

ANALYTICAL DETERMINATION OF SUPEROXIDEDISMUTASE ENZYME ACTIVITY IN GRAIN AND MALT OF BARLEY

STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMU SUPEROXIDDISMUTASY V ZRNU A SLADU JEČMENE

Belcrediová N¹., Ehrenbergerová J¹., Havlová P.²

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

²Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, Česká republika

E-mail: xbelcre0@node.mendelu.cz, ehren@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of the work was modification of superoxidedismutase (SOD) enzyme activity analysis in barley grain and identical malts. The Ransod sets from company Randox were used for enzyme determination in blood samples. This method is considerably faster and make possible to differentiate grains and malts of spring barley according their origin. SOD is classified as nature antioxidants and enzyme plays a significant role at detoxication of products of molecular oxygen degradation. The largest rate of SOD occurs in embryo of barley grain. Its presence in barley grain and malt thus inhibits rancidity of grain during storage and undesirable beer flavour. The line Wb x Wsbn (in grain-104,93 and malt 152,42 U/g dry matter) and the variety Annabell (104,65 a 147,21 U/g dry matter) had the highest activity of SOD in grain and malt of barley while the lowest activity was measured in the line KM 1910 (73,15 a 88,16 U/g dry matter) and variety Tolar (74,34 a 96,44 U/g dry matter).

Keywords: superoxidedismutase, barley, malt

ABSTRAKT

Cílem této práce byla modifikace stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy (SOD) v zrně ječmene a identických sladech. Pro modifikaci stanovení jsme použili sety Ransod od firmy Randox, které jsou určeny pro analýzu tohoto enzymu ve vzorku krve. Tato modifikovaná metodika je podstatně rychlejší a umožňuje diferencovat zrna i slad jarního ječmene podle původu. SOD patří do skupiny přírodních antioxidantů a má významnou funkci při detoxikaci produktů rozpadu molekulárního kyslíku. Největší podíl SOD se vyskytuje v embryu zrna ječmene. Jeho přítomnost v zrně a sladu zabraňuje žluknutí během skladování, ale také nežádoucím příchutím v pivu. V zrně i ve sladu měly shodně nejvyšší aktivitu SOD linie Wabet x Washonubet (v zrně 104,93 a sladu 152,42 U/g sušiny) a odrůda Annabell (104,65 a 147,21 U/g sušiny), zatímco nejnižší aktivitu jsme zjistili u linie KM 1910 (73,15 a 88,16 U/g sušiny) a odrůdy Tolar (74,34 a 96,44 U/g sušiny).

Klíčové slova: superoxiddismutasa, ječmen, slad

ÚVOD

Enzym superoxiddismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) je spolu s vitamínem E, kyselinou askorbovou, karotenoidy a dalšími látkami zařazen mezi nejvýznamnější přírodní antioxidanty.

Z chemického hlediska patří SOD do skupiny tzv. metaloproteinů a vyskytuje se ve třech formách (CuZnSOD, MnSOD, FeSOD), kde každá je součástí jiné buněčné organely. Superoxiddismutasa je obsažena ve všech aerobních organismech a představuje jednu z obran před toxickými účinky reaktivních typů kyslíku jako je $O_2^{\bullet -}$. SOD katalyzuje disproporci $O_2^{\bullet -}$ podle následující reakce:



SOD váže volné superoxidové anionty a vytváří tak méně reaktivní hydrogenperoxid. K této dismutaci dochází samovolně a se zvyšujícím se pH se tato aktivita snižuje. S rostoucím obsahem enzymů SOD se naopak reaktivita rapidně zvyšuje.

Enzymy SOD jsou přítomny v podstatě ve všech tkáních a v tepelně neopracovaných potravinách. V zrně ječmene se enzym superoxiddismutasa vyskytuje především v embryu a v menším množství i v aleuronové vrstvě. V ječmeni je syntetizován v průběhu klíčení a jeho množství se mění i v závislosti na odrůdě a lokalitě. Jeho aktivitu lze ovlivnit změnou podmínek při sladování, ale také teplotou při klíčení a stupněm domočení. Aktivita enzymu roste až do 4. dne klíčení a 5. a 6. den se již hodnoty aktivity nemění, nebo dochází k mírnému poklesu.

Slad obsahuje přirozené antioxidační činitele, kteří mají původ buď přímo v zrně nebo vznikly při procesu sladování. Jejich výskyt může zpomalit nebo zabránit oxidačním reakcím v průběhu sladování, výroby a skladování piva a nahradit tak exogenní antioxidanty.

Ve sladu může SOD působit na počátku vaření piva. Boivin (1994) na základě tříměsíčních testů antioxidační schopnosti sladu zjistil, že slady s vysokou aktivitou SOD umožňují zlepšit organoleptickou stabilitu piva. Přítomnost superoxidového anionového radikálu v pivu může mít vliv na peroxidaci lipidů, degradaci polysacharidů a inaktivaci enzymů. V zrně ječmene a ve sladu zabraňuje žluknutí zrna během skladování a nežádoucím příchutím piva.

MATERIÁL A METODIKA

Materiál a metodika pokusů:

Do zkoušky bylo zařazeno 20 odrůd jarního ječmene (Tab.1), z toho pět odrůd sladovnického typu, sedm linií vytvořených křížením sladovnických typů a *waxy* typů amerického původu na Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství MZLU v Brně a osm bezpluchých forem české provenience vyšlechtěných v Zemědělském výzkumném ústavu Kroměříž, s.r.o.

Všechny výše uvedené odrůdy a linie byly vysety na parcelách o velikosti 10 m² na Školním zemědělském podniku MZLU v Žabčicích v roce 2004. Pokusné varianty pocházely ze dvou systémů pěstování:

- **s chemickým ošetřením** (konvenční systém pěstování – hnojeno minerálními hnojivy a použity pesticidy)
- **bez chemického ošetření**

a byly sklizeny maloparcelní sklízecí mlátičkou.

Tab. 1 Seznam použitých odrůd a linií

Odrůdy sladovnického typu	Bezpluché linie	Pluchaté linie	Použité označení
Amulet	KM 1771	Kompakt x Krona	Ko x Kr
Tolar	KM 1910	Krona x Kompakt	Kr x Ko
Kompakt	KM 2001	Kompakt x Wabet	Ko x Wb
Annabell	KM 2074	Wabet x Kompakt	Wb x Ko
Jersey	KM 2084	Krona x Wanubet	Kr x Wnb
	KM 2092	Wanubet x Krona	Wnb x Kr
	KM 2283	Wabet x Washonubet	Wb x Wsnb
	KM 2387		

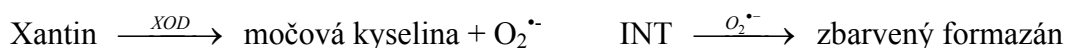
Metodika stanovení enzymu superoxiddismutasy:

Aktivita enzymu byla u všech odrůd a linií hodnocena přímo v zrna ječmene a po zeskladování i ve sladu. Vzorky ječmene byly vyčištěny a homogenizovány. Sladování provedl Výzkumný ústav pivovarský a sladařský v Brně, a.s., vždy po 500 g vzorku v mikroskladovně.

Pomleté vzorky vlastního zrna a vzorky sladu byly vystřeny vodou o teplotě 45°C a při téže teplotě po dobu 15-ti minut rmutovány. Poté se nechaly obě formy 30 minut volně zchladit a přefiltrovat. Takto upravené vzorky byly uskladněny 18 hodin při teplotě 4°C. Po 18-ti hodinách byly vzorky zředěny v poměru 1:14 s 0,01 mol/l fosfátovým puforem o pH 7,0 tak, aby se inhibovaná reakce pohybovala mezi 30 – 60%.

Aktivita SOD byla zjišťována námi upravenou metodikou pomocí setů anglické firmy RANDOX určených pro stanovení aktivity tohoto enzymu ve vzorku lidské krve nebo krve skotu, a proto jsme museli metodu upravit pro stanovení v zrna a sladu ječmene. Do kyvety bylo napipetováno 50 µl vzorku a 1,7 ml substrátu, poté se směs inkubovala 2 minuty při 37°C. Reakce byla odstartována přidáním 250 µl xantinoxidasy.

Při této metodě se využívá xantin a xantinoxidasa (XOD) k odstranění superoxidového radikálu, který reaguje s tetrazoliovou solí (INT) na červenozbarvený formazán. Aktivita SOD je pak spektrofotometricky měřena stupněm inhibice této reakce:



Absorbance byla měřena při teplotě 37°C a vlnové délce 505 nm po 30-ti sekundách (A_1) a po 3 minutách (A_2). Na základě kalibrační křivky vytvořené pomocí analýzy standardu, který je součástí uvedené sady, byla vypočtena aktivita SOD v U/g sušiny, tj. jednotky SOD na gram sušiny vzorku, u všech odrůd v zrně ječmene i sladu.

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 DISKUZE

Jednou z výhod použití setů Ransod při stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy je krátká doba provedení a především následné převedení naměřené hodnoty na jednotky U/g sušiny v porovnání s dalšími metodami, které byly využity ke zjištění aktivity SOD. Tyto metody byly nejen časově zdlouhavé, ale také technicky velmi náročné.

Z uvedené tabulky analýzy variance (Tab.2) je zřejmé, že **aktivita enzymu superoxiddismutasy v zrně ječmene** byla statisticky velmi vysoce významně ovlivněna sledovanými odrůdami a liniemi, systémem pěstování a interakcí odrůd a linií se systémem pěstování. Proto jsme dále provedli mnohonásobné testování rozdílů průměrných hodnot linií a odrůd, roků a systémů pěstování. Přestože způsob pěstování jako faktor analýzy variance měl vliv na variabilitu SOD v zrně, průměrné hodnoty aktivit SOD obou způsobů pěstování se od sebe statisticky významně nelišily. V konvenčním způsobu pěstování byla aktivita 94,91 U/g sušiny a bez chemického ošetření pak 88,70 U/g sušiny.

Tab. 2 Analýza variance aktivity enzymu superoxiddismutasy v zrně ječmene

Zdroj variability	d.f.	SS	MS
Odrůdy a linie	19	22395,38	1178,70***
Systém pěstování	1	718,52	718,52***
Interakce:			
Odrůdy a linie x systém pěstování	18	6821,97	379,00***
Chyba	77	4597,68	59,71
Celkem	115	34931,25	303,75

*** $P \leq 0,001$

Nejvyšší průměrná aktivita enzymu SOD v zrně ječmene (Tab.3) byla zjištěna u linie Kr x Ko (114,84 U/g sušiny), která se statisticky významně nelišila od linií Ko x Wb, Ko x Kr, Wb x Wsbn a sladovnické odrůdy Annabell. Statisticky významně nižší aktivita SOD u vyjmenované skupiny odrůd byla zjištěna u všech kroměřížských linií (označené zkratkou

KM) (71,87 – 89,08 U/g sušiny), sladovnických odrůd domácí provenience (Tolar – 74,344, Amulet – 81,08 U/g sušiny) i zahraniční provenience (Jersey – 87,85 U/g sušiny). Sladovnické odrůdy Kompakt (slovenská provenience) (101,62 U/g sušiny) a Annabell (německá provenience) (104,65 U/g sušiny) se od sebe aktivitou SOD nelišily. Linie z reciprokých křížení odrůd Ko x Kr (108,63 resp. 114,84 U/g sušiny) i Ko x Wb (110,19 resp. 104,42 U/g sušiny) měly vyšší aktivitu než rodičovská odrůda Kompakt (101,62 U/g sušiny). Statisticky významné zvýšení oproti odrůdě Kompakt bylo zjištěno pouze u linie Kr x Ko.

Tab. 3 Průměrné hodnoty aktivit superoxiddismutasy v zrně ječmene

Odrůdy a linie	n	Aktivita SOD
KM 2283	6	71,87 ^a
KM 1910	6	73,15 ^a
Tolar	5	74,34 ^a
KM 2092	6	75,04 ^a
KM 2001	4	75,27 ^{ab}
Amulet	9	81,08 ^{ab}
KM 2084	2	81,67 ^{abc}
KM 1771	4	81,68 ^{abc}
KM 2387	5	82,19 ^{abc}
Jersey	7	87,85 ^{bc}
KM 2074	6	89,08 ^{bcd}
Kr x Wnb	4	89,72 ^{bcde}
Wnb x Kr	10	96,29 ^{cdef}
Kompakt	5	101,62 ^{defg}
Wb x Ko	5	104,42 ^{efgh}
Annabell	4	104,65 ^{efgh}
Wb x Wsnb	5	104,93 ^{fgh}
Ko x Kr	7	108,63 ^{gh}
Ko x Wb	9	110,19 ^{gh}
Kr x Ko	7	114,84 ^h

odlišná písmena = statisticky rozdílné průměrné hodnoty

Aktivita sledovaného enzymu ve sladu (Tab.4) byla statisticky významně ovlivněna danými odrůdami a liniemi. Systém pěstování neměl statisticky významný vliv na aktivitu SOD ve sladu. V konvenčním způsobu pěstování byla aktivita 121,94 U/g sušiny a z pěstování bez chemického ošetření 123,84 U/g sušiny, tyto způsoby nebyly významně rozdílné.

Tab. 4 Analýza variance aktivity enzymu superoxiddismutasy ve sladu

Zdroj variability	d.f.	SS	MS
Odrůdy a linie	19	46213,70	2432,30***
Systém pěstování	1	576,66	576,66
Interakce :			
Odrůdy a linie x systém pěstování	19	6781,51	356,92*
Chyba	66	12728,90	192,86
Celkem	105	65818,96	626,85

***P ≤ 0,001, *P ≤ 0,05

Ve sladu byla nejvyšší aktivita enzymu SOD (Tab.5) zjištěna u linie Kr x Wnb (153,67 U/g sušiny), která se ale statisticky významně nelišila od sladovnických odrůd Kompakt, Jersey a Annabell (136,95, 146,13 a 147,21 U/g sušiny) a linií Wnb x Kr (142,33 U/g sušiny) a Wb x Wsnb (152,42 U/g sušiny). Naopak nejnižší aktivitu SOD měly kroměřížské odrůdy KM 1910, KM 1771, KM 2084, KM 2283 (88,16 – 100,29 U/g sušiny) a také, jako v případě zrna ječmene, sladovnické odrůdy Tolar a Amulet (96,44 a 105,12 U/g sušiny). Sladovnická odrůda Kompakt (136,95 U/g sušiny) měla vyšší aktivitu enzymu než linie (128,68 – 133,84 U/g sušiny), které měly tuto odrůdu v rodičovské pozici, což byl opačný jev než v případě zrna. Další skupina linií kroměřížské provenience KM 2092, KM, 2074, KM 2001, KM 2387 se od sebe ani od odrůdy Amulet aktivitou sladu významně nelišily (106,33 – 126,35 U/g sušiny). Na rozdíl od velmi vysoce významné interakce odrůd a linií se systémem pěstování aktivit SOD v zru, byla ve sladu tato interakce slabá. To nasvědčuje tomu, že sladování vliv interakce oslabuje.

Tab. 5 Průměrné hodnoty aktivit superoxiddismutasy ve sladu

Odrůdy a linie	N	Aktivita SOD
KM 1910	7	88,16 ^a
KM 1771	4	90,28 ^{ab}
Tolar	4	96,44 ^{abc}
KM 2084	4	98,27 ^{abc}
KM 2283	4	100,29 ^{abc}
Amulet	4	105,12 ^{abcd}
KM 2092	6	106,33 ^{bcd}
KM 2074	10	110,24 ^{cd}
KM 2001	4	122,04 ^{de}
KM 2387	4	126,35 ^{def}
Ko x Wb	5	128,68 ^{ef}
Kr x Ko	7	128,82 ^{ef}
Wb x Ko	4	132,55 ^{efg}
Ko x Kr	4	133,85 ^{efg}
Kompakt	7	136,95 ^{efgh}
Wnb x Kr	6	142,33 ^{fgh}

Jersey	5	146,13 ^{fg}
Annabell	6	147,21 ^{gh}
Wb x Wsnb	5	152,42 ^{gh}
Kr x Wnb	6	153,67 ^h

odlišná písmena = statisticky rozdílné průměrné hodnoty

Nejnižší aktivitu SOD měly linie kroměřížské provincie v zrně i sladu. Liniím, které měly v původu některou z *waxy* odrůd a linie vzniklé křížením sladovnických odrůd Kompakt a Krona dosahovaly naopak vyšších aktivit SOD v zrně i sladu. Naše výsledky ukazují na významně vyšší aktivitu SOD ve sladu než v zrně, což potvrzují také výsledky Boivina (1993).

ZÁVĚR

1. V odrůdách a liniích byly zjištěny významné rozdíly v aktivitě SOD a to jak ve sladu tak v zrně.
2. Aktivita SOD byla statisticky významně vyšší ve sladu (122,96 U/g sušiny) než v zrně (91,59 U/g sušiny) ječmene.
3. V zrně i ve sladu měly shodně:
 - vysokou aktivitu SOD linie Wabet x Washonubet a odrůda Annabell
 - nejnižší aktivitu pak měla linie KM 1910 a odrůda Tolar.
4. Systém pěstování neměl statisticky významný vliv na aktivitu enzymu superoxiddismutasy ani v zrně ani ve sladu ječmene jarního.

LITERATURA

- Bamforth C. W. (1983): Superoxide dismutase in barley. J. Inst. Brew., November-December, 89, p. 420 – 423.
- Boivin P. (1994): La qualite du malt en rapport avec les risques d'oxydation. Journée d'étude du CERIA – 14 October, p.45 – 48.
- Boivin P., Allain D., Clamagirant V., Maillard M.N., Cuvelier M.E., Berset C., Richard H., Nicolas J., Forget-Richard F. (1993): Mesure de l'activité antioxygène l'orge et du malt: approche multiple. Proceedings of the 24th congress EBC, p.397.
- Havlová P. (1999): Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu. UZPI Praha, s. 43.
- Packer L. (2002): Methods in Engymology. Elsevier Science (USA), p. 400.
- Parkányiová J., Parkányiová L., Pokorný P. (2003): Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů. Sborník příspěvků z Mezinárodní konference Vitamíny 2003.

Práce byla provedena díky finanční podpoře grantového projektu FRVŠ 420/G4.