

## Módszer a kukorica peroxidáz-aktivitásának meghatározására

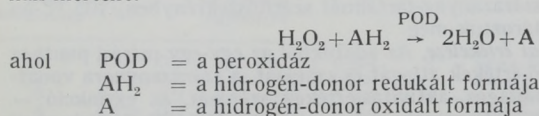
TEMESVÁRI JÁNOS, PÁRKÁNYNÉ GYÁRFÁS ANNA és  
VAMOSNÉ VIGYÁZÓ LILLY

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1981. március 5.

A kukorica egyik legfontosabb takarmánynövényünk. A növekvő igények kielégítésére természetesen változások következtek be. Új fajtákat állítottak elő, gépesítették a talajművelést, a betakarítást. Megváltoztak a szárítás módozatai és a tárolási körülmények. A szárítás, a tárolás és a feldolgozás alatt bekövetkezett biokémiai változások megismerése sokoldalú vizsgálatokat tesz szükségessé. A biokémiai változások jelzésére alkalmas enzimek egyike a peroxidáz. A takarmány-kukorica-fajták peroxidáz-aktivitásának értékeiről eddig nem voltak ismereteink. Munkánkban a kertészeti termékek peroxidáz-aktivitásának mérésére kidolgozott módszert (1, 2) a kukorica peroxidáz-aktivitásának meghatározására adaptáltuk.

A módszer azon alapszik, hogy a peroxidáz-enzim hidrogén-donor jelenlétében a hidrogén-peroxidot az alábbi reakcióegyenlet szerint bontja, miközben a hidrogén-donorból sztöchiometrikus arányban színes vegyület keletkezik. Ennek spektrofotometriásan meghatározott keletkezési sebessége a peroxidáz-enzim aktivitásának mértéke.



### Felhasznált anyagok, oldatok és módszerek

*Kukoricafajták.* A kidolgozott módszer alkalmazhatóságát több kukoricafajtán vizsgáltuk. Ezeket az Országos Mezőgazdasági Fajtakísérleti Intézettől (Budapest) szereztük be. A rendelkezésünkre álló fajták az alábbiak: Martonvásári (a továbbiakban Mv) SC 580, Mv TC 596, Mv SC 405, Mv TC 290, Mv SC 429, BC-SK 66-25, OS-SK 218, Keszthelyi SC 360, Szegedi (a továbbiakban Sze) TC 255, Sze DC 289, Sze DC 384, és Szarvasi SC 648. A mintákat 1976-ban és 1977-ben termesztették és betakarítás után tárolás céljára szárították. Ezekon kívül vizsgáltunk nem szárított kukorica-mintákat, melyeket közvetlenül a betakarítás előtt, kísérleti parcelláról kaptunk. A módszer kidolgozásához a Mv SC 405 fajta 1976-ban termesztett mintáját alkalmaztuk.

*Szubsztrátum.* A hidrogén-peroxid szubsztrátumot naponta frissen hígítottuk a 30%-os kereskedelmi oldatból (a.l., Reanal, Budapest), a reakcióhoz szükséges töménységűre.

*o*-fenilén-diamin oldat. Az *o*-fenilén-diamin hidrogén-donor (a.l.t., Reanal, Budapest) 1%-os oldata, 96%-os etanol oldószerben, szintén naponta készült.

A puffer-oldat. A reakcióelegy pH-ját 0,2 M, pH 5,0 nátriumacetát – ecetsav pufferrel biztosítottuk (3). A peroxidáz-aktivitás függését a pH-tól dinátrium-hidrogén-foszfát – citromsav (McIlvaine) pufferben (4) vizsgáltuk, a 3,0–7,5 pH-tartományban.

Nátrium-meta-biszulfit oldat. A reakció leállítására nátrium-meta-biszulfit (a.l.t., Polskie Odczynniki Chemiczne Gliwice, LNK) 5%-os desztillált vizes oldatát használtuk.

A minták előkészítése. A kukoricaszemeket Savaria (Keripar, Szombathely) darálóberendezésben aprítottuk. A kukoricadara 5 g-ját 50 cm<sup>3</sup> desztillált vízzel szobahőmérsékleten extraháltuk 60 perces rázatással, ezután 20 percig centrifugáltuk (1500 g), a felülúszót szűrtük, és az enzimet tartalmazó szűrletet (a továbbiakban enzimmikivonat) szükség szerint hígítottuk.

A mérés. Az aktivitásméréshez használt oldatokat 25 °C-ra előmelegítettük. A reakcióelegy összetétele a következő: 2 cm<sup>3</sup> enzimmikivonat, 8 cm<sup>3</sup> acetát-puffer, 1 cm<sup>3</sup> *o*-fenilén-diamin oldat, 1 cm<sup>3</sup> hidrogénperoxid-oldat. A reakcióelegyet 25 °C-on Vibrotherm (Labor – MIM, Budapest) vízfürdőben termosztáltuk. Az elegyek egy részéhez az összeöntés után azonnal (0 perc), más részéhez rendre 4, 8, 12, 16, illetőleg 20 perc elteltével 2 cm<sup>3</sup> 5%-os nátrium-meta-biszulfit oldatot és 6 cm<sup>3</sup> 96%-os etanolt adtunk az enzim inaktiválása céljából.

A különböző reakcióidők alatt az *o*-fenilén-diamin oxidálódása útján keletkezett reakciótermék színintenzitását az azonos módon kezelt, enzimmikivonatot nem tartalmazó vakpróbával szemben 420 nm-en mértük (Spektromom 204, MOM, Budapest).

Vizsgálatainkhoz 3 párhuzamos, enzim-tartalmú kivonatot készítettünk a fent leírtak szerint. Kivonatonként 2–2 párhuzamos extinkció-mérést végeztünk. A peroxidáz-aktivitást az extinkció – reakcióidő összefüggés lineáris szakaszából regressziószámítással számítottuk.

Egységnyi aktivitásának tekintettük az enzimmikivonatot akkor, ha percenként 10<sup>-3</sup> extinkcióváltozást eredményezett. 1 g szárazanyagra vonatkoztatva 1 egység (U) = 10<sup>-3</sup> ΔOD min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> (OD = extinkció).

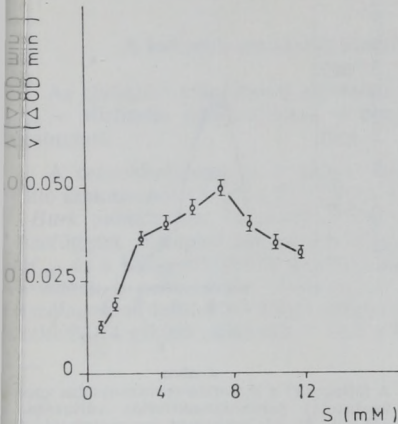
A kukoricadara-minták szárazanyag-tartalmát szárítószekrényben, 105 °C-on súlyállandóságig szárítva határoztuk meg.

A mérési adatok biometria értékelése. Az adatokból az egy-egy mérési ponthoz tartozó párhuzamos extinkció-értékek átlagát és szórását, a szárazanyagra vonatkoztatott (a továbbiakban fajlagos, aktivitás-értékek szórását, az extinkció – reakcióidő összefüggés lineáris szakaszának, valamint a kapott egyéb lineáris vagy linearizálható összefüggéseknek regressziós egyenleteit, a fajlagos aktivitás-értékek és a szárazanyag-tartalom értékek közötti eltérések statisztikai *t*-próbáit (5) programozható kalkulátoron (HP 97, Hewlett-Packard, USA) számítottuk.

## EREDMÉNYEK

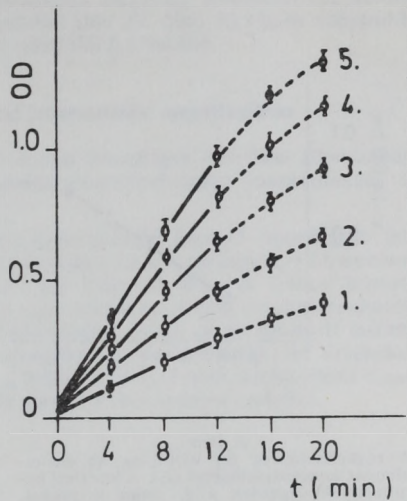
### A megfelelő szubsztrátum koncentráció meghatározása

A mérésekhez megfelelő szubsztrátum-koncentrációt 0,1% enzim-kivonatot tartalmazó reakcióelegyekkel határoztuk meg. A hidrogénperoxid-koncentráció és a reakciósebesség közötti összefüggést az 1. ábrán szemléltetjük. A reakciósebesség maximum-görbe szerint változott. A legnagyobb reakciósebességet a 12 cm<sup>3</sup> reakcióelegyben 7,35 mM (0,25 g l<sup>-1</sup>) hidrogénperoxid-koncentrációval értük el. Nagyobb koncentráció esetében az enzim-aktivitás gátolt. További kísérleteinkben a reakcióelegyek 7,35 mM hidrogénperoxidot tartalmaztak.



1. ábra

A reakciósebesség ( $v$ ) változása a hidrogénperoxid-szubstrátum koncentrációjával ( $S$ ). A reakciókörülmények: 0,083% o-fenilén-diamin hidrogén-donor, 0,1% enzimkivonat (Biarthonvási SC 405 kukorica-fajtából), pH 6,0, 25 °C. A reakciótér fogat 12 cm<sup>3</sup>. A függőleges vonalak a szórást jelentik;  $OD$  = az extinkció.



2. ábra

Az extinkció ( $OD$ ) változása a reakcióidővel ( $t$ ). A reakció-körülmények: 7,35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,05–0,15% enzimkivonat. A többi körülmény és jelölés egyezik az 1. ábrán leírtakkal.

Az egyesek áramozása	E (%)	A regressziós egyenlete	r <sup>2</sup>
1	0,05	$OD = 0,02 + 0,02 t$	0,994
2	0,075	$OD = 0,04 + 0,04 t$	0,985
3	0,1	$OD = 0,04 + 0,05 t$	0,989
4	0,125	$OD = 0,05 + 0,06 t$	0,989
5	0,15	$OD = 0,05 + 0,08 t$	0,990

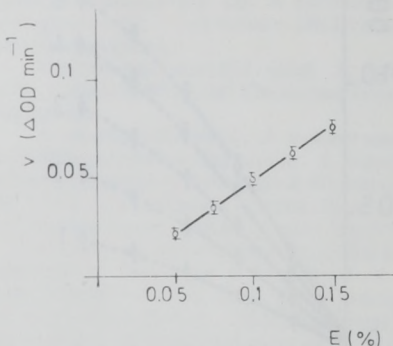
$E$  = az enzimkivonat koncentrációja a reakcióelegyben;  
 $r^2$  = a regressziós egyenlet determinációs együtthatója. A számítható felhasználat adatpárok száma:  $n = 24$ .

**Az extinkció változása a reakcióidővel**

Az extinkció-értékek változását 0,05, 0,075, 0,1, 0,125 és 0,15% enzimkivonatot tartalmazó reakcióelegyekben 0–20 percig kísértük figyelemmel. Mind az öt koncentráció esetében a reakcióelegyek extinkció-értékei és a reakcióidő között 0–12 percig kaptunk lineáris összefüggést (2. ábra).

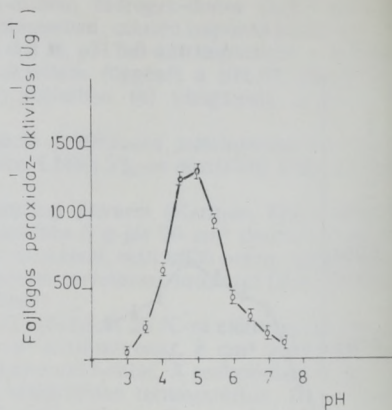
**A reakciósebesség és az enzimkivonat koncentrációjának összefüggése**

A reakciósebesség és az enzimkivonat koncentrációja között a mért tartományban (0,05–0,15%) lineáris a kapcsolat (3. ábra).



3. ábra

A reakciósebesség ( $v$ ) változása az enzimkivonat koncentrációjával ( $E$ ). A kísérleti körülmények egyeznek a 2. ábrán leírtakkal. Az egyenes egyenlete:  $v = -0,005 + 0,540 E$ ;  $r^2 = 0,994$ ,  $n = 5$ ;  $n$  = a számításához felhasznált adatpárok száma. A többi jelölés ua., mint az előző ábrákon.



4. ábra

A fajlagos (1 g kukorica-száranyagra vonatkoztatott) peroxidáz-aktivitás változása a pH-val. Az enzimkivonat koncentrációja 0,1%, a puffer: dinátrium-hidrogén-foszfát és citromsav (McIlvaine), a többi kísérleti körülmény – a pH kivételével – valamint a jelölések ugyanazok, mint a 2. ábrán U = enzimaktivitás ( $\Delta OD \text{ min}^{-1}$ ).

### A peroxidáz-aktivitás változása a pH-val

Az enzim-aktivitás és a pH összefüggésének vizsgálatára 0,1% enzimkivonatot tartalmazó reakcióelegyetek alkalmaztunk. A peroxidáz-aktivitás maximuma pH 4,4–5,0 között volt (4. ábra).

### A kukoricafajták peroxidáz-aktivitása

Az előbbieken ismertetett kísérletek alapján alkalmasnak bizonyult körülmények között (7,35 mM  $H_2O_2$ , 1% o-fenilén-diamin, 0,05–0,15% enzimkivonat, pH 5, 25 °C, 0–12 perc reakcióidő) meghatároztuk a kukorica-tételek fajlagos peroxidáz-aktivitását. A szárazanyagra számított értékeket az 5. ábrán tüntettük fel.

Mindkét évjáratban a Mv TC 290 kukoricafajtának volt a legnagyobb fajlagos peroxidáz-aktivitása, a Szarvasi SC 648 fajtának pedig a legkisebb. A kukoricafajták fajlagos peroxidáz-aktivitása 1976-ban 1460–5900  $U \text{ g}^{-1}$ , 1977-ben 1750–6040  $U \text{ g}^{-1}$  között volt.

Az azonos fajták fajlagos enzim-aktivitása egy kivétellel (Mv TC 290) 99, illetve 99,9%-os valószínűségi szinten szignifikánsan nagyobb volt 1977-ben, mint 1976-ban.

Az aktivitás-mérések jól reprodukálhatók, a szórás az átlagérték  $\pm 5\%$ -ánál kisebb.

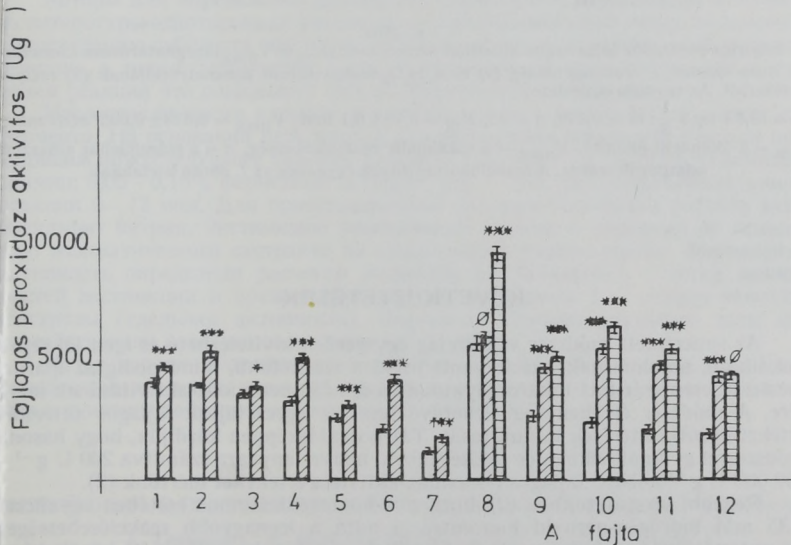
Az 1977. évből származó ötféle martonvásári kukoricafajta peroxidáz-aktivitását közvetlenül a kukoricacső törése után is mértük és az értékeket összehasonlí-

...tuk a mesterségesen szárított kukorica-minták megfelelő értékeivel. Az utóbbi mintákban a peroxidáz-aktivitás egy kivétellel (Mv TC 596) 99,9%-os valószínűségi szinten szignifikánsan kisebb, mint a szántóföldi mintáké.

### A kukorica-peroxidáz kinetikai jellemzőinek megállapítása

Az elvégzett vizsgálatok a peroxidáz-enzim látszólagos kinetikai állandóinak ( $K_m$  = Michaelis állandó,  $V_{max}$  = maximális reakciósebesség) kiszámítására is alkalmasak.

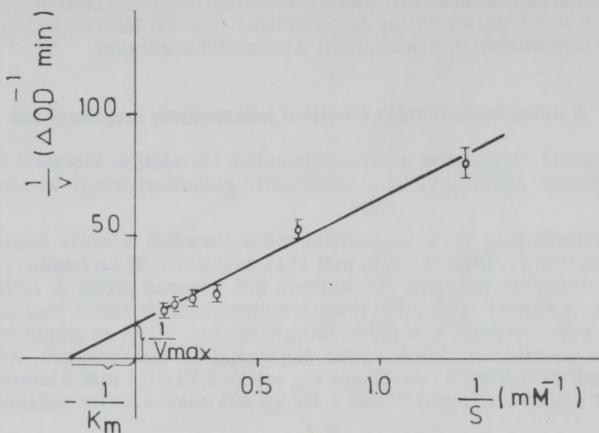
A reakciósebesség és a szubsztrátum-koncentráció közötti összefüggés felálló szakaszból (1. ábra, 0–7,36 mM  $H_2O_2$ -koncentráció tartomány) Lineweaver-Burk módszerével felvettük az említett két jellemző reciprok értékei közötti összefüggést. A kapott egyenesből lineáris regresszió-számítással meghatározhatók  $K_m$ - és a  $V_{max}$ -értékek, a 6. ábrán látható módon. Mivel az alkalmazott enzimyvonatok a peroxidázon kívül egyéb anyagokat is tartalmaznak, az értékeket óvatosan tekintjük. A látszólagos  $K_m$  értéke  $3,73 \pm 0,1$  mM, a látszólagos  $V_{max}$  értéke  $0,074 \pm 0,005 \Delta OD \text{ min}^{-1}$  volt a Mv SC 405 kukoricafajta esetében.



5. ábra

Különböző fajtájú kukorica-tételek peroxidáz-aktivitása két, egymást követő évben. Az enzimyvonatok koncentrációja az aktivitástól függően különböző, a többi kísérleti körülmény egyezik a 2. ábrán leírtakkal. A fajták:

1. Szegedi TC 255, 2. Keszthelyi SC 360, 3. Szegedi DC 289, 4. Szegedi DC 384, 5. OS-SK 218, 6. BC-SK 66-25, 7. Szarvasi SC 648, 8. Mv TC 290, 9. Mv SC 405, 10. Mv SC 580, 11. Mv SC 429, 12. Mv TC 596. Mv = Martonvásári. Az üres hasábok az 1976-ban, a ferdén sraffozottak az 1977-ben vizsgált szárított minták, a vízszintesen sraffozott hasábok az 1977-ben vizsgált szántóföldi minták fajlagos aktivitás-értékeit ábrázolják szárazanyagra vonatkoztatva. ∅ = az eltérés nem szignifikáns, \* = az eltérés 95%-os valószínűségi szinten szignifikáns, \*\*\* = az eltérés 99,9%-os valószínűségi szinten szignifikáns. A ferdén sraffozott hasábok fölötti jelzés az 1976. és 77. évi, azonos fajtájú szárított kukorica-minták közti eltérésre, a vízszintesen sraffozottak fölötti az 1977-ben vizsgált, azonos fajtájú szárított és szántóföldi minták közötti eltérésre vonatkozik.



6. ábra

A kukorica-peroxidáz látszólagos kinetikai állandóinak ( $K_m$  és  $V_{max}$ ) meghatározása Lineweaver és Burk szerint, a reakciósebesség ( $v$ ) és a  $H_2O_2$ -szubsztrátum koncentrációjának ( $S$ ) reciprok értékeiből. Az egyenes egyenlete:

$$\frac{1}{v} = 13,5 + 50,3 \frac{1}{S}; r^2 = 0,970, n = 46, K_m = 3,73 \pm 0,1 \text{ mM}; V_{max} = 0,074 \pm 0,005 \text{ ΔOD min}^{-1}.$$

$K_m$  = a Michaelis-állandó,  $V_{max}$  = a maximális reakciósebesség,  $n$  = a számításhoz elhasznált adatpárok száma. A reakciókörülmények egyeznek az 1. ábrán leírtakkal.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Az ismertetett módszer viszonylag egyszerűen kivitelezhető és igen jól reprodukálható, alkalmasnak mutatkozott mind a szántóföldi, mind pedig az iparilag mesterségesen szárított takarmánykukorica-minták peroxidáz-aktivitásának mérésére. A módszer érzékenysége lehetővé teszi az egyes fajták fajlagos aktivitásértékei közötti eltérések kimutatását. Tájékoztatásként közöljük, hogy hasonló módszerrel gyümölcsökben és zöldségekben, nedves anyagra számítva  $240 \text{ U g}^{-1} - 569\,000 \text{ U g}^{-1}$  közötti fajlagos peroxidáz-aktivitás értékeket mértünk (2).

Régebbi vizsgálatokban (2), burgonya-homogenizátumok esetében ugyancsak  $7,35 \text{ mM}$  hidrogén-peroxid koncentráció adta a legnagyobb reakciósebességet. Az optimális pH-tartomány egyéb termékek esetében hasonló az itt közöltekhez. Burgonya-homogenizátumokban pH  $5,0 - 5,4$  között, karalábé-homogenizátumokban pH  $5,1 - 5,9$ , kelvirág homogenizátumokban pH  $5,1 - 5,7$  között volt maximális peroxidáz-aktivitás (1, 6, 7). Az aktivitás pH-optimuma a puffer minőségével változhat, a puffer koncentrációjára kevésbé érzékeny (8, 9).

Mivel a növényi élelmiszer-nyersanyagokban előforduló peroxidázok meglehetősen eltérők, az ismertetett aktivitásmérő módszert nem célszerű más termékekre alkalmazni anélkül, hogy meghatároztuk volna a legnagyobb reakciósebességet adó hidrogénperoxid-koncentrációt, a reakciósebesség-reakcióidő összefüggés, valamint az enzimkoncentráció-reakciósebesség összefüggés lineáris szakaszait, továbbá az aktivitás pH-optimumát.

- (1) Winter, E.: Z. U. L. 141, 201, 1968.
- (2) Mihályi, K., Vámos-Vigyázó, L.: Acta Alimentaria, 4, 291, 1975.
- (3) Colowick, S. A., Kaplan, N. O.: Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 1955 1. köt. 140.
- (4) Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., Jones, K. M.: Data for Biochemical Research. Clarendon Press, Oxford, 1959.
- (5) Sváb, J.: Biometriai módszerek a mezőgazdasági kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1967.
- (6) Vámos-Vigyázó, L., Mihályi, K., Farkas, J.: Confructa, 24, 38, 1979.
- (7) Vámos-Vigyázó, L., Farkas, J., Babos-Szebenyi, É.: Acta Alimentaria, 9, 11, 1980.
- (8) Poux, C., Ournac, A.: Ann. Technol. Agric, 21, 47, 1972.
- (9) Beaudreau, Cl., Yasunobu, K. T.: Biochemistry, 5, 1405, 1966.

## МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КУКУРУЗЫ

*Я. Темешвари, Парканьэ – А. Дярфаши, Вамошэ – Л. Видязо*

Авторы для определения активности растворимой пероксидазы кукурузы из литературы оаптировали фотометрический кинетический метод. Установили концентрация субстрата способствующей достижению максимальной скорости реакции, а также линейную часть зависимости между экстинкцией и временем реакции что показывает степень ферментной активности.

Исследовали также влияние концентрации фермента и pH на активность фермента. На основании результатов для проведения измерений считали подходящим нижеследующее условия реакции: 7,35 мМ  $H_2O_2$ ; 0,083% О-фенилендиамин; 0,05 – 0,15% ферментный экстракт; pH – 5,0; 25°C продолжительность реакции 0 – 12 мин. Для приостановления реакции применяли раствор метабисульфита натрия. Экстинкцию реакционной жидкости измеряли по отношению энзиматического экстракта не содержащего слепую пробу. Ферментную активность определяли расчетом регрессии из линейного участка зависимостей экстинкции и времени реакции по отношению 1 г. сухого вещества кукурузы (удельная активность). Ферменты считали активным если они способствовали повышению экстинкции  $10^{-3}$ /мин.

Метод хорошо репродуцируемый, расцев  $\pm 5\%$ . Метод подходящий для определения величины удельной пероксидазной активности разнообразных полевых и сушеных образцов кукурузы разного урожая.

## METHODE ZUR BESTIMMUNG DER PEROXIDASEAKTIVITÄT VOM MAIS

*J. Temesvári, A. Párkány Gyárfás und L. Vámos-Vigyázó*

Eine in der Literatur beschriebene spektrophotometrische kinetische Methode wurde zur Bestimmung der löslichen Peroxidase-Aktivität vom Mais adaptiert. Die die höchste Reaktionsgeschwindigkeit sichernde Substratkonzentration, ferner jener lineare Abschnitt des Zusammenhanges zwischen Extinktion und Reaktionsperiode wurden festgestellt, deren Steile als Mass der Enzymaktivität dient. Die Wirkung der Enzymkonzentration und des pH-Wertes auf die Enzymaktivität wurde auch untersucht. Auf Grund der Untersuchungen die folgenden Reaktionsumständen erwiesen sich als geeignet zur Durchführung der Messung:

7,35 мМ  $H_2O_2$ , 0,083% o-Phenylendiamin, 0,05 – 0,15% Enzymextrakt, pH 5,0 25°C, 0 – 12 Minuten Reaktionsperiode.

Eine Lösung von Natriummetabisulfit diente dabei zur Abstellung der Reaktion. Die Extinktion der Reaktionsgemische wurde gegen eine keinen Enzymextrakt enthaltende Blindprobe gemessen. Die Enzymaktivität wurde vom linearen Abschnitt des Zusammenhanges zwischen Extinktion und Reaktionsperiode mittels Regressionsberechnung ermittelt und auf 1 g Mais-Trockensubstanz bezogen (spezifische Aktivität). Jene Enzymaktivität wurde als Einheit betrachtet, durch welche eine Extinktionserhöhung von  $10^{-3}$  /Minute hervorgerufen wurde. Die Methode ist gut reproduzierbar, die Streuung bezüglich des Durchschnittswertes ist weniger als +5%. Die Methode erwies sich als geeignet zur Unterscheidung der Werte der spezifischen Peroxidaseaktivität von Maismustern verschiedener Sorten und Jahrgängen, sowohl in ungetrocknetem wie auch in getrocknetem Zustand.

#### METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE PEROXIDASE ACTIVITY OF MAIZE

*J. Temesvári, A. Párkány-Gyárfás and L. Vámos-Vigyázó*

A spectrophotometric kinetic method described in literature was adapted to the determination of the soluble peroxidase activity of maize. The substrate concentration yielding the highest reaction rate furthermore the linear section of the relationship between the extinction value and the reaction period were established, the slope of which section serves as a measure of enzyme activity. Also the effect of enzyme concentration and pH value on enzyme activity was investigated. On the basis of these investigations the following reaction conditions were found suitable for carrying out the measurement:

7,35 mM  $H_2O_2$ , 0,083% o-phenylene diamine, 0,05–0,15% enzyme extract, pH 5,0, 25°C, 0–12 minutes of reaction period.

A solution of sodium metabisulphite was used for stopping the reaction. The extinction of the reaction mixtures was measured against blanks containing no enzyme extracts. Enzyme activity was determined by regression calculation from the linear section of the relationship extinction–reaction period, and referred to one gram of dry substance of maize (specific activity). The enzyme was considered to have unit activity when it was able to induce an extinction increase of  $10^{-3}$ /minute. The method can be reproduced well, the scattering referred to the mean value is below +5%. The method proved suitable for distinguishing the values of the specific peroxidase activity of undried and dried maize samples of various species and of various years.