laški fižol (*Phaseolus coccineus*) spadajo v isti rod, zato menim, da se fosfatazna aktivnost v ekstraktih njihovih semen ne more signifikantno razlikovati. Soja je fižolu podobna po strukturi, kemijskih in bioloških lastnostih, zato tudi razlika med fosfatazno aktivnostjo sojinega in fižolovih ekstraktov ne bo signifikantna.

1.3. Spremenljivke

Ker sta imela eksperimenta različni raziskovalni vprašanji, se razlikujeta tudi v odvisni, neodvisni in nadzorovani spremenljivkah. Vseeno pa imata enaki nenadzorovani in moteči spremenljivki.

PRVI EKSPERIMENT

- Neodvisne: pH (4, 5, 6), inkubacijska temperatura (35 °C, 55 °C), različno trajanje (pet in tri dni) kalitve semen kultivarja navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*); 'Češnjevec' in laškega fižola (*Phaseolus coccineus*).
- Odvisna: aktivnost fosfataznega encima v ekstraktih fižolovih semen (aktivnost določena z merjenjem absorbance).
- Nadzorovani: preprečevanje razgradnje fosfataze, čas inkubacije.

Razgradnjo fosfataz smo preprečevali tako, da smo encimske pripravke pred mešanjem z enim izmed treh pufrov in fenolftalein fosfatom ter inkubacijo hranili na ledu. Čas inkubacije smo ročno nastavili na sami napravi.

DRUGI EKSPERIMENT

- Neodvisne: različno trajanje kalitve semen (pet in tri dni) treh kultivarjev navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*): 'Češnjevec', 'Jeruzalemski', 'Ptujski maslenec'; laškega fižola (*Phaseolus coccineus*) in enega kultivarja soje (*Glycine max (L.) Merr.*).
- Odvisna: aktivnost fosfataznega encima v ekstraktih fižolovih in sojinih semen (aktivnost določena z merjenjem absorbance).
- Nadzorovane: optimalna pH (pH 5), optimalna temperatura inkubacije (35 °C), čas inkubacije, preprečevanje razgradnje fosfataze.

Vse epruvete smo napolnili z enako količino istega pufra – 5 mL pufra v vrednosti pH 5. Temperaturo in čas inkubacije smo ročno nastavili na inkubatorju, temperaturo na 35 °C in čas na 25 min. Preprečevanje razgradnje fosfataze smo nadzorovali na enak način kot pri prvem eksperimentu.

- Nenadzorovani: sobna temperatura, sobni tlak.
- Moteči: genotip semen, temperatura kalitve.

Sobne temperature in sobnega tlaka nismo mogli učinkovito nadzorovati, smo jih pa zato ves čas spremljali. Med laboratorijskim delom nismo odpirali oken ali vrat in tako ohranjali sobno temperaturo pri 25 °C in tlak pri 100 kPa, zato nista mogla vplivati na rezultate.

2. MATERIALI IN METODE DE LA

2.1. Kemikalije

- 0.1 M citronska kislina,
- 0.2 M natrijev hidrogenkarbonat (Na_2HPO_4),
- 10 % (¹w/v) natrijev karbonat (Na_2CO_3) in
- 1 % (w/v) Fenolftalein fosfat (PPP).

Vse kemikalije smo kupili pri podjetju Sigma-Aldrich.

2.2. Pripomočki in aparature

Rastlinski materiali:

- Navadni fižol (*Phaseolus vulgaris*): 'Češnjevce', 'Jeruzalemski', 'Ptujski maslenec' od Semenarna Ljubljana, Slovenija,
- 'Laški' fižol (*Phaseolus coccineus*) od Semenarna Ljubljana, Slovenija,
- Soja (*Glycine max (L.) Merr.*) od Picount d.o.o. Šenčur,

¹ Okrajšava »w/v« pomeni masno-volumski delež in nosi podatek o koncentraciji raztopine. Merska enota je običajno g/100 mL (%).

- Vermikulit, Vermit Group CKŽ137-8270, Krško.

Aparature:

- Tehtnica Kern ALJ 220 – 4 NM (+/- 0.01 g),
- Metrohm Swiss-made 827 pH lab pH meter,
- Elektronske pipete Eppendorf Xplorer® (1 mL in 5 mL),
- epT.I.P.S.® tipsi za pipete (1 mL +/- 0.006 mL in 5 mL +/- 0.03 mL),
- Monomešalec Thermo Scientific™ MaxiMix™ II,
- Ultrazvočna kopel Sonis 3 GT,
- Palični mešalnik,
- Računalnik,
- Varian Cary® 50 Bio UV-Visible Spektrofotometer (495 – 575 nm),
- Program za spektrofotometrično analizo Varian Cary WinUV,
- Vernier Kolorimeter (565 nm),
- Vmesnik Vernier LabQuest Mini in
- Logger Pro Program Verzija 3.8.1.

Laboratorijski pribor:

- 4 čaše (250 mL +/- 10 mL),
- 14 Erlenmajeric (250 mL +/- 10 mL),
- 47 epruвет, (24(+3) + 20)²,
- 2 stojali za epruветe,

² Skupno smo uporabili 47 epruвет: 27 epruвет je bilo uporabljenih v prvem eksperimentu, 24 je vsebovalo encimski ekstrakt, 3 pa so namesto ekstrakta vsebovale destilirno vodo (kontrola). V drugem eksperimentu smo potrebovali 20 epruвет.

- Kapalke,
- 14 merilnih valjev (50 mL +/- 0.5 mL),
- 14 petrijevk,
- Tolkač,
- Možnar,
- 9 Lijakov,
- Filtrirni papir,
- Žlica,
- Inkubator Lauda aqualine al 15,
- Termometer (+/- 0.5 °C) in
- Magnetično mešalo An ICA C-MAG HS 7.

2.3. Rastlinski materiali in pogoji za kalitev semen

Vse preučevane kultivarje smo posadili na domačem vrtu; kultivarje prvega eksperimenta avgusta in kultivarje drugega eksperimenta septembra. Takrat se je temperatura v mojem domačem kraju tedensko močno spreminjala, zato se temperature kalitve med obema eksperimentoma kar precej razlikujejo.

Tabela 1: Čas, datum in povprečne vrednosti temperature kaljenja pri katerih so uspevali kultivarji obeh eksperimentov

Eksperiment	Trajanje kalitve (dni)	Datum kaljenja	Povprečna vrednost temperature, pri kateri so kultivarji kalili (+/- 0.5 °C)
1	5	26.8. – 30.8.2015	30
	3	28.8. – 30.8.2015	30
2	5	2.9. – 6.9.2015	15
	3	4.9. – 6.9.2015	15

Semena preučevanih kultivarjev so kalila v vermikulitu, ki uravnava in izboljšuje vlažnost ter zračnost zemlje. Povečuje tudi kaljivost semen in rast koreninic, zato je idealen za kaljenje rastlin.

Vsi kultivarji, ki so kalili v enakem časovnem obdobju v prvem ali drugem eksperimentu, so kalili pri enaki temperaturi, pH, vlagi in svetlobi.



Slika 5: 'Laški' v vermikulitu (lastni vir)



Slika 6: 'Češnjevci' v vermikulitu (lastni vir)



Slika 7: 'Jeruzalemski' v vermikulitu (lastni vir)



Slika 8: 'Ptujski maslenec' v vermikulitu (lastni vir)



Slika 9: Fižol 'Laški' (lastni vir)



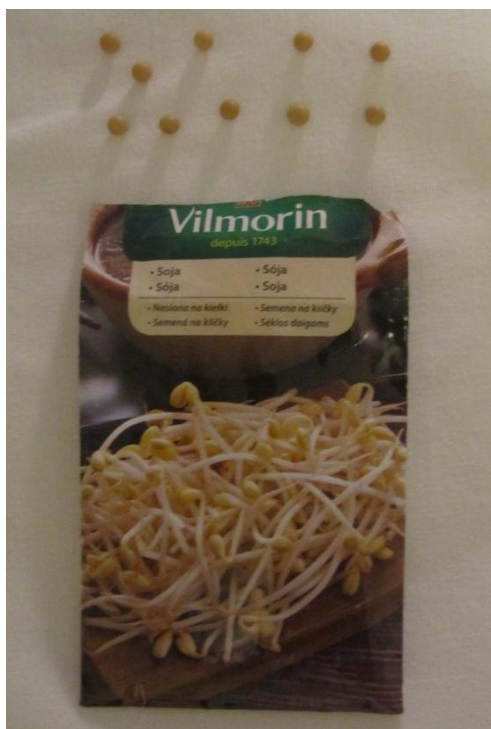
Slika 10: Kultivar 'Češnjavec' (lastni vir)



Slika 12: Kultivar 'Ptujski maslenc' (lastni vir)



Slika 11: Kultivar 'Jeruzalemski' (lastni vir)



Slika 13: Soja (lastni vir)



Slika 14: Primerjava semen vseh kultivarjev, ki so bili uporabljeni v raziskavi (lastni vir)

2.4. Postopek

Naredila sem dva eksperimenta; prvega sem ponovila dvakrat (enkrat sem inkubirala pri 35 °C in drugič pri 55 °C); za vsak kultivar drugega eksperimenta pa sem pripravila eno ponovitev.

Tabela 2: Prikaz raziskovanja v obeh eksperimentih

Eksperiment 1	
Vpliv temperature inkubiranja	35°C, 55°C
Vpliv pH	pH 4, 5, 6
Vpliv termina kalitve	3 in 5 dni kalitve
Eksperiment 2	
Vrstna in sortna specifičnost	<ul style="list-style-type: none"> • Navadni fižol (<i>Phaseolus vulgaris</i>): 'Češnjevec', 'Jeruzalemski', 'Ptujski maslenec'. • 'Laški' fižol (<i>Phaseolus coccineus</i>). • Soja (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>).
Vpliv termina kalitve	3 in 5 dni kalitve

2.4.1. Priprava raztopin

a) Pufer citronske kisline in natrijevega fosfata

Najprej smo glede na spodnjo tabelo (Tabela 3) pripravili pufre v vrednostih pH 4, pH 5 in pH 6.

Tabela 3: Količine natrijevega fosfata in citronske kisline, ki jih moramo zmešati, da dobimo pufre s pH vrednostmi pH 4, pH 5 in pH 6 (vir tabele: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>)

pH	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (mL)	0.1 M Citronska kislina (mL)
4	38,55	61,45
5	51,50	48,50
6	63,15	36,85

Potem smo pH pufrov izmerili še s pH metrom. Če je pH vrednost kakorkoli odstopala, smo dodajali citronsko kislino ali natrijev fosfat do želene vrednosti (torej do pH 4, 5 ali 6).

b) Raztopina natrijevega karbonata

10 % (w/v) raztopino Na₂CO₃ smo pripravili z 10 g soli natrijevega karbonata in 100 mL destilirne vode. Potem smo jo postavili tudi v ultrazvočno kopel, da so se njene vsebnosti pri stalni temperaturi dodobra premešale.

c) Fenolftalein fosfat (PPP)

1 % (w/v) raztopina fenolftalein fosfata je bila že standardizirana s strani podjetja Sigma-Aldrich. Hranili smo jo v hladilniku.

PRVI EKSPERIMENT

2.4.2. Tehtanje semen

V prvem eksperimentu smo preučevali semena kultivarja navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*); 'Češnjevec' in semena laškega fižola (*Phaseolus coccineus*). Najprej smo jih pobrali iz vermikulita v katerem so kalila tri ali pet dni in jih sprali pod vodo iz pipe. Potem smo odstranili semenske lupine, semena dali na petrijevko, jih prešteli in tehtali. Podatki o masah in številu semen so zbrani v spodnji tabeli (Tabela 4).

Tabela 4: Masa in število semen vsakega kultivarja po petih in treh dneh kalitve (prvi eksperiment)

Trajanje kalitve (dni)	Kultivar	Masa (+/- 0,01 g)	Število semen
3	'Laški'	50,42	18
5	'Laški'	49,50	15
3	'Češnjevec'	50,08	46
5	'Češnjevec'	50,20	44



Slika 15: Kaleča semena fižola 'Laški' (po spiranju z vodo in preden so bile odstranjene semenske lupine) (lastni vir)



Slika 16: Kaleča semena fižola 'Laški' po odstranitvi semenske lupine (lastni vir)



Slika 17: Kaleča semena kultivarja 'Češnjavec' po odstranitvi semenske lupine (lastni vir)

2.4.3. Ekstrakcija encima

Semena so bila najprej s tolkačem in možnarjem zdrobljena v kašasto zmes, ki je bila razredčena s 50 cm³ destilirne vode. Med drobljenjem kalečih semen enega kultivarja, smo petrijevke z ostalimi semeni hranili na ledu.

Kaše smo potem še dodobra premešali s pomočjo paličnega mešalnika in jih z uporabo lijaka ter filtrirnega papirja prelili v Erlenmajerice.

Z elektronskimi pipetami (5 mL in 1 mL) smo napolnili štiriindvajset epruvel. Proučevali smo dva kultivarja ('Laški' in 'Češnjevec'), oba sta kalila v dveh obdobjih (3 in 5 dni), vsakemu ekstraktu pa smo dodali enega izmed treh pufrov v vrednosti pH 4, pH 5 ali pH 6.

V vsako epruveto smo nalili 5 mL ustreznega pufra, 1 mL fenolftalein fosfata in 1 mL encimskega ekstrakta. Encimski ekstrakt smo dodali kot zadnji in epruvete takoj zatem postavili v inkubator, kar je preprečilo, da bi vsebnosti epruvel predčasno (pred inkubacijo) medsebojno reagirale. Temu smo se želeli izogniti, saj bi lahko vplivalo na rezultate raziskave. Tik pred inkubacijo smo s pH metrom še enkrat izmerili pH vrednost reakcijske raztopine (Tabela 5 in Tabela 6).

Tabela 5: Dejanske pH vrednosti pufrov in pH vrednosti mešanice pufra, fenolftalein fosfata in encimskega ekstrakta semen fižola 'Laški'

'Laški'						
Število dni kalitve	5	3	5	3	5	3
pH pufra	4,00	4,00	5,00	5,00	6,00	6,00
»Končna« pH vrednost epruvel ³	4,30	4,24	5,20	5,20	6,13	6,13

Tabela 6: Dejanske pH vrednosti pufrov in pH vrednosti mešanice pufra, fenolftalein fosfata in encimskega ekstrakta semen kultivarja 'Češnjevec'

'Češnjevec'						
Število dni kalitve	5	3	5	3	5	3
pH pufra	4,00	4,00	5,00	5,00	6,00	6,00
»Končna« pH vrednost epruvel	4,22	4,21	5,16	5,13	6,13	6,13

³ »Končna« vsebnost epruvel se nanaša na mešanico pufra, fenolftalein fosfata in encimskega ekstrakta.

Za kontrolo in umeritev spektrofotometra smo tri dodatne epruvete namesto z encimskim ekstraktom napolnili z destilirno vodo.

Potem smo epruvete za 25 min inkubirali pri 35 °C oz. 55 °C. Po koncu inkubacije smo jih takoj spet postavili na led, dodali 5 mL 10% Na₂CO₃ in premešali na vorteksu. S tem smo ustavili kemijsko reakcijo in preprečili, da bi se barva prostega fenolfaleina spremenila. Epruvete smo postavili na led in izmerili absorbanco.

2.4.4. Analiza fosfataznih ekstraktov

Spektrofotometer smo najprej kalibrirali, nato pa izmerili absorbanco ekstraktov v območju 495 – 575 nm.

Rezultate biokemijske analize smo podali s srednjimi vrednostmi in standardnimi odmiki dveh paralelnih vzorcev v dveh ponovitvah. Ti so bili nato obdelani z enosmerno analizo variance ($P < 0,05$) z uporabo programa SPSS 12 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Razlike med rezultati smo nato testirali z Duncan testom pri 0,05 % signifikantnosti. Pomembne statistične razlike med rezultati smo označili s črkami (a–e), pri čemer smo upoštevali sklepno pravilo, da je v primeru $P < 0,05$ obravnavano kot signifikantno. Torej, če sta dve ali več vrednosti absorbance označeni z istimi črkami, npr. “bc” ali “abc”, razlika ni signifikantna.

DRUGI EKSPERIMENT

Drugi, temeljni eksperiment smo izvedli pod pogoji, ki so bili v prvem eksperimentu določeni za optimalne (pufer s pH 5 in inkubacija pri 35 °C). Analizirali smo tri kultivarje navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*): 'Češnjevce', 'Jeruzalemski', 'Ptujski maslenec'; 'Laški' fižol (*Phaseolus coccineus*) in en kultivar soje (*Glycine max (L.) Merr.*).



Slika 18: Kultivarji, ki so bili uporabljeni v drugem eksperimentu in so kalili 5 dni (lastni vir)

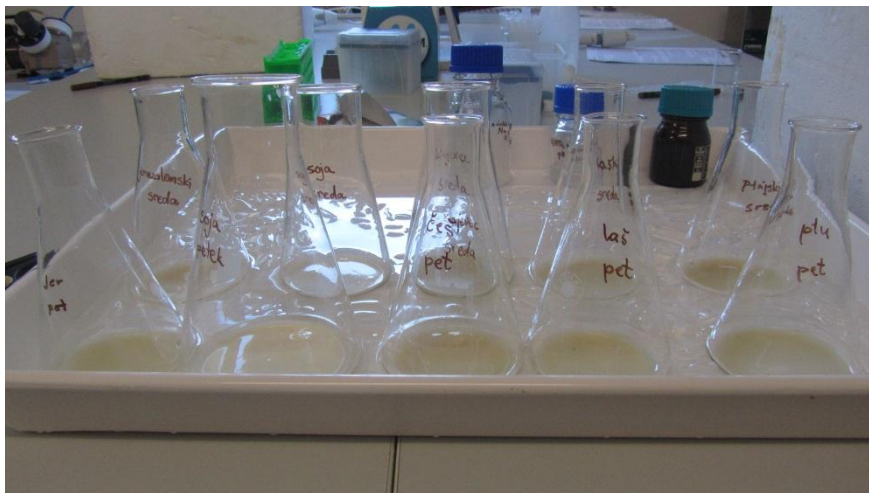
Kot v prvem eksperimentu, smo kaleča semena drugega eksperimenta prav tako prešteli in tehtali (Tabela 7).

Tabela 7: Masa in število semen vsakega kultivarja, po petih in treh dneh kalitve (drugi eksperiment)

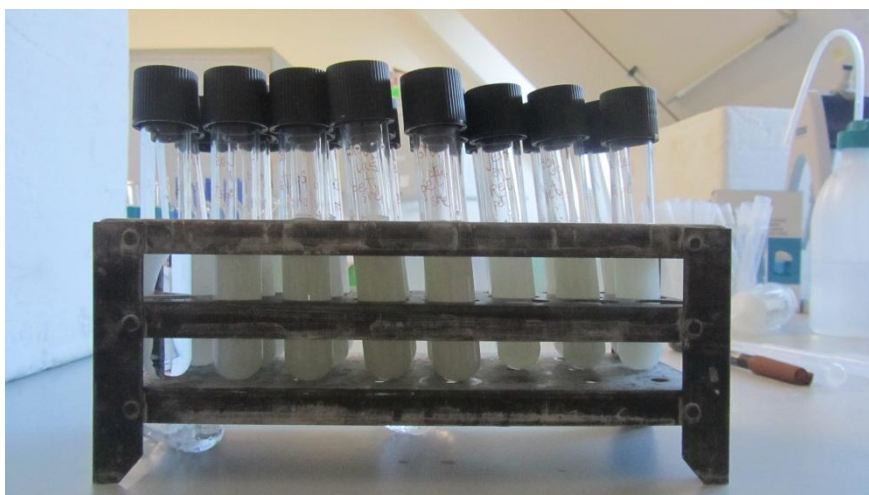
Število dni kalitve	Kultivar	Masa (+/- 0,01 g)	Število semen
3	'Laški'	50,24	35
5	'Laški'	50,79	20
3	'Češnjevec'	39,07	56
5	'Češnjevec'	39,01	43
3	'Jeruzalemski'	29,84	35
5	'Jeruzalemski'	29,92	32
3	'Ptujski maslenec'	38,56	38
5	'Ptujski maslenec'	38,48	37
3	Soja	20,99	103
5	Soja	18,80	88

V drugem eksperimentu je bil postopek encimske ekstrakcije (koraki 1 – 6) enak kot v prvem, edina razlika je bila, da pH vrednosti in temperature inkubacije nismo spreminjali. Vsak vzoreček (ekstrakt) je imel tudi dve ponovitvi, torej je vsak kultivar, ki je kalil tri ali pet dni imel dve ponovitvi. Napolnili smo 20 epruvel, ker je bilo v drugem eksperimentu preučevanih pet kultivarjev, dve obdobji kalitve, vsak vzoreček ekstrakta pa je imel dve ponovitvi. Absorbanco smo merili s spektrofotometrom (495 – 575 nm) in kolorimetrom (565 nm); postopek merjenja absorbance pa je bil identičen tistemu v prvemu poskusu. Pred začetkom

analize sta bili obe napravi tudi kalibrirani. Rezultate smo obravnavali in podali enako kot v prvem eksperimentu.



Slika 19: Encimski ekstrakti kultivarjev iz drugega eksperimenta (lastni vir)



Slika 20: Mešanice pufra, fenolftalein fosfata in encimskega ekstrakta kultivarjev drugega eksperimenta pred inkubacijo (lastni vir)



Slika 21: Sprememba barve mešanic v epruvetah iz drugega eksperimenta; po inkubaciji in dodatku Na_2CO_3 (lastni vir) ⁴

3. ZBIRANJE IN OBDELAVA PODATKOV

Spektrofotometer meri absorbanco v širšem območju (v tej raziskavi od 495 do 575 nm; meritev zabeležena na vsakih 5 nm). Izmerili smo širši spekter, da bi lahko lažje in bolj zanesljivo določili srednje vrednosti absorbance vsakega kultivarja posebej. V spodnje tabele so zbrane povprečne vrednosti skeniranega območja.

PRVI EKSPERIMENT

Tabela 8: Legenda o signifikantnosti razlik

P-vrednost	Signifikantnost
P > 0,05	ne
P < 0,05	da
P < 0,01	zelo
P < 0,001	izredno

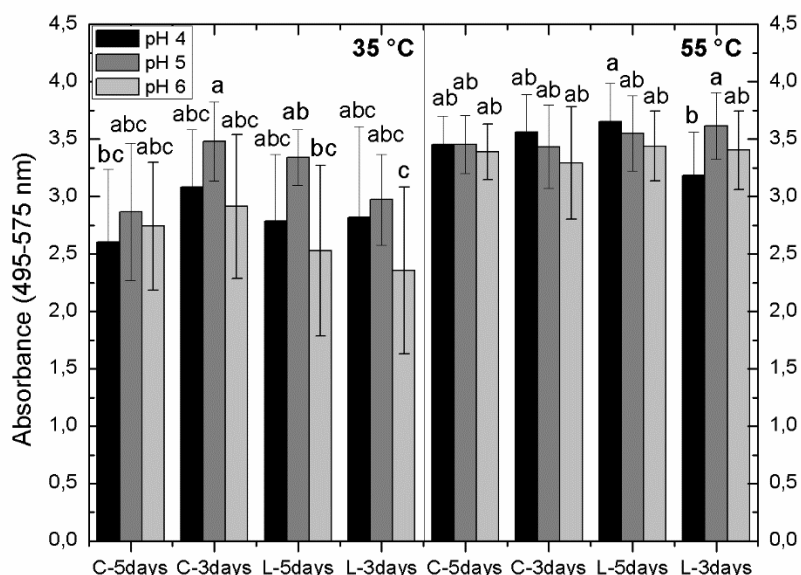
⁴ Barva se je spremenila, ker je encim fosfataza odtegnil fosfat iz raztopine PPP.

Tabela 9: Srednje vrednosti absorbance, standardna deviacija in signifikantnost razlik za fižol 'Laški'

'Laški'						
Število dni kalitve	Temperatura (+/- 0,5 °C)	pH	Povprečna vrednost absorbance pri 495 – 575 (+/- 0,07 nm)	Standardna deviacija	t-test (P-vrednost)	Signifikantnost
5	35	4	2,78	0,610	0,3490	ne
3	35	4	2,99	0,799		
5	55	4	3,65	0,322	0,0051	zelo
3	55	4	3,39	0,377		
5	35	5	3,34	0,358	0,3900	ne
3	35	5	3,37	0,442		
5	55	5	3,69	0,327	0,0373	da
3	55	5	3,92	0,291		
5	35	6	2,81	0,816	0,2750	ne
3	35	6	2,48	0,766		
5	55	6	4,04	0,331	0,4200	ne
3	55	6	3,65	0,342		

Tabela 10: Srednje vrednosti absorbance, standardna deviacija in signifikantnost razlik za kultivar 'Češnjavec'

'Češnjavec'						
Število dni kalitve	Temperatura (+/- 0,5 °C)	pH	Povprečna vrednost absorbance pri 495 – 575 (+/- 0,07 nm)	Standardna deviacija	t-test (P-vrednost)	Signifikantnost
5	35	4	2,91	0,771	0,0949	ne
3	35	4	3,01	0,498		
5	55	4	3,45	0,25	0,3420	ne
3	55	4	3,56	0,329		
5	35	5	2,87	0,597	0,0289	da
3	35	5	3,35	0,344		
5	55	5	3,45	0,252	0,4500	ne
3	55	5	3,43	0,362		
5	35	6	3,01	0,782	0,5000	ne
3	35	6	2,91	0,818		
5	55	6	3,41	0,243	0,2980	ne
3	55	6	3,29	0,491		



Graf 1: Povprečne vrednosti absorbance ekstraktov dveh kultivarjev, ki sta bila preučevana v prvem eksperimentu in razmerje med preučevanima kultivarjema, trajanjem kalitve, pH-jem pufru ter inkubacijsko temperaturo

DRUGI EKSPERIMENT

3.1.1. Spektrofotometrična analiza

Tabela 11: Povprečne vrednosti absorbance štirih kultivarjev navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*) in enega kultivarja soje (*Glycine max (L.) Merr.*) po petih dneh kalitve

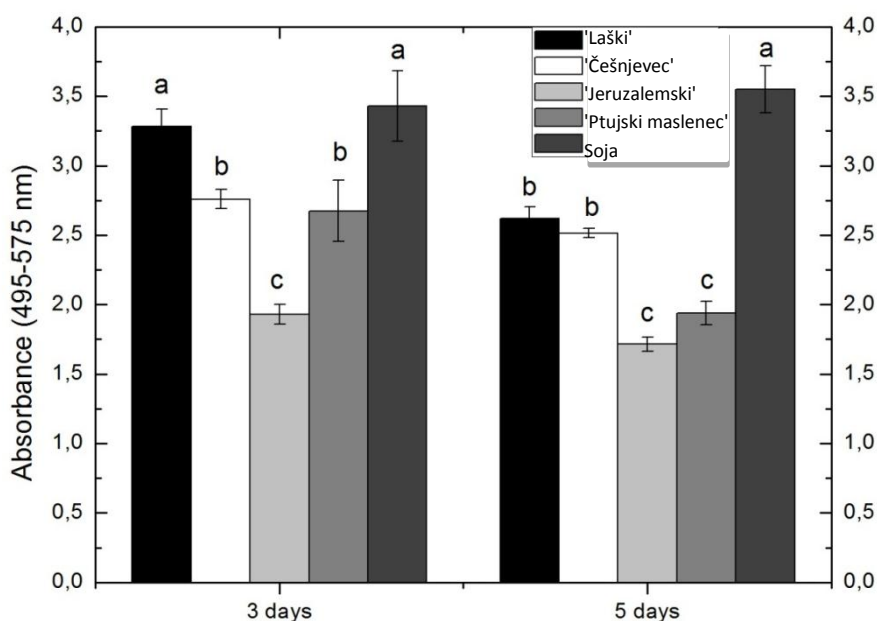
Kultivar, 5 dni kalitve	'Laški'		'Češnjevec'		'Jeruzalemski'		'Ptujski maslenec'		Soja	
Število ponovitve	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Povprečna vrednost absorbance pri 495 – 575 (+/- 0,07 nm)	2,558	2,676	2,492	2,539	1,681	1,749	1,876	2,002	3,670	3,426

Tabela 12: Povprečne vrednosti absorbance štirih kultivarjev navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*) in enega kultivarja soje (*Glycine max (L.) Merr.*) po treh dneh kalitve

Kultivar, 3 dni kalitve	'Laški'		'Češnjevec'		'Jeruzalemski'		'Ptujski maslenec'		Soja	
Število ponovitve	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Povprečna vrednost absorbance pri 495 - 575 (+/- 0,07 nm)	3,370	3,190	2,712	2,813	1,883	1,976	2,832	2,520	3,246	3,612

Tabela 13: Povprečne vrednosti absorbance vseh preučevanih kultivarjev po petih in treh dneh kalitve

Kultivar	Povprečna vrednost absorbance obeh ponovitev po petih dneh kalitve (+/- 0,007 nm)	Povprečna vrednost absorbance obeh ponovitev po treh dneh kalitve (+/- 0,007 nm)
'Laški'	2,62	3,28
'Češnjevec'	2,52	2,76
'Jeruzalemski'	1,72	1,93
'Ptujski maslenec'	1,94	2,68
Soja	3,55	3,43

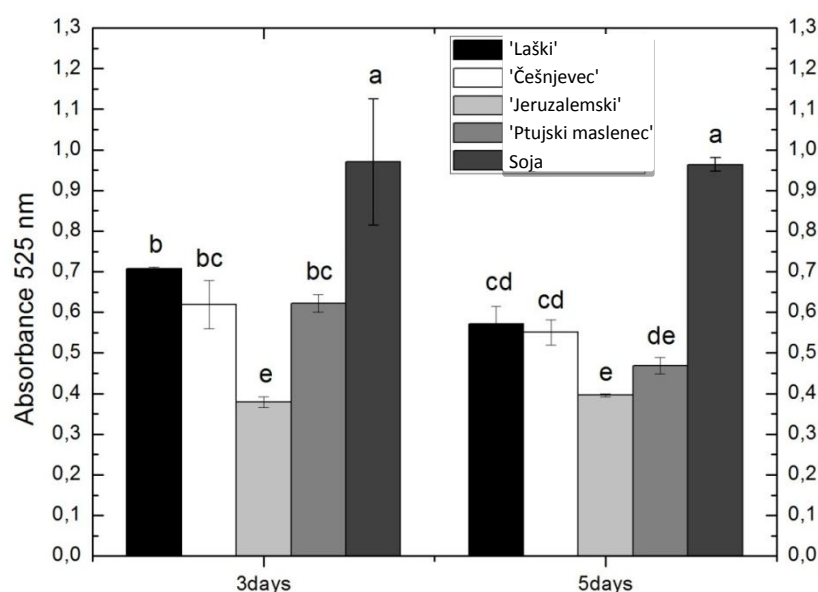


Graf 2: Povprečna vrednost absorbance vseh preučevanih kultivarjev po petih in treh dneh kalitve (absorbanca izmerjena s spektrofotometrom)

3.1.2. Kolorimetrična analiza

Tabela 14: Vse vrednosti absorbance in povprečne vrednosti absorbance obeh ponovitev vseh preučevanih kultivarjev drugega eksperimenta (absorbanca izmerjena s kolorimetrom)

Kultivar	Število ponovitve	Vrednosti absorbance pri 565 nm po 5 in 3 dneh kalitve (+/- 0,002 nm)		Povprečne vrednosti absorbance pri 565 nm po 5 in 3 dneh kalitve (+/- 0,002 nm)	
		5	3	5	3
'Laški'	1	0,541	0,704	0,572	0,707
	2	0,602	0,710		
'Češnjevec'	1	0,529	0,577	0,551	0,619
	2	0,573	0,661		
'Jeruzalemski'	1	0,399	0,370	0,396	0,380
	2	0,393	0,389		
'Ptujski maslenec'	1	0,483	0,637	0,469	0,622
	2	0,455	0,607		
Soja	1	0,952	0,860	0,964	0,970
	2	0,976	1,080		



Graf 3: Vrednosti absorbance vseh preučevanih kultivarjev po petih in treh dneh kalitve (absorbance izmerjena s kolorimetrom)

3.2. Primerjava obeh eksperimentov

Primerjavo je moč narediti samo med fižolom 'Laški' in navadnim fižolom tipa 'Češnjevec', saj sta to edina dva, ki smo jih preučevali v obeh eksperimentih. Enako lahko primerjamo samo spektrofotometrične podatke.

Tabela 15: Povprečne vrednosti absorbance kultivarjev 'Laški' in 'Češnjevec' v obeh eksperimentih⁵

Kultivar	Povprečna vrednost absorbance po 5 dneh kalitve (+/- 0,07 nm)		Povprečna vrednost absorbance po 3 dneh kalitve (+/- 0,07 nm)	
	Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 1	Eksperiment 2
'Laški'	3,34	2,62	3,37	3,28
'Češnjevec'	2,87	2,52	3,35	2,76

⁵ Zaradi primerjave so v tabeli pod stolpcem za drugi eksperiment navedene povprečne vrednosti absorbance dveh ponovitev istega kultivarja.

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1. Eksperiment 1

4.1.1. Vpliv inkubacijske temperature na fosfatazno aktivnost

Graf 1 prikazuje, da so bile najvišje vrednosti absorbance izmerjene v reakcijski raztopini, ki je bila inkubirana pri 55 °C. Vendar je malo verjetno, da bi bila inkubacija pri 55 °C tista, pri kateri bi bila fosfatazna aktivnost najvišja, saj se zdi, da sta vpliv trajanja kalitve in vpliv pH-ja pri taki temperaturi kratko malo izničena. Poleg tega tudi razlike v fosfatazni aktivnosti niso signifikantne. Ekstrakte temeljnega eksperimenta smo inkubirali pri 35 °C, saj so bile pri tej temperaturi razlike v aktivnosti večje. Iz tega sledi, da smo inkubacijo pri 35 °C določili kot optimalno.

Barry Meatyard je raziskoval mungo fižole (*Phaseolus aureus*) in navedel, da je fosfatazna aktivnost ekstraktov kalečih semen najvišja po inkubaciji pri 55 °C (Meatyard, 1999). Tudi Asaduzzaman s sod., ki so naredili raziskavo s semeni *Vigna mungo L.*, so zapisali, da je inkubacija pri 55 °C za tovrstno encimsko aktivnost najbolj optimalna (Asaduzzaman, Rahman, Yeasmin, 2011). Hayes s sod., so preučevali fosfatazno aktivnost različnih stročnic in določili temperaturo 50 °C kot najbolj optimalno (Hayes, Richardson, Simpson, 1999). Glede na rezultate moje raziskave se zdi, da pri 55 °C različne vrednosti pufrske pH in različno trajanje kalitve sploh nimata vpliva na fosfatazno aktivnost, zato je bila inkubacija pri 35 °C določena za optimalno. Poleg tega je bil v raziskavi kot indikator uporabljen fenolftalein, ki sicer ni specifičen za fosfatazne encime, temveč za kislost.

Prva hipoteza je bila ovržena, razlog za neujemanje rezultatov te raziskave, torej neujemanje optimalne temperature s temperaturo, ki jo navajajo drugi viri pa lahko tiči v dejstvu, da so bili v sklopu tega eksperimenta preučevani drugačni kultivarji. Možno je, da so fosfataze teh kultivarjev drugačne in so najbolj aktivne pri drugačni temperaturi inkubacije (v sklopu te raziskave pri 35 °C). Optimalna temperatura inkubacije pri kateri so kisle fosfataze v kalečih semenih ekstraktov najbolj aktivne je verjetno specifična za vsak kultivar. Vendar, da bi lahko to trdili z gotovostjo, bi bilo treba eksperiment ponoviti.

4.1.2. Vpliv pH vrednosti na fosfatazno aktivnost

Glede na podatke v Tabelah 9 in 10 ter Grafu 1 je očitno, da je bila fosfatazna aktivnost v ekstraktih kalečih semen, ki so bili inkubirani pri 35 °C (optimalna temperatura) najvišja, ko so bili ekstrakti pripravljene s pufrom v vrednosti pH 5. Sicer pa razlike med absorbanco vzorčkov, ki so bili zmešani z eno izmed treh različnih pH vrednosti niso signifikantne. Razlike v fosfatazni aktivnosti ekstraktov kalečih semen, ki so bili inkubirani pri 55 °C so manjše in nesigifikantne, zato je precej težko določiti kateri pH je za fosfataze najbolj optimalen. Tako je bil za najprimernejšo pH vrednost pufra izbran pH 5.

Različni avtorji navajajo pH vrednost 5.5 kot najbolj optimalno (Gibbins, Norris, 1963; Richardson, Simpson, 1999), Hayes s sod. pa pH 5.3 Meatyrd in Asaduzzaman s sod. so v ločenih raziskavah ugotovili, da je pH 5 najbolj optimalen za aktivnost kislih fosfataz, kar se ujema z rezultati mojega eksperimenta (Meatyrd, 1999; Asaduzzaman, Rahman, Yeasmin, 2011). Druga hipoteza je bila tako potrjena.

4.1.3. Vpliv trajanja kalitve na fosfatazno aktivnost

Pod pogoji, ki so bili v sklopu te raziskave označeni kot optimalni (ekstrakti narejeni s pufrom v vrednosti pH 5 in inkubirani pri 35 °C), je bila fosfatazna aktivnost najvišja v kultivarjih, ki so kalili tri dni (krajši čas). To drži za fižol 'Laški' in kultivar 'Češnjevce', čeprav razlike v fosfatazni aktivnosti semen, ki so kalila tri in tistih, ki so kalila pet dni, pri obeh niso bile signifikantne.

Asaduzzaman s sod. so v svoji raziskavi določili, da kisle fosfataze v kalečih semenih *Vigna mungo L.* dosežejo maksimalno aktivnost po petih dneh kalitve. Izpostavili so tudi, da na kalitev vplivata temperatura in sorta semen, kar pomeni, da je pri raziskavi, ki analizira več kultivarjev hkrati precej težko kvantitativno določiti časovni potek fosfatazne aktivnosti med kalitvijo semen (Asaduzzaman, Rahman, Yeasmin, 2011). Gibbins s sod. so preučevali navadni fižol (*Phaseolus vulgaris*) in navedli, da je bila fosfatazna aktivnost semen najvišja, ko so slednja kalila devet dni. Po devetih dneh je aktivnost upadla (Gibbins, Norris, 1963). Da povzamem, tretja hipoteza je bila torej ovržena; zdi pa se, da je aktivnost fosfataznega encima specifična za vsak kultivar, vendar bi bilo treba eksperiment ponoviti, da bi lahko to trdili z gotovostjo.

4.2. Eksperiment 2: Spektrofotometrična analiza

4.2.1. Fosfatazna aktivnost v različnih kultivarjih fižola (*Phaseolus vulgaris*), laškega fižola (*Phaseolus coccineus*) in soje (*Glycine max (L.) Merr.*)

Glede na Graf 2 lahko sklepamo, da je bila aktivnost fosfataz najvišja v ekstraktih semen soje (*Glycine max (L.) Merr.*) in najnižja v navadnem fižolu 'Jeruzalemski'. Med obravnavanimi fižoli, je bil najbolj fosfatazno aktiven 'Laški' fižol. Vse te ugotovitve veljajo za kultivarje, ki so kalili tri dni, tako kot tudi za tiste, ki so kalili pet dni.

Phaseolus vulgaris je gensko izredno variabilen, zato je kar težko zaključiti kateri izmed preučevanih kultivarjev navadnega fižola je fosfatazno najbolj aktiven. Zdi se, da so v pogojih pod katerimi so bili kultivarji analizirani, torej pH 5 in 35 °C, ekstrakti soje najbolj encimsko aktivni oziroma vsaj bolj aktivni od vseh ekstraktov fižolovih kultivarjev, ki so bili preučevani v okviru te raziskave. To in variabilnost aktivnosti encima fosfataze med kultivarji bi lahko pripisovali dejstvu, da so vsi preiskovani kultivarji različni in potrebujejo različne, specifične pogoje (pH, temperatura, trajanje kalitve), ki so optimalni za njihove fosfataze. To ugotovitev podpira tudi sklep Lare Škof z Univerze v Mariboru, ki je naredila raziskavo s štirimi sortami navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*: 'Jeruzalemski', 'Jabelski pisanec', 'Zorin', 'Cipro'). Glede na rezultate svoje raziskave je zaključila, da je verjetno »vsaka sorta fižola specifično odreagirala na različne pogoje«, zato bi bilo težko trditi katero toplotno tretiranje je »najbolj optimalno za vse sorte hkrati.« (Škof, 2014, str. 26). Četrta hipoteza te raziskave je bila potrjena.

4.2.2. Vpliv trajanja kalitve na fosfatazno aktivnost

Iz Grafa 2 je razvidno, da je bila v štirih od petih preučevanih kultivarjev fosfatazna aktivnost višja v semenih, ki so kalila tri dni, torej krajši čas. To ne drži za sojo, katere semena so bila najbolj fosfatazno aktivna po petih dnevih kalitve. Razvidno je tudi, da je trajanje kalitve signifikantno vplivalo le na fosfatazno aktivnost fižola 'Laški' in kultivarja 'Ptujski maslenec'; v obeh je bila aktivnost višja v semenih, ki so kalila tri dni. Tretja hipoteza je tako ovržena (4.1.3.). Povrh tega se zdi, da trajanje kalitve pravzaprav ni imelo signifikantnega učinka na fosfatazno aktivnost vseh ostalih kultivarjev.

4.3. Eksperiment 2: Kolorimetrična analiza

4.3.1. Fosfatazna aktivnost v različnih kultivarjih fižola (*Phaseolus vulgaris*), laškega fižola (*Phaseolus coccineus*) in soje (*Glycine max (L.) Merr.*)

Glede na Graf 3 lahko sklepamo, da so razlike v fosfatazni aktivnosti med kultivarji v glavnem podobne kot smo jih izmerili s pomočjo spektrofotometra, čeprav razlike med 'Laškim' fižolom in kultivarjema 'Češnjevec' ter 'Ptujski maslenec' niso signifikantne. Aktivnost fosfataz je bila najvišja v ekstraktih soje (*Glycine max (L.) Merr.*), če pa se osredotočimo samo na kultivarje navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*) pa lahko ugotovimo, da je bila tovrstna encimska aktivnost najvišja v kalečih semenih laškega fižola in najnižja v kalečih semenih kultivarja 'Jeruzalemski'. Razlog za to je verjetno dejstvo, da so se pogoji pod katerimi smo preučevali ekstrakte drugega eksperimenta najboljše ujemali z optimalnimi pogoji fižola 'Laški' in najslabše s tistimi od kultivarja 'Jeruzalemski'.

4.3.2. Vpliv trajanja kalitve na fosfatazno aktivnost

Iz Grafa 3 lahko razberemo, da je bila aktivnost fosfataznih encimov najvišja v semenih, ki so kalila krajši čas, torej tri dni, kar drži za vse preučevane kultivarje, razen za kultivar 'Jeruzalemski', ki je bil bolj fosfatazno aktiven po petih dneh kalitve. Povrh tega lahko tudi ugotovimo, da je trajanje kalitve signifikantno vplivalo le na fosfatazno aktivnost kultivarjev 'Laški' in 'Ptujski maslenec'.

4.4. Primerjava spektrofotometra in kolorimetra

Obe napravi, kolorimeter in spektrofotometer, se uporabljata za merjenje absorbance. Glavna razlika med njima je, da kolorimeter meri absorbance pri samo eni valovni dolžini (v tej raziskavi 525 nm), medtem ko spektrofotometer meri transmitanco (T) ali propustnost v širšem spektru (495 – 575 nm). Kolorimeter meri samo v vidnem; spektrofotometer pa v vidnem, infrardečem (IR) in tudi ultravijoličnem (UA) spektru. Če se osredotočimo na Tabelo 13 (spektrofotometer) in Tabelo 14 (kolorimeter), lahko ugotovimo, da izmerjenih vrednosti absorbance ni moč primerjati, saj se preveč razlikujejo. Vseeno pa sta obe napravi izmerili najnižjo vrednost absorbance pri kultivarju 'Jeruzalemski' in najvišjo pri soji.

4.5. Primerjava obeh eksperimentov

Le 'Laški' in 'Češnjevec' sta bila preučevana v obeh eksperimentih, zato lahko primerjamo samo njune vrednosti. Iz Tabele 15 je razvidno, da se vrednosti absorbanc med obema eksperimentoma kar precej razlikujejo; sta pa imela kultivarja prvega eksperimenta višje vrednosti absorbance. Razlog za to tiči verjetno v veliki razliki med temperaturo kalitve obeh eksperimentov (Tabela 1), saj so kultivarji prvega kalili pri precej višji temperaturi kot kultivarji drugega eksperimenta (30 °C v prvem in 15 °C v drugem eksperimentu). Temperatura kalitve vpliva na rast in razvoj semen, tudi na velikost klični listov, dolžino korenin; torej vpliva na fosfatazno aktivnost ekstraktov. 'Laški' iz prvega eksperimenta je imel daljše korenine in večje klični liste kot 'Laški' iz drugega eksperimenta, saj je bila temperatura kalitve takrat (avgusta) višja. Zaradi razvitosti kalečih semen lahko sklepamo, da so bile zaloge fosforja v klični listih že dodobra porabljene. Rastlina želi nadomestiti ta primanjkljaj fosforja, zato izloči večjo količino fosfataz, ki sproščajo fosfor. Posledično je aktivnost fosfataz v takšnih, bolj kalečih semenih višja.

5. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Najpomembnejši cilj družbene odgovornosti je prispevati k trajnostnem razvoju. Svoje raziskave sem se lotila družbeno odgovorno z namenom, da bi njeni rezultati morda vsaj malo prispevali k splošnemu znanju o kisljih fosfatazah in predvsem, da bi razširili zavest o pomembnosti optimalnih pogojev kalitve semen, ki vsebujejo tovrstne fosfataze ter tako doprinesli k vsesplošnemu hitrejšemu in bolj dobičkonosnemu kmetijstvu. Upam, da bo moja raziskava vsaj malo pripomogla tudi k preučevanju kisljih fosfataz, ki so izrednega pomena za kalitev in razvoj rastlin ter vzpodbudila preučevanje delovanja alkalnih fosfataz, predvsem tistih, ki se najdejo v prostati. Povišana količina fosfataz na prostati namreč poveča tudi tveganje za raka na prostati.

6. ZAKLJUČEK

Metoda, ki je bila uporabljena v sklopu te raziskave je bila primerna za odgovarjanje na zastavljeni raziskovalni vprašanji in pridobitev zadovoljivih rezultatov. Če povzamem, ugotovila sem, da na aktivnost fosfataznega encima v različnih kultivarjih vplivajo trajanje kalitve, pH vrednost pufru s katerim so encimski ekstrakti zmešani in inkubacijska temperatura. Rezultati so pokazali, da sta pH vrednost 5 in inkubacijska temperatura 35 °C v glavnem najbolj optimalni za aktivnost fosfataz. Poleg tega je aktivnost tega encima najvišja po treh dneh kalitve semen. Fosfatazna aktivnost se med kultivarji razlikuje, čeprav te razlike niso signifikantne. Potrebno bi bilo tudi poudariti, da ima temperatura kalitve izreden vpliv na fosfatazno aktivnost, saj bližje kot je ta temperatura optimalni temperaturi kalitve kultivarja, bolj zrelo je seme, več fosforja potrebuje in aktivnost encima fosfataza se poveča. Kakorkoli, optimalna temperatura kalitve in inkubacije, pH pufru in trajanje kalitve so specifični za vsak kultivar, zato je precej težko vzpostaviti pogoje, ki bi najboljše ali vsaj enako dobro ustrezali vsem preučevanim kultivarjem. Vseeno se zdi, da so fosfataze v semenih soje na splošno bolj aktivne od tistih v preučevanih fižolih – vsaj med kultivarji in pri pogojih, pod katerimi so bili analizirani v sklopu te raziskave.

Največja prednost uporabljene metode je precej hitra pridobitev zanesljivih rezultatov oziroma vsaj takih, na podlagi katerih lahko oblikujemo ustrezne zaključke. Uspela sem tudi odgovoriti na zastavljene hipoteze; dve sta bili potrjeni in dve ovrženi. Metoda pa je imela tudi nekaj pomanjkljivosti. Če bi eksperimenta še enkrat ponovila, bi semena kalila pod bolj nadzorovanimi pogoji (v rastni komori), torej predvsem pri stalni temperaturi, saj lahko ta, če niha, precej vpliva na rezultate raziskave. Predlagala bi tudi ločitev kličnih listov semen od korenin, saj kadar uporabljamo fenolftalein kot indikator, ne moremo zagotovo trditi katere fosfataze so aktivne; tiste v novo raslih koreninah ali tiste v klični listih. Razlika med tema dvema semenskima deloma je v tem, da klični listi predstavljajo zalogo hranil in drugih bistvenih sestavin za razvijajoči se zarodek (na primer fosforja, ki ga sprošča fosfataza), med tem ko korenine privzemajo anorganski fosfor iz tal. To bi lahko bila tudi ideja za nadaljnje raziskovanje, prav tako kot preučevanje vpliva različnih indikatorjev in časov inkubacije na fosfatazno aktivnost ekstraktov.

Nadaljnje bi lahko analizirali aktivnost alkalnih fosfataz, ki so prisotne v nekaterih rastlinah in primerjali njihove optimalne pogoje (kalitveno in inkubacijsko temperaturo, pH ter trajanje kalitve) z rezultati te raziskave.

7. VIRI IN LITERATURA

- Asaduzzaman A., Rahman M., Yeasmin T. (2011). Purification and Characterization of Acid Phosphatase from a Germinating Black Gram (*Vigna mungo L.*) Seedling, str. 747 – 756
- Campbell N., Reece J. (2008). Biology, 8th Edition, Poglavje 39: Plant Responses to Internal and External Signals, str. 827 - 831
- Gibbins L., Norris F. (1963). Phytase and acid phosphatase in the dwarf bean, *Phaseolus vulgaris*, Vol. 86, No. 1, str. 67-71. [online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1201713/> (povzeto 11.1.2016, 20:10)
- Hayes J., Richardson A., Simpson R. (1999). Phytase and acid phosphatase activities in extracts from roots of temperate pasture grass and legume seedlings, *Australian Journal of Plant Physiology*, Vol. 26, No. 8, str. 801-809. [online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.publish.csiro.au/paper/PP99065.htm> (povzeto 15.1.2016, 17:25)
- Hopkins W., Hüner N. (2009). Introduction to plant physiology, 4th Edition, Enzymes, str. 146-149
- Meatyrd B. (1999). Phosphatase enzymes from plants: a versatile resource for post-16 courses, *Journal of Biological Education*, Vol. 33, No. 2, str. 109 – 112
- New England BioLabs, Applications, Cloning and Synthetic Biology, Dephosphorylation. [online]. Dostopno na URL naslovu: <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-end-modification/dephosphorylation> (povzeto 27.11.2015, 15:05)
- Nicanuzia dos Prazeres J., Ferreira C., Aoyama H. (2003). Plant Physiology and Biochemistry, Acid Phosphatase Activities During the Germination of *Glycine max* seeds, str. 15 - 20

- Olczak M., Morawiecka B., Watorek W. (2003). Plant purple acid phosphatases — genes, structures and biological function, *Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Wroclaw University*, Vol. 50, No. 4, str. 1245-1253. [online]. Dostopno na URL naslovu: http://www.actabp.pl/pdf/4_2003/1245.pdf (povzeto 15.1.2016, 18.00)
- Sigma – Aldrich, Buffer Reference Center, Citric Acid – Na₂HPO₄ Buffer Solutions, pH approx. 2.6 – 7.6. [online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html> (povzeto 15.11.2015, 10:20)
- Škof L. (2014). Vpliv termoterapije na kalitev semen navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.), str. 22 - 27
- Taiz L., Zeiger E. (2002). Plant Physiology, 4th Edition, Poglavje 16: Growth and Development, Embryogenesis, str. 382 – 383

8. PRILOGE

Priloga 1: Kalibracija spektrofotometra Varian Cary® 50 Bio UV-Visible

Navodila (spodaj) za kalibracijo spektrofotometra, ki je bil uporabljen v sklopu te raziskave so bila vzeta iz priročnika Cary WinUV Software Manual.

- a. Izberite *Calibrate During Run*. Kalibracija se bo začela po kliku na gumb *Start*.
- b. Stisnite *Start* in prikazalo se bo okno 'Standard/Sample Selection'.
- c. Določite 'standards' in 'samples', ki bodo v analizi uporabljeni.
- d. Stisnite OK.
- e. Odprlo se bo okno 'Present Standard'. Vstavite pravi 'standard' v spektrofotometer in stisnite OK, da bo naprava opravila meritev njegove absorbance.
- f. Ponavljajte korak »e«, dokler ne izmerite vseh 'standardov'.

(Dostopno na URL naslovu: Agilent Technologies, Calibration of Cary Spectrophotometer.

Povzeto po: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/1625.pdf>, 25.1.2016,

12:45)

Priloga 2: Kalibracija kolorimetra Vernier

Navodila (spodaj) za kalibracijo kolorimetra, ki je bil uporabljen v sklopu te raziskave so bila vzeta iz spletne strani Vernier; Vernierjeve datoteke o kalibraciji kolorimetra.

Program Logger Pro

- a. Odprite pokrov kolorimetra.
- b. Postavite kuveto v kolorimeter in zaprite pokrov. Kuvete je potrebno držati na zgornjem robu.

Prva kalibracijska točka

- c. Iz menijske vrstice Experiment izberite Calibrate Colorimeter (%T) in stisnite *Calibrate now*.
- d. Na kolorimetru obrnite gumb za valovno dolžino na položaj "0% T".
- e. V 'edit box' vpišite 0.
- f. Ko se meritev za 'Reading 1' stabilizira, stisnite *Keep*.

Druga kalibracijska točka

- a. Na kolorimetru obrnite gumb za valovno dolžino na želeno vrednost.
- b. Vpišite 'Type100' v 'edit box'.
- c. Ko se meritev za 'Reading 2' stabilizira, stisnite *Keep* in potem *Done*.

(Dostopno na URL naslovu: Vernier, Calibration of the colorimeter. Povzeto po: http://www.vernier.com/til/files/1665/colorimeter_calibration.pdf, 25.1.2016, 13:00)