



УДК 577.15.2.311.03

БИФЕРМЕНТНАЯ СИСТЕМА ЛИПАЗА/ЛИПОКСИГЕНАЗА В ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛАХ АОТ В ОКТАНЕ

© 2002 г. И. М. Павленко[#], О. С. Купцова, Н. Л. Клячко, А. В. Левашов*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва, Воробьевы горы*

Поступила в редакцию 17.01.2001 г. Принята к печати 30.03.2001 г.

Показана принципиальная возможность функционирования биферментной системы липаза/липоксигеназа в среде обращенных мицелл ди(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты (АОТ) в октане. В качестве субстрата липазы использовали препарат рыбьего жира (жира морских млекопитающих) с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот. Показано, что биферментная реакция протекает в стационарном режиме с лимитирующей стадией процесса, катализируемой липазой. В оптимальных условиях эффективность работы биферментной системы в среде обращенных мицелл на порядок выше, чем в водном растворе. Таким образом, биферментная система липаза/липоксигеназа может быть использована в качестве нового спектрофотометрического метода определения липазной активности.

Ключевые слова: биферментная система; липаза; триглицериды; жирные кислоты; липоксигеназа; обращенные мицеллы.

ВВЕДЕНИЕ

Липаза (гидролаза триацилглицеридов, КФ 3.1.1.3) – фермент, гидролизующий эфиры глицерина и жирных кислот, широко встречается у животных [1], растений [2] и микроорганизмов [3–5]. Данный фермент играет ключевую роль в обмене липидов всех живых организмов, а также участвует в процессах отложения и мобилизации жира, используемого в качестве энергетического резерва клетки. Липаза – уникальный биокатализатор, имеющий распространенную субстратную специфичность, сегодня повсеместно используется в органическом синтезе [6, 7], медицине [8–10], пищевой [11] и бумажной [12] промышленности.

Однако определение липолитической активности – в целом непростая задача, а существующие на сегодняшний день методы весьма сложны, неудобны на практике и, как правило, не обладают высокой чувствительностью. Так, например, турбидиметрический [13] и сталагмометрический [14] методы, основанные на измерении изменения физических свойств реакционной системы, не дают надежных результатов, поскольку эти физические свойства зависят от многих факторов, в том числе и от pH, присутствия ионов металлов. Данные методы не нашли широкого применения. Колориметрические и флуориметрические методы, основанные на определении выделившихся спиртов, например, метод Флетчера [15], обеспе-

чивают большую точность, чем вышеназванные. Однако применение этого метода ограничено по той причине, что используемые в качестве субстрата липазы фениловые эфиры короткоцепочечных жирных кислот не могут служить адекватными, специфическими субстратами липаз. Наиболее часто для определения активности липаз используются методы, в которых измеряют освобождаемые ферментом жирные кислоты [16, 17]. Чувствительность метода определения жирных кислот можно значительно повысить, применяя колориметрические методы [18, 19]. Метод pH-статирования позволяет определять начальные скорости липазной реакции, но является относительно малочувствительным и применим только в щелочной области pH [20]. Нельзя не упомянуть и высокочувствительный флуориметрический метод с использованием синтетических флуорогенных ацилглицеридов [21]. Однако получение триглицеридов, содержащих флуорофор на конце алифатической цепи, весьма непростая задача, что обуславливает дороговизну этого метода.

Данная работа посвящена изучению биферментной системы липаза/липоксигеназа в среде обращенных мицелл АОТ–вода–октан (рис. 1). Выбор липоксигеназы в качестве второго фермента связан с тем, что она может окислять полиненасыщенные жирные кислоты, высвобождая из триглицеридов в результате их гидролиза, катализируемого липазой (первый фермент) (см. схему).

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-34-29; факс: (095) 939-34-29; эл. почта: ivanka_p@aport.ru).

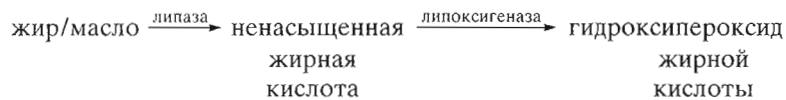


Схема.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения кинетических характеристик липазы и липоксигеназы, функционирующих в отдельности, в качестве субстратов использовали *n*-нитрофениллаурат (NPL) и линолевую кислоту соответственно.

Значения k_{cat} для липазы в водной среде превышают наблюдаемые в обращенных мицеллах (таблица). Однако, как видно из рис. 2, в мицеллярной среде отсутствует эффект ингибирования субстратом, наблюдаемый в водном растворе. Значение k_{cat} для липоксигеназы в обращенных мицеллах с высоким содержанием воды практически совпадает с k_{cat} для водной среды, хотя K_m при этом существенно ухудшается. Возможно, такой результат связан с концентрированием субстрата в органической фазе (октане).

В независимом эксперименте было установлено, что липаза в системе линолевая кислота/липоксигеназа и липоксигеназа в системе NPL/липаза, добавленные в рабочем диапазоне концентраций, не оказывали существенного влияния на активность друг друга, а главное, не вызывали ингибирующего эффекта.

pH-Зависимости начальных скоростей реакций гидролиза NPL и окисления линолевой кислоты, катализируемые липазой и липоксигеназой, соответственно, приведены на рис. 3. Значения pH для системы обращенных мицелл отвечают pH буферного раствора, используемого для приготовления мицелл требуемой степени гидратации ($w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$). Установлено, что pH-оптимум каталитической активности липазы в системе обращенных мицелл при w_0 25 и 15 равен 8.5, что соответствует ее pH-оптимуму в водном рас-

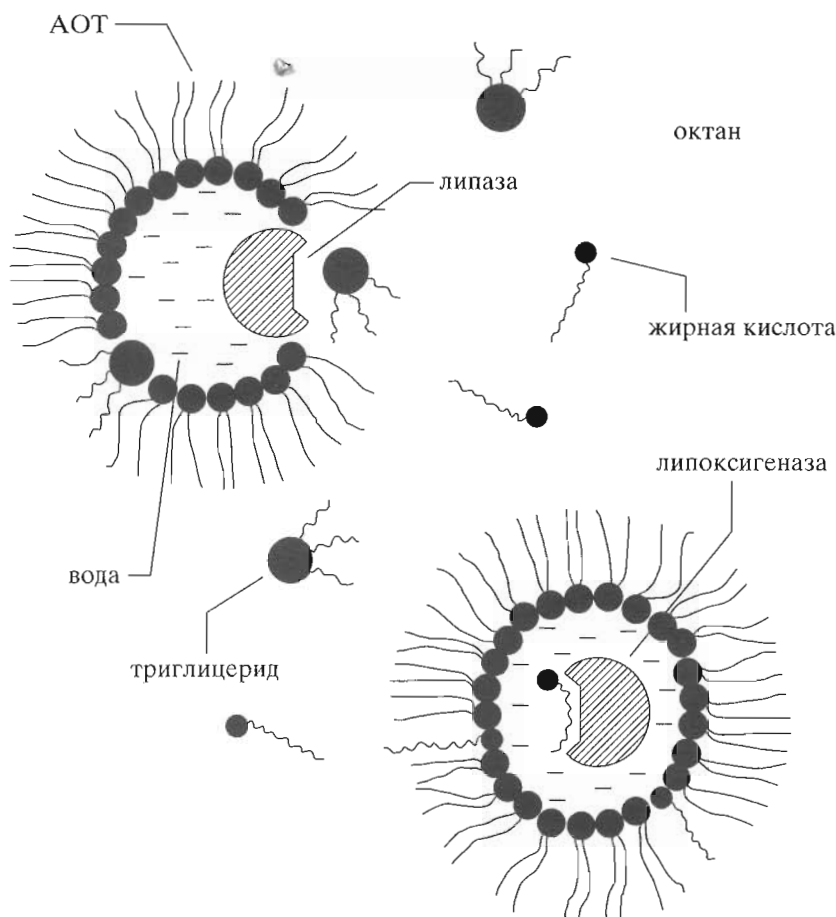


Рис. 1. Схематическое представление биферментной системы липаза/липоксигеназа в системе обращенных мицелл.

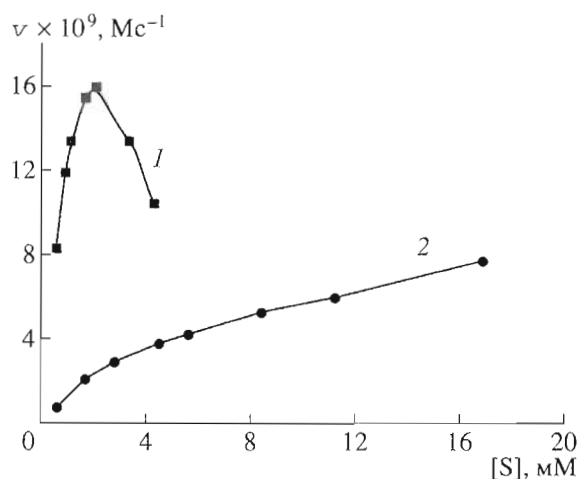


Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза NPL, катализируемой липазой, от концентрации субстрата: 1 – в водной среде (0.1 М Трис, pH 8.0), 2 – в системе обращенных мицелл (w_0 25, 0.05 М АОТ в октане, 0.1 М Трис, pH 8.0); $[E]_0$ 1.36×10^{-6} М.

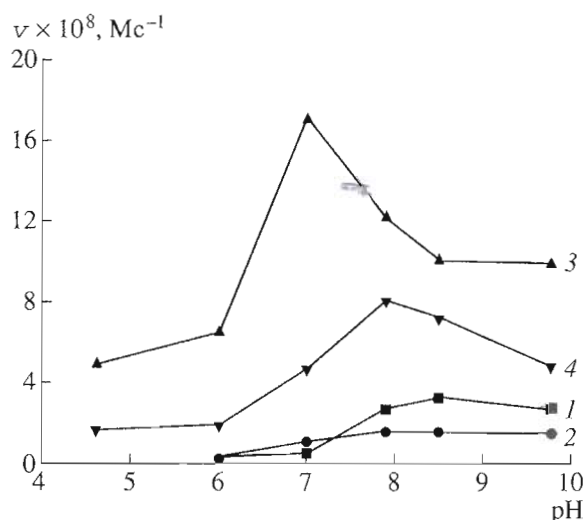


Рис. 3. pH-Зависимость каталитической активности липазы (1, 2) и липоксигеназы (3, 4), функционирующей в системе обращенных мицелл; w_0 25 (1, 3) и 15 (3, 4); $[E]_0$ 4.5×10^{-7} М.

творе. Липоксигеназа проявляла наибольшую активность при pH 7.0 в водной среде и системе обращенных мицелл при w_0 25. В системе обращенных мицелл с меньшим содержанием воды наблюдалось смещение pH-оптимума липоксигеназной активности до 8.0. Полученный результат, по-видимому, можно объяснить изменением свойств самого фермента при вынужденном контакте с полиэлектролитной матрицей АОТ при малом содержании воды в мицелле. Анализируя pH-зависимости обоих ферментов, можно заключить, что значение pH 8.0 оптимально для функционирования биферментной системы липаза/липоксигеназа в системе обращенных мицелл.

Для изучения кинетики реакции в биферментной системе липаза/липоксигеназа в качестве субстрата липазы был использован рыбий жир (жир морских млекопитающих), характеризующийся высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот в составе триглицеридов. Было обнаружено, что при его биферментном превращении в мицеллярной среде, как и в водном растворе, наблюдается лаг-период. Согласно кинетике биферментных реакций [22] лаг-период наблюдает-

ся при условии, что скорость первой стадии много меньше скорости второй.

Для определения лимитирующей стадии процесса последовательного превращения рыбьего жира были получены зависимости начальной скорости биферментной реакции от концентрации каждого из ферментов. Как видно из рис. 4, начальная скорость биферментного процесса практически не зависит от концентрации второго фермента (липоксигеназы), напротив, для липазы (первого фермента) эта зависимость имеет линейный характер. Полученные зависимости свидетельствуют о том, что реакция, катализируемая липазой, является в данном случае лимитирующей стадией всего процесса. Важно отметить отсутствие фонового гидролиза рыбьего жира, а также неспособность липоксигеназы окислять сам рыбий жир. Таким образом, наблюдаемая скорость характеризует именно активность липазы.

Как видно из рис. 5, в биферментном процессе превращения рыбьего жира в системе обращенных мицелл АОТ в октане, в отличие от водного раствора, не наблюдается ингибирование субстратом. Значение максимальной скорости реакции

Кинетические характеристики ферментов в водном растворе и системе обращенных мицелл АОТ в октане

Система	Липаза		Липоксигеназа	
	$k_{\text{cat}} \times 10^3, \text{c}^{-1}$	$K_m \times 10^3, \text{M}$	$k_{\text{cat}}, \text{c}^{-1}$	$K_m \times 10^3, \text{M}$
0.1 М Трис	22.3	1.4	2.1	4.4
0.05 М АОТ, w_0 10	1.5	9.4	0.4	29.5
0.05 М АОТ, w_0 15	3.7	5.9	1.9	26.1
0.05 М АОТ, w_0 25	3.9	5.1	2.0	20.8

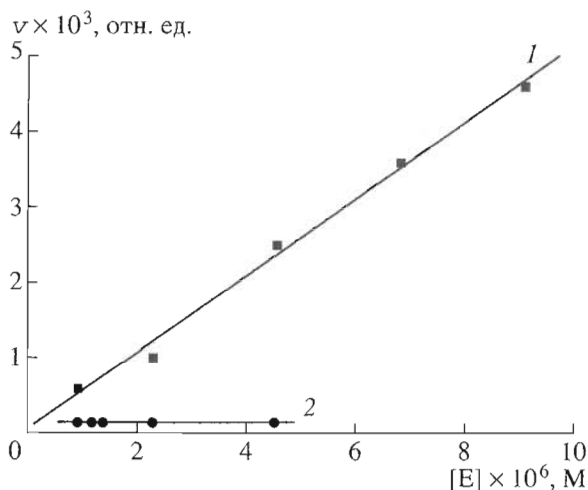


Рис. 4. Зависимость начальной скорости биферментного процесса превращения рыбьего жира (S) в системе обращенных мицелл (w_0 25) от концентрации липазы (1) и липоксигеназы (2). $[S]_0$ 1.136 мг/мл.

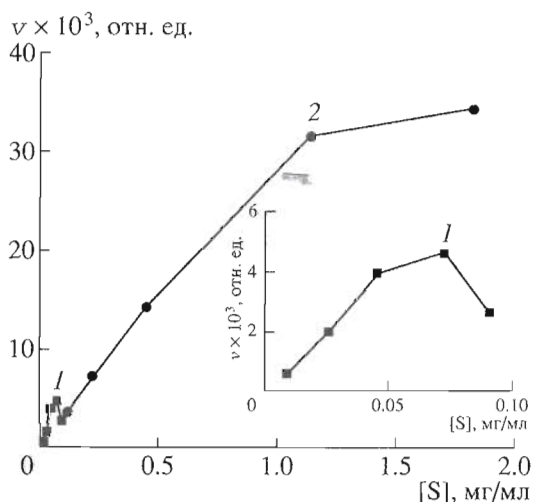


Рис. 5. Зависимость начальной скорости биферментного процесса превращения рыбьего жира в водном растворе (1) и в системе обращенных мицелл (w_0 25) (2) от его концентрации. $[Липаза]_0$ 4.5×10^{-6} М, $[Липоксигеназа]_0$ 9.1×10^{-7} М.

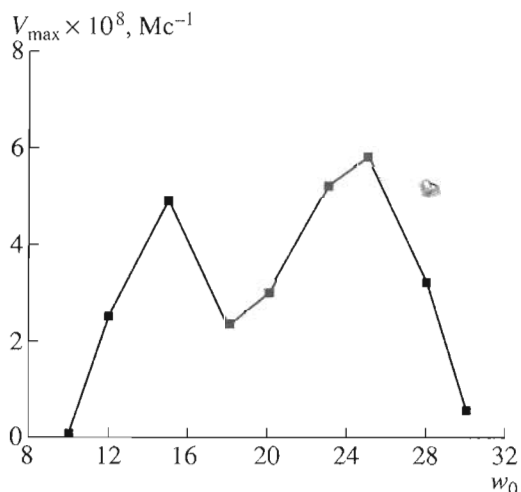


Рис. 6. Зависимость максимальной скорости реакции гидролиза NPL, катализируемой липазой в системе обращенных мицелл, от степени гидратации АОТ. $[E]_0$ 9.1×10^{-6} М.

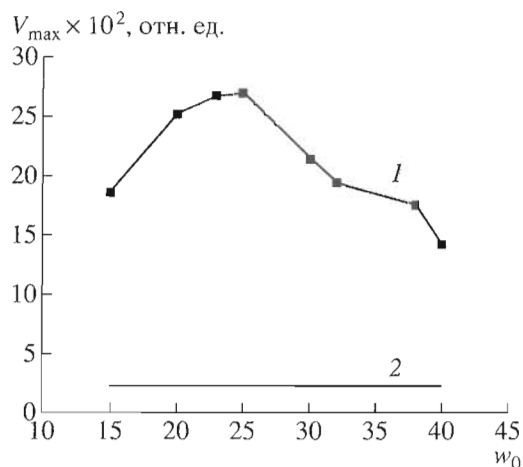


Рис. 7. Зависимость максимальной скорости биферментного процесса от степени гидратации АОТ; $[E]_0$ 9.1×10^{-6} М (1). Для сравнения приведен уровень максимальной скорости данного процесса в водном растворе (2).

в обращенных мицеллах на порядок выше, чем в водной среде.

Известно, что каталитическая активность многих ферментов зависит от степени гидратации молекул ПАВ (параметр, контролирующий размер внутренней полости мицеллы) [23]. Эта зависимость описывается кривой с максимумом. Оптимальная каталитическая активность ферментов, солюбилизованных в обращенных мицеллах, как правило, наблюдается в условиях соответствия размеров белка и мицеллярной матрицы [24].

На рис. 6 представлена полученная зависимость каталитической активности липазы от степени гид-

ратации, имеющая вид кривой с двумя максимумами при w_0 15 и 25. Подобные зависимости, имеющие несколько оптимумов, наблюдаются для ферментов, способных функционировать в виде ассоциатов разного олигомерного состава. В этом случае оптимумы на кривой зависимости каталитической активности от степени гидратации ПАВ соответствуют функционированию разных форм белка, в том числе и его отдельных субъединиц. Из литературных данных [25] известно, что панкреатическая липаза свиньи представляет собой мономерный белок с молекулярной массой 50 кДа. Согласно принципу соответствия геометрических

размеров белка и внутренней полости мицеллы при оптимальном значении w_0 , данный белок должен был бы проявлять наибольшую каталитическую активность при w_0 15. Наличие еще одного оптимума при w_0 25, по-видимому, свидетельствует о способности липазы образовывать молекулярные агрегаты, в данном случае, согласно расчетам, тетрамер. Известно [26], что зависимость каталитической активности соевой липоксигеназы от w_0 не имеет ярко выраженного максимума; фермент проявляет наибольшую активность при значениях степени гидратации $w_0 > 20$.

Для биферментной системы липаза/липоксигеназа оптимум каталитической активности наблюдается при w_0 25 (рис. 7). Сравнение зависимостей, представленных на рис. 6 и 7, позволяет сделать вывод о том, что оптимум при w_0 25 для биферментной системы соответствует функционированию тетрамера липазы. В свою очередь наличие плеча на кривой зависимости (рис. 7) при больших значениях w_0 может быть связано с образованием более сложных биферментных ассоциатов.

Наблюдаемая максимальная скорость, проявляемая данной сопряженной системой в мицеллярной среде при разных значениях w_0 на порядок превышает максимальную скорость, наблюдаемую в водном растворе. Эти данные говорят об отсутствии диффузионных затруднений при перераспределении субстратов липазы и липоксигеназы в органической фазе, что еще раз подчеркивает преимущество использования в качестве реакционной среды системы обращенных мицелл по сравнению с водным раствором.

Таким образом, в работе показана возможность экспрессного и непрерывного определения липазной активности с помощью биферментной системы липаза/липоксигеназа в среде обращенных мицелл. Следует отметить простоту приготовления системы и легкость ее эксплуатации.

В настоящий момент одной из важных практических задач в пищевой промышленности является получение триглицеридов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, поскольку утилизация именно этих кислот в организме человека снижает, в частности, риск сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме этого, конечные продукты метаболического превращения ненасыщенных жирных кислот, содержащих 1,4-*цис,цис*-пентаденильный фрагмент и являющихся природными субстратами липоксигеназ, представляют собой биологически важные вещества, такие, как лейкотриены, тромбоксаны и простагландины, выполняющие регуляторную функцию в организме человека [27, 28]. Поэтому предлагаемая нами биферментная система липаза/липоксигеназа может оказаться удобной тест-системой для определения ненасыщенных жирных кислот в со-

ставе триглицеридов масел и жиров, позволяющей установить их пищевую ценность.

Замена в данной биферментной системе липазы на фосфолипазу, возможно, позволит определять фосфолипазную активность. Сопряженная система липаза/липоксигеназа также может быть удобной для изучения позиционной специфичности липаз при использовании в качестве субстратов триглицеридов с различным положением в них ненасыщенных жирных кислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали панкреатическую липазу свиньи (КФ 3.1.1.3), соевую липоксигеназу-1 (КФ 1.13.11.12), *n*-нитрофениллаурат (NPL), линолевую кислоту, натриевую соль ди(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты (аэрозоль ОТ, АОТ) (Sigma, США), три(гидроксиметил)аминометан (Трис) (Fluka, Швейцария), гликохолат натрия (Ferak, Германия), двенадцативодный гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, октан перегнаный (Реахим, Россия), аптечный препарат рыбьего жира.

Все кинетические измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-265 FW (Япония), снабженном термостатируемым кюветным отделением, при температуре 30°C.

Для измерений в водной среде растворы субстрата и фермента готовили в буферном растворе (0.1 М Трис, pH 8.0, содержащий 10 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, 1% (по весу) гликохолат натрия) непосредственно перед экспериментом. В системе обращенных мицелл для этих целей использовали 0.05 М раствор АОТ в октане, 0.1 М Трис, pH 8.0, без солей.

Активность липазы определяли по начальной скорости накопления продукта (*n*-нитрофенола) в реакционной смеси в ходе ферментативной реакции гидролиза субстрата (NPL) по методу Флетчера [15] при непрерывной спектрофотометрической регистрации при λ 400 нм. Фоновый гидролиз субстрата в условиях опыта отсутствовал.

Активность липоксигеназы определяли по начальной скорости накопления продукта (гидроксипероксида линолевой кислоты) в реакционной смеси в ходе ферментативной реакции окисления линолевой кислоты согласно [26]. Измерения проводили путем непрерывной спектрофотометрической регистрации кинетики реакции при λ 234 нм в водной среде и при λ 245 нм в системе обращенных мицелл АОТ в октане.

Для определения максимальной скорости биферментной реакции в водной среде реакционную смесь, содержащую 2.2 мл буферного раствора, соответствующее количество водной эмульсии рыбьего жира с концентрацией 2 мг/мл, 10 мкл раствора липоксигеназы (2 мг/мл), термостатировали 2 мин при 30°C, после чего добавляли 10 мкл раствора

липазы (50 мг/мл). Регистрировали кинетику накопления гидропероксида жирной кислоты при λ 234 нм. В системе обращенных мицелл реакционную смесь готовили непосредственно в спектрофотометрической кювете. Для этого в 2.2 мл 0.05 М раствора АОТ в октане солиubilizовали соответствующее количество раствора рыбьего жира с концентрацией 50 мг/мл, необходимое количество буферного раствора в соответствии с требуемой степенью гидратации, 10 мкл раствора липоксигеназы (2 мг/мл). Полученную смесь термостатировали 2 мин при 30°C. Затем добавляли 10 мкл раствора липазы (50 мг/мл). Реакционную смесь интенсивно встряхивали и регистрировали накопление гидропероксида жирной кислоты при λ 245 нм при 30°C. Скорость реакции выражали в единицах оптического поглощения в минуту (отн. ед.).

Фоновый гидролиз субстрата в условиях опыта отсутствовал. Не обнаружена способность липоксигеназы окислять жирные кислоты в составе триглицеридов.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов ФЦНТП "Новейшие методы биоинженерии: Биокаталитические технологии", NWO № 047-007-005 (Голландия), NATO № LST.CLG.974984.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carriere F., Bezzine S., Verger R. // J. Mol. Catal. B. 1997. V. 3. P. 55–56.
2. Borgstrom B., Brockman H.L. Lipases. Amsterdam: Elsevier, 1984.
3. Jaeger K.E., Ransas S., Dijkstra B.W., Colson C., van Heuvel M., Misset O. // FEMS Microbiol. Rev. 1994. V. 15. P. 29–63.
4. Gilbert E.J. // Enzyme and Microb. Technol. 1993. V. 15. P. 634–645.
5. Wohlfahrt S., Jaeger K.E. // BioEngineering. 1993. V. 9. P. 39–46.
6. Gutman A.L., Shapira M. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 1995. V. 52. P. 87–128.
7. Chopineau J., Kieboom P.G., Klibanov A.M., Riva S. // J. Am. Chem. Soc. 1998. V. 110. P. 584–589.
8. Wicke-Planquart C., Canaan S., Riviere M., Dupuis L., Verger R. // Protein Eng. 1996. V. 9. P. 1225–1232.
9. Carriere F., Moreau H., Raphel V., Laugier R., Benicourt C., Junien J.L., Verger R. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 202. P. 75–83.
10. Suzuki A., Mizumoto A., Sarr M.J., Dimagno E.P. // Gastroenterology. 1997. V. 112. P. 2048–2055.
11. Gudmundsson B.O., Almarsson O., Haraldsson G.G. // Tetrahedron. Lett. 1993. V. 34. P. 5791–5794.
12. Fujita Y., Matsukura M., Hata K., Shimoto H., Sharyo M., Skaguchi H., Gibson K. // Tappi J. 1992. V. 75. P. 117–122.
13. Vogel W.C., Zieve L. // Clin. Chem. 1963. V. 9. P. 168–172.
14. Rona P., Michaelis L. // Biochemistry. 1911. V. 31. P. 345–351.
15. Fletcher P.D.I., Robinson B.H. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. 1985. V. 81. P. 2667–2679.
16. Dole V.P. // J. Clin. Invest. 1956. V. 35. P. 150–156.
17. Dole V.P., Meinertz H. // J. Biol. Chem. 1960. V. 235. P. 2595–2601.
18. Han D., Kwon D.Y., Rhee J.S. // Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. P. 615–618.
19. Walde P. // J. Amer. Oil. Chem. Soc. 1990. V. 67. P. 110–115.
20. Mattson F.H., Volpenhein R.A. // J. Amer. Oil. Chem. Soc. 1966. V. 43. P. 286–291.
21. Zandonella G., Haalck L., Spener F., Paltauf F., Hermetter A. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 1997. V. 3. P. 127–130.
22. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. М.: Фаир Пресс, 1999. С. 280–289.
23. Мартинек К., Левашов А.В., Клячко Н.Л., Хмельницкий Ю.Л., Березин И.В. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 669–696.
24. Martinek K., Levashov A.V., Klyachko N.L., Pantin V.I., Berezin I.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1981. V. 657. P. 277–294.
25. Schmid R.D., Verger R. // Angew. Chem. Int. Ed. 1998. V. 37. P. 1608–1633.
26. Kurganov B.I., Shkarina T.N., Malal'kova E.A., Davydov D.R., Chebotarena N.A. // Biochimie. 1989. V. 71. P. 573–578.
27. Marx J.L. // Science. 1982. V. 215. P. 1380–1382.
28. Lagaede M., Gualde N., Rigaud M. // Biochemistry. 1989. V. 257. P. 313–320.

The Lipase/Lipoxygenase Bienzyme System in AOT Reversed Micelles in Octane

I. M. Pavlenko[#], O. S. Kuptsova, N. L. Klyachko, and A. V. Levashov

[#]Fax: +7 (095) 939-3429; phone +7 (095) 939-3429; e-mail: ivankap@aport.ru

Moscow State University, Chemical Faculty, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

In this work it is shown that the bienzyme lipase/lipoxygenase system can function in reversed micelles of bis(2-ethyl)hexyl sulfosuccinate (AOT) in octane. As a lipase substrate, a fish fat preparation (fat of sea mammals) with a high content of polyunsaturated fatty acids was used. It was demonstrated that the bienzyme reaction proceeded in a stationary mode and had a rate-limiting step catalyzed by lipase. Under optimal conditions, the efficacy of functioning of the bienzyme system was by an order of magnitude higher than that in water. The lipase/lipoxygenase bienzyme system can be used as a new method of spectrophotometric determination of lipase activity. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: bienzyme system, fatty acids, lipase, lipoxygenase, reversed micelles, triglycerides