

GREEN MASS OF BARLEY PLANTS AS A SOURCE ANTIOXIDANT ENZYMES

ZELENÁ HMOTA ROSTLIN JEČMENE JAKO ZDROJ ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ

Kopáček J., Ehrenbergerová J., Macuchová S.

Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: kope@email.cz, ehren@mendelu.cz, macuchova.s@seznam.cz

ABSTRACT

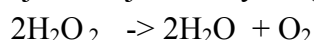
The topic of this study consisted in chemist research of green parts of young barley plants in the different growth phases, in light of enzyme catalase activity. The aim of our work was to choose the optimal material of barley for growing and subsequent processing. We dealt with problems of machine-made harvest of green matter. In the organism, enzyme catalase protects cells against the toxic effect of a higher concentration of hydrogen peroxide by cleaving to water and oxygen. On our three-year research we evaluated activity of enzyme catalase in barley grass. We used spring two-row barley varieties *Sebastian*, *Malz* and the line *KM1910*, grown in 2005-2007 in plots of MUA F in Žabčice and Agrotest Kroměříž, under restricted chemical inputs. Analytical determination of enzyme catalase were carried out in two samplings. Barley green matter was taken in defined growth phases, as described by the decimal code (DC) scale: sampling I at growth phase DC29 and sampling II at phase DC31. In the year 2006 juice was made from the biomass of the variety *Sebastian* (DC31, Žabčice). Then the obtained product (juice) was analyzed. To determine the activity of catalase enzyme we used the photometric method based on measurement of the decrease in absorbance at hydrogen peroxide cleaving, the difference measured for a time unit is a measure of catalase activity. Mentioned analyses we performed in the Brewing and Malting Research Institute in Brno. Catalase activity is expressed in $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ dry matter. Samplings, localities and years had very highly significantly effect on catalase activity. No significant effect was found in average catalase activity between the line *KM1910* ($718 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) and variety *Sebastian* ($684 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$), but variety *Malz* showed significantly lower rate ($631 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$). Average values (involving all factors) obtained from single localities embodied no statistically significantly difference. Green matter from sampling I– DC29 had significantly higher activity of catalase ($854 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) than sampling II– DC31 ($503 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$).

Key words: green barley, green matter, barley grass, catalase, antioxidants

ÚVOD

Mladé zelené části rostlin charakterizuje obecně zvýšený obsah některých vitaminů a provitaminů, zajímavý je zejména zvýšený podíl vitamínu E, C a karotenoidů, s prokázanou antioxidační účinností. Jsou ovšem také bohatým zdrojem mnoha významných enzymů, z nichž jsou ceněny zvláště superoxid dismutasa (SOD) a katalasa (CAT).

Enzym katalasa patří do skupiny oxidoreduktas (Zehnálek, 2003). Katalasa (EC 1.11.1.6) je heminový protein obsahující v prostetické skupině čtyři ferriprotoporfyrinové zbytky, pevně vázané na bílkovinu (Bergmeyer, 1970). Zajišťuje štěpení pro buňky škodlivého peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Byl izolován z rostlinných, živočišných materiálů i mikroorganismů a je jedním z neaktivnějších enzymů (Havlová, 1999).



Jedná se o tetramerní hemoprotein o molekulové hmotnosti 240 kDa, obsahující 4 molekuly NADPH. Nejvyšší aktivitu v lidském těle vykazuje v mitochondriích a peroxizomech hepatocytů a v cytoplazmě enterocytů. V organismu chrání buňky před toxickým vlivem vyšší koncentrace peroxidu vodíku a to odstraňováním peroxidu vodíku produkovaného v peroxizomech oxidasami při beta-oxidaci mastných kyselin, glyoxalátového cyklu nebo při katabolismu purinů. Katalyzuje přímý rozpad peroxidu vodíku nebo oxidaci některých substrátů peroxidem vodíku (Piterková, 2005). Inhibitory katalázy jsou H_2S , HCN , CO , NaN , Cu^{2+} , Pb^{2+} , HCOOH . Optimální pH pro činnost katalasy je 6,8-7,5.

Cílem naší práce bylo stanovit aktivitu enzymu katalázy v zelené hmotě během raného růstu a vývoje rostlin.

MATERIÁL A METODIKA

1) Rostlinný materiál, tzn. dvě odrůdy pluchatého dvouřadého jarního ječmene *Sebastian a Malz* a bezpluchá linie *KM1910*, byly pěstovány v letech 2005-2007 na dvou lokalitách, v Žabčicích a v Kroměříži za omezených chemických vstupů, tj. bez pesticidů a pouze s $30\text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$. Analytická stanovení enzymu katalasy se prováděla ve dvou odběrech zelené hmoty a to v definovaných růstových fázích podle makrofenologické stupnice. Zelená hmota byla odebrána v růstové fázi DC29 (I. odběr) a v růstové fázi DC31 (II. odběr).

2) Součástí řešení bylo další zpracování zelené biomasy ječmene s ohledem na šetrnost konzervačního postupu a následnou degradaci antioxidantů. V roce 2006 byla z biomasy rostlin získána šťáva. Pro její výrobu použita odrůda *Sebastian* z DC31 z lokality Žabčice, která měla v průměru nejvyšší aktivitu katalasy ve srovnání s ostatními vzorky ječmene. Šťáva byla konzervována čtyřmi způsoby: lyofilizací, zmrazením (-18°C), fluidním sušením (30°C) a ošetřením vysokým hydrostatickým tlakem (500 MPa , 10 min.). Výtěžnost šťávy byla 68% během homogenizace a lisování.

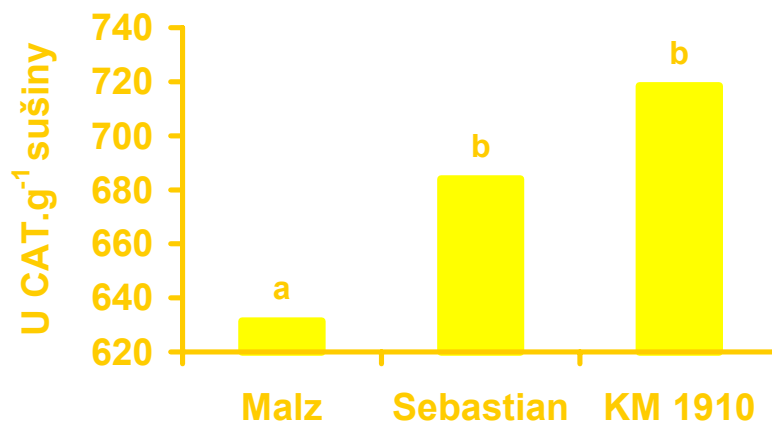
3) Pro stanovení aktivity katalasy byla na základě literární rešerše vybrána spektrofotometrická metoda dle Bergmeyera (1970). Enzym katalasa katalyzuje rozklad peroxidu vodíku. Na této reakci je založen princip stanovení aktivity uvedeného enzymu. Tato metoda spočívá v měření poklesu absorbance při štěpení peroxidu vodíku a to v oblasti 240nm . Změřená diference absorbance za časovou jednotku je pak mírou aktivity enzymu. Aktivita katalasy je vyjádřena v $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ suché hmoty.

4) Mechanizovaná sklizeň zelené hmoty byla provedena na maloparcelních pokusech založených na lokalitě Troubsko. Vyseta byla odrůda jarního ječmene *Jersey* a ve fázi DC31 byla provedena sklizeň pomocí sklízeče HEGE 212 a současně i ručně.

5) Pro vyhodnocení experimentálních výsledků aktivity katalasy (vyjádřených v sušině hmoty) byl použit statistický program STATISTICA CZ verze 7.0, design analýzy variance a pro testování rozdílů průměrných hodnot Fisherův test (LSD).

VÝSLEDKY A DISKUZE

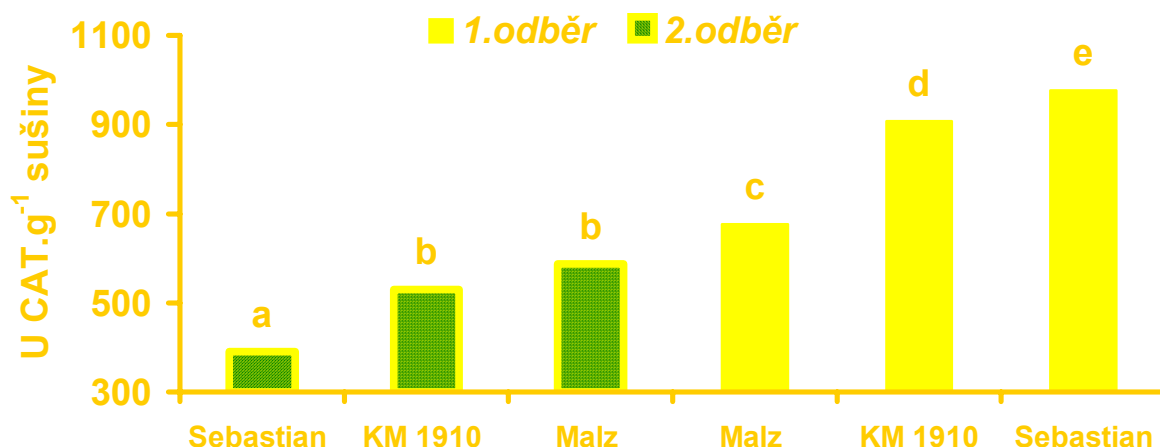
Graf. 1 Průměrná aktivita katalázy u jednotlivých odrůd/linie



V průměrné aktivitě katalasy (přes všechny ostatní faktory, tj. lokality, odběry a roky) nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi linií *KM1910* s nejvyšší hodnotou (718 U.g⁻¹) a odrůdou *Sebastian* (684 U.g⁻¹), odrůda *Malz* vykazala významně nižší průměrnou aktivitu (631 U.g⁻¹) oproti oběma předchozím odrůdám. (Graf 1)

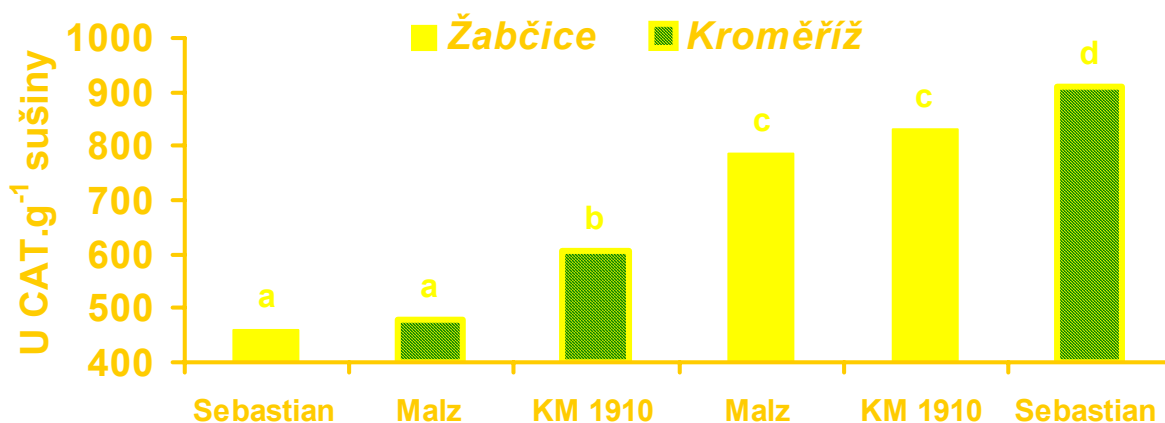
Vysvětlivky: Rozdílná písmena nad sloupci grafu udávají statisticky významnou rozdílnost \bar{x} hodnot (P=0,05).

Graf 2: Aktivita katalasy v jednotlivých odběrech



Jestliže porovnááme mezi sebou průměrné hodnoty aktivity katalasy prvního a druhého odběru zelené biomasy, zjistíme, že aktivita katalasy byla statisticky významně vyšší v prvním odběru (v růstové fázi DC 29) oproti druhému odběru DC 31 (Graf 2). V průměru odrůd (přes lokality a roky) činila aktivita katalasy v prvním odběru 854 U.g⁻¹ a v druhém 503 U.g⁻¹. Paulíčková (2006) uvádí, že obsahy nutričních substancí silně závisí na růstové fázi, zatímco odrůda a lokalita hrají v této souvislosti méně důležitou roli.

Graf 3: Průměrná aktivita katalasy na jednotlivých lokalitách



V průměru tří let a dvou odběrů měla nejvyšší aktivitu katalasy odrůda *Sebastian* v Kroměříži (908 U.g⁻¹), která tak byla statisticky významně vyšší oproti linii *KM1910* (604 U.g⁻¹) a odrůdě *Malz* (477 U.g⁻¹). V lokalitě Žabčice však měla odrůda *Sebastian* statisticky významně nižší aktivitu (460 U.g⁻¹) oproti odrůdě *Malz* (785 U.g⁻¹) i linii *KM1910* (833 U.g⁻¹), které se od sebe aktivitou katalázy významně nelišily.

Tab.1: Průměrné hodnoty aktivity katalasy v získaných šťávách (výsledky jsou přepočtené na sušinu vzorku)

Způsob konzervace	Katalasa [U.g ⁻¹]
Fluidní sušení	73
Lyofilizace	-
Hydrostatický tlak	231
Zmrazení	-

Enzym katalasa vykázal aktivitu pouze u fluidně sušené šťávy a u šťávy připravené hydrostatickým tlakem. Je tedy možné konstatovat, že šetrnějším způsobem úpravy šťáv bylo použití hydrostatického tlaku než fluidní sušení.

Tab.2: Odhadovaný výnos zelené hmoty ječmene

	Výnos [t.ha ⁻¹]		
	zelená hmota	šťáva	sušina
Sklizeň HEGE 212	11,39	7,74	1,88
Ruční sklizeň	12,75	8,67	2,10

Zelená hmota byla sklizena z pokusných parcel o výměře 10m² a to jak ručním způsobem za pomoci nůžek a elektrického střihače, tak mechanizovaně sklízečem HEGE 212. Sklizená hmota rostlin byla na místě zvážena a výnosy byly přepočítány na t.ha⁻¹.

ZÁVĚR

Při stanovení aktivity katalasy byly zjištěny odrůdové rozdíly, přičemž nejvyšší aktivitu katalasy vykazovala odrůda *Sebastian*. Velkou roli na hodnotu aktivity katalasy však měly interakce odrůd a to jak s lokalitami, tak i s termíny odběrů zelené hmoty.

Hmota prvních odběrů (DC29) měla vyšší aktivitu katalasy.

Byly stanoveny statisticky významné rozdíly v průměrných hodnotách aktivity katalasy v jednotlivých ročnících. Aktivitě katalasy vyhovoval ročník 2006, kdy průběh počasí v jarních měsících se blížil dlouhodobému průměru a aktivita katalasy byla oproti roku 2005 i 2007 nejvyšší.

První výsledky technologie pěstování a zpracování: výnos zelené hmoty cca 12 tun z 1 ha, výtěžnost šťávy cca 70 % (při 8.2 % sušiny). Způsob konzervace šťáv měl vliv na aktivitu katalasy. Zpracování hydrostatickým tlakem je šetrnější než fluidní sušení.

Práce vznikla za podpory projektu GA ČR 525/05/0781.

LITERATURA

Bergmeyer, H. U. (1970): Methoden der Enzymatischen Analyse. 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim: 636-647.

Havlová P. (1999): Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu. ÚZPI, Praha, 43 stran

Paulíčková I., Ehrenbergerová J., Fiedlerová V., Gabrovská D., Havlová P., Holasová M., Kopáček J., Ouhrabková J., Pinkrová J., Rysová J., Vaculová K., Winterová R., (2007): Evaluation of Barley Grass as a Potential Source of Some Nutritional Substances. Czech J. Food Sci.: 25, 65–72.

Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005): Oxidativní stres. Chemické listy, 99: 455-466.

Zehnálek J. (2003): Biochemie 2, MZLU Brno, 200 stran