

A búza lipoxigenáz-aktivitásának meghatározása

PÁLOSINÉ SZÁNTHÓ VILMA, VÁMOSNÉ VIGYÁZÓ LILLY
ÉS PÁRKÁNYNÉ GYÁRFÁS ANNA

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1981. március 5.

A gabonafélék tárolása és feldolgozása során szöveti enzimei fontos szerepet játszanak. A búzában levő lipoxigenáz (linoleát: oxigén oxidoreduktáz, E.C. 1.13.11.12.) a tészta reológiai tulajdonságait előnyösen befolyásolja (3), szerepe lehet a karotinoidok elszintelenítésében (2), valamint az íz- és illat-anyagok kialakításában is.

Szubsztrátumai a linolsav, a linolénsav és az arachidonsav, általában a cisz-cisz-1,4-pentadiének. Ezek a vegyületek a reakció során allil-helyzetben hidroperoxidot tartalmazó cisz-transz-1,3-pentadiénekké alakulnak. A lipoxigenáz aktivitását az így keletkezett, konjugált kettős kötésű vegyületek UV-abszorpciójának növekedési (9), vagy az oxidáció során felhasznált oxigén elfogyási sebességének mérése alapján lehet meghatározni (5). Ismert olyan eljárás is, amely a hidroperoxidok bomlásakor felszabaduló oxigént valamely alkalmas H^+ -donorra, pl. vas(II) ionokra viszi át és a rodanid-ionok jelenlétében képződő vas(III)-rodanid keletkezési sebességét méri spektrofotometriásan (8).

Cikkünkben búzakivonatok lipoxigenáz-aktivitásának mérésére alkalmas UV-spektrofotometriás eljárást és néhány, az eljárással kapott eredményt ismertünk.

Anyagok és módszerek

A méréseinkhez felhasznált Bezosztaja 1 (B 1) és Martonvásári 4 (Mv 4) búzákat az Országos Mezőgazdasági Fajtakísérleti Állomás Vetőmagelosztója bocsátotta rendelkezésünkre. A mintákat az állomás telephelyén, Tordason termesztették.

A megfelelő reakciókörülmények kialakítására meghatároztuk az enzimmivonatot, a szubsztrátum-koncentrációt, a reakcióidőt optimális értékeiket. A méréseket irodalmi utalások (4, 6, 7) alapján szobahőmérsékleten, pH 6,9-en végeztük.

A búzakivonat készítése: az egész szemű búzát Savaria (Keripar, Szombathely) típusú darálóberendezésben megdaráltuk. Ebből 20 g-t 5 °C-on 50 cm³ desztillált vízzel asztali rázógépen 60 percig rázattunk. Ezt az elegyet 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk, 20 000 ford./perc sebességgel (Beckman, Fullerton, California, model J 2-21 centrifuga, rotor: J 20). A felülúszót szűrtük, a meghatározáshoz a szűrlet (a továbbiakban enzimmivonatot) 0,01-0,04 cm³-ét használtuk fel, az enzim-aktivitástól függően. Az enzimmivonatot koncentrációján a továbbiakban azt értjük, hogy a reakcióelegyben levő kivonat hány g·[100 cm³]⁻¹ búzának felel meg.

A szubsztrátum-oldat készítése: szubsztrátumként linolsavat (cisz-9-cisz-12-oktadekadiénsav; SIGMA grade III, 99%-os) alkalmaztunk. Az oldatot *Lulai és Baker (6)* szerint készítettük: 0,25 cm³ Tween 20 (polioxietilén szorbitán monolaurát; Sigma) és 5 cm³ levegőmentesített borátpuffer (pH 9,0) elegyét nitrogén átáramoltatása közben mágneses keverővel kevertettük. Cseppenként 0,25 cm³ linolsavat adtunk hozzá. Zavaros oldat keletkezett, amely 1 N nátrium-hidroxid hatására kitisztult (kb. 0,6–0,8 cm³). Az oldatot levegőmentesített desztillált vízzel térfogatát 100 cm³-re egészítettük ki. A szubsztrátumot naponta frissen készítettük, a felhasználásig hűtőszekrényben tartottuk.

A reakció-elegy kialakítása: a búzakivonatoknak – fehérje-tartalmuknál fogva – a spektrofotometriás mérés hullámhosszán (234 nm-en) saját elnyelésük van (értéke 0,200–0,400). Ezért a méréshez szükséges mennyiségű enzimm kivonatot pH 6,9 foszfátpufferrel 2,98 cm³-re kiegészítettük és erre az oldatra állítottuk be a spektrofotométer-rést. Ezután hozzápipettáztuk a 0,02 cm³ szubsztrátumot az oldathoz és mértük az extinkciót különböző időpontokban (E_1). A reakcióelegy összes térfogata 3 cm³. A linolsav a levegő oxigénje hatására is oxidálódik, ennek mértékét naponta meghatároztuk és korrekcióba vettük. Ehhez a linolsavat pH 6,9 foszfátpufferrel olyan arányban hígítottuk, mint a reakcióelegyben és a tiszta puffer-oldattal szembeni extinkcióját (E_2) mértük. *Lulai és Baker (6)* szerint a mérés hibás eredményt ad, ha ez az érték meghaladja a 0,04 extinkció-értéket. Tapasztalataink szerint 0,100 érték a mérési eredményeket csak hibahatáron belül változtatta. Az E_2 -értékeket az E_1 -értékekből kivonva, kaptuk azt az extinkcióértéket (OD), amelynek az enzimhatásra bekövetkező kezdeti változási sebességével jellemeztük az aktivitást ($\Delta OD \text{ min}^{-1}$).

Erdmények és következtetések

Az extinkció változása a reakcióidővel

A mérési körülmények között az extinkció a reakcióidő függvényében 3 percig változott lineárisan (1. ábra).

A szubsztrátum-koncentráció és a reakciósebesség közötti összefüggés vizsgálata

Mivel ismert (6), hogy a linolsav egyes lipoxigenázok esetében szubsztrátum-felesleg-gátlást okoz, meghatároztuk azt a szubsztrátum-koncentrációt, amely a búza-lipoxigenázra a legnagyobb reakciósebességet biztosítja. Az enzimm kivonat koncentrációja a reakcióelegyben 0,27% volt. A reakcióelegy szubsztrátumtartalmát $2,68 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ és $16,08 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ között változtattuk úgy, hogy az adott koncentrációjú szubsztrátum-oldatból különböző térfogatokat adtunk a reakció-elegyhez, melynek térfogatát minden esetben 3 cm³-re egészítettük ki 6,9-es pH-jú foszfát-puffer oldattal. A 2. ábra mutatja a reakciósebesség változását a szubsztrátumkoncentrációval.

A reakciósebesség a legnagyobb, ha a reakcióelegy $5,4 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ linolsavat tartalmaz. Ezért a továbbiakban ezt a koncentrációt alkalmaztuk mérésinkhez.

A legnagyobb reakciósebességet biztosító szubsztrátum-koncentráció értéke függ a reakció-elegy Tween-koncentrációjától is (1). *Surrey (9)* kísérletei szerint megfelelő a linolsav: Tween (1:1) vagy 1:1,5) arány, mérésinkben (1:1) arányt alkalmaztunk.

A reakciósebesség változása az enzimkoncentrációval

Meghatároztuk azt az enzimkoncentráció-tartományt, amelyben – az adott mérési körülmények között – a reakciósebesség lineárisan változik.

A vizsgálatot két búzafajta kivonatával végeztük. A reakció-elegyben a Martonvásári 4 búza kivonatának koncentrációja 0,33%, 0,40% és 0,53%, a Bezostaja 1 búzáé 0,13%, 0,20%, 0,27% és 0,40% volt. A reakció sebességét a különböző koncentrációjú enzimkivonatok esetében a 3. ábra mutatja.

A vizsgált tartományban a reakció sebessége az enzimkivonat koncentrációjával arányosan változott mind a két búza-minta esetében.

Az aktivitás-meghatározáshoz elfogadott mérési körülmények

Az eredmények alapján a búzakivonatok lipoxigenáz-aktivitását 25 °C-on Sp 195 típusú spektrofotométeren 234 nm hullámhosszon 0–3 percig mérjük.

A reakció-elegy készítése: 2,96 cm³, pH 6,9 foszfát-puffer oldatot (0,05 mol dm⁻³) 0,02 cm³ enzimkivonattal összekeverjük és beállítjuk a spektrofotométer rését, majd 0,02 cm³ szubsztrátum hozzáadásával megindítjuk a reakciót. Az oldat extinkcióját, 0,5 min-enként mérjük (E₁-értékek). A kapott extinkció-értékekből levonjuk a 0,02 cm³ szubsztrátum + 2,98 cm³, pH 6,9 foszfát pufferoldat elegyének ugyanazzal a pufferrel (pH:6,9) szemben mért extinkció-értékét (E₂). A 0,5 min-enként mért E₁-extinkció-értékek és az E₂-extinkció-érték különbségét OD-val jelöljük.

Az aktivitás-érték meghatározásához három enzimkivonatot készítünk és minden kivonat OD-értékeit 0,5 min-enként 3 párhuzamosban meghatározzuk. Gyakorlott kivitelező két kivonat készítésével, kivonatonként két párhuzamos mérésorozattal is kellő pontosságot érhet el. Az OD-értékeket az idő függvényében ábrázoljuk. Az enzim-aktivitás kiszámításához az így kapott görbék lineáris szakaszait használjuk fel. A lineáris regresszió-számítással meghatározott egyenletben a független változó együtthatója adja meg az extinkció-változás (ΔOD) sebességét (dimenziója: $\Delta OD \cdot \text{min}^{-1}$), azaz az enzim aktivitását. Egységnyi aktivitásúnak tekintjük az enzimet akkor, ha percenként 10^{-3} extinkció-változást hoz létre. 1 egység (E) = $10^{-3} \Delta OD \text{ min}^{-1}$. Az aktivitást a búza tömegére vonatkoztatjuk és fajlagos aktivitásnak nevezzük (dimenziója: $\Delta OD \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$).

Példák a módszer alkalmazására: A módszert többek között 2 évjáratban, azonos termőhelyen természetű 2 búzafajta fajlagos lipoxigenáz-aktivitásának meghatározására alkalmaztuk.

Mérési eredményeinket az 1. táblázatban közöljük

1. táblázat

Azonos termőhelyről származó búzafajták fajlagos lipoxigenáz-aktivitás értékei

Az évjárat	A búzafajta fajlagos lipoxigenáz-aktivitása (Eg ⁻¹)	
	Martonvásári 4	Bezostaja 1
1979	15 300 ± 420	12 300 ± 600
1980	24 800 ± 1 000	13 600 ± 200

$$E = 10^{-3} \Delta OD \text{ min}^{-1}$$

$$v\% = 1,5 - 4,9$$

$$v = \text{a variációs koefficiens}$$

$$n = 6$$

A táblázatból látható, hogy a Martonvásári 4 búza lipoxigenáz-aktivitása mind a két évjáratban nagyobb, mint a Bezosztaja 1 búza lipoxigenáz-aktivitása. A Bezosztaja 1 búza lipoxigenáz-aktivitása a két évjáratban közel azonos, de a Martonvásári 4 búza lipoxigenáz-aktivitásában jelentős eltérés mutatkozott.

A módszer reprodukálhatósága igen jó; a variációs koefficiens 1,5–4,9%-nak adódott.

A búza-lipoxigenáz látszólagos kinetikai állandóinak számítása

A szubsztrátum-koncentráció – reakciósebesség görbéből a $0-5,4 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} koncentráció tartományban Lineweaver-Burk szerint számítottuk a kinetikai állandókat (4. ábra).

A látszólagos Michaelis-állandó ($K_{m_{app}} = 3,46 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} és a maximális reakciósebesség ($V_{max_{app}} = 0,961 \text{ AOD} \cdot \text{min}^{-1}$

A kapott mérési eredményeinket összehasonlítottuk irodalmi adatokkal.

A 2. táblázatban feltüntettük egy gabonafajta, az árpa, és a legnagyobb lipoxigenáz-tartalmú növény, a szójabab adatait. A reakció maximális sebességét biztosító szubsztrátum-koncentráció értékei a búza és az árpa enzimek kivonatok esetében közelítőleg megegyeznek. A szójabab-enzim esetében $(10) 3 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} -nél nagyobb szubsztrátum-koncentrációval rendellenességeket tapasztaltak, ezért a látszólagos Michaelis-állandó értékét a $3 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} -nél kisebb szubsztrátum-koncentráció tartomány adataiból határozták meg.

2. táblázat

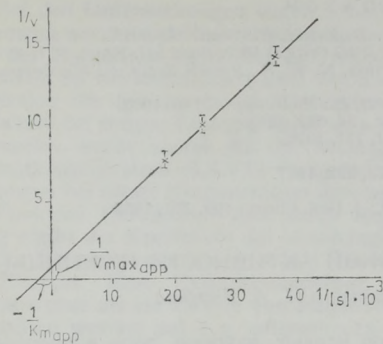
A maximális reakciósebességet biztosító szubsztrátum-koncentrációk és a látszólagos Michaelis-állandók összehasonlítása különböző származású lipoxigenáz-enzimek esetében

Növény	Maximális reakciósebességet biztosító szubsztrátum-koncentráció mol dm^{-3}	$K_{m_{app}}$ mol dm^{-3}	Irodalom
Búza	$5,4 \cdot 10^{-5}$	$3,46 \cdot 10^{-4}$	(6) (10)
Árpa	$5,47 \cdot 10^{-5}$	$2,44 \cdot 10^{-6}$	
Szójabab	$3 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$	

A szubsztrátum: linolsav.

$K_{m_{app}}$ = a látszólagos Michaelis-állandó

A háromféle növényből származó enzimkivonatok esetében az enzimeknek a szubsztrátum iránti affinitása – amely a K_m -értékkel jellemezhető – eltérő, a legnagyobb az árpakivonat enzimének affinitása a linolsavhoz.



1. ábra

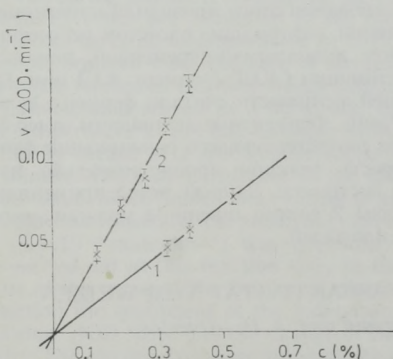
Az enzimkivonat extinkciójának (OD) változása a reakcióidővel (t). Az enzimkivonat Bezosztaja I (1979) búzából készült, koncentrációja a reakcióelegyben 0,27% búzának felel meg.

A linolsav-szubsztrátum koncentrációja $5 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} . A mérési körülmények: pH 6,9, 25 °C (szobahőmérséklet).

A regressziós egyenes egyenlete:

$$\text{OD} = -0,005 + 0,093 t; r = 0,9992.$$

A függőleges vonalak a szórást jelentik.



3. ábra

A reakciósebesség (v) változása az enzimkivonat koncentrációjával (c)

A szubsztrátum-koncentráció és a mérési körülmények u. azok, mint az 1. ábrán.

Az egyenesek egyenletei:

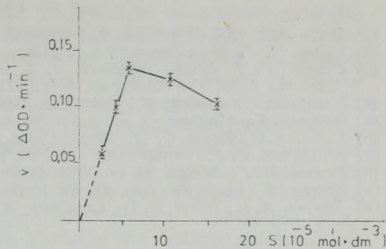
$$1. v = -0,001 + 0,150 c \quad r = 0,9976$$

(Martonvásári 4 búza)

$$2. v = 0,0003 + 0,367 c \quad r = 0,9955$$

(Bezosztaja 1 búza)

A függőleges vonalak a szórást jelölik.

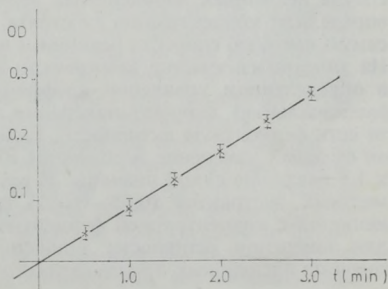


2. ábra

A reakciósebesség (v) változása a linolsav-koncentrációval (S)

A mérési körülményeket 1. az 1. ábrán.

A függőleges vonalak a szórást jelölik.



4. ábra

A szubsztrátum-koncentráció (S) és a reakciósebesség (v) reciprok értékeinek összefüggése Lineweaver-Burk szerint

Az egyenes megszerkesztéséhez a 2. ábrán feltüntetett görbe felszálló ágának mérési pontjai szolgálnak alapul.

$$\text{Az egyenes egyenlete: } \frac{1}{v} = 1,04 + 0,00036 \frac{1}{[S]}$$

$$r = 0,981 \quad [S] = \text{a szubsztrátum-koncentráció mol } \text{dm}^{-3}\text{-ban}$$

$$V_{\text{max app}} = 0,961 \Delta\text{OD min}^{-1}$$

$$K_{\text{m app}} = 3,46 \cdot 10^{-4} \text{ mol } \text{dm}^{-3}$$

A függőleges vonalak a szórást jelölik.

- (1) Ben-Aziz, A., Grossman, S., Ascarelli, I., Budowski, P.: *Anal. Biochem.*, 34, 88, 1970.
- (2) Eskin, N. A. M., Grossman, S., Pinsky, A.: *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 9, 1, 1977.
- (3) Frazier, P. J., Leigh-Dugmore, F. A., Daniels, N. W. R., Russell Eggitt, P. W., Coppock, J. B. M.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 24, 421, 1973.
- (4) Freimuth, U., Ludwig, E., Heinig, R., Gebhardt, E.: *Nahrung*, 16, 149, 1972.
- (5) Galliard, T., Matthew, J. A.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 24, 623, 1973.
- (6) Lulai, E. C., Baker, C. W.: *Cereal Chem.*, 53, 777, 1976.
- (7) McDonald, C. E.: *Cereal Chem.*, 56, 84, 1979.
- (8) Proelss, H. F., Wright, B. W.: *Clin. Chem.*, 23, 522, 1977.
- (9) Surrey, K.: *Plant Physiol.*, 39, 65, 1964.
- (10) Tappel, A. L., Boyer, P. D., Lundberg, W. O.: *J. Biol. Chem.*, 199, 267, 1952.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПОКСИГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПШЕНИЦЫ

П. В. Санто — В. Л. Видязо и П. А. Дярфаш

Тканевые ферменты хлебных злаков играют важную роль в процессе переработки и хранения пшеницы. Липоксигеназа в пшенице положительно влияет на реологические свойства теста, действует на образование вкуса и запаха. Субстраты цис-цис-1,4 пентадиены, в процессе реакции в алиловом состоянии преобразуются в гидропероксид содержащий цис-транс-1,3-пентадиен. Липоксигеназную активность можно установить из возрастающей скорости УФ-абсорпций образующихся при этом сопряженных соединений с двойной связью.

В качестве субстрата авторы применяли линолевую кислоту, измерения проводили при комнатной температуре, при pH-6,9. Изменение экстинкции измеряли при 234 нм, спектрофотометром типа MOM Sp 195, в каждые 0,25 мин. Экстинкцию субстрата откорректировали. Так как линолевая кислота в случае некоторых липоксигеназ тормозит образование излишнего субстрата, определили концентрацию субстрата ($5,4 \cdot 10^{-5}$ моль йж-3) обеспечивающую самую высокую скорость реакции и на основании этого проводили измерение. Из линейного участка зависимости времени экстинкции расчетом регрессии в определенном уравнении коэффициента независимой-переменной, показывающей начальную скорость измерения экстинкции (АОД) (размер: АОД мин⁻¹), то есть ферментную активность. Единицей активности считали фермент, если он создавал изменение экстинкции 10^{-3} /мин. Ферментные активности отнесли к 1 г воздушно сухой пшенице. В случае соответствующего разжижения ферментных экстрактов (0,05–0,5%) скорость реакции пропорционально изменяется с концентрацией ферментного экстракта. Данный метод применяли для измерения активности липоксигеназы 2 сортов пшеницы урожая двух годов из идентичных производственных площадей.

BESTIMMUNG DER LIPOXYGENASEAKTIVITÄT VOM WEIZEN

V. P. — Szánthó; L. V. — Vígázó und A. P. — Gyárfás

Die Enzyme der Gewebe von Getreidepflanzen spielen während der Verarbeitung und Lagerung eine wichtige Rolle. Die in Weizen vorkommende Lipoxygenase beeinflusst vorteilhaft die rheologischen Eigenschaften des Teiges, und kann sogar in der Entwicklung der Geschmacksstoffe und Geruchsstoffe eine Rolle spielen. Die Substrate dieses Enzyms sind die cis-cis-1,4-Pentadiene, die während der Reaktion zu in einer Allyllage Hydroperoxid enthaltenden cis-trans-1,3-Pentadienen umgewandelt werden. Die Lipoxygenaseaktivität ist aus der Erhöhungsgeschwindigkeit der UV-Absorption der auf solche Weise gebildeten und eine konjugierte Doppelbindung enthaltenden Verbindungen bestimmbar.

Bei den Untersuchungen wurde Linolsäure als Substrat verwendet, und die Messungen wurden bei Raumtemperatur und bei pH 6,9 durchgeführt. Die Änderung der Extinktion wurde bei 234 nm mittels eines Spektrophotometers vom Typ MOM Sp 195 in Zeitintervallen von 0,25 Minuten gemessen, wobei die eigene Extinktion des Substrates als Korrektur berücksichtigt wurde. Nachdem die Linolsäure bei einigen Lipoxygenasen eine Verhinderung des Substratüberschusses verursacht, wurde zuerst die die höchste Reaktionsgeschwindigkeit sichernde Substratkonzentration ($5,4 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) bestimmt, und sodann wurden die Messungen bei dieser Konzentration durchgeführt. In der vom linearen Abschnitt der Funktion Extinktion-Zeit durch Regressionsberechnung ermittelten Gleichung ergibt der Koeffizient der unabhängigen Variable die Anfangsgeschwindigkeit der Extinktionsänderung (ΔOD) (Dimension: $\Delta OD \text{ min}^{-1}$) d. h. die Aktivität des Enzyms. Eine Extintionsänderung von 10^{-3} (Minute hervorruftendes Enzym wurde als ein Enzym von einheitlicher Aktivität betrachtet. Die Enzymaktivitäten wurden auf 1 g lufttrockenen Weizen bezogen. Bei entsprechenden Verdünnungen (0,05–0,5%) der Enzymextrakte veränderte sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Konzentration des Enzymextraktes proportionell. Die Methode wurde unter anderen in zwei Jahrgängen zur Messung der Lipoxygenaseaktivität von zwei von der gleichen Gewinnungsstelle erhaltenen Weizensorten verwendet.

DETERMINATION OF THE LIPOXYGENASE ACTIVITY OF WHEAT

V. P. – Szánthó, L. V. – Vigyázó and A. P. – Gyárfás

The enzymes of the tissues of cereals play an important role during the processing and storage of cereals. Lipoxygenase present in wheat influences favourably the rheological properties of pastes and it may play a role also in the formation of the flavouring and scent substances. Substrates of this enzyme are the cis-cis-1,4-pentadienes which are converted in the course of the reaction into cis-trans-1,3-pentadienes carrying hydroperoxide in allyl position. The activity of lipoxygenase can be determined from the rate of increase of the ultraviolet absorption of the compounds formed in this way which contain conjugated double bonds.

Linoleic acid served as a substrate, the measurements were carried out at room temperature at pH 6.9. Changes in the extinction values were observed at 234 nm by means of a spectrophotometer of MOM Sp 195 type, at intervals of 0.25 minute. The own extinction of the substrate was taken into account as correction value. Since linoleic acid causes in case of certain lipoxygenases an inhibition of excess substrate, the substrate concentration ensuring the highest reaction rate (5.4×10^{-5} mole dm⁻³) was previously determined and the measurements were carried out at this reaction rate. In the equation determined from the linear section of the curve of the extinction plotted against time by means of regression calculation the coefficient of the independent variable gives the initial rate (of a dimension: $\Delta OD \text{ min}^{-1}$) of the change of extinction (ΔOD) i. e. the actual enzyme activity. The enzyme possesses unit activity on producing 10^{-3} /minute of extinction change. Enzyme activities were referred to 1 g of air-dry wheat. In case of appropriate dilutions (0.05–0.5%) of the enzyme extracts the reaction rate varied proportionately to the concentration of the enzyme extract. The method has been applied already in two seasons for the measurement of the lipoxygenase activity of two wheat varieties originating from the same habitat.