

## ЛИПАЗЫ СЕМЯН РАПСА

А.И. Никитенко, В.Н. Леонтьев, В.С. Болтовский

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

### Введение

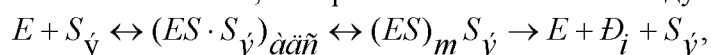
Рапс (лат. *Brassica napus*) – вид травянистых растений из рода Капуста семейства Крестоцветные. Одна из основных масличных культур, культивируемых на территории Республики Беларусь [1]. Одним из существенных факторов, влияющих на качество рапсового масла, в первую очередь нерафинированного, является 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. Представляет собой липопротеин с неорганическим кофактором – ионами кальция [2].

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. 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 [4]. 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;  $S_0$  – эмульгированный субстрат; S – единичная молекула субстрата;  $(ES \cdot S_0)_{адс}$  – фермент, адсорбированный на поверхности эмульгированного субстрата;  $(ES)_m$  – комплекс Михаэлиса;  $P_i$  – продукты реакции.

В последнее время интерес к липазам значительно возрос в силу ее значительной роли и возможности разнообразного применения в различных отраслях промышленности, органическом синтезе, медицине и т. д.

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 (увеличение кислотного числа).

Цель исследования – анализ липолитической активности в жмыхе семян ярового рапса, при прямом холодном прессовании и общая характеристика фермента.

### Методы исследования

В качестве источника липазы использовали яровой рапс сорта «Гермес» урожая 2010 года. Основные характеристики семян представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика семян рапса, используемых для анализа

Показатель	Значение
Влажность, %	5,97
Сорность, %	1,76
Масличность в пересчете на абсолютно сухое вещество, %	39,05
Содержание сырой клетчатки в пересчете на абсолютно сухое обезжиренное вещество, %	18,36
Содержание сырого протеина в пересчете на абсолютно сухое обезжиренное вещество, %	35,61

Измельченные семена подвергали прямому холодному прессованию, и полученный жмых использовали для выделения и анализа липазы. Для чего из средней пробы жмыха отбирали навеску и помещали в колбу с 0,01 М фосфатным буферным раствором (рН 7) в соотношении 1:4. Инкубировали при непрерывном перемешивании на качалке в течение 30 мин и центрифугировали содержимое колбы при 6000 об/мин в течение 5 мин. Полученный супернатант пропускали через хроматографическую колонку (1,2×27 см), заполненную носителем Sephadex G 25 (Course) для отделения высокомолекулярной фракции, содержащей ферменты. Концентрацию белка определяли по методу Варбурга-Христиана [5].

В полученном образце титриметрическим методом измеряли липолитическую активность по количеству свободных жирных кислот, образовавшихся при гидролизе триглицеридов под действием фермента.

В качестве субстрата использовали эмульсию рапсового масла. В стакан вносили 5 см<sup>3</sup> рапсового масла и 0,2 г Tween-20. к смеси добавляли 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, нагревали до 75°C эмульгировали и охлаждали при постоянном перемешивании и далее использовали для анализа.

Аликвоту раствора субстрата (6 см<sup>3</sup>) переносили в колбу и нагревали 10 мин в термостате при 37°C, добавляли 2 см<sup>3</sup> ферментной вытяжки, смесь перемешивали и выдерживали 24 ч при 37°C. Ферментативную реакцию прекращали добавлением 10 см<sup>3</sup> этилового спирта. Для контроля к 2 см<sup>3</sup> ферментной вытяжки приливали 10 см<sup>3</sup> этилового спирта, а затем после перемешивания 6 см<sup>3</sup> раствора субстрата.

Содержимое контрольной и опытной проб титровали 0,02 М раствором гидроксида калия [6] и по полученным данным определяли удельную активность липазы по формуле:

$$A = \frac{\tilde{N} \cdot (V_1 - V_0) \cdot 1000}{t \cdot m},$$

где С – концентрация гидроксида калия, моль/л; V<sub>1</sub>, V<sub>0</sub> – количество гидроксида калия, пошедшего на титрование опытной и контрольной проб, мл; t – время выдерживания опытной пробы, ч; m – масса белка, содержащегося в опытной пробе, мг.

Молекулярную массу липазы определяли методом гель-хроматографии на колонке 1,2×88 см, заполненной TOYAPPEARL HW-55 (FINE). Профиль элюирования представлен на рисунке 1.

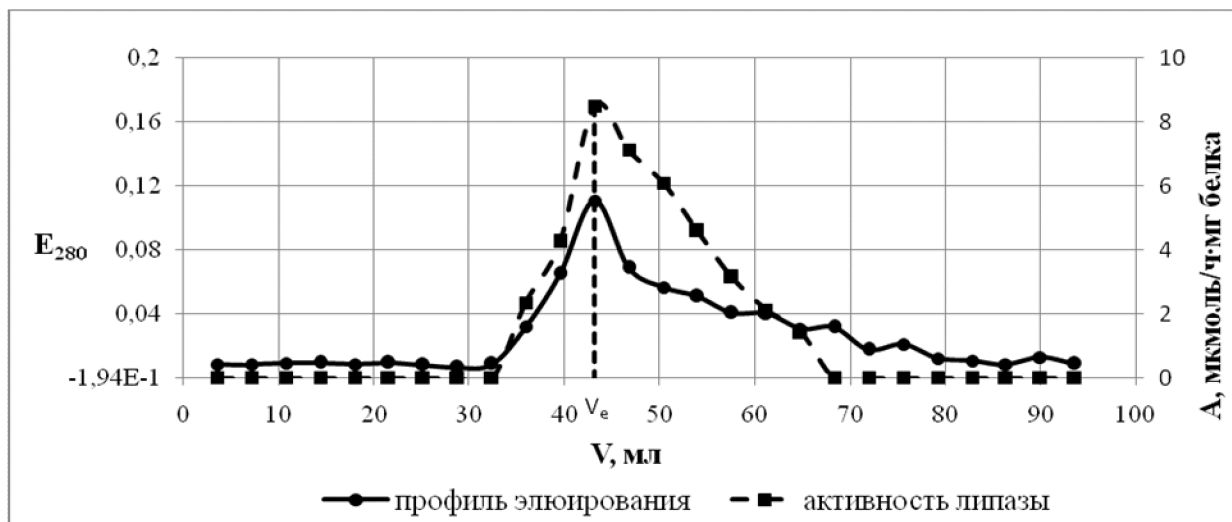


Рисунок 1 – Профиль элюирования и активность липазы из семян ярового рапса сорта «Гермес»

Для калибровки колонки использовали стандартные белки с известными молекулярными массами: альбумин сывороточный (человека) (2), альбумин яичный (3), кальмодулин (4), цитохром С (из сердца лошади) (5). Профиль элюирования стандартных белков представлен на рисунке 2.

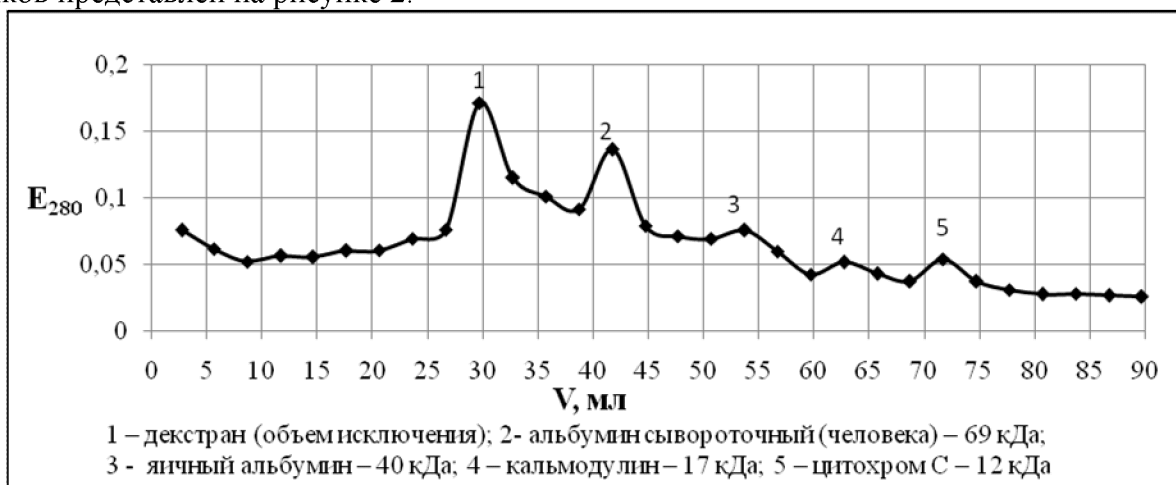


Рисунок 2 – Калибровка колонки

По полученным результатам строили калибровочную зависимость (рисунок 3), на основании которой была определена молекулярная масса липазы из семян рапса, которая составила 65 кДа.

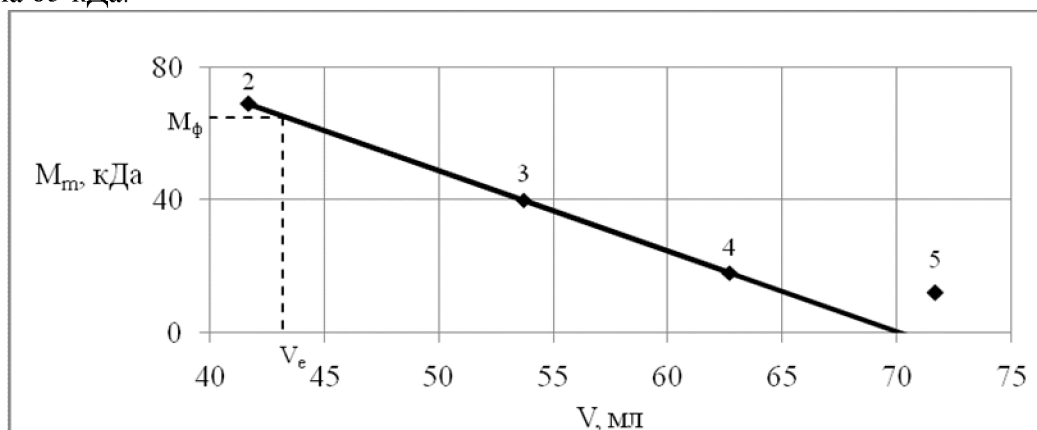


Рисунок 3 – Зависимость молекулярной массы белка от объема элюирования

Таким образом, установлены следующие характеристики липазы из семян рапса:

- Удельная активность 8,5 мкмоль·ч/мг белка;
- Молекулярная масса около 65 кДа.

#### **Выводы**

1. Исследование показало наличие липазной активности в жмыхе, полученном после холодного прессования семян ярового рапса сорта «Гермес» 8,5 мкмоль·ч/мг белка.
2. Молекулярная масса липазы из семян ярового рапса сорта «Гермес» составляет около 65 кДа.
3. Дальнейшее исследование должно быть направлено на анализ липолитической активности в жмыхе, полученном при прямом холодном прессовании семян рапса других сортов, а также влияния липазы на качественные показатели масла при различных временах экспозиции.

#### **Список литературы**

1. Щербаков, В.Г. Биохимия и товароведение масличного сырья / В.Г. Щербаков. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 2003. – 360 с.
2. 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.
3. Брокерхоф, Х., Дженсен, Р. Липолитические ферменты / Пер. с англ. Т.П. Левчук, Э.А. Малаховой, Э.А. Толосы. – М.: Мир, 1978. – 396 с.
4. Рапс / Д. Шпаар [и др]; под общ. ред. Д. Шпаара. – Минск: «ФУАинформ», 1999. – 208 с.
5. Belguith, H. Immunopurification of a rape (*Brassica napus* L.) seedling lipase / H. Belguith, S. Fattouch, T. Jridi, J. Ben Hamida // African Journal of Biochemistry Research. – 2009. – Vol. 3 (11). – P. 356–365.
6. Sammour, R.H. Purification and Partial Characterisation of an Acid Lipase in Germinating Lipidbody Linseedlings / R.H. Sammour // Turk. J. Bot. – 2005. – Vol. 29. – P 177–184.

### **RAPESEED LIPASES**

**A.I. Nikitsenko, V.N. Leontiev, V.S. Boltovskii**

*Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus*

The purpose of the investigation is the analysis of activity of a rape seedling lipase, received by direct cold pressing, and general characteristic of the enzyme.

The enzyme lipase (triacylglycerol acyl hydrolase, E.C. 3.1.1.3) was obtained from the rapeseed cake that had been produced by direct cold pressing method. Lipase activity was determined on the emulsion contained 6,54% of rapessed oil and 0,19% of Tween-20. The molecular weight of the lipase, 64 kDa, was established by gel-penetrating chromatography on the 1,2×88 cm column filled with TOYAPEARL HW-55 (FINE).

The obtained lipase activity was 8,50 mcmmole/h·mg of protein.