

MINIMALIZAČNÍ POSTUPY STANOVENÍ OBSAHU MASTNÝCH KYSELIN V ŘEPCE OLEJCE

Lenka Endlová^{1,2}, Viktor Vrbovský², Jan Pastrňák²

¹*Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Katedra chemie, 30. dubna 22, Ostrava*

²*OSEVA PRO s.r.o., o.z. Výzkumný ústav olejnin Opava, Purkyňova 10, Opava, +420 553 624 160, endlova@oseva.cz*

Abstrakt

Ve vzorcích semen řady odrůd řepky olejky ozimé (*Brassica napus*) byl stanoven obsah mastných kyselin (MK) metodou plynové chromatografie (GC). Obsah MK byl analyzován v izolovaném oleji, v jednom semeni a v segmentu semene téhož vzorku (odrády), s cílem vytvořit modifikované metody izolace a stanovení methylesterů MK z minimálního množství výchozího vzorku. Mezi obsahy majoritních MK zjištěných jednotlivými postupy byly stanoveny korelace. Byly zjištěny signifikantně pozitivní závislosti mezi obsahy sledovaných MK stanovených v oleji, v jednom semeni a v segmentu semene. Dle předběžných výsledků se jeví přesnost minimalizačních metod jako dostatečná.

Klíčová slova: řepka olejka, mastné kyseliny, plynová chromatografie

Úvod

Řepka ozimá má v současnosti silné postavení v českém i evropském zemědělství. Ve sklizňovém roce 2013 zaujímala v ČR téměř 420 tis. ha orné půdy a stala se po ozimé pšenici druhou nejpěstovanější plodinou. Olej, který v semenech moderních odrůd řepky zaujímá 46 až 49 % sušiny [1], je využíván v potravinářství (výroba rafinovaných jedlých olejů, margarínů, a z nich odvozených výrobků), chemickém průmyslu (např. kaučukové směsi, glycerín) a k výrobě paliv pro vznětové motory. Extrahované řepkové šroty, samotné řepkové semeno, nebo surový olej, jsou pak hodnotnou složkou krmiv pro hospodářská zvířata. Složení MK je rozhodující pro kvalitu oleje a tím i pro jeho výsledné použití. Dominantní složkou řepkového oleje je kyselina olejová (u „klasických“ odrůd 57 až 68 %, u odrůd typu „High Oleic“ až 80 % oleje). Oleje s vyšším zastoupením kyseliny olejové jsou vhodnější pro teplou kuchyni (smažení). Naopak olej s vyšším podílem kyseliny linolové a hlavně kyseliny linolenové je velmi vhodný k použití ve studené kuchyni. Z hlediska lidské výživy je nežádoucí obsah kyseliny erukové, která způsobuje kardiální lipózu, špatnou resorpci při trávení a retardaci růstu. Moderní odrůdy typu „00“ tuto kyselinu již téměř neobsahují. Naopak v některých odvětvích chemického průmyslu je kyselina eruková požadovaná pro výrobu detergentů a maziv. Odrůdy s vyšším podílem kyseliny erukové (50 %) se označují jako „E0“ [2, 3].

Jelikož je kvalita oleje dána především genotypem (odrádou), je do značné míry ovlivnitelná šlechtitelským procesem. V rámci projektu „Využití biotechnologických metod, nových výchozích materiálů a efektivních postupů ve šlechtění ozimé řepky (NAZV, č. QI111A075)“ jsou mimo jiné řešeny aktivity s cílem zvýšit efektivitu tvorby nových genotypů řepky s požadovaným obsahem MK. Významné zefektivnění by měla přinést možnost velmi rané selekce vhodných genotypů ještě před vysetím semen. Za tímto účelem byly v roce 2013 analyzovány vzorky semen řepky ozimé metodou plynové chromatografie, a to jednak klasickými postupy (izolace oleje z většího množství semene) a současně s využitím postupů stanovení v minimálním množství vzorku. Na základě výsledků byla posouzena možnost praktického využití minimalizačních postupů pro ranou selekci požadovaných genotypů. Vyvinutá metoda bude v další fázi aplikována pro stanovení MK v dělohách mikrosporových regenerantů řepky (dihaploidní linie).

Materiál a metody

Pro uvedený pokus bylo při sklizni v roce 2013 odebráno 18 vzorků řepky ozimé z geneticky ustálených šlechtitelských materiálů a registrovaných odrůd. Stanovení skladby MK proběhlo v izolovaném řepkovém oleji, v jednom semeni a v segmentu jednoho semene. Z důvodu možnosti dopěstování rostliny ze semene, u kterého současně proběhlo stanovení obsahu MK, byly provedeny pokusy s jeho rozdělením na část pro chemickou analýzu a na část, která si ponechala schopnost klíčit a kterou bylo možné vysít. Za tímto účelem bylo potřeba stanovit správný postup rozdělení semene na příslušné segmenty. Při přípravě vzorku bylo nutné respektovat anatomicko-morfologickou stavbu řepkového semene. Praktickým zkoušením nevhodnějšího řezu bylo otestováno kolem deseti způsobů vedení. Řez byl veden skalpelem pod binokulární lupou za pomoci laboratorní pinzety. Rozdělená semena byla podrobena zkoušce klíčivosti na Petriho miskách s destilovanou vodou. Po třech dnech proběhlo vyhodnocení. Podle stavu klíčenců a jejich poškození bylo stanoveno, který řez je pro následný růst rostliny nevhodnější. Segmenty byly vysety také přímo do půdního substrátu. Vhodně vedeným řezem nebylo vzcházení rostlin nijak ovlivněno. Dále byly segmenty zkušebně uloženy za běžných skladovacích podmínek po dobu pěti měsíců. Ani tato doba po řezu neměla zásadní vliv na životaschopnost semen.

Izolace oleje klasickým postupem byla provedena z homogenního vzorku osiva o hmotnosti 6 g pomocí Soxhletovy extrakce petroletherem. Po odfoukání petroletheru byl olej vysušen a následně bylo provedeno jeho zmýdelnění methanolickým roztokem NaOH za vzniku alkalické soli a esterifikace zahříváním suchou HCl v methanolu při 80 °C. Vzniklé lipofilní methylestery MK se extrahovaly do petroletheru [4].

Vzhledem k možnostem původní aparatury na esterifikaci MK byl postup přípravy a izolace methylesterů MK z minimálního množství modifikován. Příprava methylesterů MK z jednoho semene, respektive z jeho částí, byla provedena v mikrozkuševkách za použití methanolickeho roztoku NaOH a směsi isooktanu a isopropanolu. Vzniklé lipofilní methylestery MK se extrahovaly do isooktanu.

U připravených vzorků byla stanovena skladba MK pomocí plynové chromatografie s následnou detekcí (GC/FID). Pro identifikaci a stanovení poměrů zkoumaných látek byl použit plynový chromatograf Master GC (DANI Instruments S.p.A.) s plamenově ionizačním detektorem. Separace probíhala na kapilární koloně FAME Wax (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm, Phenomenex). Na kolonu byl dávkován 1 μl roztoku methylesteru naředěným petroletherem nebo izooktanem v módu split 1:20 až 1:80. Počáteční teplota byla nastavena na 195 °C, poté následoval nárůst teploty o 5 °C/min. na teplotu 240 °C s následným nárůstem 10 °C/min. na konečných 250 °C. Celková doba analýzy byla 15 min. Injektor byl vyhříván po celou dobu separace na teplotu 240 °C a detektor na 250 °C. Průtok nosného plynu (H₂) byl 1,8 ml/min. Identifikace píků byla provedena porovnáním se standardní směsí 37 methylesterů MK (Supelco 37 FAMES Standard Mixture) zanalyzované při výše popsaných chromatografických podmínkách a obsah mastných kyselin byl vyjádřen jako procentuální zastoupení jednotlivých kyselin. Pro hodnocení výsledků byl využit statistický program Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA).

Výsledky a diskuze

V jednotlivých vzorcích (extrahovaný olej, 1 semeno a segment semene) byl stanoven obsah 10 hlavních MK. Rozsah zjištěných koncentrací MK udává Tabulka 1. Ve všech vzorcích dominovala kyselina olejová (59,3 - 65,8 %), následovala kyselina linolová (16,4 - 24,1 %), linolenová (6,9 - 10,6 %), palmitová (3 - 6,5 %) a stearová (0,9 - 2,6 %).

Tabulka 1. Rozsah nalezených koncentrací jednotlivých MK ve vzorcích (%)

MK	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C18:2	C18:3	C22:0	C22:1
	palmitová	stearová	olejová	linolová	linolenová	arachová	eikosenová	eikodienová	behenová	eruková
Olej	3-4,3	0,9-1,5	60,2-65,2	18,4-24,1	6,9-9,8	0,3-0,5	0,8-1,1	0,0-0,1	0,2-0,3	-
1 semeno	3,8-5	1-2,4	59,3-65,8	16,4-23,8	7,4-10,6	0,4-0,9	0,8-1,5	0,0-0,1	0,2-0,3	-
Segment Semene	4,2-6,5	1,4-2,6	59,7-65,1	16,7-22,9	7,0-10,0	0,3-0,9	0,8-1,4	0,0-0,1	0,2-0,4	-

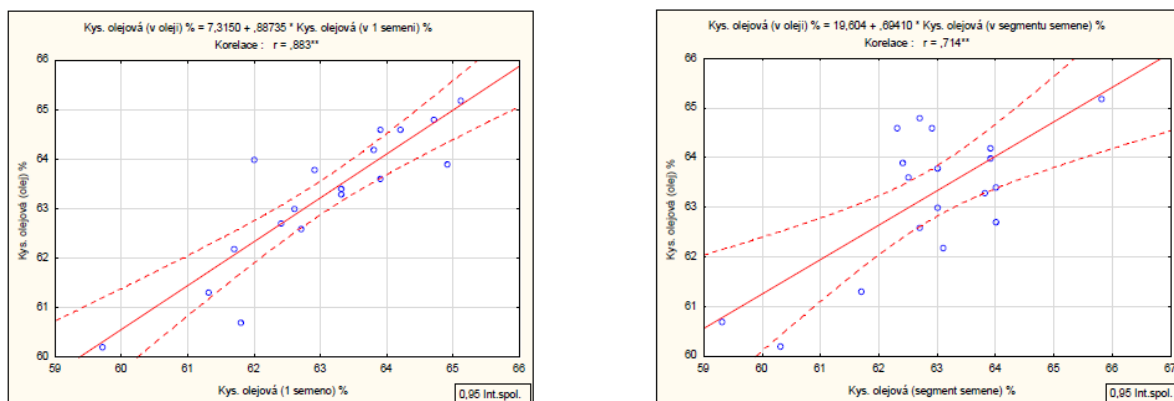
Hlavním cílem pokusu bylo porovnání jednotlivých metod stanovení MK. Za tímto účelem proběhlo stanovení vzájemných závislostí mezi obsahy MK zjištěnými klasickými postupy (referenční metoda) a obsahy MK zjištěnými modifikovanými postupy z minimálních výchozích vzorků. Vztahy byly sledovány u majoritně zastoupených MK (kyselina olejová, linolová a linolenová). Závislosti mezi obsahy uvedených MK byly stanoveny korelační analýzou s výpočtem korelačních koeficientů (Tabulka 2, Obrázek 1).

Byla zjištěna vysoce průkazná pozitivní korelace mezi obsahy kyseliny olejové stanovenými v extrahovaném oleji x 1 semeni ($r = 0,883^{**}$) a v extrahovaném oleji x segmentu semene ($r = 0,714^{**}$). Vysoce průkazný byl také korelační koeficient mezi obsahy kyseliny linolové v extrahovaném oleji x 1 semeni ($r = 0,933^{**}$) a v extrahovaném oleji x segmentu semene ($r = 0,874^{**}$). Mezi obsahy kyseliny linolenové v extrahovaném oleji x 1 semeni ($r = 0,603^{**}$) a v extrahovaném oleji x segmentu semene ($r = 0,592^{**}$) byly identifikovány také vysoce průkazné pozitivní závislosti. Všechny uvedené korelace mezi referenční metodou a minimalizačními postupy byly na hladině významnosti 0,99. Při doplňkovém hodnocení vztahů mezi obsahy kyseliny olejové, linolové a linolenové v segmentu semene x 1 semeni byly stanoveny průkazné pozitivní korelace na hladině významnosti 0,95.

Tabulka 2. Hodnocení vztahu vybraných MK zjištěných v různých výchozích vzorcích

MK	Interakce / výchozí vzorek	Korelační koeficient
Kyselina olejová	olej x 1 semeno	$r = 0,883^{**}$
Kyselina olejová	olej x segment semene	$r = 0,714^{**}$
Kyselina olejová	segment semene x 1 semeno	$r = 0,532^*$
Kyselina linolová	olej x 1 semeno	$r = 0,933^{**}$
Kyselina linolová	olej x v segment semene	$r = 0,874^{**}$
Kyselina linolová	segment semene x 1 semeno	$r = 0,745^{**}$
Kyselina linolenová	olej x 1 semeno	$r = 0,603^{**}$
Kyselina linolenová	olej x segment semene	$r = 0,592^{**}$
Kyselina linolenová	segment semene x 1 semeno	$r = 0,500^*$

Zvýrazněné koeficienty: * významnost na hladině 95%; ** významnost na hladině 99%



Obrázek 1. Příklad závislosti mezi obsahy kyseliny olejové v oleji, semenu a segmentu semene

Závěr

Možnost analýzy obsahu MK z minimálního výchozího vzorku je z praktického hlediska velice přínosné pro včasnou selekci požadovaných genotypů řepky během šlechtitelského procesu. Uvedený pokus prokázal vysokou přesnost minimalizačních postupů. Především aplikace minimalizačních postupů stanovení MK ze segmentu semene s možností dopěstování rostliny z téhož vzorku je předpokladem významného zefektivnění výběru a následného vedení perspektivních linií. V rámci uvedeného projektu je plánováno minimalizační postupy aplikovat také pro stanovení obsahu mastných kyselin v dělohách mikrosporových embryí dihaploidních regenerantů. V tomto příspěvku byly předloženy jednoleté výsledky, k zobecnění můžeme přikročit po získání víceletých údajů.

Dedikace

Prezentované výsledky byly získány na základě řešení projektu č. QI111A075 „Využití biotechnologických metod, nových výchozích materiálů a efektivních postupů ve šlechtění ozimé řepky“ (2011 – 2014), financovaného MZe prostřednictvím Národní agentury pro zemědělský výzkum.

Použitá literatura

- [1.] ZEHNÁLEK, P. *Seznam doporučených odrůd řepky olejky 2013*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Národní odrůdový úřad. 1. vydání, 2013. Brno. s. 36. ISBN 978-80-7401-069-9.
- [2.] PRUGAR, J. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. VÚPS a.s., Kvasný průmysl, 2008. Praha. s. 167. ISBN 978-80-86576-28-2.
- [3.] KIMBER, D., MCGREGOR D.I. *Brassica Oilseeds. Production and Utilization*. Wallingford – CAB INTERNATIONAL, 1995. s. 219. ISBN: 0 85198 960 8.
- [4.] KOLOVRAT, O. *Stanovení obsahu mastných kyselin v oleji řepkového semene metodou plynové chromatografie (GLC)*. Metodický návod. Oddělení chemické laboratoře VÚOI Opava, nepublikováno. 1991.

Abstract

The content of the fatty acids (FA) was analyzed using gas chromatography in the pure oil, one seed and seed segment of many rapeseed varieties (*Brassica napus*). The aim was created by the modified method for the isolation and determination of FA methylesters using the minimal initial sample. The correlations between the contents of the major FA stained by these three methods were calculated. The significant positive dependence correlation was identified between FA contents of pure oil, one seed and in seed segment from the identical genotype, the analysis of one and segment sample can give the comparable results.