

STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMU SUPEROXIDDISMUTASY POMOCÍ SOUPRAVY RANSOD V ROSTLINNÉM MATERIÁLU

NATÁLIE BŘEZINOVÁ BELCREDI^a, JAROSLAVA EHRENBARGEROVÁ^a, JAROSLAV PRÝMA^b
a PAVLA HAVLOVÁ^b

^a Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^b Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno
xbelcre0@node.mendelu.cz

Došlo 16.5.06, přijato 10.11.06.

Klíčová slova: superoxiddismutasa, enzym, Ransod, ječmen

Úvod

V poslední době se mnoho vědeckých výzkumů zabývá oxidačním stresem, čímž se rozumí zvýšená přítomnost reaktivních forem kyslíku či volných radikálů, které následně vedou k porušení buňky. Za normálních podmínek je tvorba reaktivních forem kyslíku v rovnováze s mechanismy vedoucími k jejich odstraňování. Tento systém se označuje jako scavengerový, tzn. zametačový, který zajišťuje, že reakce probíhají ve fyziologickém rozmezí a organismus tudíž neohrožují. Mezi nejdůležitější enzymové scavengery patří superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa a glutathionreduktasa¹.

Enzym superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) je zařazen do skupiny oxidoreduktas, jeho systematický název je superoxid/superoxid oxidoreduktasa² a byl objeven McCordem a Fridovichem jako vysoce aktivní obranný systém proti působení volných kyslíkových radikálů³. SOD katalyzuje dismutační reakci superoxidu a vodíku na méně reaktivní peroxid vodíku, který je dále odstraněn katalasami a peroxidasami^{1,4}. Uvedená spontánní reakce je při pH 7 velmi rychlá a přesto je urychlena tímto enzymem o další čtyři řády (rychlostní konstanta je pak $2 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (cit.⁵).

Superoxiddismutasa byla nalezena u téměř všech organismů, které poutají kyslík⁶, v některých aerotolerantních anaerobech⁷, obligátních anaerobech⁸ a rozeznávajíme tři druhy SOD lišící se kofaktorem, kterým je atom kovu (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+}). FeSOD a MnSOD jsou strukturně velmi podobné a mají podjednotky o molekulové hmotnosti 23 kDa. Obě formy SOD se vyskytují ve formě dimeru, ale MnSOD se vyskytuje i jako tetramer⁹ obsaže-

ný v mitochondriální matrix všech doposud studovaných rostlin na rozdíl od FeSOD, která je mnohem méně prostudovaná než MnSOD. FeSOD byla nalezena v chloroplastech u některých analyzovaných rostlinných druhů. CuZnSOD je enzym dimerické struktury o celkové molekulové hmotnosti 32 kDa, který byl identifikován v cytosolu a ve stromatu chloroplastu širokého spektra organismů¹⁰ a nebo v podobě tetrameru ve tkáních člověka².

Náš projekt se zabýval stanovením aktivity enzymu SOD v zrna ječmene, kde je lokalizován především v embryu a v menší míře je součástí i aleuronové vrstvy. Aktivita SOD v zrna ječmene se mění v závislosti na odrůdě a lokalitě pěstování^{11–13}. SOD hraje důležitou roli nejenom v zrna ječmene, ale také ve sladu, kde zabraňuje žluknutí během skladování, což se pozitivně může odrazet na výsledném produktu pivovarského průmyslu – na pivu. Vyšší aktivita SOD byla zjištěna ve sladu oproti zrna^{13–15}.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Mletí vzorků zrna bylo provedeno na laboratorním mlýnku Super Jolly SJ 500 (Mezos, Česká republika). Rmutování probíhalo ve rmutovacím přístroji (1-Cube, Česká republika), který je určen pro laboratoře pivovarů a sladoven ke stanovení extraktu sladu metodami KONGRES a HARTONG. Rmutovací přístroj je opatřen mikropočítačem, odporovým teploměrem Pt 100, elektromagnetickým ventilem pro automatické zchlazování rmutovací lázně, LCD dvouřádkovým displejem, membránovou klávesnicí a řídicím softwarem. Na stanovení absorbance byl použit UV spektrofotometr Cary 1E firmy Varian (USA) ve spojení s vyhřívacím nosičem na kyvety (Varian, USA). K měření byly použity UV kyvety (Varian, USA). Podmínky, při kterých byla absorbance naměřena, jsou uvedeny v tabulce I.

Chemikálie a jejich příprava

Souprava Ransod (RANDOX Laboratories Ltd., Velká Británie), jejíž součástí byl substrát, pufr, xanthinoxidasa a standard. Všechny chemikálie kromě pufru byly v soupravě Ransod v sypké formě. Složení jednotlivých složek soupravy je uvedeno v tabulce II.

Princip metody je založen na využití xanthinu a xanthinoxidasy, které vytvářejí superoxidový radikál, který

Tabulka I

Podmínky pro stanovení superoxiddismutasy

Parametr	Hodnota
Vlnová délka	505 nm
Kolona	1 cm optická délka
Teplota	37 °C
Měření	proti vzduchu

Tabulka II
Složení soupravy Ransod

Obsah	Koncentrace roztoků	Stabilita
1. Substrát		10 dní při teplotě 2–8 °C.
Xanthin	0,05 mmol l ⁻¹	
I.N.T.	0,025 mmol l ⁻¹	
2. Pufr		uvedeno na obalu pufru
CAPS	40 mmol l ⁻¹ , pH 10,2	
EDTA	0,94 mmol l ⁻¹	
3. Xanthinoxidasa	80 U/l	10 dní při teplotě 2–8 °C.
4. Standard	uvedeno vždy v příloženém letáku u soupravy	14 dní při teplotě 2–8 °C

reaguje s tetrazoliovou solí na červeně zbarvený formazán. Aktivita SOD je měřena stupněm inhibice této reakce, ke které dochází při teplotě 37 °C a absorbancí 505 nm.

Příprava soupravy Ransod:

- substrát – rozpuštěn ve 20 ml pufru,
- pufr – neupravuje se,
- xanthinoxidasa – rozpuštěna v 10 ml deionizované vody,
- standard – rozpuštěn v 10 ml deionizované vody.

Souprava Ransod je určena pro stanovení aktivity SOD ve vzorku krve.

Fosfátový pufr (RANDOX, Laboratories Ltd., Velká Británie) 0,01 mol l⁻¹, pH 7,0.

V ý b ě r v z o r k ů

Pro analýzy byly použity vzorky zrna sedmi odrůd a sedmi linií jarního ječmene (tab. III), které byly vypěstovány na Školním zemědělském podniku MZLU v Žabčicích v roce 2005. Po sklizni byly odebrány vzorky zrna čtyř odrůd sladovnického typu (Amulet, Kompakt, Krona, Tolar), tří *waxy* (voskové zrno) odrůd (Wabet, Wanubet, Washonubet) vyšlechtěných v Montaně (USA), které mají v endospermu změněný poměr amylosa/amylopektin ve prospěch amylopektinu. Dále bylo využito i zrno z vlastních linií, které vznikly křížením a selekcí odrůd sladovnických s *waxy* odrůdami. Soubor byl tedy

sestaven z geneticky odlišných genotypů, dala se tedy u nich předpokládat rozdílná aktivita sledovaného enzymu.

P r a c o v n í p o s t u p

Příprava vzorků zrna ječmene

Všechny vzorky byly rozemlety a homogenizovány. Do nádoby pro rmutování bylo naváženo 25 g vzorku zrna ječmene, které byly vystřeny 225 ml deionizované vody o teplotě 45 °C. Vzorky byly rmutovány 15 min při teplotě 45 °C ve rmutovacím přístroji metodou HARTONG. Po uplynutí této doby se vzorky samovolně nechaly chladit 30 min na teplotu 25 °C a minimálně jednu hodinu se filtrovaly. Takto upravené vzorky byly skladovány podle Bamforth¹¹ 18 h při teplotě 4 °C a zředěny 1:14 fosfátovým pufrem (0,01 mol l⁻¹, pH 7,0) tak, aby se procenta inhibované reakce pohybovala mezi 30–60 % inhibice na ose y kalibrační křivky.

Měření absorbance

Další příprava byla shodná jak pro připravené vzorky zrna, tak pro standardy S1–S6 (tab. IV). Do kyvety bylo napipetováno 0,05 ml vzorku a 1,7 ml substrátu. Směs byla opatrně promíchána, vložena do spektrofotometru a inkubována 2 min při 37 °C, poté bylo přidáno 0,25 ml xanthinoxidasy, která odstartovala reakci. První absorbance byla naměřena po 30 s (*A*₁) a druhá po třetí minutě (*A*₂).

Tabulka III
Seznam použitých linií a jejich zkratk

Waxy odrůdy	Použité označení	Pluchaté linie	Použité označení
Wabet	Wb	Kompakt x Krona	Ko x Kr
Wanubet	Wnb	Krona x Kompakt	Kr x Ko
Washonubet	Wsnb	Kompakt x Wabet	Ko x Wb
		Wabet x Kompakt	Wb x Ko
		Krona x Wanubet	Kr x Wnb
		Wanubet x Krona	Wnb x Kr
		Wabet x Washonubet	Wb x Wsnb

Tabulka IV
Ředění standardu k sestrojení kalibrační křivky

Ozn.	Objem standardu	Objem fosfátového pufru [ml]
S6	neředěný standard	–
S5	5 ml z S6	5
S4	5 ml z S5	5
S3	5 ml z S4	5
S2	3 ml z S3	6
S1 ^a	fosfátový pufr	–

^a Fosfátový pufr (S1) se rovná míra neinhibované reakce 100 %.

Výpočet aktivity

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \Delta A / \text{min. standardu nebo vzorku}$$

$$100 - \frac{\Delta A_{\text{standardu nebo vzorku}} / \text{min} \times 100}{\Delta A_{S1/\text{min}}} = \% \text{ inhibice}$$

A_1 – první absorbance naměřená po 30-ti sekundách, A_2 – druhá absorbance naměřená po 3. minutě.

Procenta inhibice byly vyneseny do grafu kalibrační křivky, kde byl odečten odpovídající logaritmus koncentrace při základu deset. Po odlogaritmování byla hodnota vynásobena ředícím koeficientem a tento výsledek uváděn v jednotkách U/ml. Přepočet výsledku na U/g sušiny:

$$\text{SOD U/ml} \times \frac{\text{objem vystřené vody}}{\text{navážka vzorku zrna}} \times \frac{100}{\% \text{ sušiny}} = \text{SOD U/g sušiny}$$

Validace metody

Kalibrační křivka

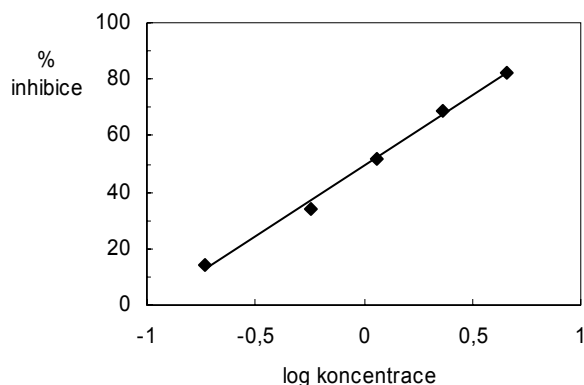
Standard byl připraven podle uvedené tabulky IV. Absorbance u připravených standardů S1–S6 byla naměřena stejným postupem jako u vzorků zrna. Tento postup je popsán výše. Do grafu byly vyneseny procenta inhibice proti $\log_{10}$ koncentrace standardů S1–S6 (obr. 1).

Linearita a citlivost

Kalibrační graf byl lineární s průměrným koeficientem determinace ($R = r^2$) $0,9906 \pm 0,0018$.

Opakovatelnost

Přesnost byla vypočítána z 50 naměřených hodnot pro vzorek zrna linie Krona x Kompakt. Kontrolní vzorek byl měřen při každé analýze vzorků v časovém období čtyř měsíců. Průměrná aktivita enzymu SOD uvedeného vzorku byla $(108,2 \pm 1,6)$ U/g sušiny.



Obr. 1. Kalibrační křivka; $y = 49,625x + 49,257$, $R^2 = 0,9945$

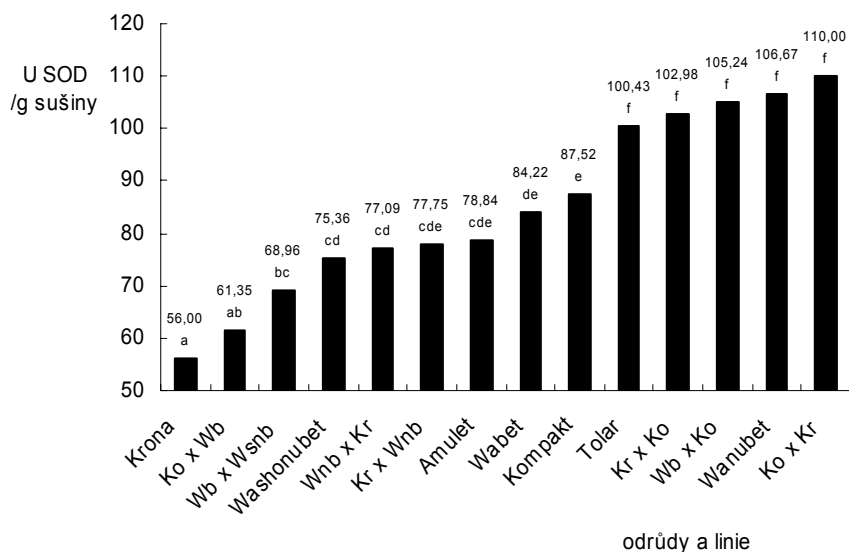
Statistické zpracování výsledků

Získané experimentální výsledky byly zpracovány pomocí programu UNISTAT 5.1. vícefaktorovou analýzou variance s následným testováním rozdílů průměrných hodnot LSD –testem ($P \leq 0,05$).

Výsledky a diskuse

Statisticky významně vyšší aktivita enzymu SOD (obr. 2) byla zjištěna u linií Ko x Kr (110 U/g sušiny), Wanubet (107 U/g sušiny), Wb x Ko (105 U/g sušiny), Kr x Ko (103 U/g sušiny) a také u sladovnické odrůdy Tolar (100 U/g sušiny) ve srovnání s dalšími devíti odrůdami a liniemi analyzovaného souboru. Odrůda Kompakt měla významně nižší aktivitu než již jmenované odrůdy, ale nelišila se významně od sladovnické odrůdy Amulet (79 U/g sušiny) a odrůdy Wabet (84 U/g sušiny), které nebyly statisticky významně rozdílné v porovnání s liniemi Kr x Wnb (78 U/g sušiny), Wnb x Kr (77 U/g sušiny) a odrůdou Washonubet (75 U/g sušiny). Sladovnická odrůda Krona (56 U/g sušiny) měla nejnižší aktivitu SOD, ale statisticky významně se nelišila od linie Ko x Wb (61 U/g sušiny).

Pomocí setu Ransod bylo možné stanovit aktivitu enzymu SOD ve vzorcích zrna ječmene po úpravě metodiky. Princip úpravy metodiky spočíval především v přípravě zrna ječmene, který byl naprosto odlišný od přípravy vzorků krve, pro který byla diagnostická souprava původně výrobcem určena. V postupu přípravy vzorků musel být vyřešen i poměr ředění fosfátovým pufrům tak, aby procenta inhibiční reakce bylo možné odečíst z grafu kalibrační křivky. Vzhledem k tomu, že se v této práci jednalo o stanovení enzymu s antioxidačním efektem, lze z uvedených výsledků předpokládat, že zrno odrůd s maximální aktivitou SOD bude vhodnou surovinou pro výrobu sladu,



Obr. 2. **Průměrná aktivita enzymu superoxiddismutasy v zrna ječmene;** odlišná písmena v grafu označují statisticky významně odlišné průměrné hodnoty při $P \leq 0,05$, Ko x Kr = Kompakt x Krona, Kr x Ko = Krona x Kompakt, Ko x Wb = Kompakt x Wabet, Wb x Ko = Wabet x Kompakt, Kr x Wnb = Krona x Wanubet, Wnb x Kr = Wanubet x Krona, Wb x Wsnb = Wabet x Washonubet

protože přítomnost enzymu v zrna a sladu zabráňuje nejen žluknutí během skladování, ale také nežádoucím příchutím piva^{12–16}. SOD obecně, v surovinách používaných jako potraviny a krmiva, má důležitý význam jako enzymový scavenger při vychytávání škodlivých volných radikálů v lidském i živočišném organismu².

Ze sladovnických odrůd české provenience vykazovala vysokou aktivitu SOD odrůda Tolar vyšlechtěná ve firmě Plant Select Hrubčice, dále tři linie vyšlechtěné na Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně a bezpluchá odrůda Wanubet americké provenience.

Závěr

Cílem této práce bylo přizpůsobení analytického postupu přípravy zrna pro stanovení enzymu SOD v ječmeni jarním pomocí diagnostického setu Ransod firmy RANDOX. Opakovatelnost metody byla stanovena u linie Krona x Kompakt, jejíž průměrná aktivita SOD byla $(108,2 \pm 1,6)$ U/g sušiny. Touto metodou jsme stanovili aktivitu SOD zrna sedmi odrůd a sedmi linií jarního ječmene sladovnické i nesladovnické kvality. Sledované vzorky měly aktivitu SOD v rozmezí 56–110 U/g sušiny. Nejnížší aktivita byla zjištěna u sladovnické odrůdy Krona. Statisticky významně vyšší aktivita byla zjištěna u pěti odrůd a linií, vesměs odlišného genetického původu, oproti dalším devíti genotypům v souboru. Pro použití na výrobu sladu se zvýšenou antioxidační kapacitou se jeví nejvhodnější česká sladovnická odrůda Tolar s aktivitou SOD 100 U/g sušiny. Ame-

rická odrůda Wabet a nově vyšlechtěné linie Kompakt x Krona, Wabet x Kompakt a Krona x Kompakt s aktivitou SOD 103–110 U/g sušiny budou vhodnými surovinami pro výrobu potravin či krmiv.

Diagnostický set Ransod, který byl popsán v této práci, lze spolehlivě použít pro stanovení aktivity SOD v zrna ječmene i ve sladu. Je však nutné přizpůsobit přípravu vzorků rostlinnému materiálu způsobem popsáným v této práci.

Práce vznikla za podpory grantu FRVŠ 420/2005/G4, VC 1M0570 a GA ČR 525/05/0781.

Seznamy symbolů

CAPS	3-(cyklohexylamino)propan-1-sulfonová kyselina
I.N.T.	5-fenyl-2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-2H-tetrazolium-chlorid
Ko x Kr	Kompakt x Krona
Ko x Wb	Kompakt x Wabet
Kr x Ko	Krona x Kompakt
Kr x Wnb	Krona x Wanubet
SOD	superoxiddismutasa
Wb	Wabet
Wb x Ko	Wabet x Kompakt
Wnb	Wanubet
Wb x Wsnb	Wabet x Washonubet
Wnb x Kr	Wanubet x Krona
Wsnb	Washonubet

LITERATURA

1. Škrha J.: *Remedia* 8, 362 (1998).
2. Fridovich I.: *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 58, 61 (1986).
3. McCord J. M., Fridovich I.: *J. Biol. Chem.* 244, 6049 (1969).
4. Hasan H. M., Fridovich I.: *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.* 4, 160 (1981).
5. Mališková J.: *Bakalářská práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2004.
6. McCord J. M., Keele B. B. Jr., Fridovich I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1024 (1971).
7. Tally F. P., Goldin B. R., Jacobus N. V., Gorbach S. L.: *Infect. Immun.* 16, 20 (1977).
8. Hewitt J., Morris J. G.: *FEBS Lett.* 50, 315 (1975).
9. Racek J., Holeček V.: *Chem. Listy* 93, 774 (1999).
10. Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D.: *Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 199 (1994).
11. Bamforth C. W.: *J. Inst. Brew.* 89, 420 (1983).
12. Havlová P.: *Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu*. ÚZPI, Praha, (1999).
13. Belcrediová N., Ehrenbergerová J., Havlová P.: *MendelNet'05 Agro., Brno, 29. listopad 2005*. Sborník abstraktů (Ryant P., Cerkal R., Středa T., Kapler P., Vejražka K., ed.), str. 19 (přednáška), (2005).
14. Boivin P., Allain D., Clamagirant V., Maillard M. N., Cuvelier M. E., Berset C., Richard H., Nicolas J., Forget-Richard F.: *24th Congress EBC: European Brewery Convention, Oslo, 1993*. Proceedings, str. 397, (1993).
15. Boivin P.: *Cerevisia* 26, 109 (2001).
16. Belcrediová N., Ehrenbergerová J., Havlová P.: *Acta Univ. Agric et Silv. Mendel. Brun.* 2, 7 (2006).

N. Belcrediová^a, J. Ehrenbergerová^a, J. Prýma^b, and P. Havlová^b (^a *Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*, ^b *Research Institute of Brewing and Malting, Brno*): **Analytical Determination of Superoxide Dismutase Enzyme in Plant Materials Using Ransod Set**

The activity of superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) in several barley grain samples was measured using a diagnostic Ransod set, which is utilized for determination of SOD in blood. The determination of SOD activity is based on inhibition of the reaction of xanthine and xanthine oxidase with a tetrazolium salt and measurement of absorbance of the produced formazane at 505 nm and 37 °C. The calibration curve was linear. The SOD activity of a Krona x Kompakt sample was (108.2±1.6) U/g dry matter. A significantly higher antioxidant activity was found in several samples, which are recommended for production of malt or food and fodder. The determination of SOD activity in barley and malt using the Ranson set is simple and reliable.