

Dagmara Mierzejewska, Ewa Kubicka, Lucjan Jędrychowski, Jadwiga Grabska
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk
Oddział Nauki o Żywności w Olsztynie

Zmiany aktywności i immunoreaktywności lipazy podczas przechowywania nasion rzepaku

Changes of specific activity and immunoreactivity of lipase during storage of rapeseed

Słowa kluczowe: lipaza, aktywność enzymatyczna, immunoreaktywność, rzepak, przechowywanie, wilgotność

Key words: lipase, enzymatic activity, immunoreactivity (ELISA), rapeseed, storage, moisture

Jakość frakcji tłuszczowej przechowywanych nasion rzepaku jest zależna od wielu czynników, między innymi od wilgotności przechowywanych nasion. W przeprowadzonym doświadczeniu badano zmiany aktywności i immunoreaktywności lipazy przechowywanych nasion rzepaku o wilgotności 6 i 10%. Stwierdzono, że w nasionach o wilgotności 10% aktywność lipazy ulegała większym zmianom niż w przypadku nasion o wilgotności 6% i zawierała się w przedziale od 18,73 do 55,85 J.A./mg białka. Immunoreaktywność lipazy przechowywanych nasion o wilgotności 10% zmieniała się w stosunkowo niskim zakresie od 4,55 do 9,68 mg białka immunoreaktywnego/ml ekstraktu w porównaniu z nasionami o wilgotności 6%, gdzie obserwowano zmiany immunoreaktywności w zakresie od 1,27 do 11,68 mg białka immunoreaktywnego/ml ekstraktu. Można stwierdzić, że wysokiej specyficznej aktywności lipazy nie odpowiadała wysoka immunoreaktywność enzymu podczas przechowywania nasion rzepaku o wilgotności zarówno 6% jak i 10%.

Lipid fraction quality of rapeseed stored is dependent on a number of factors including — among others — stored seeds moisture. In the experiment activity and immunoreactivity of lipase in stored rapeseed with moisture 6 and 10% was investigated. It was found that enzyme activity of stored rapeseed with 10% moisture content ranged to higher extent (from 18.73 to 55.85 A.U./mg protein) and contrary, enzyme immunoreactivity ranged to lesser extent (from 4.55 to 9.68 mg immunoreactive protein) as compared to rapeseed with 6% moisture content. It was found that high specific activity did not correspond with high immunoreactivity during storage of rapeseeds with either 6 or 10% moisture content.

Wstęp

Rzepak jest podstawowym surowcem przemysłu olejarskiego w Polsce. Około 40% masy rzepaku stanowi tłuszcz, a 38–43% białka. Wilgotność nasion rzepaku generalnie wynosi 8%. Skład frakcji tłuszczowej nasion rzepaku uzależniony jest od jego odmiany. Dominującymi kwasami tłuszczowymi w oleju rzepakowym są kwasy oleinowy (od 12 do 59%), linolowy oraz linolenowy (Shahidi 1990). W czasie przechowywania surowca skład chemiczny nasion rzepaku ulega zmianom. Na jakość frakcji tłuszczowej przechowywanych nasion rzepaku mogą wpływać natywne enzymy, jak lipazy (E.C.3.1.1.3) — hydrolazy trójacyloglicerolowe, których aktywność jest zależna między innymi od wilgotności przechowywanych nasion. Według Grzesiuka in. (1981) nawet w suchych nasionach rzepaku lipazy mogą być w pewnym stopniu aktywne.

Celem podjętych badań było określenie zmian aktywności enzymatycznej i immunoreaktywności lipazy przechowywanych nasion rzepaku o wilgotności 6 i 10%.

Material i metody

Material

Materiałem badanym były nasiona produkcyjne rzepaku ozimego Bolko — odmiany podwójnie uszlachetnionej.

Przechowywanie nasion rzepaku

Nasiona rzepaku po 24 godzinnej regulacji wilgotności do 6 i 10% przechowywano w zamkniętych pojemnikach (Meshehdani i in. 1990) w temperaturze 10°C.

Próby (w dwóch seriach) pobierano z przechowywanego materiału: kontrolną „0” po ustaleniu wilgotności i kolejno po 14, 21, 28, 42 i 56 dniu przechowywania.

Ekstrakcja lipazy

Ekstrakcję lipazy prowadzono według metody Lina i Huan'ga (Lin, Huan'g 1983). Do 2 g nasion dodawano 10 ml roztworu ekstrakcyjnego (TRIS-HCL, pH 7,0). Mieszaninę ekstrakcyjną rozdrabniano za pomocą UltraturaxuT-25 (IKA Labortechnik) przez 1,5 minuty, a następnie wirowano przy $10\,081 \times g$ przez 20 minut.

Oznaczanie aktywności lipazy

Aktywność enzymów lipolitycznych oznaczano metodą dyfuzyjną w zestawionym agarze według Lawrence'a (1967) stosując jako substrat tributuryloglicerol

TC 4:0 (SIGMA). Podłoża do hydrolizy przygotowywano dodając do upłynnionego agaru emulsję triacyloglicerolu oraz 100 mM bufor TRIS-maleinianowy, pH 8,0.

Mieszaninę agarową w ilości 1 ml rozlewano na mikroskopowe szkiełka podstawowe. Po wycięciu w zestalonym podłożu studzienek o średnicy 5 mm i naniesieniu na nie po 5 μ l ekstraktu enzymatycznego, płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 16 godzin. Miara aktywności lipolitycznej była wielkość strefy rozjaśnienia, mierzona przy pomocy mikroskopu optycznego. Za umowną jednostkę aktywności lipolitycznej (J.A.) przyjęto logarytmiczny przyrost strefy rozjaśnienia o 1 jednostkę w danych warunkach pomiaru (Lawrence 1967).

Oznaczenie zawartości białka

Zawartość białka w próbach oznaczono metodą Bradford (Bradford 1976). Do wyznaczenia krzywej standardowej jako białka wzorcowego użyto albuminy surowicy krwi wołowej BSA (Sigma, A 3350) w zakresie stężeń od 0 do 100 μ g/ml.

Oznaczanie immunoreaktywności lipazy metodą ‘competitive’ ELISA

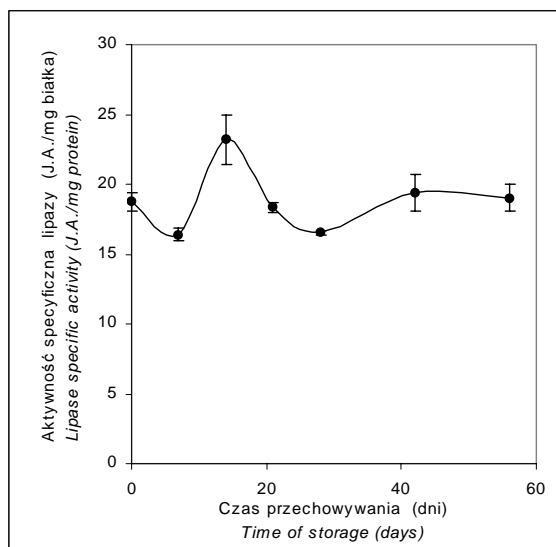
Mikropłytki (Maxi-sorb[®], NUNC) opłaszczano roztworem antygeny o stężeniu 10 μ g/ml, w 50mM buforze węglanowym o pH 9,8, w ilości 100 μ g/studzienkę i inkubowano 12–18 h w temperaturze 4°C. Następnie mikropłytki przemywano czterokrotnie 10 mM buforem fosforanowym o pH 7,4 z dodatkiem 0,5% Tween–20 (0,5% T/PBS). Miejsca niewysyczone antygenem blokowano 1,5% roztworem żelatyny (Sigma, G 9382) w 50 mM buforze węglanowym o pH 9,8, w ilości 150 μ l/studzienkę i inkubowano w temperaturze 25°C przez 30 min. Po przemyciu mikropłytek 0,5% T/PBS do studzienek podawano jednocześnie 50 μ l próby z antygenem oraz 50 μ l poliklonalnych przeciwciał króliczych przeciwko lipazie ciał tłuszczowych. Mikropłytki inkubowano 1 h w temperaturze 25°C i przemywano czterokrotnie buforem 0,5% T/PBS. Następnie dodawano roztwór koziej antykróliczej immunoglobuliny znaczonej peroksydazą chrzanową (Sigma, A 6154), w ilości 100 μ l/studzienkę. Mikropłytkę inkubowano 1 godzinę w temperaturze 25°C. Po przemyciu mikropłytki buforem 0,5% T/PBS dodawano 100 μ l/studzienkę roztworu o-fenylodiaminy (Sigma, P 8287). Płytkę inkubowano 30 min w temperaturze 25°C, po czym reakcję enzymatyczną zatrzymano dodając 4 M H₂SO₄. Absorbancję odczytywano dla długości fali $\lambda = 492$ nm. Analogicznie wykonywano krzywą wzorcową dla czystego antygeny.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie wykorzystując program komputerowy Immunofit[™] EIA/RIA firmy Beckman, dla przedziału ufności 0,05.

Wyniki i dyskusja

Przechowywanie nasion rzepaku o wilgotności 6%

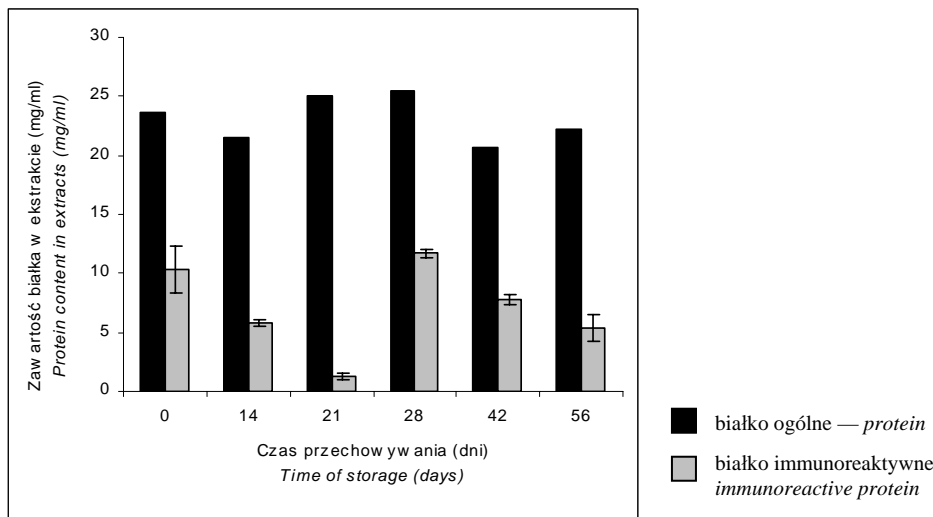
Podczas przechowywania nasion rzepaku o wilgotności 6% aktywność lipazy zmieniała się w zakresie od $16 \pm 0,50$ do $23 \pm 2,5$ J.A./mg białka (rys. 1). Stwierdzono, że maksymalną aktywność, $23 \pm 2,5$ J.A./mg białka, osiągnęła lipaza w 14 dniu przechowywania nasion. Najniższe poziomy aktywności zaobserwowano po 7 i 28 dniach przechowywania (odpowiednio $16 \pm 0,50$ i $16,4 \pm 0,10$ J.A./mg białka). Może to być związane ze zmianami biochemicznymi zachodzącymi w nasionach, co jednak należałoby potwierdzić dodatkowym doświadczeniem.



Rys. 1. Zmiany aktywności specyficznej lipazy podczas przechowywania nasion rzepaku o wilgotności 6% — *Changes of lipase specific activity in stored rapeseed with 6% moisture*

Równoległe do badań aktywności oznaczano immunoreaktywność frakcji lipazy ciał tłuszczowych (CT) w przechowywanych nasionach o wilgotności 6%. Stwierdzono istotne różnice immunoreaktywności tej frakcji w czasie przechowywania (rys. 2). Stwierdzono, że próba nasion rzepaku przechowywana 28 dni wykazuje maksymalną immunoreaktywność lipazy CT — $11,7 \pm 0,29$ $\mu\text{g/ml}$ ekstraktu enzymatycznego, czyli poziom bardzo zbliżony do próby kontrolnej, w której immunoreaktywność lipazy CT kształtowała się na poziomie $10 \pm 1,9$ $\mu\text{g/ml}$ ekstraktu enzymatycznego. Po 21 dniach przechowywania nasion obserwowano

znaczny spadek immunoreaktywności badanej frakcji białka aż do $1,3 \pm 0,48 \mu\text{g/ml}$ ekstraktu enzymatycznego. Może to świadczyć o dużej dynamice zmian immunoreaktywności jak i aktywności lipazy CT. Hipotezę tą należy potwierdzić przez analizę dodatkowych prób pobranych kolejno podczas 28 dni przechowywania.

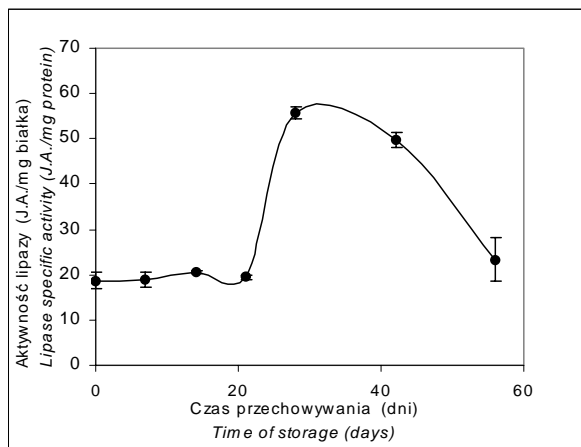


Rys. 2. Zawartość białka ogółem i białka immunoreaktywnego w ekstraktach z przechowywanych nasion rzepaku o wilgotności 6% — *Total and immunoreactive protein contents in extracts obtained from stored rapeseed with 6% moisture*

Powyższe analizy pozwoliły stwierdzić, że maksimum aktywności lipazy obserwowane po 14 dniu przechowywania odpowiada spadkowi immunoreaktywności lipazy CT, co może świadczyć o zmianach w budowie białka (ściśle jego epitopów).

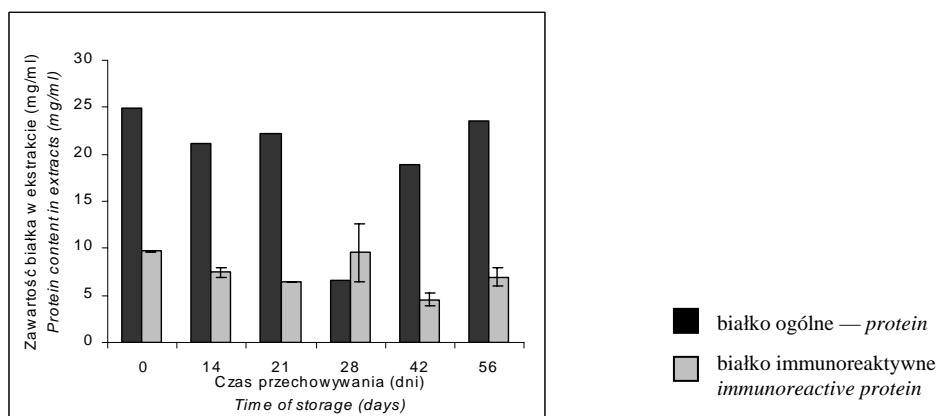
Przechowywanie nasion rzepaku o wilgotności 10%

Przechowywanie nasion rzepaku o wilgotności 10% powodowało, podobnie jak w omawianej wyżej grupie, zmiany aktywności specyficznej jak i zawartości immunoreaktywnej frakcji lipazy CT. Na rysunku 3 przedstawiono zależność aktywności specyficznej lipazy od czasu przechowywania. Stwierdzono, że przez pierwsze 21 dni aktywność nie ulegała znacznym zmianom i zawierała się w przedziale od $18 \pm 1,57 \text{ J.A./mg}$ białka do $20,5 \pm 0,47 \text{ J.A./mg}$ białka. Maksimum aktywności — $55 \pm 0,79 \text{ J.A./mg}$ białka — enzym osiągnął po 28 dniach przechowywania nasion. Dalsze magazynowanie surowca powodowało powolny spadek aktywności lipazy zawartej w nasionach do $23 \pm 6,77 \text{ J.A./mg}$ białka po 56 dniach.



Rys. 3. Zmiany aktywności specyficznej lipazy podczas przechowywania nasion rzepaku o wilgotności 10% — *Changes of lipase specific activity in stored rapeseed with 10% moisture*

Stwierdzono, że podczas przechowywania nasion o wilgotności 10% immunoreaktywność lipazy CT zawierała się w przedziale od $4 \pm 0,72$ do $9,7 \pm 0,065$ $\mu\text{g/ml}$ ekstraktu enzymatycznego i wykazywała tendencję malejącą w miarę wydłużania czasu przechowywania (rys. 4).



Rys. 4. Zawartość białka ogółem i białka immunoreaktywnego w ekstraktach z przechowywanych nasion rzepaku o wilgotności 10% — *Total and immunoreactive protein contents in extracts obtained from stored rapeseed with 10% moisture*

Przeprowadzone badania potwierdzają decydujący wpływ wilgotności i czasu przechowywanych nasion na aktywność enzymu i jego immunoreaktywność. Istotnie statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi grupami potwierdziła analiza statystyczna (dla $p < 0,05$).

W badaniach nad aktywnością natywnych lipaz roślin oleistych powszechnie stosuje się metody: miareczkową, kolorymetryczną i fluorescencyjną, zaś metody pozwalające na oznaczenie zawartości badanego enzymu lipolitycznego były dotychczas stosowane w niewielkim stopniu (Hills, Beevers 1987; Murphy i in. 1989). Uzyskane wyniki mogą świadczyć o skomplikowanym charakterze przemian enzymu, zachodzących zależnie od wilgotności przechowywanych nasion. Wysoka aktywność enzymu przechowywanych nasion rzepaku o wilgotności nasion 10%, przy jednoczesnej jego stosunkowo niskiej immunoreaktywności, może świadczyć o tym, że enzym posiada epitopy, które są niezależne od miejsc aktywnych enzymu.

Z kolei wysoka immunoreaktywność enzymu w porównaniu z zawartością białka ogółem (rys. 2, 4) może świadczyć o zawartości innych związków mogących wpływać na wynik oznaczenia immunologicznego lub o intensywnych przemianach zachodzących w obrębie epitopów lub ujawnieniu się nowych epitopów i zależności przemian od wilgotności nasion i czasu przechowywania. Enzym może tworzyć także aglomeraty z innymi białkami. Lipazy są rozpoznawane jako duże białkowe aglomeraty o masie cząsteczkowej 250 do 300 kDa (Weselake i in. 1989; O'Sullivan, Hills 1990; Huang i in. 1988), które w wyniku rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE wykazują pasma o masach cząsteczkowych 62, 64 (Fuchs, Hansen 1994) lub 65 kDa (Huang i in. 1988). Poprzez utworzenie takiego aglomeratu może następować zmiana immunoreaktywności enzymu, co z kolei może wpływać na oznaczenie immunometryczne.

Wnioski

Lipaza w nasionach o wilgotności 10% osiągnęła dwukrotnie wyższy poziom aktywności w porównaniu z nasionami o wilgotności 6%. Jej immunoreaktywność w przechowywanych nasionach rzepaku o wilgotności 6 i 10% kształtowała się w podobnych granicach osiągając po 56 dniach poziom około 6 μg immunoreaktywnej lipazy w 1 ml ekstraktu enzymatycznego.

Conclusions

Specific activity of lipase in stored rapeseed with moisture 10% was two-fold higher as compared to rapeseed with moisture 6%. The enzyme immunoreactivity in stored rapeseed with moisture 6 and 10% was similarly ranged and after 56-day storage it accounted for about 6 μg immunoreactive lipase/1 ml of enzymatic extract.

Literatura

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Fuschs C., Hansen G. 1994. Partial purification and some properties of *Brassica napus* lipase. *Z. Naturforsch.*, 49c: 293-301.
- Grzebiuk S., Kulka K. 1981. *Fizjologia i biochemia nasion*. PWRiL, Warszawa.
- Hills M.J., Beevers H. 1987. An antibody to the castor bean glyoxysomal lipase (62kDa) also binds to a 62kDa protein in extracts from many young oilseed plants. *Plant Physiol.*, 85: 1084-1088.
- Huang A.H.C., Lin Y-H., Wang S. 1988. Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65: 897-899.
- Shahidi F. 1990. Rapeseed and Canola: Global production and distribution. In: Shahidi F. *Canola and Rapeseed Production, chemistry, nutrition and processing technology*. Van Nostrand Reinhold, 3-13.
- Lawrance R.C., Fryer T.F., Reiter B. 1967. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature*, 3: 1264-1265.
- Lin Y-H., Huang A.H.C. 1983. Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.*, 225: 360-369.
- Murphy D.J., Cummins I., Kang A.S. 1989. Immunological investigation of lipases in germinating oilseed rape *Brassica napus*. *J. Sci. Food Agric.*, 47: 21-31.
- O'sullivan J., Hills M.J., Murphy D.J. 1990. Purification and properties of lipase from oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Proceedings of the Ninth International symposium on Plant Lipids*. Portland Press Limited, London: 313-315.
- Meshehdani T., Pokorny J., Davidek J., Panek J. 1990. Deactivation of lipoxygenase during rapeseed processing, *Corps Gras*, 37: 23-27.
- Weselake R.J., Thomson L.W., Tenaschuk D., Mac Kenzie S.L. 1989. Properties of solubilized microsomal lipase from germinating *Brassica napus*. *Plant Physiol.*, 91: 1303-1307.