

УДК 577.15:577.151.03:577.152.311:544.773.32

ОСОБЕННОСТИ ВЫБОРА ТЕМПЕРАТУРЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РЕАКЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА МАСЛА САФЛОРА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛИПАЗЫ ИЗ *Candida rugosa*

Майдина, А.Б. Белова, А.В. Левашов, Н.Л. Клячко

(кафедра химической энзимологии; e-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru)

Работа посвящена изучению катализируемого липазой из *Candida rugosa* гидролиза масла сафлора в эмульсии типа масло в воде, стабилизированной поверхностно-активным веществом, дезоксихолатом натрия, под действием температуры. Показано, что выбор оптимальной для проведения данной реакции температуры определяется не только ее влиянием на каталитическую активность и стабильность фермента, но и действием на состояние реакционной среды, эмульсии, от «качества» которой существенным образом зависят как кинетические параметры липазы, так и выход продукта реакции, линолевой кислоты. Так, например, несмотря на то, что наибольшее значение начальной скорости ферментативной реакции наблюдается при 40°C и фермент практически не инактивируется при его инкубации (45°C), наибольший выход реакции наблюдается при 30°C, и при повышении температуры реакционной смеси он снижается, что обусловлено именно изменением «качества» эмульсии.

Липаза (гидролаза триглицеридов К.Ф.3.1.1.3) – фермент, катализирующий гидролиз триглицеридов до моноглицеридов и жирных кислот, содержится в организме животных [1], в растениях [2] и в микроорганизмах [3–5]. Липаза – уникальный биокатализатор, имеющий широкую субстратную специфичность; в настоящее время широко используется в органическом синтезе [6, 7], медицине [8–10] и целлюлозно-бумажной промышленности [12] (см. также обзоры [13–14]).

Субстратами липазы являются нерастворимые в воде триглицериды, в то время как фермент хорошо растворим в воде, иными словами, реакции должны протекать на поверхности раздела фаз. Основной отличительной особенностью многих липаз является их способность к поверхностной активации фермента в присутствии агрегированных молекул субстрата (жировых капель) [15–17].

Известно, что растительные масла различаются по составу входящих в них жирных кислот. Масло сафлора является уникальным, в нем может содержаться до 80% ценной полиненасыщенной линолевой кислоты (*цис*-, *цис*-октадекадиен-9-12-овая кислота) [18]. Ферментативное получение свободных жирных кислот из триглицеридов представляется весьма перспективным способом. Привлекательность ферментативных процессов связана с тем, что, во-первых, не окисляются двойные связи ненасыщенных жирных кислот, а, во-вторых, технологические процессы, основанные на приме-

нении липаз, не оказывают отрицательного воздействия на окружающую среду [19].

В случае липаз (помимо традиционных для ферментативных реакций параметров) свойства реакционной среды, в частности «качество» эмульсии, играют особую роль. В данной работе методом рН-стабилизации были изучены параметры реакции ферментативного гидролиза масла сафлора под действием липазы в эмульсии типа масло в воде, стабилизированной поверхностно-активным веществом (ПАВ), дезоксихолатом натрия, при разных значениях температуры с целью выбора оптимального температурного режима для скорости реакции и выхода получаемого продукта. Проведено изучение влияния температуры как на фермент, так и на реакционную среду, а именно состояние эмульсии.

Экспериментальная часть Материалы и методы

В работе были использованы полученные из разных источников коммерческие препараты липаз (КФ 3.1.1.3) фирмы “Sigma” (США): *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Candida rugosa*. В качестве субстрата использовали масло сафлора красильного (*Carthamus tinctori*) производства КНР. Дезоксихолат, хлорид и гидроксид натрия (“ос.ч.”) изготовлены фирмой “ДИА-М”.

Выделившуюся при гидролизе масла кислоту титровали 25 мМ раствором гидроксида натрия в автоматическом режиме с использованием рН-стата

(ТТТ80, АВU80, "Radiometer", Дания) с термостатируемой ячейкой.

Дополнительную стабилизацию эмульсии типа масло в воде проводили ультразвуковой обработкой с использованием ультразвуковой ванны ("Branson 1510E-MTH", "150W", "50-60Hz").

Приготовление стабильной эмульсии. К 5 или 10 мл 20–50 мМ водного раствора NaCl, pH 7,5–9,5, добавляли 50–300 мкл запасного (20%) раствора дезоксихолата натрия (необходимая оптимальная концентрация ПАВ была определена в специальном эксперименте по зависимости активности используемых ферментов от концентрации ПАВ), 60–100 мкл масла сафлора. Эмульсию подвергали действию ультразвука 2 раза по 10 мин, тщательно перемешивая в промежуток между обработками.

Измерение скорости и определение выхода ферментативной реакции. В предварительно приготовленную эмульсию добавляли 100 мкл запасного (10 мг/мл) раствора фермента (в случае препарата нерастворимой иммобилизованной липазы фермент добавляли непосредственно в ячейку рН-стата в концентрации 2 мг/5 мл) и определяли количество выделившейся кислоты методом автоматического титрования ее гидроксидом натрия при постоянном значении pH раствора, оптимальном для каждой из липаз.

Изучение зависимости активности, стабильности фермента и выхода продукта от температуры. Для определения скорости ферментативной реакции в зависимости от температуры проводили измерения в ячейке рН-стата при соответствующей температуре. Для определения стабильности (остаточной активности) фермента его инкубировали при температуре 20–55°C. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, добавляли в приготовленную эмульсию и измеряли количество выделившейся кислоты методом рН-статиования в стандартных условиях при 30°C. Стабильность эмульсии и влияние ее "качества" на активность фермента определяли при 30 и 45°C, инкубируя именно эмульсию при данных температурах. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, добавляли липазу и измеряли количество выделившейся кислоты методом рН-статиования в стандартных условиях при 30°C.

Результаты и их обсуждение

Известно, что температура является одним из факторов, влияющих на скорость как химических, так и

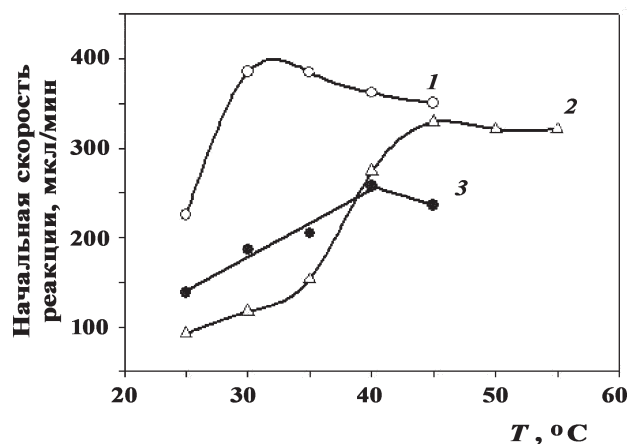


Рис. 1. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза масла сафлора, катализируемой липазами из *Alcaligenes* (1), *Burkholderia* (2) и *Candida rugosa* (3), от температуры. Условия эксперимента: концентрация фермента, мг/мл: 1, 3 – 1; 2 – 2; концентрация дезоксихолата натрия 1,2%; pH 9,5; 50 мМ NaCl

ферментативных реакций. Зависимости начальной скорости реакции гидролиза масла сафлора, катализируемой липазами из разных источников, приведены на рис. 1. Как видно, во всех случаях повышение температуры реакции приводит к ее ускорению до некоторого предела, за которым может следовать уменьшение скорости, как это показано на примерах липаз из *Alcaligenes* и *Candida rugosa*. Для липазы из *Burkholderia* обнаруживается кажущаяся независимость скорости реакции от температуры. Такой ход зависимости может быть обусловлен различными процессами (инактивация фермента, переход реакции в диффузионно-контролируемый режим и т.д.). Было показано, что некоторое понижение скорости реакции при повышении температуры не сказывалось существенно на выходе продукта реакции гидролиза масла сафлора – линолевой кислоты. Исключением являлась липаза из *Candida rugosa*, данные для которой приведены на рис. 2. Как видно из рисунка, наряду с уменьшением скорости реакции при температурах выше 30°C (рис. 2, а) наблюдалось существенное уменьшение выхода продукта (рис. 2, б). Так, выход продукта реакции гидролиза масла сафлора, катализируемой липазой из *Candida rugosa* при 45°C, уменьшается более чем в 2 раза по сравнению с наблюдаемым при 30°C (рис. 2, б). Как уже отмечалось выше, липаза является одним из ферментов, для функционирования которых важно наличие поверхности раздела фаз [15–17]. В нашем случае поверхность раздела фаз стабилизирована наличием поверхностно-активного вещества – дезоксихолата натрия. Чем может быть обусловлено столь существенное сниже-

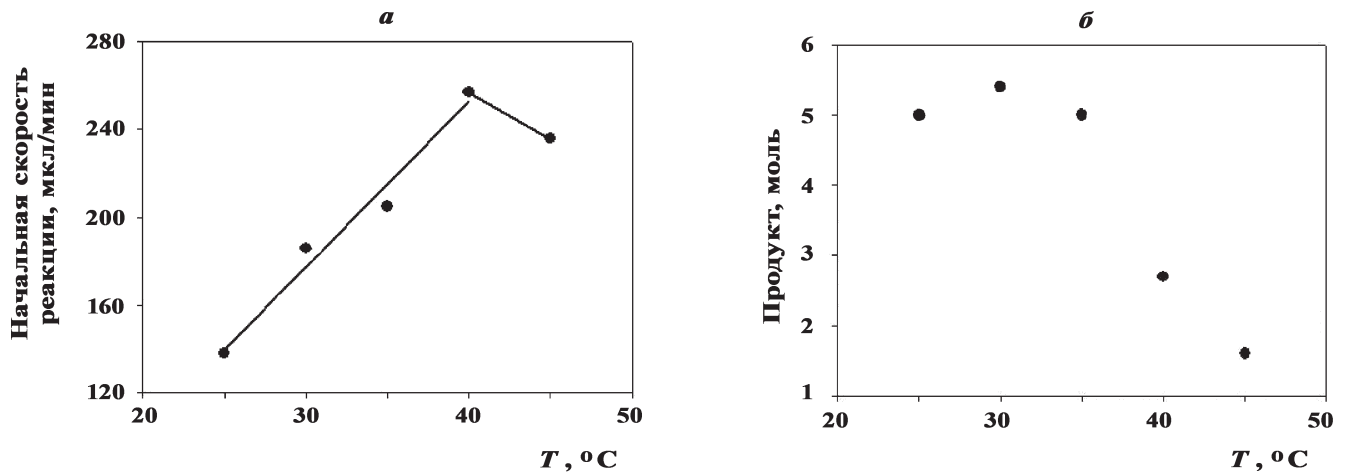


Рис. 2. Зависимость начальной скорости (а) и концентрации продукта (б) реакции гидролиза масла сафлора, катализируемой липазой из *Candida rugosa*, от температуры. Условия эксперимента представлены в подписи к рис. 1

ние выхода, инактивацией фермента или “качеством” эмульсии? Для ответа на этот вопрос в специальном эксперименте было проведено инкубирование при 45°C как фермента, так и эмульсии в течение 45 мин, т.е. времени проведения реакции до полного ее истощения, при котором фиксировалось количество образовавшегося продукта (рис. 2, б). Результаты представлены на рис. 3. Как видно, предварительное инкубирование фермента (1) практически не приводило ни к изменению начальной скорости (рис. 3, а) реакции

гидролиза масла сафлора, катализируемого липазой из *Candida rugosa*, ни к изменению величины выхода продукта реакции (рис. 3, б). В то же время предварительное инкубирование эмульсии (2) сказывалось как на начальной скорости (рис. 3, а), так и на выходе продукта реакции (рис. 3, б), существенно снижая оба параметра катализируемого липазой из *Candida rugosa* процесса.

Таким образом, для липазы из *Candida rugosa* выбор температуры реакции имеет принципиальное

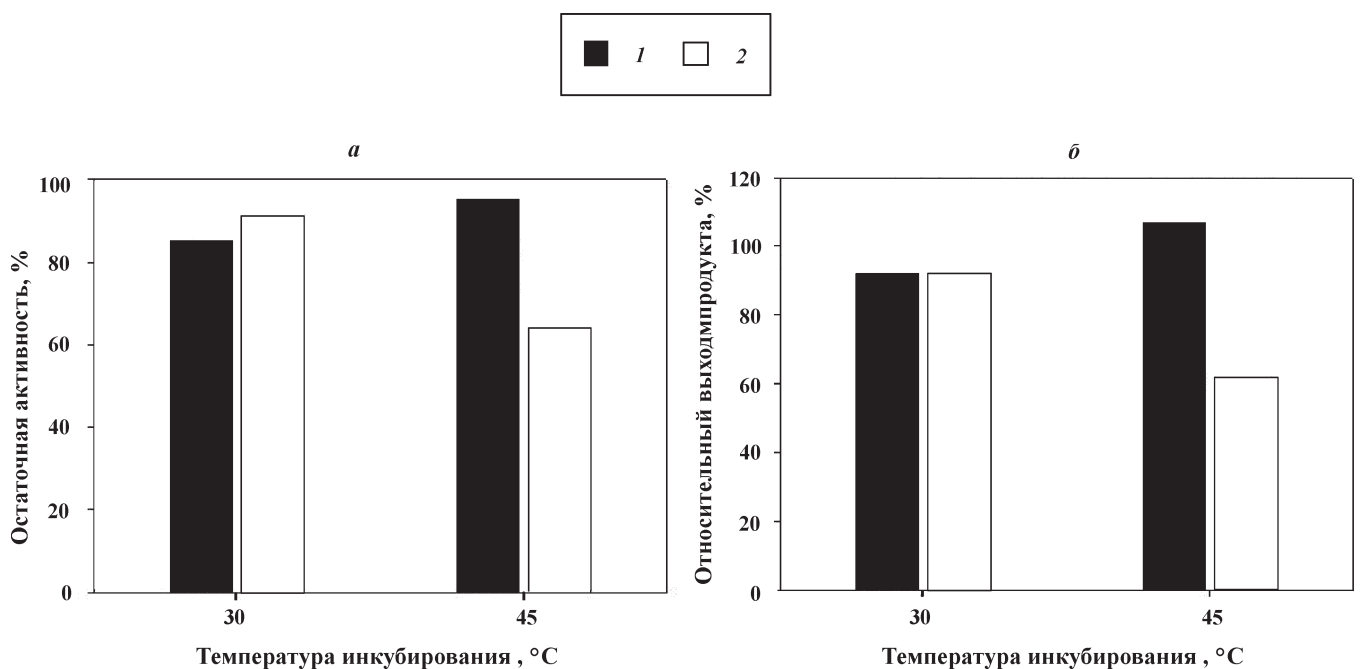


Рис. 3. Зависимость остаточной активности фермента (а) и выхода продукта (б) реакции гидролиза масла сафлора, катализируемой липазой из *Candida rugosa*, измеренной в стандартных условиях при 30°C после инкубирования фермента (1) и эмульсии (2) при 30 и 45°C в течение 45 мин. Условия эксперимента представлены в подписи к рис. 1

значение не только как фактор, влияющий на активность и стабильность фермента, но и как фактор,

влияющий на состояние реакционной среды и/или поверхности раздела фаз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Carrier F., Bezzine S., Verger R.* // J. Mol. Catalysis. B. 1997. **3**. P. 55.
2. *Borgstrom B., Brockman H.L.* Lipases. Amsterdam, 1984.
3. *Jaeger K.E., Ransas S., Dijkstra B.W., Colson C., van Heuvel M., Misset O.* // FEMS Microbiol. Rev. 1994. **15**. P. 29.
4. *Gilbert E.J.* // Enzyme Microb. Technol. 1993. **15**. P. 634.
5. *Wohlfahrt S., Jaeger K. E.* // Bio Engineering. 1993. **9**. P. 39.
6. *Gutman A.L., Shapira M.* // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 1995. **52**. P. 87.
7. *Chopineau J., Kieboom P.G., Klivanov A.M., Riva S.* // J. Amer. Chem. Soc. 1998. **110**. P. 584.
8. *Wicke-Planquart C., Canaan S., Riviere M., Dupius L., Verger R.* // Protein Eng. 1996. **9**. P. 1225.
9. *Carriere F., Moreau H., Raphel V., Laogier R., Benicourt C., Junien J.L., Verger R.* // Eur. J. Biochem. 1991. **202**. P. 75.
10. *Suzuki A., Mizumoto A., Sarr M.J., Dimagno E.P.* // Gastroenterology. 1997. **112**. P. 2048.
11. *Gudmundsson B.O., Almarsson O., Haraldsson G.G.* // Tetrahedron Lett. 1993. **34**. P. 5791.
12. *Fijita Y., Matsukura M., Hata K., Shimoto H., Sharyo M., Skaguchi H., Gibson K.* // Tappi J. 1992. **75**. P. 117.
13. *Reetz M.T., Jaeger K.-E.* // TIBTECH 1998. **161**. P. 396.
14. *Reetz M.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2002. **6**. P. 145.
15. *Брокерхоф Х., Дженсен Р.* Липолитические ферменты. М., 1978.
16. *Schmid R.D., Verger R.* // Angew. Chem. Int. Ed. 1998. **37**. P. 1608.
17. *Verger R.* // TIBTECH. 1997. **15**. P. 32.
18. *Чен Хао., Жинь Ли Хуа.* Химия липидов. Пекин, 2004.
19. *Xu X., Fomuso L. B., Akoh C. C.* // J. Agric. Food Chem. 2000. **48**. P. 3.

Поступила в редакцию 23.11.07

PECULIARITIES OF TEMPERATURE CHOISE FOR LYPASE CATALISED HYDROLYSIS OF SUFFLOWER OIL

Maidina, A.B. Belova, A.V. Levashov, N.L. Klyachko

(Division of Chemical Enzymology)

The article is devoted to investigation of temperature influence on catalytic hydrolysis of safflower oil in surfactant- stabilized water-in-oil emulsion. It was shown, that the choice of optimal temperature is defined not only by the temperature influence on the enzyme stability, but on the reaction media state also.