

Научная статья

УДК 577.663

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-1-57-66>



Усовершенствование методики определения липазы, основанной на методе получения жирных кислот, в ферментных препаратах для пищевой промышленности

Е.М. Серба, Е.Н. Соколова✉, М.Б. Оверченко, Л.В. Римарева, Н.И. Игнатова,
Ю.А. Борщева

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», г. Москва, Российская Федерация

Аннотация. Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к отраслям, объем продукции которых постоянно растет, а сфера применения неуклонно расширяется. Создание промышленного производства наиболее широко используемых ферментных препаратов помогает существенно интенсифицировать и усовершенствовать многие существующие технологии или даже сформировать принципиально новые. Все это свидетельствует о том, что производство ферментных препаратов является одним из перспективных направлений в биотехнологии, которое будет и далее интенсивно расширяться. В этой связи большой интерес для многих отраслей народного хозяйства, где необходим частичный или полный гидролиз жиров и масел, представляют липазы. Они находят применение в пищевой и легкой промышленности, сельском хозяйстве, медицине, а также в аналитической практике. Проведены сравнительные исследования 3-х методов, основанных на реакции гидролитического расщепления сложноэфирных связей в молекуле жира с высвобождением свободных жирных кислот. Установлены оптимальные параметры наибольшего образования жирных кислот. Выбран субстрат, на котором получена более стабильная эмульсия с более высокой точностью измерений. В результате установлены оптимальные условия проведения биокаталитической реакции гидролиза субстрата (оливкового масла) с использованием стандартного ферментного препарата «Липаза»: температура составляет 40 °С; рН – 4,7; продолжительность – 20 мин. С целью получения достоверных данных и подтверждения подобранных оптимальных параметров проведены сравнительные исследования по определению активности липазы в различных объектах микробного происхождения. При варьировании дозировкой ферментного препарата активность липаз находится в пределах 5% погрешности измерений, что принято в стандартных методиках определения активности ферментного препарата для пищевой промышленности и подтверждено экспериментальными данными.

Ключевые слова: растительные масла, методики, ферментные препараты, жирные кислоты, гидролиз

Для цитирования: Серба Е.М., Соколова Е.Н., Оверченко М.Б., Римарева Л.В., Игнатова Н.И., Борщева Ю.А. Усовершенствование методики определения липазы, основанной на методе получения жирных кислот, в ферментных препаратах для пищевой промышленности // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 1. С. 57–66. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-1-57-66>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Improving an approach to lipase determination in enzyme preparations for the food industry based on a method of fatty acid production

Elena M. Serba, Elena N. Sokolova✉, Marina B. Overchenko, Lyubov' V. Rimareva,
Nadezhda I. Ignatova, Yuliya A. Borsheva

Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology – branch of Federal Research Center
of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation

Abstract. The production of enzyme preparations remains to be a promising and permanently growing direction of modern biotechnology. The industrial production of the most widely used enzyme preparations contributes not only to improving the existing technologies, but also to developing fundamentally new processes. In this connection, lipases as part of the processes of partial or complete hydrolysis of oils and fats present significant research interest. Lipases find application in food processing and consumer goods manufacturing, as well as in agriculture, medicine, and analytical practice. In this study, we compare three methods based on the reaction of hydrolytic cleavage of

© Серба Е.М., Соколова Е.Н., Оверченко М.Б., Римарева Л.В., Игнатова Н.И., Борщева Ю.А., 2023

ester bonds in a fat molecule followed by the release of free fatty acids. The optimum parameters providing for the highest production of fatty acids were determined. A substrate to obtain a more stable emulsion under a higher accuracy of measurements was experimentally selected. The established optimum conditions for a biocatalytic reaction of substrate hydrolysis (olive oil) using the conventional enzyme preparation "Lipase" included the temperature of 40 °C, the pH of 4.7, and the duration of 20 minutes. In order to confirm the validity of the data and parameters obtained, comparative studies were carried out to determine lipase activity in various objects of microbial origin. When varying the dosage of the enzyme preparation, the lipase activity was found to be within 5% of measurement accuracy. This error agrees well with the conventional methods of determining the activity of enzyme preparations for the food industry.

Keywords: vegetable oils, methods, enzyme preparations, fatty acids, hydrolysis

For citation: Serba E.M., Sokolova E.N., Overchenko M.B., Rimareva L.V., Ignatova N.I., Borsheva Yu.A. Improving an approach to lipase determination in enzyme preparations for the food industry based on a method of fatty acid production. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(1):57-66. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-1-57-66>.

ВВЕДЕНИЕ

Большинство пищевых технологий основано на биокаталитических методах конверсии сельскохозяйственного сырья. Ферментативный катализ позволяет радикально изменять функционально технологические свойства сырья на различных этапах его переработки, открывая тем самым широкие возможности для создания принципиально новой специализированной продукции [1]. Реализация отечественных ферментных препаратов (ФП) в отраслях пищевой и перерабатывающей промышленности обеспечивает ресурсосбережение и импортозамещение, позволяет снизить расход сырья, увеличить выход и повысить качество целевой продукции.

Базовая основа контроля качества ФП для пищевой промышленности состоит в проведении испытаний по их безопасности, включающих определение непатогенности штамма – продуцента ферментов – и токсичности полученных на его основе биопрепаратов, а также анализ содержания основных и минорных ферментов, по уровню активности которых тестируют ФП [2–4].

В настоящее время ассортимент ФП существенно изменился. На рынке представлены концентрированные ФП микробного происхождения с различной субстратной специфичностью и механизмом действия, обладающие повышенной стабильностью и расширенным диапазоном температурного и pH-оптимума. Наличие ФП с новыми физико-химическими характеристиками привело к необходимости создания современных усовершенствованных методик определения их активности [2]. На основе этих методов осуществляется контроль качества ФП, проводятся исследования по определению их субстратной специфичности и уровня ферментативной активности, разрабатываются условия применения и нормы расхода ФП для биокаталитической переработки сельскохозяйственного сырья.

В последние годы основное внимание уделялось ферментам амилолитического, гемицеллюлазного, протеолитического и пектиназного действия, наибо-

лее широко применяемым в пищевой промышленности (ПП) [3]. Для организации (проведения) контроля качества ФП разработаны национальные и межгосударственные стандарты, включающие унифицированные методы определения их активности¹. Однако отсутствуют стандартизированные методы определения активности ряда ферментов (например, липазы), также необходимых для пищевой промышленности.

Интерес исследователей к одному из важнейших гидролитических ферментов – липазе – существенно возрос [5–7]. Роль липазы как ключевого фермента, участвующего в липидном обмене в организме человека, достаточно велика. Липаза способствует усвоению жирорастворимых витаминов А, D, Е, К, обеспечивает переваривание липидов, участвует в энергетическом обмене [8–10]. В пищевой промышленности липаза применяется в производстве хлебобулочных и кондитерских изделий, сыров; входит в состав многих улучшителей муки [11]. Липолитическое действие фермента при расщеплении высокомолекулярных жирных кислот на фракции используется для формирования аромата и вкуса некоторых продуктов (например, полутвердых и твердых сыров). Перспективно ее применение для переработки вторичного сырья животного происхождения, а также отходов масложировой промышленности; в кожевенной промышленности – при выделке мехов и кож; в сельском хозяйстве – при приготовлении легкоусвояемых кормов и для улучшения обмена веществ у животных² [12].

Липазы делятся на два основных класса гидролаз: «истинные» эстеразы (ЕС 3.1.1.1, гидролазы карбоксиэфиров) и липазы (ЕС 3.1.1.3; триацилглицеролгидролазы; стеапсин; трибутираза; липаза триглицеридов, или ТАГ-липаза)^{3,4}. Эстеразы катализируют разрыв эфирных связей в основном в триглицеридах, состоящих из коротких жирных кислот; они специфичны главным образом в отношении длины и формы углеводородных цепей по обе стороны от эфирной связи.

Наиболее востребованы в ПП ТАГ-липазы, катализирующие гидролитическое расщепление водонерастворимых субстратов, таких как триацилглицерины,

¹Машанов А.И., Величко Н.А., Ташлыкова Е.Е. Биоконверсия растительного сырья. Красноярск, 2014. 223 с.

²Силантьева Л.А. Технология продуктов смешанного сырьевого состава. СПб.: ИТМО, 2016. 40 с.

³Артемук Е.Г., Королько А.В. Ферменты. Брест, 2010. 31 с.

⁴Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии: справочник. Минск: Высшая школа, 1976. 288 с.

состоящие из длинноцепочечных жирных кислот, с образованием высших жирных кислот и глицерина. Гидролиз липидов – это гетерогенный процесс, а липаза обладает способностью функционировать на поверхности раздела фаз (липид–вода). При этом чем выше степень диспергирования субстрата, тем активнее проходит липолиз.

Результаты анализа научно-методической литературы показывают, что для определения активности липолитических ферментов существуют различные методы⁵ [13–15]. Они различаются способами определения количества образовавшихся продуктов гидролиза или остаточного субстрата: нефелометрические, титриметрические и колориметрические. Имеются различия в виде используемого субстрата и его концентрации в реакционной смеси, а также в условиях проведения анализа (температура, pH субстрата, длительность процесса).

Наиболее простыми являются нефелометрические методы, основанные на измерении просветления жировой эмульсии под действием фермента. Однако из-за невысокой точности измерений их в основном используют в качестве экспресс-методов для получения сравнительных или качественных данных⁶ [16].

Ряд методов определения активности липазы основан на титриметрическом определении количества жирных кислот, образовавшихся в результате гидролиза субстрата. При этом в методиках в качестве субстрата используют различные источники, в основном это растительные масла^{7,8} [17, 18]. Описаны методы определения активности липазы с применением трибутирина. Однако на этом субстрате проявляется совместное действие липаз и эстераз [19–21].

Цель работы – исследование процесса биокаталитического гидролиза жирных кислот, источниками которых являлись оливковое, подсолнечное и кукурузное масло, для экспериментального обоснования разработки усовершенствованного метода идентификации и контроля уровня липолитической активности в ферментных препаратах для пищевой промышленности.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных не менее чем в 3-х повторностях осуществляли методом однофакторного дисперсион-

ного анализа с апостериорным критерием Тьюки при $p < 0,05$ с использованием программы Statistica 6.0.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследований являлись нерафинированные растительные масла (подсолнечное, оливковое и кукурузное) – субстраты для проведения биокаталитической реакции; ФП «Липаза» производства фирмы «Энзим» (Украина). Качественные характеристики и показатели безопасности выбранных растительных масел приведены в табл. 1.

Сравнительный анализ количественного содержания продуктов гидролиза проводили с использованием 3-х известных титриметрических методов⁵, основанных на реакции гидролитического расщепления сложнэфирных связей в молекуле жира с высвобождением свободных жирных кислот. Количество щелочи, пошедшее на титрование, прямо пропорционально количеству свободных жирных кислот, образовавшихся в результате ферментативного гидролиза растительного масла.

I метод. В качестве субстрата использовали эмульсию, содержащую 5% подсолнечного масла и 2% альфа-моностеарата. Раствор ФП готовили в 10%-м растворе ацетатного буфера с pH 4,7. Липолитическую активность выражали количеством 0,01 н раствора гидроксида калия (см³), пошедшим на титрование жирных кислот (ЖК), образовавшихся при действии 1 г ФП на субстрат в течение 2-х часов при 40 °С⁵.

II метод. В качестве субстрата использовали эмульсию, содержащую 40% оливкового масла и 2% поливинилового спирта. Липолитическую активность выражали количеством 0,05 н раствора гидроксида натрия (см³), пошедшим на титрование ЖК, образовавшихся при действии 1 г ФП на субстрат в течение 1 ч при 37 °С (pH = 7,0)⁷.

III метод. В качестве субстрата использовали эмульсию, содержащую 50% подсолнечного масла, в 0,1 М ацетатном буфере. Липолитическую активность выражали количеством 0,1 н раствора гидроксида калия (см³), пошедшим на титрование высвободившихся ЖК, образующихся при гидролитическом расщеплении 1 г масла в течение 1 ч при 20 °С (pH = 4,7)⁴.

Таблица 1. Качественные характеристики и показатели безопасности растительных масел

Table 1. Qualitative characteristics and safety indicators of vegetable oils

Показатели	Используемые субстраты		
	Подсолнечное	Оливковое	Кукурузное
Степень и способ очистки	Нерафинированное Первый сорт	Extra virgin	Нерафинированное Первый сорт
Исходное кислотное число, мг КОН/г	1,1±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1
Уровень содержания тяжелых металлов, %	не более 0,001%	не более 0,001%	не более 0,001%
Наличие пестицидов, мг/кг	0,05–0,2	0,05–0,2	0,05–0,2

⁵Полыгалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов: справочник. М.: ДеЛи Принт, 2003. С. 244–247.

⁶Амелина Г.Н., Леонова Л.А. Нефелометрия и турбидиметрия. Томск: ТГУ, 2015. 13 с.

⁷Булавицкая О.А., Егорова И.Е. Обмен липидов. Иркутск: ИГМУ, 2013. 37 с.

⁸Демьянцева Е.Ю., Копнина Р.А. Ферментативный катализ в ЦБП: учебно-методическое пособие. СПб.: СПбГТУРП, 2014. 47 с.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапе работы проведены сравнительные исследования 3-х титриметрических методов определения липолитической активности в ФП «Липаза», взятом в качестве стандартного образца. Заявленная производителем активность составляла 4500 ед/г ФП. Полученные данные показали существенные различия в количественном уровне определяемой липолитической активности, низкую воспроизводимость и высокие погрешности каждой методики.

Результаты проведения анализа липолитической активности ФП «Липаза» (стандартный образец) с использованием тестируемых методов позволили выявить их недостатки.

По I методу:

1) сложности в подготовке субстрата (подсолнечного масла), т. к. его приготовление в ацетатном буферном растворе с рН, равном 4,7, не позволяет получать однородную суспензию. При этом значении рН происходит расслоение субстрата, что мешает проведению ферментативной реакции. Приготовление эмульсии масла с альфа-моностеаратом глицерина на воде позволяет достичь ее стабильности;

2) сложности при титровании жирных кислот, образующихся в результате ферментативного гидролиза: отмечен нечеткий, неустойчивый переход окраски индикатора (фенолфталеина) из бесцветной в розовую, которая исчезает в течение 30–40 сек.;

3) в формуле расчета липолитической активности не учитывалась длительность каталитического процесса.

По II методу:

1) сложности с физическим состоянием эмульсии субстрата, которая через 2–3 мин расслаивалась;

2) титрование проходило более стабильно, но присутствовала высокая погрешность измерений, вызванная расслоением эмульсии субстрата;

3) в формуле расчета липолитической активности не учитывалась длительность каталитического процесса.

По III методу:

1) нестабильность субстрата (подсолнечного масла);

2) использование после проведения ферментативной реакции в качестве инaktivатора диэтилового эфира;

3) в формуле расчета активности присутствует показатель количества субстрата, но не учтены длительность каталитического процесса и количество фермента, взятое на анализ.

С целью получения стабильных результатов при использовании I-го метода скорректированы условия титрования в связи с неустойчивостью перехода окраски индикатора, связанного, по-видимому, с низкой исходной концентрацией субстрата, и, соответственно, незначительного перехода продуктов гидролиза ЖК в реакционную среду. Поэтому в дальнейшем окончание титрования контролировали по потенциометру, доводя значение рН растворов до 9,5–10,0. Однако стабильных показателей достигнуто не было.

Выявленные сложности с физическим состоянием эмульсии субстрата при проведении анализа по II-му методу показали высокую погрешность измерений при титровании, вызванную расслоением эмульсии субстрата.

Для сравнения результатов анализа активность липазы (ед. ЛС/г) рассчитывали по следующей формуле:

$$ЛС = \frac{(V_1 - V_2) \cdot n}{m \cdot t},$$

где V_1 – количество раствора 0,01 н КОН, пошедшее на титрование опытной пробы, см³; V_2 – то же для контрольного образца, см³; m – количество ФП, взятое на анализ, г; n – объем реакционной смеси, взятой на анализ, см³; t – длительность гидролиза, мин.

Результаты расчета липолитической активности в стандартном ФП показали существенный разброс в полученных данных. При этом более стабильные результаты получены по методу III (табл. 2). Количество

Таблица 2. Определение липолитической активности по методу III

Table 2. Determination of lipolytic activity according to method III

Количество ферментного препарата (n), взятого на анализ, г	Количество 0,01 н КОН, пошедшее на титрование, см ³		Активность липазы, ед. ЛС/г
	Опыт	Контроль	
0,00005	0,55	0,20	145,8±13,1
0,00010	0,65		112,5±5,2
0,00015	0,90		116,7±5,8
0,00020	1,15		118,2±5,9
0,00030	0,80		50,0±6,0

Примечание. Значения представлены в виде средних ± стандартное отклонение.

ФП, взятое на исследование, соответствовало механизму фермент-субстратного комплекса.

Показано, что в диапазоне от 0,0001 до 0,0002 г фермента, взятого на анализ, погрешность измерений составила ±5%.

В дальнейшем основные направления для усовершенствования методики включали выбор субстрата, исследование условий проведения ферментативной реакции и уточнение формулы для количественного расчета уровня активности липазы в определяемом образце ФП. В целях замены токсичного реагента, применяемого для инактивации фермента по истечении ферментативной реакции, исследовали возможность его замены на более безопасный.

За основу были взяты условия проведения активности липазы по III-му методу. Изменения в основном заключались в исследовании таких показателей, как длительность гидролиза, объем реакционной смеси и количество ФП, взятое на анализ, которые должны быть учтены в формуле расчета липолитической активности.

Далее проведены исследования по выбору субстрата и времени гидролиза для получения новых экспериментальных данных зависимости активности фермента от времени его гидролиза (рис. 1).

В качестве субстрата использовали один из 3-х видов растительного масла: подсолнечное, оливковое и кукурузное. Гидролиз субстрата проводили в 0,1 М ацетатном буфере при температуре 20 °С. О количестве ЖК в реакционной среде, образующихся в результате ферментативного гидролиза, судили по количеству 0,01 н раствора КОН, пошедшему на титрование прогидролизированных субстратов.

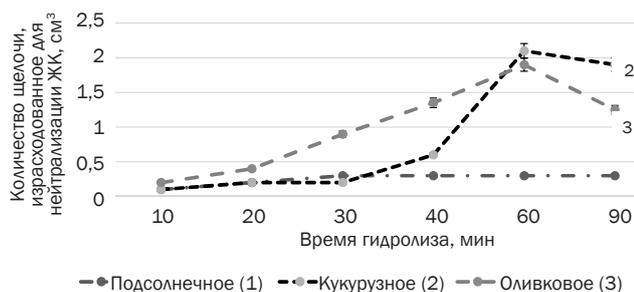


Рис. 1. Влияние длительности ферментативного гидролиза различных видов растительного масла на образование жирных кислот

Fig. 1. Fatty acids formation through enzymatic hydrolysis of various types of vegetable oil

Установлено, что использование в качестве субстрата оливкового масла позволило получить более стабильную эмульсию и повысить точность измерений (см. рис. 1). В процессе его гидролиза отмечен наиболее широкий диапазон, в котором наблюдалась прямо пропорциональная зависимость количества высвобождаемых свободных ЖК от длительности биокаталитической реакции – от 10 до 60 мин. Поэтому в дальнейшем в качестве субстрата использовали оливковое масло.

На следующем этапе исследовали влияние условий ферментативного гидролиза (рН реакционной смеси

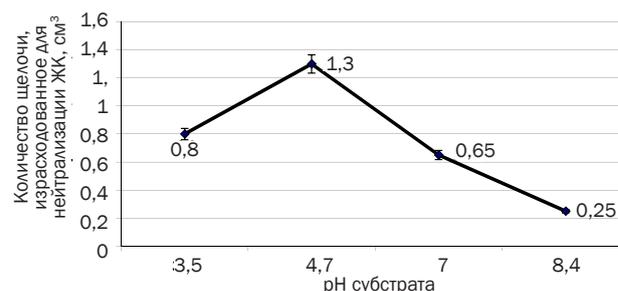


Рис. 2. Влияние рН субстрата на высвобождение жирных кислот при гидролизе оливкового масла в течение 60 мин

Fig. 2. Fatty acids release during olive oil 60 min hydrolysis depending on substrate pH value

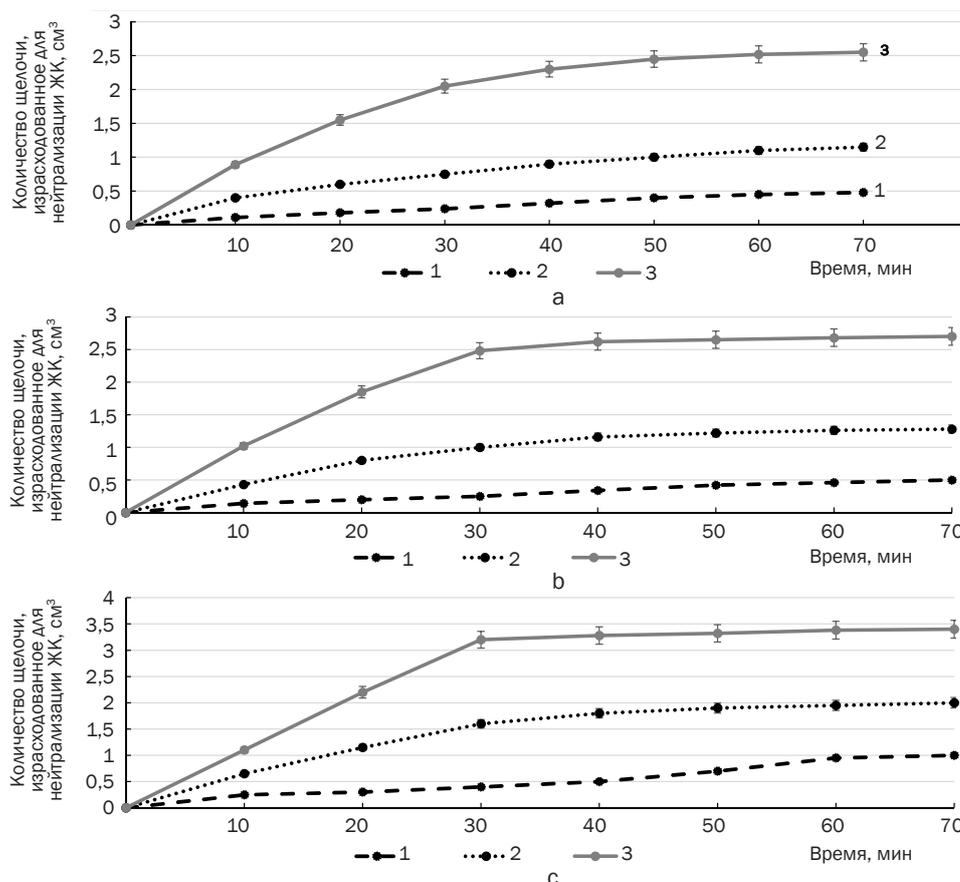


Рис. 3. Динамика образования жирных кислот в процессе ферментативного гидролиза оливкового масла под действием различных температур: а – температура гидролиза 20 °С; б – температура гидролиза 30 °С; с – температура гидролиза 40 °С. 1 – $m_1 = 0,00005$ г; 2 – $m_2 = 0,0001$ г; 3 – $m_3 = 0,0002$ г (m – количество ферментного препарата, взятое на анализ)

Fig. 3. Dynamics of fatty acids formation through olive oil enzymatic hydrolysis under the influence of various temperatures: а – hydrolysis temperature 20 °С; б – hydrolysis temperature 30 °С; с – hydrolysis temperature 40 °С. 1 – $m_1 = 0,00005$ г; 2 – $m_2 = 0,0001$ г; 3 – $m_3 = 0,0002$ г (m – the amount of the enzyme preparation taken for analysis)

и температуры) на количество высвободившихся ЖК (рис. 2 и 3).

Результаты исследований показали, что наибольшее количество щелочи, пошедшее на титрование, имело место при значении pH = 4,7. Дальнейшее повышение pH приводило к существенному снижению ее количества, а следовательно, и к снижению активности ФП.

Для установления оптимальных режимов проведения биокаталитической реакции и определения липолитической активности на следующем этапе исследовали динамику образования ЖК в свободной форме при разных температурах (20, 30 и 40 °С) и длительность процесса (от 10 до 70 мин) в зависимости от количества фермента, взятого на анализ (см. рис. 3).

Приведенные данные показывают, что на рис. 3 (а, б, с) можно выделить типичные кинетические кривые ферментативной реакции, при которых начальный участок кривой линейен, т. е. зависимость концентрации образовавшегося продукта гидролиза от времени имеет пропорциональный характер. На основании полученных результатов установлено, что пропорциональная зависимость образования свободных ЖК от длительности биокаталитической реакции и концентрации фермента наблюдалась в основном в интервале от 10 до 30 мин. Наибольшее высвобождение ЖК в процессе гидролиза оливкового масла имело место при температуре 40 °С в течение 30 мин. Дальнейшая продолжительность гидролиза субстрата не приводила к существенному увеличению концентрации ЖК в реакционной смеси, а следовательно, и количества 0,01 н раствора КОН, пошедшего на их титрование.

В связи с тем, что длительность прямолинейного участка кинетической кривой от опыта к опыту несколько изменялась, были выбраны условия, при которых отмечены наиболее стабильные результаты, отражающие зависимость прироста образования свободных ЖК во времени: температура 40 °С и длительность гидролиза 20 мин при дозировках взятого на анализ ФП 0,0002 и 0,0001 г.

Таким образом, подобранные параметры ферментативной реакции (температура составила 40 °С, pH – 4,7 и длительность гидролиза (t) – 20 мин) были введены в усовершенствованный метод определения липолитической активности. Поскольку метод основан на определении ЖК, образовавшихся в результате действия липазы на субстрат – оливковое масло, путем титрования их щелочью, а в оливковом масле содержится до 78% олеиновой кислоты [20–22], расчет липолитической активности вели на олеиновую кислоту. За единицу активности липазы (ед. ЛС) принимали такое количество фермента, которое при 40 °С и значении pH = 4,7 катализирует за 1 мин расщепление оливкового масла с образованием 1 мкмоль олеиновой кислоты. Активность выражали в ед. ЛС/г (для порошкообразного) или ед. ЛС/см³ (для жидкого) анализируемого ФП. В связи с тем, что жидкие ФП представлены на рынке в основном в концентрированном виде (ультраконцентраты), для более точного расчета их активности необходимо вводить в формулу расчета показатель плотности данных ФП.

С целью учета конечного разведения ФП (m) в реакционной среде в формулу расчета активности дополнительно введен коэффициент, равный 4. Данный

коэффициент учитывает количество рабочего раствора ФП (1 см³), взятого на анализ, в 4 см³ реакционной смеси, в которую входят 1,0 см³ оливкового масла, 1 см³ ацетатного буфера (pH = 4,7), 1 см³ воды и 1 см³ рабочего раствора ФП.

Липолитическую активность ферментного препарата ЛС, ед. ЛС/г или ед. ЛС/см³, вычисляли по формуле:

$$ЛС = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 4 \cdot T}{282,46 \cdot m \cdot t} \cdot d,$$

где V₁ – количество раствора 0,01 н КОН, пошедшее на титрование опытного образца, см³; V₂ – то же для контрольного образца, см³; 4 – коэффициент, учитывающий 4-кратное разбавление рабочего раствора ФП непосредственно в реакционной смеси; T – титр 0,01 н раствора КОН, эквивалентен количеству гидроксида калия, содержащемуся в 1 см³ 0,01 н раствора, мкг/см³ (561 мкг/см³); 282,46 – молекулярная масса олеиновой кислоты, мкг/мкмоль; m – количество ФП, взятое на анализ, г; t – длительность гидролиза, мин; d – плотность жидкого ФП, г/см³.

Результаты, представленные в табл. 2, подтвердили, что расчетный уровень липолитической активности (ед. ЛС/см³), определяемый на основании количества 0,01 н раствора КОН, пошедшего на титрование ЖК, был стабилен при подобранных условиях: продолжительность гидролиза – 20 мин; температура – 40 °С; количество ФП, взятого на анализ: m₁ = 0,0001 г, m₂ = 0,0002 г (табл. 3). Увеличение продолжительности

Таблица 3. Зависимость величины липолитической активности ферментного препарата «Липаза» от количества фермента и продолжительности гидролиза субстрата

Table 3. Dependence of the lipolytic activity of the Lipase enzyme preparation on the enzyme amount and the substrate hydrolysis duration

Количество ферментного препарата, взятое на анализ, г	Время гидролиза, мин	Объем 0,01 н КОН, (V ₁ - V ₂), см ³	ЛС, ед/см ³
m ₁ = 0,0001	10	0,65	5161±242
	20	1,15	4565±148
	30	1,60	4235±162
	40	1,80	3573±147
	50	1,90	3017±114
	60	1,95	2580±121
	70	2,00	2269±104
m ₂ = 0,0002	10	1,10	4367±187
	20	2,20	4367±248
	30	3,20	4237±137
	40	3,25	3226±123
	50	3,32	2636±96
	60	3,38	2236±88
	70	3,40	1928±72

Примечание. Значения представлены в виде средних ± стандартное отклонение.

Таблица 4. Определение липолитической активности в ферментных препаратах отечественного производства
Table 4. Determination of lipolytic activity in enzyme preparations of domestic production

Наименование ферментного препарата	Количество ферментного препарата, взятое на анализ, г	Объем 0,01 н КОН, ($V_1 - V_2$), см ³	ЛС, ед/г	Погрешность, %
Амилопротооризин	0,001	0,4	106,0±4,4	4,2
	0,005	1,9	101,7±3,6	
Глюканофоедин	0,001	0,7	185,5±7,1	2,9
	0,005	3,4	180,2±7,3	
Пектофоедин	0,001	0,2	52,0±3,6	4,2
	0,005	0,9	49,7±2,6	

Примечание. Значения представлены в виде средних ± стандартное отклонение.

гидролиза до 40–70 мин приводило к снижению активности липазы и повышению величины погрешности.

Таким образом, определяемая активность, которая при равных условиях ферментативной реакции пропорциональна концентрации фермента, зависит от эффективности его каталитического действия, т. е. от количества продуктов гидролиза, изменяющегося под влиянием фермента в единицу времени. В результате установлены оптимальные условия проведения биокаталитической реакции гидролиза субстрата (оливкового масла) с использованием стандартного ФП «Липаза»: температура – 40 °С; pH – 4,7; продолжительность – 20 мин.

С целью получения достоверных данных и подтверждения подобранных оптимальных параметров проведены сравнительные исследования по определению активности липазы в различных объектах микробного происхождения (табл. 4).

Результаты исследований по определению липолитической активности подтвердили выбранные ранее оптимальные параметры и условия проведения каталитической реакции при разработке методики. При варьировании дозировкой ФП активность липаз находится в пределах 5% погрешности измерений, что принято в стандартных методиках определения активности ФП для пищевой промышленности и подтверждено экспериментальными данными.

Таким образом, определение липолитической активности в анализируемом объекте необходимо осуществлять следующим образом. В коническую колбу объемом 100 см³ помещают 1 см³ оливкового масла, добавляют 1 см³ ацетатного буфера со значением pH = 4,7, тщательно перемешивают, вносят 1,0 см³ рабочего раствора фермента и 1,0 см³ дистиллированной воды, предварительно прогретых в течение

3–4-х мин при температуре 40 °С. Общий объем реакционной смеси составляет 4 см³. Колбу закрывают пробкой и помещают в термостатируемый шейкер. Содержимое колбы встряхивают при постоянном перемешивании для проведения ферментативной реакции при (40,0±1,0) °С в течение 20 мин.

По окончании ферментативного гидролиза для инактивации фермента к реакционной смеси добавляют 30 см³ 96%-го этилового спирта. Свободные ЖК, образовавшиеся при ферментативном расщеплении масла, оттитровывают 0,01 н раствором КОН. В качестве индикатора используют спиртовой раствор фенолфталеина. Окончанием титрования считается появление устойчивой бледно-малиновой окраски фенолфталеина. Одновременно проводят аналогичный контрольный ферментативный гидролиз с кипяченным рабочим раствором ФП.

ВЫВОДЫ

На основании результатов проведенных исследований предлагается модифицированная методика определения липолитической активности, в которую внесены следующие изменения:

- в качестве субстрата подобрано оливковое масло, что позволило получить более стабильную эмульсию и повысить точность измерений;
- осуществлена замена токсичного реактива, используемого ранее для инактивации фермента, на этиловый спирт как более безопасный реагент;
- уточнена формула расчета липолитической активности;
- разработаны и экспериментально подтверждены оптимальные параметры методики определения липолитической активности: температура – 40 °С, время гидролиза – 20 мин, pH субстрата – 4,7.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Римарева Л.В., Серба Е.М., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Игнатова Н.И. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности // Вопросы питания. 2017. Т. 86. N 5. С. 63–74.
2. Сафина В.Р., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. Влияние субстратной индукции и условий культивирования на синтез хитозаназ *Bacillus thuringiensis* B-387 // Пищевая промышленность. 2019. N 4. С. 85–87. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10043>.
3. Серба Е.М., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И.,

Таджибова П.Ю., Римарева Л.В. К вопросу о контроле качества ферментных препаратов для пищевой промышленности // Пищевая промышленность. 2019. N 4. С. 87–88. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10044>.

4. Римарева Л.В., Серба Е.М., Оверченко М.Б., Таджибова П.Ю., Серба Е.В., Кривова А.Ю. [и др.]. Научно-экспериментальное обоснование безопасности биотехнологической продукции для пищевой промышленности // Вестник Российской сельскохо-

заяственной науки. 2019. N 1. С. 40–43. <https://doi.org/10.30850/vrsn/2019/1/40-43>.

5. Дьяченко Ю.А., Цикуниб А.Д. Активность липазы как показатель высокого качества и экологической чистоты семян подсолнечника // Техника и технология пищевых производств. 2017. Т. 44. N 1. С. 118–123.

6. Зубарева И.М., Митина Н.Б., Кириченко Е.С. Изучение липазной активности *Blakeslea Trispora* продуцента бета-каротина // Вопросы химии и химической технологии. 2012. N 1. С. 32–35.

7. Чирикова М.С., Шакун Т.П., Петрова Г.М., Глушень Е.М. Выделение и идентификация нового природного штамма – деструктора жировых соединений // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. научных трудов. 2016. Т. 8. С. 382–391.

8. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Гундобина О.С., Михайлова С.В., Захарова Е.Ю., Вишнёва Е.А. [и др.]. Дефицит лизосомной кислой липазы: клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям // Педиатрическая фармакология. 2016. Т. 13. N 3. С. 239–243. <https://doi.org/10.15690/pf.v13i3.1573>.

9. Quinn A.G., Burton B., Deegan P., Di Rocco M., Enns G.M., Guardamagna O., et al. Sustained elevations in LDL cholesterol and serum transaminases from early childhood are common in lysosomal acid lipase deficiency // *Molecular Genetics and Metabolism*. 2014. Vol. 111, no. 2. P. S89. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.12.215>.

10. Fouchier S.W., Defesche J.C. Lysosomal acid lipase A and the hyper cholesterol emic phenotype // *Current Opinion in Lipidology*. 2013. Vol. 24, no. 4. P. 332–338. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328361f6c6>.

11. Коршенко Л.О. Стабилизация качества хлеба из пшеничной муки с низкими хлебопекарными свойствами // Вестник Евразийской науки. 2014. N 6. С. 2–11. <https://doi.org/10.15862/115TVN614>.

12. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Таджибова П.Ю., Серба Е. М. Некоторые аспекты методологии контроля безопасности, качества и подлинности ферментных препаратов для пищевой промышленности // Пищевая промышленность. 2020. N 4. С. 48–55. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-04411>.

13. Gupta P., Upadhyay L.S.B., Shrivastava R. Lipase catalyzed-transesterification of vegetable oils by lipolytic bacteria // *Research Journal of Microbiology*. 2011. Vol. 6, no. 3. P. 281–288.

1. Rimareva L.V., Serba E.M., Sokolova E.N., Borshcheva Yu.A., Ignatova N.I. Enzyme preparations and biocatalytic processes in the food industry. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2017;86(5):63-74. (In Russian).

2. Safina V.R., Melentiev A.I., Aktuganov G.E. The effect of substrate induction and culture conditions on synthesis of chitosanases by *Bacillus thuringiensis*, strain B-387. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 2019;(4):85-87. (In Russian). <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10043>.

3. Serba E.M., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Tadzhibova P.Yu., Rimareva L.V. On the issue about quality control of enzyme preparations for the food industry. *Pishchevaya promyshlennost' = Food In-*

14. Никитенко А.И., Леонтьев В.Н., Болтовский В.С. Методические особенности определения активности липаз в семенах рапса // Труды БГТУ. № 4: Химия, технология органических веществ и биотехнология. 2011. N 4. С.190–193.

15. Альмяшева Н.Р., Голышкин А.В. Закономерности биосинтеза липолитических ферментов ксилотрофным базидиомицетом *Fomes fomentarius* // Современные проблемы науки и образования. 2016. N 6. С. 553.

16. Кригер А.В., Дышлюк Л.С., Долганюк В.Ф., Зимина М.И., Асякина Л.К. Выделение, очистка и изучение свойств рекомбинантной липазы, экспрессированной в *Escherichia coli* // Фундаментальные исследования. 2013. N 12. С. 122–126.

17. Григорьянц А.Г., Коротаяева М.А., Алехнович В.И., Шиганов И.Н. Инструментальные методы контроля состава и свойств полидисперсных сред // Наука и образование. 2012. N 2. С.11–14.

18. Вертипрахов В.Г., Бутенко М.Н. Новый способ определения количества пищевых белков, жиров и углеводов в продуктах и кормах // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. N 9. С. 52–55.

19. Гамаюрова В.С., Воробьев Е.С., Давлетшина Г.А., Ржечицкая Л.Э. Анализ кинетических параметров ферментативного катализа реакций этерификации в среде гексана // Кинетика и катализ. 2021. Т. 62. N 3. С. 316–324. <https://doi.org/10.31857/S0453881121030023>.

20. Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н., Нуриддинов М.А., Розанов А.С. Разработка биокатализатора для переэтерификации пищевых жиров с использованием иммобилизованных ферментов липаз // Высокие технологии в современной науке и технике: сб. научных трудов ТПУ. Томск. 2013. С. 119–123.

21. Шеламова С.А., Тырсин Ю.А. Роль карбоксильных групп в каталитической активности липазы *Rhizopus oryzae* 1403 // Региональные геосистемы. 2014. С. 103–108.

22. Воловик В.Т., Леонидова Т.В., Коровина Л.М., Блохина Н.А., Касарина Н.П. Сравнение жирнокислотного состава различных пищевых масел // Международный журнал прикладных исследований. 2019. N 5. С. 147–152. <https://doi.org/10.17513/mjpi.12754>.

REFERENCES

dustry. 2019;(4):87-88. (In Russian). <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10044>.

4. Rimareva L.V., Serba E.M., Overchenko M.B., Tadzhibova P.Yu., Serba E.V., Krivova A.Yu., et al. Scientifically and experimental safety substitution of biotechnology products for the food processing industry. *Vestnik Rossiiskoi sel'skokhozyaistvennoi nauki = Vestnik of the Russian Agricultural Science*. 2019;(1):40-43. (In Russian). <https://doi.org/10.30850/vrsn/2019/1/40-43>.

5. D'yachenko Yu.A., Tsikunib A.D. Lipase activity as an indicator of high quality and ecological purity of sunflower seeds. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv = Food Processing: Techniques and Technology*. 2017;44(1):118-123. (In Russian).

6. Zubareva I.M., Mitina N.B., Kirichenko E.S. Study of the lipase activity of *Blakeslea Trispora*, a beta-carotene producer. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii*. 2012;(1):32-35. (In Russian).

7. Chyrykava M.S., Shakun T.P., Petrova G.M., Glushen E.M. Isolation and identification of new native strain-degrader of lipid compounds. *Mikrobnye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov*. 2016;8:382-391. (In Russian).

8. Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Gundobina O.S., Mikhailova S.V., Zakharova E.U., Vishnyova E.A., et al. Deficiency of lysosomal acid lipase: clinical recommendations for child health care delivery. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*. 2016;13(3):239-243. (In Russian). <https://doi.org/10.15690/pf.v13i3.1573>.

9. Quinn A.G., Burton B., Deegan P., Di Rocco M., Enns G.M., Guardamagna O., et al. Sustained elevations in LDL cholesterol and serum transaminases from early childhood are common in lysosomal acid lipase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2014;111(2):S89. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.12.215>.

10. Fouchier S.W., Defesche J.C. Lysosomal acid lipase A and the hyper cholesterol emic phenotype. *Current Opinion in Lipidology*. 2013;24(4):332-338. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328361f6c6>.

11. Korshenko L.O. Stabilization of wheat bread's quality with low baking properties. *Vestnik Evraziiskoi nauki = The Eurasian Scientific Journal*. 2014;(6):2-11. (In Russian). <https://doi.org/10.15862/115TVN614>.

12. Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Tadzhibova P.Yu., Serba E.M. Some aspects of the methodology for controlling the safety, quality and authenticity of enzyme preparations for the food industry. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 2020;(4):48-55. (In Russian). <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-04411>.

13. Gupta P., Upadhyay L.S.B., Shrivastava R. Lipase catalyzed-transesterification of vegetable oils by lipolytic bacteria. *Research Journal of Microbiology*. 2011;6(3):281-288.

14. Nikitenko A.I., Leontiev V.N., Boltovskii V.S. Methodical features of the lipase activity definition in rapeseeds. *Trudy BGTU. № 4: Khimiya, tekhnologiya organ-*

icheskikh veshchestv i biotekhnologiya = Proceedings of BSTU. № 4. Chemistry, organic substances technology and biotechnology. 2011;(4):190-193. (In Russian).

15. Almyasheva N.R., Golyshkin A.V. Biosynthesis of lipolytic enzymes by xylotrophic basidiomycete *Fomes fomentarius*. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016;(6):553. (In Russian).

16. Kriger A.V., Dyshlyuk L.S., Dolganyuk V.F., Zimina M.I., Asyakina L.K. Allocation, cleaning and studying of properties of the recombinant lipase, expressed in *Escherichia coli*. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013;(12):122-126. (In Russian).

17. Grigor'yanc A.G., Korotaeva M.A., Alehnovich V.I., Shiganov I.N. Instrumental methods of control over content and properties of polydisperse medium. *Nauka i obrazovanie = Science and Education*. 2012;(2):11-14. (In Russian).

18. Vertiprakhov V.G., Butenko M.N. New method of determining the quantity of food belkov, fats and carbohydrates in the products and the fodders. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2014;(9):52-55. (In Russian).

19. Gamayurova V.S., Vorobiev E.S., Davletshina G.A., Rzhechitskaya L.E. Analysis of the kinetic parameters of the enzymatic catalysis of esterifications in hexane. *Kinetics and catalysis = Kinetics and Catalysis*. 2021;62(3):316-324. (In Russian). <https://doi.org/10.31857/S0453881121030023>.

20. Samoilo Yu.V., Sorokina K.N., Nuriddinov M.A., Rozanov A.S. Development of a biocatalyst for interesterification of edible fats using immobilized lipase enzymes. In: *Vysokie tekhnologii v sovremennoi nauke i tekhnike: sbornik nauchnykh trudov TPU*. Tomsk; 2013, p. 119-123. (In Russian).

21. Shelamova S.A., Tyrsin Y.A. The role of carboxyl groups in the catalytic activity of lipase *Rhizopus oryzae* 1403. *Regional'nye geosistemy = Regional Geosystems*. 2014;103-108. (In Russian).

22. Volovik V.T., Leonidova T.V., Korovina L.M., Blokhina N.A., Kasarina N.P. Comparison of fatty acid composition of different edible oils. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh issledovaniy*. 2019;(5):147-152. (In Russian). <https://doi.org/10.17513/mjpf.12754>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Серба Елена Михайловна,

д.б.н., заместитель директора по науке,
Всероссийский научно-исследовательский институт
пищевой биотехнологии – филиал
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,
111033, г. Москва, ул. Самокатная, 4Б,
Российская Федерация,
Serbae@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1660-2634>

Соколова Елена Николаевна,

к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт
пищевой биотехнологии – филиал
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena M. Serba,

Dr. Sci. (Biology), Deputy Director for Science,
Russian Scientific Research Institute of Food
Biotechnology – branch of Federal Research Center
of Nutrition, Biotechnology and Food Safety,
4B, Samokatnaya St., 111033, Moscow,
Russian Federation,
Serbae@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1660-2634>

Elena N. Sokolova,

Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
Russian Scientific Research Institute of Food
Biotechnology – branch of Federal Research Center
of Nutrition, Biotechnology and Food Safety,

111033, г. Москва, ул. Самокатная, 4Б,
Российская Федерация,
✉elenaniksokolova@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6084-7786>

4B, Samokatnaya St., 111033, Moscow,
Russian Federation,
✉elenaniksokolova@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6084-7786>

Оверченко Марина Борисовна,
к.т.н., ведущий научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт
пищевой биотехнологии – филиал
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,
111033, г. Москва, ул. Самокатная, 4Б,
Российская Федерация,
mb_over@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0191-5897>

Marina B. Overchenko,
Cand. Sci. (Engineering), Leading Researcher,
Russian Scientific Research Institute of Food
Biotechnology – branch of Federal Research Center
of Nutrition, Biotechnology and Food Safety,
4B, Samokatnaya St., 111033, Moscow,
Russian Federation,
mb_over@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0191-5897>

Римарева Любовь Вячеславовна,
д.т.н., главный научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт
пищевой биотехнологии – филиал
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,
111033, г. Москва, ул. Самокатная, 4Б,
Российская Федерация,
Irimareva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3097-0836>

Lyubov' V. Rimareva,
Dr. Sci. (engineering), Chief Researcher,
Russian Scientific Research Institute of Food
Biotechnology – branch of Federal Research Center
of Nutrition, Biotechnology and Food Safety,
4B, Samokatnaya St., 111033, Moscow,
Russian Federation,
Irimareva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3097-0836>

Игнатова Надежда Иосифовна,
научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт
пищевой биотехнологии – филиал
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,
111033, г. Москва, ул. Самокатная, 4Б,
Российская Федерация,
ignatova59@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8416-7478>

Nadezhda I. Ignatova,
Researcher,
Russian Scientific Research Institute of Food
Biotechnology – branch of Federal Research Center
of Nutrition, Biotechnology and Food Safety,
4B, Samokatnaya St., 111033, Moscow,
Russian Federation,
ignatova59@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8416-7478>

Борщева Юлия Александровна,
к.т.н., старший научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт
пищевой биотехнологии – филиал
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,
111033, г. Москва, ул. Самокатная, 4Б,
Российская Федерация,
juliyaborshova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0911-5325>

Yuliya A. Borsheva,
Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Russian Scientific Research Institute of Food Biotech-
nology – branch of Federal Research Center of Nutri-
tion, Biotechnology and Food Safety,
4B, Samokatnaya St., 111033, Moscow,
Russian Federation,
juliyaborshova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0911-5325>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили окончательный
вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 24.03.2022.
Одобрена после рецензирования 10.12.2022.
Принята к публикации 28.02.2023.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding
the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved by all
the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 24.03.2022.
Approved after reviewing 10.12.2022.
Accepted for publication 28.02.2023.