СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛИПАЗЫ I RHIZOPUS ORYZAE 1403 К ЖИРНЫМ КИСЛОТАМ

С. А. Шеламова, Н. М. Дерканосова, Н. В. Янышева

Воронежская государственная технологическая академия, г. Воронеж, Россия,
biochem@vgta.vrn.ru

Специфичность липаз по отношению к строению жирнокислотного остатка исследуется различными методами. Некоторые авторы считают, что при этом нужно использовать синтетические субстраты - эфиры спиртов (чаще метанола) или β-нафтола и нитрофенола. Этот подход кажется корректным, но как показывают результаты, важную роль играет «вторая половина» субстрата. Поэтому специфичность к жирным кислотам, установленная, например, на метиловых эфирах может быть более или менее отличной от эфиров, других спиртов и триглицеридов.

В настоящей работе определялась жирнокислотная специфичность одной из изоформ липолитического комплекса микромицета *Rhizopus oryzae* 1403 - Липазы I. Для этого использовано два подхода. С одной стороны, изучена кинетика гидролиза некоторых синтетических гомогенных триглицеридов. С другой, применен метод, предложенный G. Aggelis et al., 1993, согласно которому в качестве субстратов использовали метиловые эфиры жирных кислот, полученные путем метилирования некоторых природных масел и жиров, имеющих характерный жирнокислотный состав (молочный и рыбий жир, касторовое и льняное масло).

Начальные скорости реакции были определены экспериментально при оптимальных условиях действия фермента - температуре (35±1) ºС, и pH 6,5. Концентрация триглицеридов в реакционной смеси составляла 0,5-5,0 мМ, фермента - 10-70 μг/ см^3. Кинетические параметры гидролиза триглицеридов - K_M и V_{max} были определены с помощью метода двойных обратных координат Лайнуивера-Берка и составили 502-786 μМ и 4,66-15,62 μМ·мин$^{-1}$ мг$^{-1}$ соответственно. По сродству Липазы I к исследуемым триглицеридам их можно расположить в следующий ряд по жирнокислотным остаткам:

$$C_4 < C_8 < C_{10} < C_{12} < C_{18:1} < C_{18:2}.$$

Жирнокислотную специфичность фермента при гидролизе метиловых эфиров жирных кислот природных масел оценивали по коэффициенту K(FA), который представляет собой отношение концентрации жирных кислот в продуктах гидролиза $[FA]_p$ к их концентрации в исходном субстрате $[FA]_s$, в % масс.:

$$K(FA) = [FA]_p / [FA]_s.$$

При предпочтительном гидролизе метиловых эфиров коэффициент K(FA)>1.

Результаты исследований показали, что предпочтительность Липазы I растет к жирным кислотам с длиной цепи от 4 (K(FA) 0,25) до 18 атомов углерода (K(FA) 1,05-1,50), а для $C_{20:1}$ этот показатель уже снижается и составляет 0,27. Такая тенденция наблюдалась на всех маслах.

В пределах длины углеводородной цепи 14-18 явно была выражена специфичность к ненасыщенным жирным кислотам с одной и двумя двойными связями. Линоленовая кислота являлась менее предпочтительной, так же как и рицинолевая. Это говорит о том, что наличие большого количества (больше 2) двойных связей и окси-группы может создавать пространственные затруднения при образовании фермент-субстратного комплекса.