

УДК 577.152.311:582.683.2

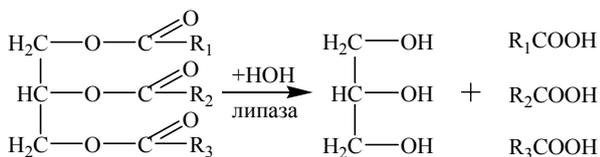
А. И. Никитенко, аспирант (БГТУ);**В. Н. Леонтьев**, кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой (БГТУ);**В. С. Болтовский**, кандидат химических наук, доцент (БГТУ)**МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗ В СЕМЕНАХ РАПСА**

Разработан метод определения липолитической активности, состоящий из следующих стадий: приготовление ферментной вытяжки, отделение высокомолекулярных соединений вытяжки от низкомолекулярных; концентрирование фермента методом диализа с помощью ПЭГ 20000; добавление субстрата к ферментному концентрату; выдерживание системы при 40°C в течение суток; титрование свободных жирных кислот раствором КОН в присутствии индикатора. Полученный концентрат также использовали для определения молекулярной массы фермента методом гель-хроматографии. Молекулярная масса составила 65 кДа.

A method for determination of lipolytic activity has been developed. It comprises the following stages: preparation of enzyme extract, separation of high-molecular compounds of the extract from low-molecular compounds, enzyme concentration using dialysis method by means of PEG 20000, addition of enzyme extract to the substrate, maintaining the system at 40°C for 24 hours; titration of free fatty acids by KOH solution in the presence of the indicator. Received concentrate has also been used for determination of the molecular weight of the lipase by gel-chromatography method. Molecular weight was 65 kDa.

Введение. Рапс (лат. *Brassica napus*) – вид травянистых растений из рода Капуста семейства Крестоцветные [1]. Одна из распространенных масличных культур, культивируемых на территории Республики Беларусь. Она является основным сырьем для производства растительных масел и ценным источником кормового белка. Одним из существенных факторов, влияющих на качество рапсового масла, в первую очередь нерафинированного, является действие липолитических ферментов, попадающих в масло из семян в процессе его извлечения.

Липаза (триацилглицеролацилгидролаза, стеапсин, трибутираза, липаза триглицеридов КФ 3.1.1.3) – фермент, катализирующий гидролитическое расщепление триацилглицеринов до глицерина и жирных кислот [2]. Это соединение представляет собой липопротеин с неорганическим кофактором – ионами кальция. Упрощенная схема гидролиза триацилглицеринов представлена на рис. 1.



R₁, R₂, R₃ – остатки жирных кислот

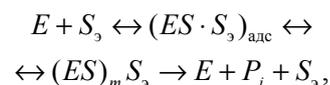
Рис. 1. Упрощенная схема гидролиза триацилглицеринов под действием липазы

Источники:

– семена некоторых растений (злаковые, масличные культуры);

– животные ткани (поджелудочная железа);
– микроорганизмы [3].

Ферментативный гидролиз липидов – гетерогенный процесс. Липазы являются ферментами поверхностного действия и активизируются, лишь находясь на поверхности суперсубстрата, нерастворимого в воде. Конформация фермента изменяется при связывании с субстратом, и полипептидный участок, сдвигаясь в сторону, открывает доступ молекулам субстрата к активному центру [2]. Способность липаз функционировать на поверхности раздела фаз липид – вода подразумевает, что фермент взаимодействует с полярными и неполярными молекулами. Следует отметить, что взаимодействие с неполярными молекулами может вызвать конформационные изменения в структуре фермента, вследствие чего появляется каталитическая активность. Наряду с вышесказанным установлено, что чем выше степень диспергирования субстрата, тем быстрее идет липолиз. Вероятно, это связано с явлением сорбции фермента на поверхности субстрата. Считается, что именно этот процесс и является первым актом ферментативного липолиза, который можно записать следующим образом:



где E – фермент; S_3 – эмульгированный субстрат; S – единичная молекула субстрата; $(ES \cdot S_3)_{\text{адс}}$ – фермент, адсорбированный на поверхности эмульгированного субстрата; $(ES)_m$ – комплекс Михаэлиса; P_i – продукты реакции.

В последнее время интерес к липазам значительно возрос в силу их большой роли и возможности разнообразного применения в различных отраслях промышленности, органическом синтезе, медицине и т. д. [4].

Основная часть. Настоящее исследование основано на предположении о том, что при разрушении семян в процессе их измельчения и прессования в технологии производства растительного масла происходит активация липазы, действие которой приводит к гидролизу триглицеридов и тем самым к ухудшению качества конечного продукта, а именно к увеличению кислотного числа масла. Таким образом, очевидно, что целью настоящей работы является определение липолитической активности в жмыхе семян рапса, представляющее собой важную научно-практическую задачу, решение которой позволит повысить качество получаемого рапсового масла.

В литературе приведено множество способов определения липолитической активности с использованием различных физических и физико-химических методов с применением различных субстратов [4–10].

Первоначально использовали известный титриметрический метод определения липазной активности, применяемый для зерновых культур [5]. Метод заключается в приготовлении ферментной вытяжки в растворе фосфатного буфера ($\text{pH} = 7$) и субстрата, состоящего из рапсового масла, эмульгатора (Tween-20) и воды в виде эмульсии. В качестве субстрата использовали эмульсию, поскольку ферментативный гидролиз является гетерогенным процессом и липаза действует на поверхности раздела фаз липид – вода. Далее к субстрату добавляли ферментную вытяжку и выдерживали при 40°C в течение суток. После окончания ферментативной реакции определяли активность липазы путем титрования $0,01$ н. раствором гидроксида калия в присутствии фенолфталеина.

В качестве источника липазы использовали жмых, полученный при холодном прессовании предварительно измельченных семян.

Однако в процессе эксперимента выяснилось, что ферментная вытяжка имела светло-желтый цвет из-за незначительного перехода масла и пигментов в раствор. Поэтому в процессе титрования не наблюдался резкий переход окраски. Была предпринята попытка использовать другой индикатор, имеющий близкий диапазон перехода окраски (бромтимоловый синий – из желтого в синий). Однако он также не дал положительного результата.

Следующим способом, с помощью которого была предпринята попытка установить точку эквивалентности, стало кондуктометрическое

титрование. Данный метод основан на использовании химической реакции, в результате которой происходит заметное изменение электропроводности раствора [11]. Так как электропроводность является функцией концентрации, то в ходе титрования происходит изменение ее величины: по мере прибавления титранта следят за изменением удельной электропроводности или сопротивления раствора. Кривые кондуктометрического кислотно-основного титрования имеют различный вид в зависимости от силы кислоты и основания. Поскольку в ходе ферментативного гидролиза образуются жирные кислоты, которые являются слабыми, то в данном случае происходит титрование слабой кислоты сильным основанием. При этом до точки эквивалентности должно наблюдаться некоторое снижение электропроводности, связанное с уменьшением концентрации кислоты, но не очень резкое. По мере накопления соли, обладающей одноименным с кислотой анионом, все в большей мере подавляется диссоциация кислоты: вклад в диссоциацию хорошо диссоциирующей соли преобладает, поэтому электропроводность растет. После достижения точки эквивалентности избыток титранта, являющегося сильным основанием, приводит к резкому возрастанию электропроводности. На рис. 1 представлен общий вид, который должна иметь кривая титрования в данном случае.

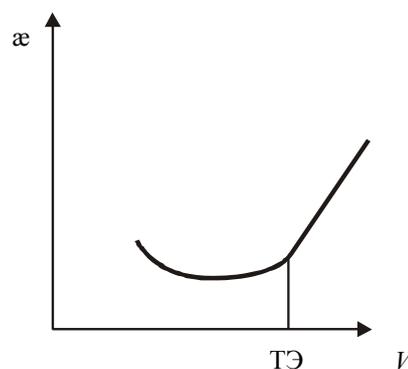


Рис. 1. Кривая кондуктометрического титрования слабой кислоты сильным основанием: κ – электропроводность; ТЭ – точка эквивалентности; V – объем титранта

Однако кривая титрования имела вид, представленный на рис. 2.

Такой вид кривой может быть связан с низкой степенью диссоциации жирных кислот, а также с присутствием посторонних электролитов, так как фоновый сигнал становится столь значимым, что не удастся зарегистрировать изменение электропроводности в ходе титрования.

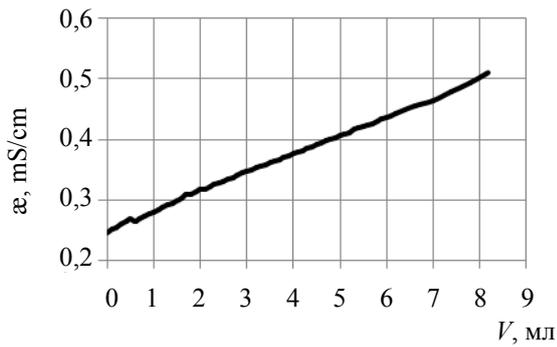


Рис. 2. Кривая кондуктометрического титрования свободных жирных кислот КОН, образовавшихся в субстрате в ходе ферментативного гидролиза

Поэтому было принято решение после получения ферментной вытяжки отделять высокомолекулярные вещества от низкомолекулярных. Для этого после центрифугирования полученный супернатант пропускали через хроматографическую колонку (1,2×27 см), заполненную носителем Sephadex G 25 (Course). Концентрацию белка определяли по методу Варбурга – Христиана, который заключается в измерении оптической плотности раствора при 260 и 280 нм [12]. При этом концентрация раствора вычисляется по формуле

$$C_{\text{мг/мл}} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}, \quad (1)$$

где $C_{\text{мг/мл}}$ – концентрация белка в исследуемой пробе, мг/мл; A_{280} , A_{260} – оптическая плотность раствора при 280 и 260 нм соответственно.

Полученный образец концентрировали в целлофановом мешочке путем погружения его в сухой ПЭГ 20000. В концентрате определяли активность, и поскольку концентрат не имел окраски, то в точке эквивалентности происходило резкое изменение окраски системы в присутствии фенолфталеина.

Проведенный анализ показал, что по отношению к исследуемому объекту модифицированный нами метод позволяет получать стабильные удовлетворительные результаты.

Разработанный метод состоит из следующих стадий:

- приготовление ферментной вытяжки в растворе фосфатного буфера (рН = 7) и субстрата (эмульсия рапсового масла в присутствии эмульгатора Tween-20);
- отделение высокомолекулярных соединений вытяжки от низкомолекулярных;
- концентрирование фермента методом диализа с помощью ПЭГ 20000;
- добавление ферментного концентрата к субстрату;
- выдерживание системы при 40°C в течение суток;
- титрование свободных жирных кислот раствором КОН в присутствии индикатора.

Активность липазы рассчитывалась по формуле

$$A = \frac{C \cdot (V_1 - V_0) \cdot 1000}{t \cdot m}, \quad (2)$$

где A – активность липазы, мкмоль/ч·мг белка; C – концентрация КОН, моль/л; V_1 – объем КОН, пошедший на титрование исследуемой пробы, мл; V_0 – объем КОН, пошедший на титрование контрольной пробы, мл; t – время выдерживания исследуемой пробы, ч; m – масса белка, содержащегося в исследуемой пробе, мг.

Масса белка, содержащегося в исследуемой пробе, вычисляется по формуле

$$m = C_{\text{мг/мл}} \cdot V_{\text{П}}, \quad (3)$$

где $V_{\text{П}}$ – объем ферментного концентрата, прибавляемого к субстрату, мл.

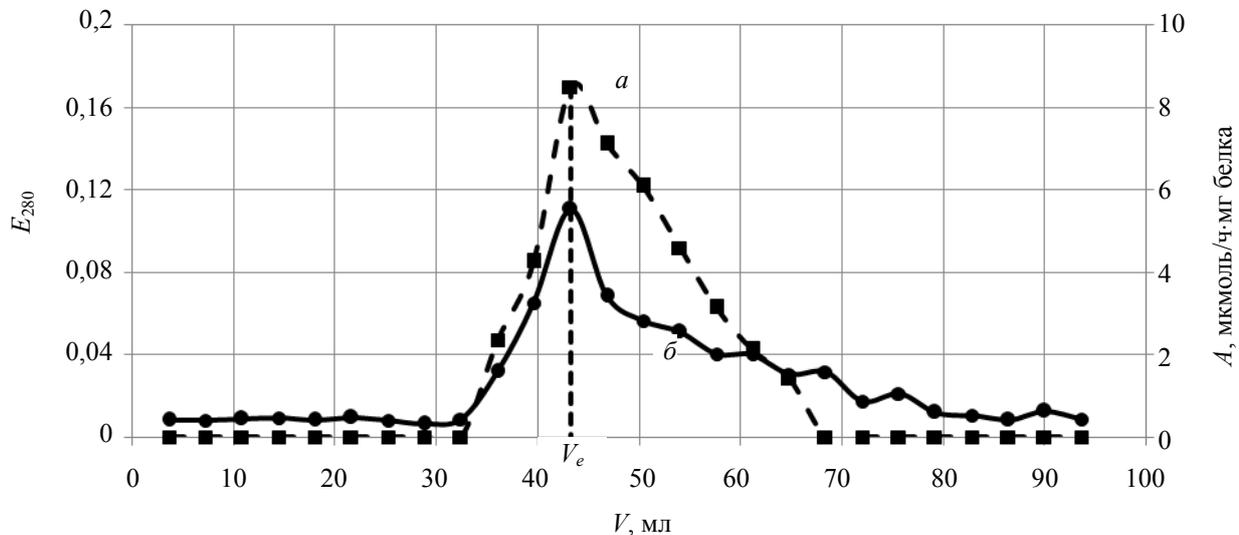


Рис. 3. Профиль элюирования и активность липазы из семян рапса: a – активность липазы; b – профиль элюирования

В дальнейшем полученный таким методом концентрат использовали для определения молекулярной массы фермента. Профиль элюирования представлен на рис. 3. Молекулярную массу липазы определяли методом гель-хроматографии на колонке 1,2×88 см, заполненной TOYAPPEARL HW-55 (FINE).

На рис. 4 показана зависимость объема элюирования от молекулярной массы белка, по которой была определена молекулярная масса липазы.

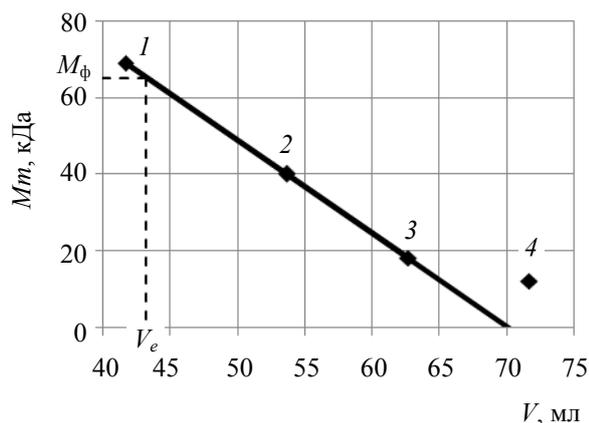


Рис. 4. Зависимость молекулярной массы белка от объема элюирования:

- 1 – альбумин сывороточный (человека) – 69 кДа;
 2 – яичный альбумин – 40 кДа;
 3 – кальмодулин – 17 кДа; 4 – цитохром С – 12 кДа

Молекулярная масса липазы составила 65 кДа, что не противоречит данным литературы [2].

Заключение. В ходе работы были изучены и апробированы различные методики определения липолитической активности, на основании анализа которых был разработан метод, позволивший не только определить активность липазы, но и количественно ее оценить.

Дальнейшие исследования будут направлены на определение активности липазы семян озимого и ярового рапса различных сортов, анализ влияния липазы на качественные показатели масла при различных временах экспозиции, выявление зависимости компонентного состава рапсового масла из семян различных сортов от активности липазы.

Литература

- Щербаков, В. Г. Биохимия и товароведение масличного сырья / В. Г. Щербаков. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 2003. – 360 с.
- Грачева, И. Н. Технология ферментных препаратов / И. Н. Грачева, А. Ю. Кривова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Науч.-произв. об-ние «Элевар», 2000. – 512 с.
- Брокерхоф, Х. Липолитические ферменты / Х. Брокерхоф; пер. с англ. Т. П. Левчук, Э. А. Малаховой, Э. А. Толосы. – М.: Мир, 1978. – 396 с.
- Characteristics of lipase isolated from coconut (*Cocos nucifera* linn) seed under different nutrient treatments / В. О. Ejedegba [et al.] // African Journal of Biotechnology. – 2007. – Vol. 6 (6). – P. 723–727.
- Польгалина, Г. В. Определение активности ферментов: справочник / Г. В. Польгалина, В. С. Чердиченко, Л. В. Римарева. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 376 с.
- Shafei, M. S. Role of some fermentation parameters affecting lipase production by *Fusarium solani* / M. S. Shafei, I. S. Abd-Elsalam // Acta Pharmaceutica Turcica. – 2005. – Vol. 47. – P. 209–223.
- Immunopurification of a rape (*Brassica napus* L.) seedling lipase / Н. Belguith [et al.] // African Journal of Biochemistry Research. – 2009. – Vol. 3 (11). – P. 356–365.
- Sammour, R. H. Purification and Partial Characterization of an Acid Lipase in Germinating Lipid-body Linseedlings / R. H. Sammour // Turkish Journal of Botany. – 2005. – Vol. 29. – P. 177–184.
- Belguith, H. Evidence of cross-reactivity between porcine pancreatic and rapeseed (*Brassica napus* L.) lipases / H. Belguith, T. Jridi, J. B. Hamida // Biochemical Society Transactions. – 2000. – Vol. 28. – P. 974–976.
- Production and Biochemical Characterization of an extracellular lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 / N. Pogori [et al.] // Biotechnology. – 2008. – Vol. 7. – P. 710–717.
- Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа: учеб. для вузов / А. Ф. Жуков [и др.]; под ред. О. М. Петрухина. – М.: Химия, 2001. – 496 с.
- Справочник биохимика: пер. с англ. / Р. Досон [и др.]. – М.: Мир, 1991. – 544 с.

Поступила 07.03.2011