

J. Grabska, L. Jędrychowski

Centrum Agrotechnologii i Weterynarii PAN Olsztyn

Metodyka oznaczania aktywności lipolitycznej nasion rzepaku

Wstęp

Oznaczanie i poznanie właściwości enzymów lipolitycznych nasion roślin oleistych pozwala na wyjaśnienie ich roli fizjologicznej podczas przechowywania i w czasie kiełkowania nasion. Prowadzone od ok. 9 lat w różnych ośrodkach (głównie amerykańskich) prace zmierzające do uzyskania czystej lipazy rzepaku, pozwoliły na scharakteryzowanie niektórych jej właściwości. Aktywność jej oznaczano głównie metodami kolorymetrycznymi (metoda mydeł miedziowych) lub fluorescencyjnymi. Murphy i wsp. (1989) zastosowali metodę immunologiczną ELISA do wykrywania obecności lipazy w suchych nasionach rzepaku i kukurydzy. Spośród dostępnych metod badania aktywności lipolitycznej na uwagę zasługują: metoda dyfuzyjna i metody ekstrakcyjne.

Celem pracy było porównanie metody dyfuzyjnej i metody ekstrakcyjnej oznaczania aktywności lipolitycznej nasion rzepaku.

Materiał i metody

Przedmiotem badań były ekstrakty enzymatyczne uzyskane z nasion rzepaku odmiany Bolko i Skrzyszowicki po 3, 4, 5 dniach kiełkowania. Suche nasiona moczone w wodzie przez 24 godziny, a następnie kiełkowane na wilgotnej bibule w zaciemnionym pomieszczeniu, w temperaturze pokojowej. Próby nasion pobierano co 24 godziny w ciągu 5 dni i sporządzano ekstrakty enzymatyczne, wg metody Lin Y-H. i A. H. C. Huang'a (1983) (schemat) i oznaczano w nich:

- zawartość białka — przez pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm, stosując jako wzorzec albuminę rzepaku rozpuszczoną w roztworze użytym do sporządzania ekstraktów enzymatycznych,
- aktywność lipolityczną — metodą dyfuzyjną wg Lawrence'a (1967) używając jako substratu 1% roztworu wodnego trójbutyryny z dodatkiem 0,01% tween'u

20. Emulsję przygotowywano bezpośrednio przed użyciem stosując mieszadło szybkoobrotowe typu ultraturrax (Janke & Kunkel IKA Labortechnik). Podłoże do hydrolizy przygotowywano dodając do 13 ml upłynnionego agaru 5 ml buforu oraz 2 ml emulsji trójbutyryny. Po energicznym wymieszaniu 1 ml roztworu wylewano na mikroskopowe szkiełko podstawowe o wymiarach 5 cm x 2 cm. Po zestaleniu się podłoża wycinano w nim studzienkę o średnicy 5 mm, do której наносzono 5 μ l ekstraktu enzymatycznego.

Inkubację prowadzono w temperaturze 30°C. Miarą aktywności lipolitycznej była średnica strefy rozjaśnienia podłoża, mierzona przy pomocy mikroskopu optycznego i wyrażona w mm lub przeliczona na zawartość białka (mm/mg białka).

Do badania wpływu pH substratu na aktywność lipolityczną stosowano bufony: octanowy – 0,1M o pH 4,5; tris-maleinowy 0,1M o pH od 5,5 do 8,5 i tris-HCl – 0,1M o pH 9,0.

Obserwując zmiany aktywności lipolitycznej w czasie 24 godzinnej inkubacji odczyty wykonywano co 2 godziny metodą ekstrakcyjno-miareczkową wg Deeth'a i wsp. (1975).

Substrat, emulsję zawierającą 10% oleju rzepakowego w 10% gumie arabskiej, przygotowywano przy użyciu mieszadła szybkoobrotowego typu ultraturrax. Mieszaninę reakcyjną, w której stosunek enzymu do substratu wynosił 1:2, inkubowano w temperaturze 30°C, a następnie 2-krotnie ekstrahowano frakcję tłuszczową i oznaczano w niej zawartość WKT metodą miareczkowania. Mieszaninę ekstrakcyjną stanowiły: izopropanol, hexan, 4N kwas siarkowy w stosunku 40:10:1v/v.

Miareczkowanie przy użyciu 0,01N KOH prowadzono za pomocą autobiurety ABU80 o pojemności 2,5 ml (firmy Radiometer). Wyniki wyrażano w μ gramorównoważnikach/ml ekstraktu enzymatycznego (μ równ./ml e.e.) lub w n równ./ mg białka.

Badając wpływ pH substratu na aktywność lipolityczną ekstraktów enzymatycznych, emulsję oleju rzepakowego przygotowywano w buforach: tris-maleinowym — 0,1M o pH od 5,5 do 8,5; glicynowym — 0,1M o pH 9,0 i 9,5.

Dynamikę zmian aktywności lipolitycznej obserwowano podczas 24 godzinnej inkubacji, wykonując pomiary co 4 godziny.

Obie metody badania aktywności lipolitycznej zastosowano do oznaczania aktywności lipaz rzepaku w czasie kiełkowania nasion odmian: Bolko i Skrzyszowicki.

Wyniki i wnioski

Dynamika zmian aktywności lipolitycznej w czasie 24 godzinnej inkubacji, mierzona proponowanymi metodami, świadczy o stałej szybkości reakcji podczas całego okresu inkubacji (współczynniki korelacji dla metody dyfuzyjnej 0,9753 i 0,9699 dla metody ekstrakcyjno-miareczkowej), co umożliwia dokonywanie badań

SCHEMAT BADANIA AKTYWNOŚCI LIPOLITYCZNEJ NASION RZEPAKU

NASIONA KIEŁKOWANE

EKSTRAKT ENZYMATYCZNY

{roztwór ekstrakcyjny: 0,6 M sacharozy, 1mM EDTA, 10 mM KCL, 1 mM MgCl₂,
2 mM DTT(ditiotreitol), 0,15 M trycyny}
stosunek roztworu ekstrakcyjnego do nasion: 15 ml + 3 g nasion

OZNACZENIA

ZAWARTOŚĆ BIAŁKA: absorbancja 280 nm; krzywa wzorcowa: albumina rzepaku w roztworze ekstrakcyjnym

AKTYWNOŚĆ LIPOLITYCZNA

METODA DYFUZYJNA WG LAWRENCE' A

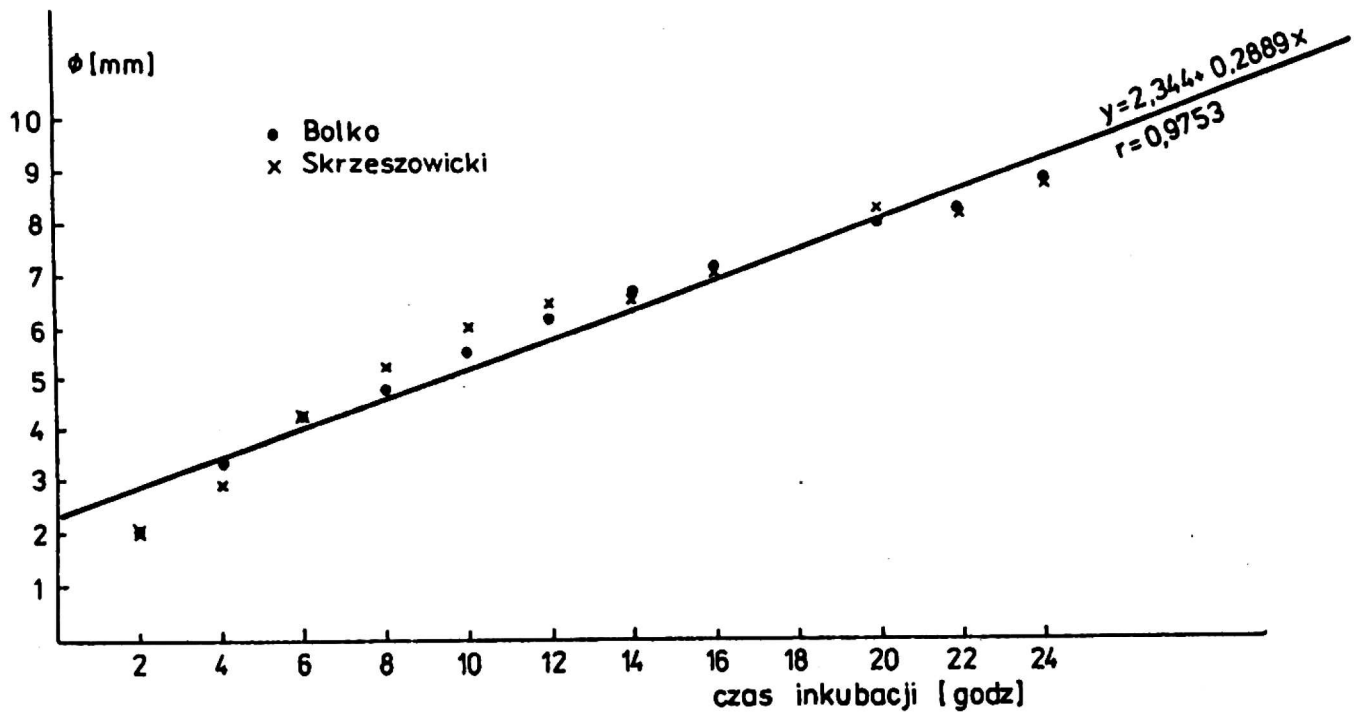
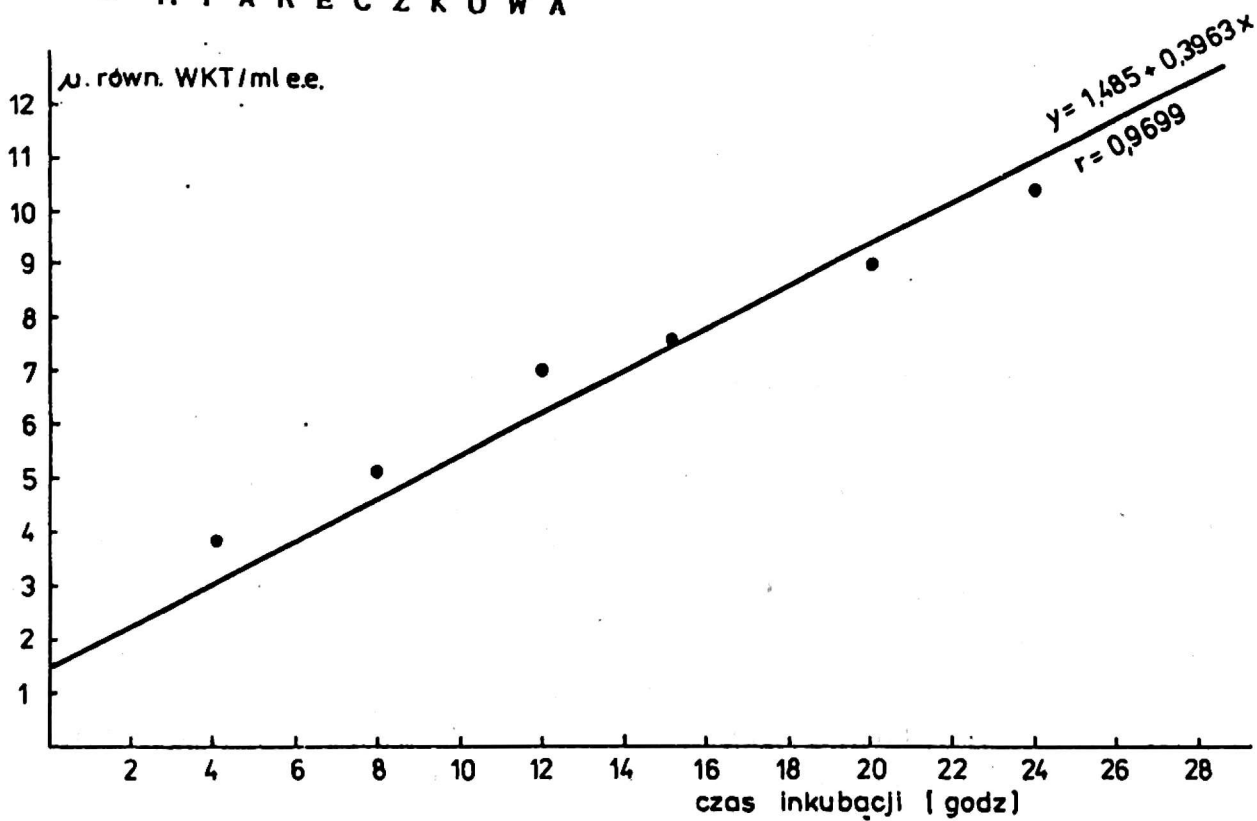
substrat: TC4; czas inkubacji: 16 godzin; temperatura inkubacji: 30°C; pH: 5,5; 8,5
wynik: średnica strefy lipolizy w mm

METODA EKSTRAKCYJNO-MIARECZKOWA WG DEETH' A I WSP.

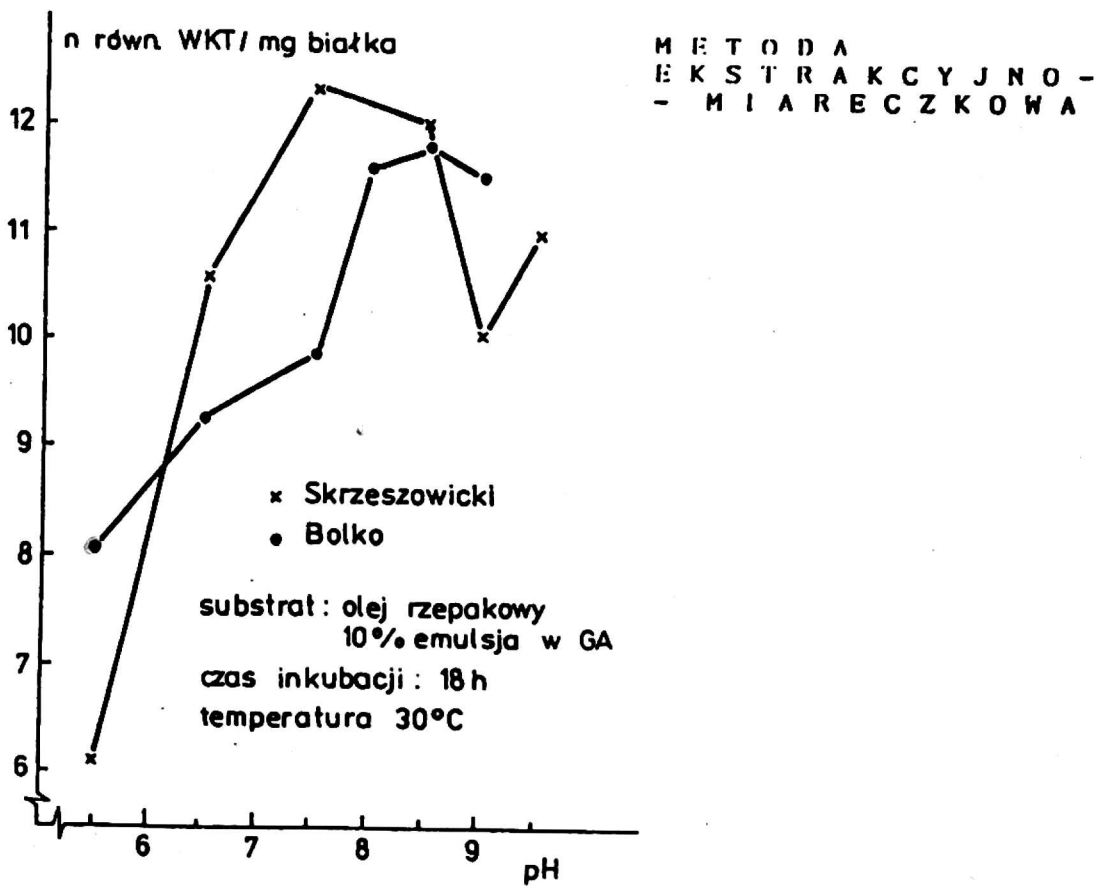
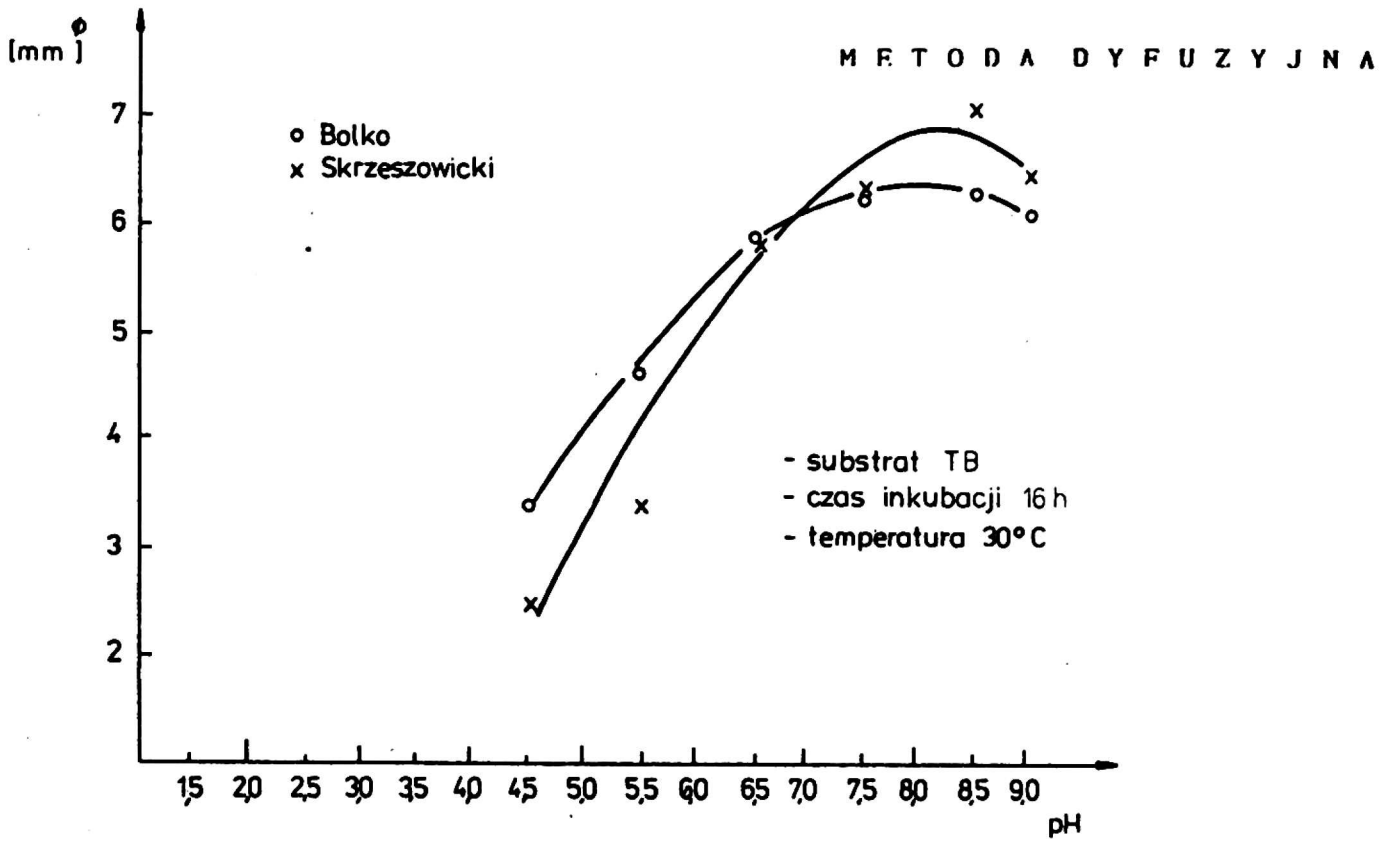
substrat: olej rzepakowy; czas inkubacji: 18 godzin; temperatura inkubacji: 30°C; pH: 8,5
wynik: μ gramorównoważniki WKT/ml ekstraktu enzym. lub n gramorównoważniki/mg białka

seryjnych w ciągu pierwszej doby inkubacji w odpowiednio wybranym (dowolnym) czasie (rysunek 1). Ekstrakty enzymatyczne uzyskane z nasion odmian: Bolko i Skrzyszowicki wykazują optimum aktywności lipolitycznej mierzonej metodą dyfuzyjną w pH 8,5, a metodą ekstrakcyjno-miareczkową odpowiednio w pH 8,5 i 7,5 (rysunek 2). Aktywność lipolityczna nasion rzepaku obu odmian, mierzona proponowanymi metodami, wzrasta gwałtownie w trzecim dniu kiełkowania nasion i rośnie w ciągu całego okresu kiełkowania (rysunek 3), przy czym współczynnik korelacji między stosowanymi metodami równy 0,8043 (łącznie dla obu odmian) świadczy o możliwości zastosowania dowolnie wybranej metody do badania aktywności lipolitycznej nasion rzepaku (rysunek 4).

M E T O D A D Y F U Z Y J N A

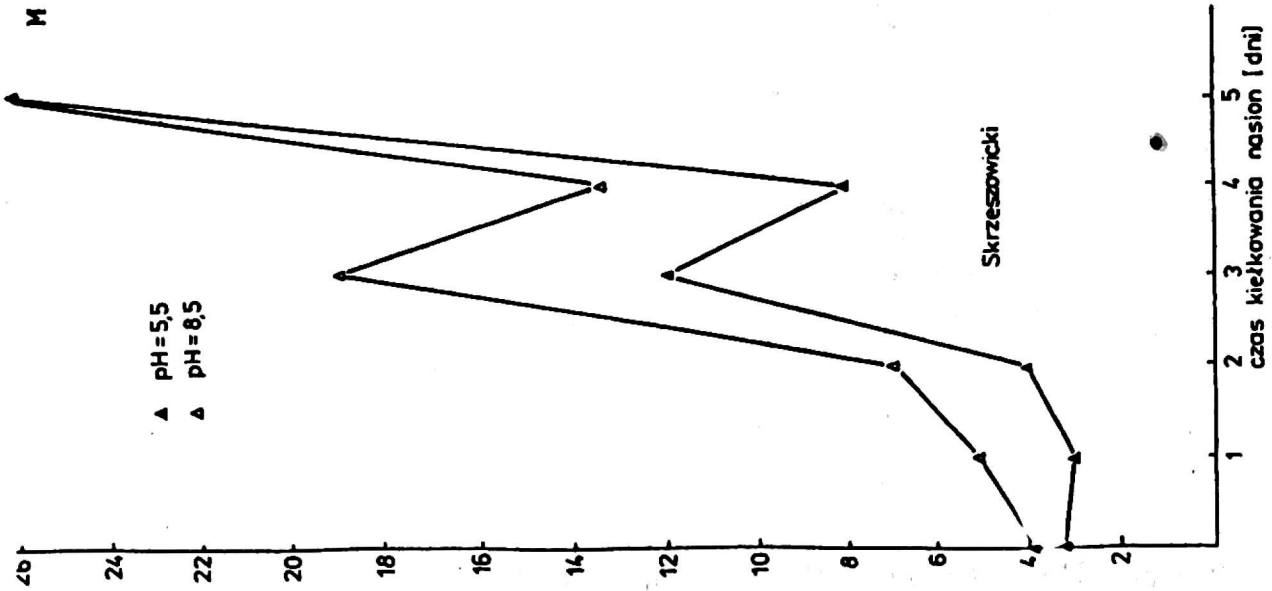
M E T O D A
E K S T R A K C Y J N O -
- M I A R E C Z K O W A

Rysunek 1. Dynamika zmian aktywności lipolitycznej podczas inkubacji

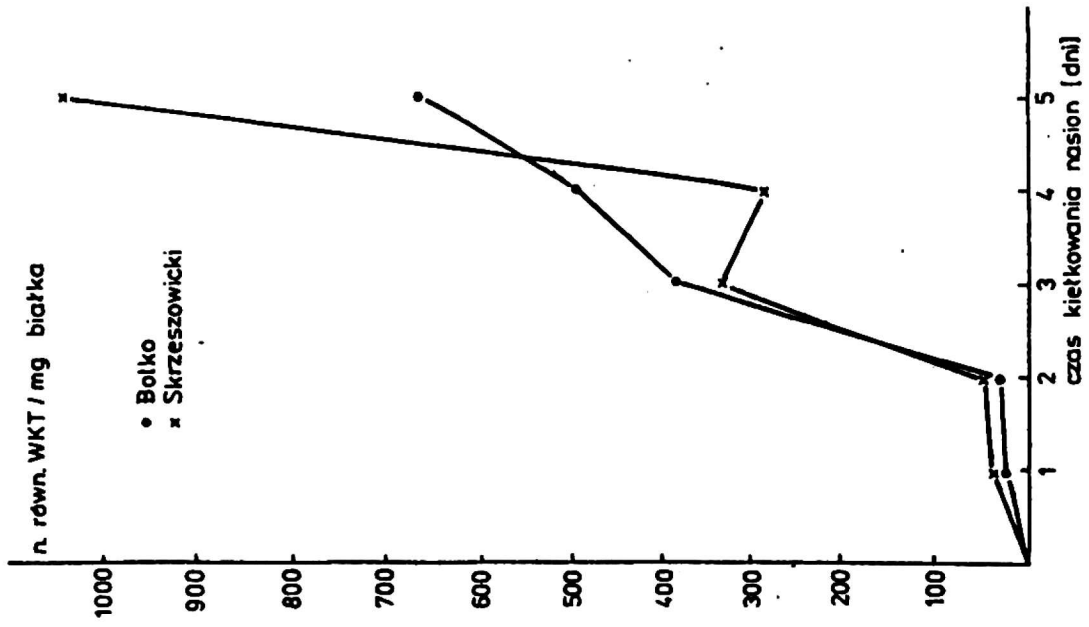


Rysunek 2. Wpływ pH substratu na aktywność lipolityczną

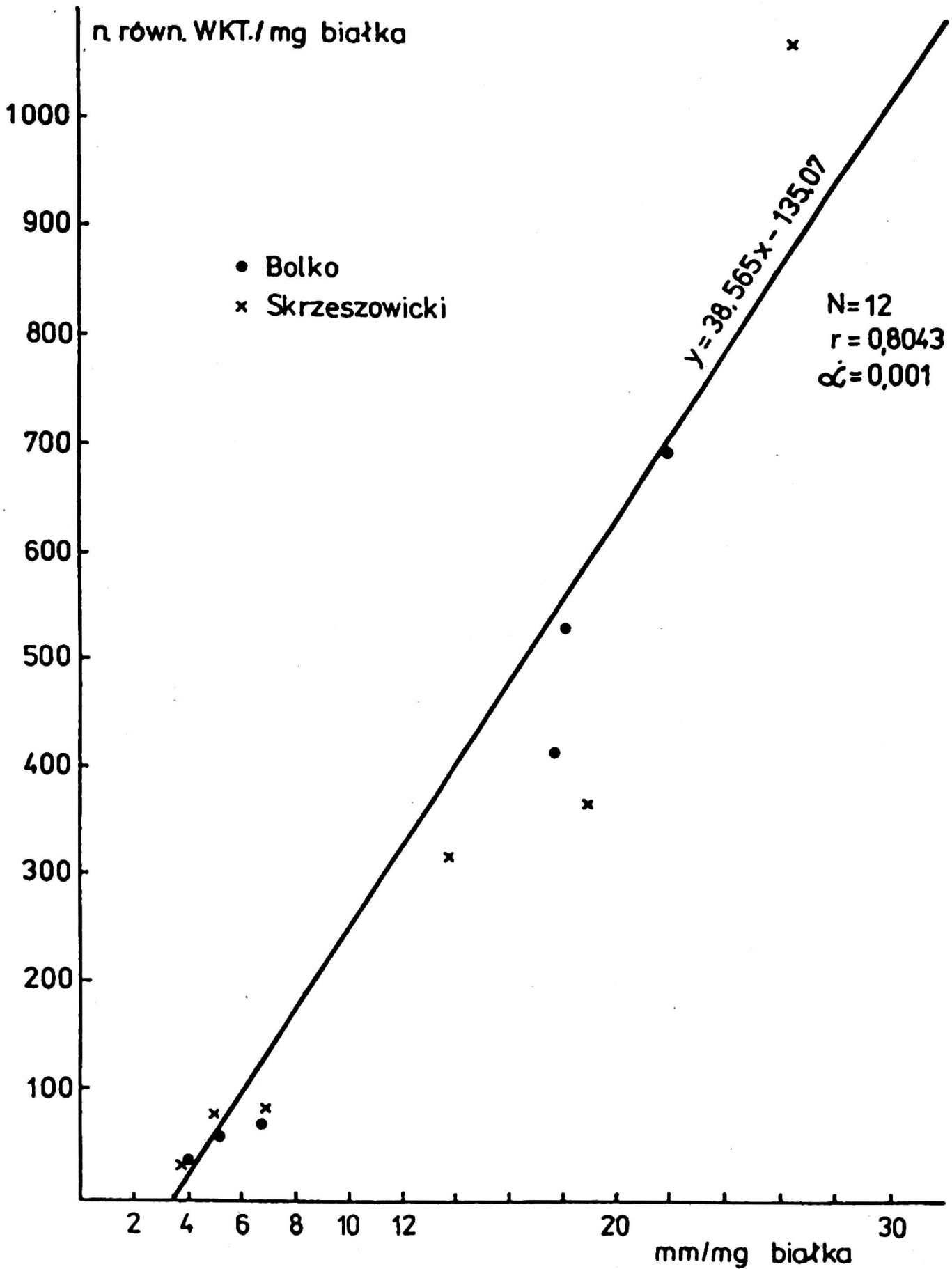
METODA DYFUZYJNA



METODA EKSTRAKCYJNO-MIARECZKOWA



Rysunek 3. Zmiany aktywności lipolitycznej podczas kiełkowania nasion rzepaku



Rysunek 4. Zależność między aktywnością lipolityczną oznaczaną metodą ekstrakcyjno-miareczkową oraz dyfuzyjną

- Deeth H. C., Fitz-Gerald C. H., Wood A. F. 1975. A Convenient Method for Determining the Extent of Lipolysis in Milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, September.
- Lawrence R. C., Fryer T. F., Reiter B. 1967. Rapid Method for the Quantitative Estimation of Microbial Lipases. *Nature*, March 25.
- Lin Yon-Hui, Huang H. C. 1983. Lipase in Lipid Bodies of Cotyledons of Rape and Mustard Seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 225.
- Murphy D. J., Cummins I., Kang A. S. 1989. Immunological Investigation of Lipases in Germinating Oilseed Rape, *Brassica napus*. *J. Sci. Food Agric.* 47.

Methodics of lipolytic activity estimation in the seed of oilseed rape
