

Ewa Kubicka, Lucjan Jędrzychowski

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk

Oddział Nauki o Żywności w Olsztynie

## Wpływ związków fenolowych ekstrahowanych z nasion dyni na aktywność natywnej lipooksygenazy

### Effect of phenolic compounds extracted from pumpkin seeds on native lipoxygenase activity

Słowa kluczowe: aktywność lipooksygenazy, związki fenolowe, nasiona dyni

Key words: lipoxygenase activity, phenolic compounds, pumpkin seeds

Ekstrakty lipooksygenazy z nasion dyni uzyskano stosując 10 różnych roztworów ekstrakcyjnych. Ekstrakty wykazywały zróżnicowaną aktywność specyficzną lipooksygenazy oraz charakteryzowały się zróżnicowaną zawartością związków fenolowych. Aktywność lipooksygenazy mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 234 nm. Względną zawartość związków fenolowych mierzono przy długości fali 280 i 320 nm i wyrażano jako stosunek  $OD_{320}/OD_{280}$ . Stabilność lipooksygenazy mierzono po 7 dniach przechowywania w  $-18^{\circ}\text{C}$ . Nie obserwowano inhibicyjnego wpływu związków fenolowych ekstrahowanych wraz z lipooksygenazą na aktywność enzymu.

Lipoxygenase extracts were obtained from pumpkin seeds using 10 selected extraction solutions. Extracts were characterized by varied specific activity of lipoxygenase and phenolic compounds content. Lipoxygenase was assayed spectrophotometrically at 234 nm wavelength. Relative phenolic compounds content was measured at 280 and 320 nm wavelength and expressed as the ratio  $OD_{320}/OD_{280}$ . Stability of lipoxygenase activity in crude extracts was determined after seven-day storage at temperature  $-18^{\circ}\text{C}$ . In our investigation we did not find the inhibitory effect of phenolic compounds extracted together with lipoxygenase on the enzyme activity.

## Wstęp

Lipooksygenaza (E.C. 1.13.11.12) katalizuje reakcje utleniania kwasów tłuszczowych zawierających strukturę *cis, cis* 1,4-pentadienową. W wyniku reakcji katalizowanej przez lipooksygenazę powstają wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych, które ulegają dalszym przemianom na drodze zarówno enzymatycznej, jak i nieenzymatycznej (Eskin i in. 1979). Wodoronadtlenki i produkty ich degradacji mogą wchodzić w interakcje z białkami, peptydami oraz aminokwasami. Produkty powstałe w wyniku reakcji katalizowanej przez lipooksygenazę

kształtują w sposób istotny cechy organoleptyczne produktu i powodują obniżenie jego wartości odżywczej (Gardner 1979).

Lipooksygenaza występuje powszechnie w królestwie roślinnym, a jej aktywności w nasionach roślin oleistych bogatych w wielonienasycone kwasy tłuszczowe będące substratem dla enzymu należy poświęcić szczególną uwagę. Nasiona roślin oleistych są znane z wysokiej zawartości związków fenolowych — głównie kwasów fenolowych (Sosulski 1979) uważanych za silne naturalne przeciwutleniacze, tak więc aktywność enzymu nasion roślin oleistych należałoby rozważać w kontekście tych związków. Przeciwiutleniające właściwości związków fenolowych są badane w sposób intensywny, a w wielu badaniach udowodniono, że mogą one wywierać inhibicyjny wpływ na lipooksygenazę (Macarone i in. 1995; Kohyama i in. 1997; Hayase, Kato 1984).

Z przeglądu literatury wynika, że wpływ związków fenolowych nasion dyni na aktywność natywnej lipooksygenazy nie został dotychczas zbadany.

Celem naszych badań było sprawdzenie czy ekstrahowane z dyni związki fenolowe razem z lipooksygenazą wykazują inhibicyjny wpływ na aktywność enzymu.

## Material i metody

---

### Material

Nasiona dyni pochodziły Centrali Nasiennej w Olsztynie. Nasiona zostały obłuskane i odtłuszczone zimnym acetonem ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).

### Ekstrakty enzymatyczne

Ekstrakty enzymatyczne przygotowano z materiału odtłuszczonego acetonem stosując następujące mieszaniny ekstrakcyjne w stosunku 1:10 (w/v) (Gambor, Zalik 1958; Leoni i in. 1991; Price 1993; Khalyafa i in. 1990):

Mieszanina ekstrakcyjna:

- 1a 0,2 M bufor fosforanowy, pH 7,0 z dodatkiem 1% (w/v) BSA (albuminy surowicy krwi wołowej), 1% (w/v) PVP (poliwinylopirolidyny), 1% (v/v) Tritonu X-100
- 2a 0,2 M bufor fosforanowy o pH 7,0 z dodatkiem 1% (w/v) BSA, 1% (w/v) PVP, 1% (v/v) Tritonu X-100, 0,01 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
- 3a 0,2 M bufor fosforanowy, pH 7,0 z dodatkiem 0,01 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
- 4a 0,2 M bufor fosforanowy, pH 7,0 z dodatkiem 0,01 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 1% (v/v) Tritonu X-100

- 5a 0,2 M bufor fosforanowy, pH 7,0
- 1b 0,2 M bufor octanowy, pH 5,0 z dodatkiem 1% (w/v) BSA, 1% (w/v) PVP, 1% (v/v) Tritonu X-100
- 2b 0,2 M bufor octanowy, pH 5,0 z dodatkiem 1% (w/v) BSA, 1% (w/v) PVP, 1% (v/v) Tritonu X-100, 0,01 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>
- 3b 0,2 M bufor octanowy, pH 5,0 z dodatkiem 0,01 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>
- 4b 0,2 M bufor octanowy, pH 5,0 z dodatkiem 0,01 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1% (v/v) Tritonu X-100
- 5b 0,2 M bufor octanowy, pH 5,0

Ekstrakcję prowadzono przez okres 1 godziny w temperaturze 0–4°C z mieszaniem w odstępach 10 minutowych. Następnie mieszaninę wirowano przy 24 000 x g przez 20 minut. W uzyskanym supernatancie stanowiący surowy ekstrakt mierzono aktywność lipooksygenazy. Kolejnego pomiaru aktywności dokonano po tygodniu przechowywania surowych ekstraktów w atmosferze azotu w temperaturze –18°C.

### Zawartość związków fenolowych

Względna zawartość związków fenolowych została oznaczona przez pomiar gęstości optycznych przy długości fali 280 i 320 nm (spektrofotometr DU 7500, firmy Beckman). Wyniki wyrażono jako stosunek gęstości optycznej zmierzonej przy długości fali 320 nm do gęstości optycznej zmierzonej przy długości fali 280 nm ( $OD_{320}/OD_{280}$ ).

### Oznaczenie zawartości białka

Zawartość białka w surowych ekstraktach oznaczono metodą Bradforda (Bradford 1976). Do wyznaczenia krzywej standardowej jako białka wzorcowego użyto albuminy surowicy krwi wołowej BSA (Sigma) w zakresie stężeń od 0 do 100 µg/ml.

### Oznaczenie aktywności lipooksygenazy

Oznaczenie aktywności lipooksygenazy poprzedzono przygotowaniem emulsji substratu i mieszaniny reakcyjnej.

Emulsja kwasu linolowego (substrat) została przygotowana metodą Surrey'a (1964) w modyfikacji Shiiba'y i in. (1991) w atmosferze azotu z 0,1 ml kwasu *cis*, *cis*-9,12-oktadekadienowego, 2,5 ml 0,05 M buforu octanowego pH 7,0, 0,12 ml Tween 20 i 0,32 ml 1,0 M roztworu NaOH. Po sporządzeniu emulsji jej objętość była uzupełniana do 50 ml 0,05 M buforem octanowym, pH 7,0.

Mieszanina reakcyjna zawierała 2,5 ml buforu octanowego pH 5,0, 0,09 ml emulsji substratu i 0,01 ml surowego ekstraktu. Aktywność lipooksygenazy oznaczono spektrofotometrycznie przy długości fali 234 nm w temperaturze 25°C według metody Zimmermana i Vick'a (Zimmerman, Vick 1970). Za jednostkę aktywności enzymu przyjęto taką ilość enzymu, która powodowała przyrost absorbancji o jedną jednostkę w czasie jednej minuty. Wyniki podano w przeliczeniu na aktywność specyficzną lipooksygenazy (J.A./mg białka).

## Wyniki i dyskusja

---

Stosując wybrane mieszaniny ekstrakcyjne uzyskano ekstrakty o zróżnicowanej aktywności specyficjnej lipooksygenazy od  $0,22 \pm 0,016$  (mieszanina 3b) do  $6,33 \pm 0,097$  (mieszanina 4b) J.A./mg białka (tab. 1). Uzyskane ekstrakty enzymatyczne charakteryzowały się zróżnicowaną stabilnością enzymu podczas przechowywania (tab. 1). Względna zawartość związków fenolowych wyrażona jako  $OD_{320}/OD_{280}$  była także zróżnicowana w ekstraktach. Najniższą względną zawartość związków fenolowych ( $OD_{320}/OD_{280} = 0,22$ ) wykazywał ekstrakt 5b, natomiast najwyższą ( $OD_{320}/OD_{280} = 0,56$ ) ekstrakt 4b (tab. 2). Stosując analizę metodą regresji stwierdzono statystycznie istotną ( $R = 0,8583$ ,  $\alpha = 0,01$ ) zależność między aktywnością specyficzną lipooksygenazy a wartością  $OD_{320}/OD_{280}$  (rys. 1). Ekstrakty o wysokiej aktywności specyficjnej lipooksygenazy charakteryzowały się wysoką względną zawartością związków fenolowych, a te o niskiej aktywności enzymatycznej charakteryzowały się niską względną zawartością związków fenolowych, tak więc nie stwierdzono inhibicji specyficjnej aktywności lipooksygenazy przez natywne związki fenolowe ekstrahowane wraz z enzymem. Aktywność lipooksygenazy w ekstraktach uzyskanych wydaje się być raczej zależna od czynników chemicznych niż od związków fenolowych. Uzyskane wyniki mogą jednakże sugerować wpływ związków fenolowych na aktywność enzymu, ponieważ najwyższy spadek aktywności specyficjnej lipooksygenazy podczas przechowywania obserwowano w ekstrakcie enzymatycznym charakteryzującym się wysoką zawartością związków fenolowych (4b). Uzyskane w powyższych badaniach wyniki nie są zgodne z wcześniej uzyskanymi wynikami dotyczącymi związku między zawartością związków fenolowych i aktywnością natywnej lipooksygenazy nasion słonecznika (Kubicka i in. 1999).

Tabela 1

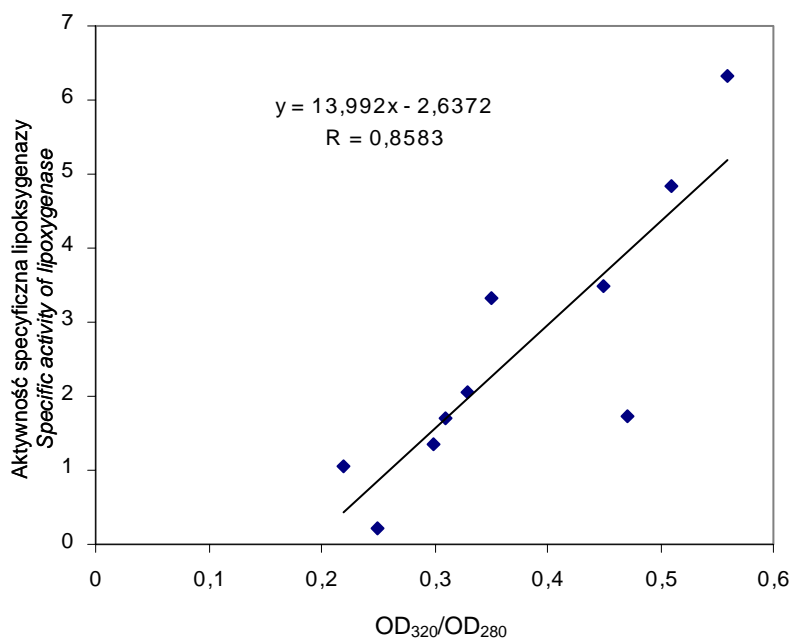
Specyficzna aktywność lipooksygenazy w surowych ekstraktach enzymatycznych z nasion dyni po ekstrakcji i po 7 dniach przechowywania w temperaturze  $-18^{\circ}\text{C}$  — *Lipoxygenase specific activity in crude extracts from pumpkin seeds after extraction and after seven-day storage in temperature  $-18^{\circ}\text{C}$*

Mieszanka ekstrakcyjna <i>Extraction mixture</i>	Aktywność specyficzna lipooksygenazy [J.A./mg protein] <i>Specific activity of lipoxygenase [A.U./ mg protein]</i>	
	po ekstrakcji — <i>after extraction</i>	po 7 dniach przechowywania <i>after seven-day storage</i>
1a	$2,06 \pm 0,070$	$1,61 \pm 0,074$
2a	$3,33 \pm 0,210$	$3,08 \pm 0,0748$
3a	$1,36 \pm 0,166$	$2,09 \pm 0,029$
4a	$4,84 \pm 0,133$	$5,09 \pm 0,190$
5a	$1,70 \pm 0,070$	$1,59 \pm 0,071$
1b	$1,72 \pm 0,074$	$1,04 \pm 0,127$
2b	$3,48 \pm 0,307$	$2,48 \pm 0,210$
3b	$0,22 \pm 0,016$	$1,61 \pm 0,106$
4b	$6,33 \pm 0,097$	$0,71 \pm 0,045$
5b	$1,06 \pm 0,073$	$0,31 \pm 0,048$

Tabela 2

Gęstość optyczna przy długości fali 280 nm i 320 nm oraz stosunek  $\text{OD}_{320}/\text{OD}_{280}$  surowych ekstraktów enzymatycznych — *Optical densities at 280 and 320 nm and  $\text{OD}_{320}/\text{OD}_{280}$  ratio for crude extracts*

Mieszanka ekstrakcyjna <i>Extraction mixture</i>	$\text{OD}_{280}$	$\text{OD}_{320}$	$\text{OD}_{320}/\text{OD}_{280}$
1a	$29,39 \pm 0,859$	$9,67 \pm 0,097$	0,33
2a	$30,26 \pm 1,614$	$10,51 \pm 0,186$	0,35
3a	$25,01 \pm 0,528$	$7,45 \pm 0,230$	0,30
4a	$54,68 \pm 0,749$	$27,65 \pm 0,426$	0,51
5a	$22,77 \pm 0,484$	$7,02 \pm 0,187$	0,31
1b	$18,40 \pm 1,165$	$8,73 \pm 0,541$	0,47
2b	$24,19 \pm 1,323$	$10,98 \pm 0,906$	0,45
3b	$12,93 \pm 0,194$	$3,24 \pm 0,033$	0,25
4b	$35,03 \pm 1,265$	$19,53 \pm 0,538$	0,56
5b	$10,51 \pm 0,266$	$2,32 \pm 0,033$	0,22



Rys. 1. Zależność między aktywnością specyficzną lipooksygenazy w surowych ekstraktach enzymatycznych po ekstrakcji i zawartością związków fenolowych — *Relationship between specific activity of lipoxygenase in crude extracts after extraction and relative content of phenolic compounds*

Przeciwutleniające właściwości związków fenolowych były przedmiotem licznych badań. Obserwowano inhibicję lipooksygenazy nasion soi przez związki przeciwutleniające (Macarone i in. 1995). Wykazano, że ekstrakt zawierający związki fenolowe z oliwek wykazywał silnie inhibicyjny wpływ na lipooksygenazę (Kohyama i in. 1997), a aktywność częściowo oczyszczonej lipooksygenazy nasion soi była hamowana przez związki fenolowe ekstrahowane z grochu i soi (dane niepublikowane).

## Wnioski

Związki fenolowe ekstrahowane z nasion dyni wraz z enzymem nie wywierają inhibicyjnego wpływu na enzym. Aktywność lipooksygenazy wydaje się być raczej zależna od składu chemicznego roztworów ekstrakcyjnych.

## Conclusions

---

Phenolic compounds extracted from pumpkin seeds together with the enzyme do not effect the activity of the enzyme in inhibitory way. The lipoxygenase activity appears to be dependent rather on chemical reagents used in extraction mixtures than on phenolic compounds.

## Literatura

---

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Eskin N.A.M., Grossman S., Pinsky A. 1977. Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 9: 1-40.
- Gamborg O.L., Zalik S. 1958. Studies on a lipoxydase system from sunflower seeds and seedlings. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 36: 1149-1157.
- Gardner H.W. 1979. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: A review. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 220-229.
- Hayase F., Kato H. 1984. Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30: 37-46.
- Khalyafa A., Kermasha S., All I. 1990. Partial Purification and Characterization of Lipoxygenase of Canola Seed (*Brassica napus* var. Westar), *J. Agric. Food Chem.*, 38: 2003-2008.
- Kohoyama N., Nagata T., Fujimoto S., Sekiya K. 1997. Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3, 4-dihydroxyphenyl) ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61: 347-350.
- Kubicka E., Jędrychowski L., Amarowicz R. 1999. Effect of phenolic compounds extracted from sunflower seeds on native lipoxygenase activity. *Grasas y Aceites*, 50: 127-130.
- Leoni O., Iori R., Palmieri S. 1985. Purification and properties of lipoxygenase in germinating sunflower seeds. *J. Food Sci.*, 50: 88-92.
- Maccarrone M., Veldink G.A., Vliegthart J.F.G., Agrb A.F. 1995. Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by chain-breaking antioxidants. *Lipids*, 30: 51-54.
- Price N.C. 1993. Techniques for Enzyme Extraction. In: *Enzyme Assay. A Practical Approach*, pp. 255-275. R. Eienthal and J. Michael (Ed.). IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Shiiba K., Negishi Y., Okada K., Nagao S. 1991. Purification and characterization of lipoxygenase isozymes from wheat germ. *Cereal Chemistry*, 68: 115-122.
- Sosulski F.W. 1979. Organoleptic and Nutritional Effects of Phenolic Compounds on Oilseed Protein Products : A Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56: 711-715.
- Surrey K. 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxydase activity. *Plant Physiol.*, 30: 65-70.
- Zimmerman N.D., Vick B.A. 1970. Hydroperoxide isomerase. A new enzyme in lipid metabolism. *Plant Physiol.*, 46: 445-453.