

Štruktúrna analýza lipidov

III. Stereošpecifická analýza glycerolipidov fosfolipázou A_2 z včelieho jedu

ŠTEFAN SCHMIDT – ONDREJ JUHÁSZ – VÁCLAV KOMAN – BOHUMIL ŠKÁRKA

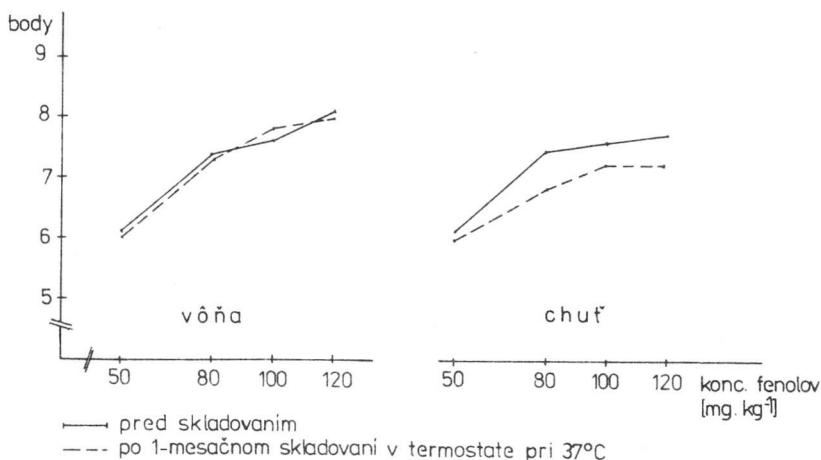
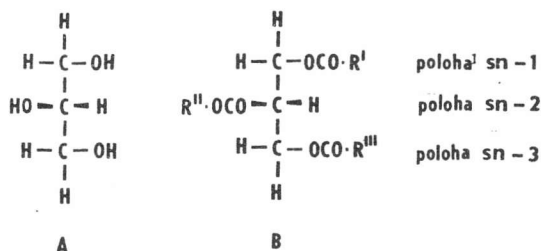
Súhrn. V práci je opísaná metóda stereošpecifickej analýzy glycerolipidov s použitím fosfolipázy A_2 z lyofilizovaných včelích žihadiel. Dvoma metódami sme stanovili aktivitu enzýmového preparátu a optimalizovali podmienky stereošpecifickej deacylácie polohy sn-2 molekúl fosfatidylcholínu zo slepačieho žltka.

Zistili sme, že za podmienok navrhutej metódy optimálny čas hydrolýzy fosfatidylcholínu fosfolipázou A_2 z včelieho jedu je šesť hodín. Tento čas už zaručuje takmer kompletne štiepenie fosfatidylcholínu na jeho lyzoderivát a voľné masné kyseliny. Analýzou získaných frakcií sme opísali distribúciu masných kyselín v polohe sn-1 a sn-2 molekúl žltkového fosfatidylcholínu. Výsledky boli v dobrej zhode s literárnymi údajmi.

Molekulová štruktúra triacylglycerolov prírodných tukov a olejov pozostáva z glycerolu, na ktorý sú esterovo viazané vyššie masné kyseliny. Glycerol sám má dokonalú rovinu symetrie, pokiaľ sú však krajné polohy v triacylglycerole obsadené rôznymi masnými kyselinami (MK), bude stredný C-2 atóm asymetrický, s prejavom na optickej aktivite.

Keďže však prírodné tuky a oleje zvyčajne pozostávajú z veľkého počtu rôznych štruktúr triacylglycerolových molekúl [1], problém stereochemie, resp. presného určenia polohy MK v acylglycerole vyriešil až Hirschmannov návrh [2], neskôr všeobecne prijatý a odporúčaný príslušnými komisiami IUPAC – IUB [3]. Návrh sa opiera o systém tzv. stereošpecifického číslovania uhlíkových atómov glycerolu. Keď sa acylglycerol orientuje vo Fischerovej projekci tak, že glycerolový trojuhlíkový reťazec je orientovaný vertikálne a hydroxylová skupina na atóme C-2 je vľavo, priradí sa najvyššie položenému uhlíkovému atómu lokant 1. Pred morféom glycerol sa potom priradí infix -sn-, odvodený z termínu „stereospecific numbering“. Príklad je na obrázku 1.

Ing. Štefan Schmidt, CSc., Ing. Ondrej Juhász, CSc., doc. Ing. Václav Koman, DrSc., prof. Ing. Bohumil Škárka, DrSc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemicko-technologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.



Obr. 1. Stereochemická konfigurácia glycerolu (A) a triacyl-sn-glycerolu (B) podľa Hirschman-
na [2].

Fig. 1. Stereochemical configuration of glycerol (A) and triacylglycerol (D) according to
Hirschmann [2]. (¹Position.)

Z uvedeného vyplýva, že metóda enzýmovej deacylácie glycerolipidov pankreatickou lipázou, opísaná v predchádzajúcom príspevku [4], neposkytne pri potrebe kompletnej analýzy triacylglycerolov (TAG) informáciu o všetkých polohových izoméroch TAG molekúl. Pankreatická lipáza neumožňuje rozlíšenie medzi polohami sn-1 a sn-3 triacylglycerolov, ktoré sú zo stereochemického hľadiska rozdielne.

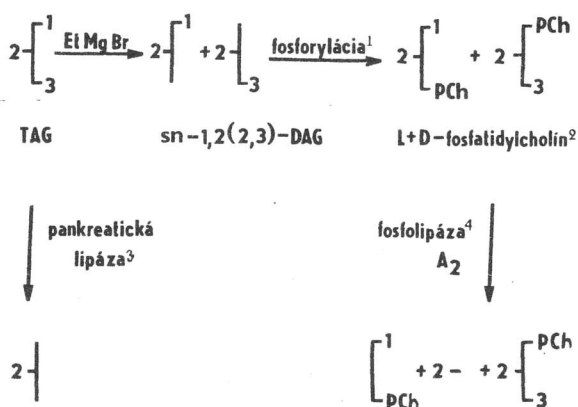
Problém rieši tzv. stereošpecifická analýza glycerolipidov, ktorú ako prvý zaviedol Brockerhoff [5]. Napriek skutočnosti, že dosiaľ nebol izolovaný lipolytický enzým schopný rozlišovať medzi polohami sn-1 a sn-3 triacyl-sn-glycerolov, zverejnilo sa neskôr viacero metód [6–9], umožňujúcich v konečnom dôsledku stanoviť zloženie MK v polohách sn-1, 2, 3 TAG molekúl, prípadne v polohách sn-1,2 fosfolipidov. Analytické metódy sú založené predovšetkým na hydrolytickej stereošpecifickosti fosfolipázy A₂. Stereošpecifická ana-

lýza glycerolipidov pozostáva najčastejšie z týchto troch základných reakčných krokov:

- a) deacylácia TAG na reprezentatívne diacylglyceroly,
- b) fosforylácia diacylglycerolov na syntetické fosfolipidy,
- c) hydrolýza fosfolipidov fosfolipázou A_2 .

Pri stanovení distribúcie mastných kyselín v prírodných fosfolipidoch sa aplikuje pochopiteľne iba krok c).

Prvý a doteraz neprekonaný Brockerhoffov postup [5] sa zakladá na tvorbe ekvimolárnej zmesi diacylglycerolov (DAG) pomocou Grignardovho činidla, syntéze fosfatidylfenolov alebo lepšie fosfatidylcholínov [10], ktoré sa následne štiepia fosfolipázou A_2 z hadieho jedu na príslušné lyzofosfolipidy a mastné kyseliny uvoľnené z polohy sn-2. V reakčnej zmesi ostávajú neatakované 2,3-diacyl-sn-glycerofosfolipidy (obr. 2), ktoré sa v prírode bežne nevyskytujú. Zloženie mastných kyselín v polohe sn-2 pôvodných TAG molekúl sa overí nezávisle pomocou pankreatickej lipázy.



Obr. 2. Brockerhoffov postup [5] stereošpecifickej analýzy triacyl-sn-glycerolov (PCh – fosforylcholín).

Fig. 2. Brockerhoff procedure [5] of stereospecific analysis of triacyl-sn-glycerols (PCh-phosphorylcholine).

(¹Phosphorylation; ²L + D-phosphatidylcholine; ³Pancreatic lipase; ⁴Phospholipase.)

Alternatívnu metódu, využívajúcu stereošpecifickú fosforyláciu reprezentatívnych DAG s diacylglycerolkinázou z *E. coli*, uviedol Lands a kol. [11]. Metóda vzbudila záujem najmä v biochemických kruhoch, pretože výsledný produkt diacyl-sn-glycerofosfát je štruktúrne identický s významným intermediátom pri biosyntéze triacylglycerolov.

Nedávno uviedli Chemin-Douaud a Karleskind [12] novú enzýmovú metódu, v ktorej autori obchádzajú relatívne nedostupnú fosfolipázu A_2 z hadieho jedu. Myher a Kuksis [13] opísali stereošpecifickú analýzu TAG molekúl pomocou fosfolipázy C (EC. 3.1.4.3) z baktérie *Clostridium welchii*.

Fosfolipázy sú dôležité enzýmy v metabolizme. Tieto enzýmy sú zastúpené predovšetkým v hadích jedoch, v jedoch včiel a škorpiónov, ako aj v živočíšnych tkanivách. Fosfolipáza A_2 (EC. 3.1.1.4) selektívne hydrolyzuje esterové väzby v polohe sn-2 molekúl 3-sn-glycerofosfolipidov za vzniku voľných MK a lyzofosfolipidov obsahujúcich MK v polohe 1 (pozri obr. 2). Fosfolipáza A_2 z hadieho jedu je stereošpecifická pre L-glycerofosfolipidy a reaguje s väčšinou prírodných zmesí tohto typu vrátane fosfatidylcholínu, fosfatidylserínu, fosfatidyletanolamínu, fosfatidylinozitolu, fosfatidylglycerolu a kardiolípu, ale nereaguje s polyfosfoinozitolmi. Atakuje aj fosfatidylfenoly, syntetické medziprodukty Brockerhoffovho postupu stereošpecifickej štruktúrnej analýzy triacylglycerolov [5].

Enzým fosfolipáza A_2 je pozoruhodný svojou tepelnou stabilitou, aktivitu si udrží aj po 15 min zahratí na 90 °C pri pH 3,0 [14]. Enzým vykazuje absolútnu požiadavku na ióny Ca^{2+} . Aktivitu zvyšujú ióny Na^+ , K^+ , Mg^{2+} a Mn^{2+} . Optimálne pH prostredie leží v alkalicknej oblasti pri pH 7,5–8,5. Aktivitu fosfolipázy A_2 inhibujú ióny Cu^{2+} , Zn^{2+} , ďalej fosfáty, sulfidy, oxaláty, kyanidy, citráty a masné kyseliny. Kyselina palmitová, olejová a linolová (16 : 0, 18 : 1 a 18 : 2) pôsobia inhibične už pri koncentrácii pod 0,1 mmol · l⁻¹ [14].

Jedným z bohatých zdrojov fosfolipázy A_2 sú jedy hadov z čelade vretenicovitých (*Viperiade*), štrkáčovité (*Crotalidae*), koralcovité (*Elapidae*) a mornárovité (*Hydrophidae*). Najpoužívanější je jed z druhu *Crotalus adamanteus* alebo *C. atrox*, predovšetkým však z čelade koralcovitých jed kobry kráľovskej – *Ophiophagus hannah* [15]. Ten istý autor zároveň vyslovil predpoklad o analytickom využití fosfolipázy A_2 z jedu včely medonosnej (*Apis mellifera*). Enzým z včelieho jedu hydrolyzuje alkyl-, alkenyl- a acylformy fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu s porovnateľnou rýchlosťou [16], kým fosfolipáza A_2 z hadieho jedu (druh *Naja naja* – *Elapidae*) alkyl- a acylformy fosfolipidov hydrolyzuje dvakrát rýchlejšie ako ich alkenylformy [17]. Na rozdiel od fosfolipázy A_2 z hadieho jedu obdobný enzým včelieho jedu katalyzuje aj hydrolýzu polyfosfoinozitolov [18]. Najpoužívanším substrátom pre fosfolipázu A_2 je fosfatidylcholín, štiepenie je stimulované dietyléterom a rýchlosť štiepenia nezávisí od stupňa nenasýtenosti MK [14].

Keďže využitie jedu z včelích žihadiel na analýzu triacylglycerolov a fosfolipidov sa v literatúre iba naznačovalo [15], zamerali sme sa v tomto treťom príspevku zo súboru publikácií s názvom „Štruktúrna analýza lipidov“ na štúdium vhodnosti fosfolipázy A_2 z včelieho jedu na stereošpecifickú analýzu glycerolipidov. S týmto cieľom súviselo predovšetkým stanovenie aktivity fos-

folipázy A_2 a špecifikácia reakčných podmienok pri enzýmovej hydrolýze fosfolipidov.

Materiál a metódy

Na enzýmovú hydrolýzu glycerolipidov sme použili včelí jed vo forme mletých včelích žihadiel z n. p. Slovakofarma Hlohovec. Na enzýmové štiepenie sme vybrali ako substrát fosfatidylcholí, izolovaný z vaječných žĺtkov [19], udržiavaný ako 20 % chloroformový roztok pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Použité chemikálie boli stupňa čistoty p. a. (Lachema Brno), pôvod špeciálnych chemikálií uvádzame priamo v texte.

a) Stanovenie aktivity fosfolipázy A_2 včelieho jedu

Vychádzali sme z metódy Wellsa a Hanahana [20], ktorej princípom je titračné meranie rýchlosti uvoľnenia MK z fosfolipidov (postup I). Aktivitu enzýmu sme tak isto orientačne zistili meraním úbytku absorbancie suspenzie vaječného žĺtka pri 925 nm metódou podľa Marinettiho [21] (postup II).

Postup I: Do 5 ml banky sme k 2 ml čerstvého roztoku substrátu ($15\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ fosfatidylcholínu v zmesi dietyléter–metanol v objemovom pomere 95 :5) pridali 25 μl enzýmového preparátu so známou koncentráciou v rozpätí 3–4 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Enzýmový preparát sme pripravili zriedením v roztoku 0,22 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl, 0,02 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CaCl_2 a 1 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA (pH 7,5). Po energickom pretrepaní (30 s) sme reakčnú zmes nechali stáť 10 min pri teplote 20–25 $^{\circ}\text{C}$. Reakciu sme zastavili prídavkom etanolu (95 %) do výsledného objemu 5 ml. Uvoľnené masné kyseliny sme ihneď titrovali 0,02 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH v 95 % etanole na 1 kvapku roztoku krezolovej červene (0,1 %).

Jednotka aktivity enzýmu je definovaná ako množstvo enzýmu katalyzujúce hydrolýzu 1 μmol fosfatidylcholínu za 1 minútu. Množstvu MK (%) uvoľnených pri hydrolýze s fosfolipázou A_2 sa vypočíta podľa vzťahu

$$\% \text{ MK} = \frac{(a - b) \cdot f \cdot c \cdot 100}{m}$$

kde a je spotreba 0,02 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH na titráciu vzorky (ml), b – spotreba 0,02 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH na slepý pokus (ml), c – koncentrácia roztoku NaOH ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$), f – faktor 0,02 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH, m – návažok substrátu (g).

Postup II: Pracovali sme presne podľa [21]. Absorbanciu suspenzie vaječného žĺtka sme merali pri 925 nm v čase 0 až 5 min v jedominútových intervaloch.

b) Enzýmová hydrolýza fosfolipázou A_2

Pôvodný pracovný postup Robertsona a Landsa [22] sme upravili takto: 45 mg fosfatidylcholínu sme rozpustili v 5 ml dietyléteru zbavenom peroxi-

dov. K roztoku substrátu sme pridali 100 μ l enzýmového preparátu, ktorý sme pripravili rozpustením 5 mg lyofilizovaných včelích žihadiel v 1 ml tlmivého roztoku (20 mmol \cdot l⁻¹ TRIS, pH 7,5), ktorý obsahoval 0,4 μ mol CaCl₂. Hydrolýza prebiehala v 10 ml banke pri laboratórnej teplote (20–25 °C) v atmosfére argónu (prípadne N₂) za intenzívneho miešania magnetickým miešadlom.

V stanovených časových intervaloch sme reakčnú zmes vniesli do 50 ml Erlenmeyerovej banky a reakciu zastavili prídavkom 10 ml metanolu. Do banky sme pridali zhruba 5 g bezv. Na₂SO₄ a zmes sme nechali stáť 30 min pod inertnou atmosférou. Po dekantácii sme síran dvakrát premyli s 20 ml dest. chloroformu. Roztoky sme spojili a odparili na vákuovej rotačnej odparke pri max. teplote 40 °C na objem asi 0,5 ml. Lipolyzovanú vzorku sme ďalej separovali metódou adsorpčnej tenkovrstvovej chromatografie.

c) Podmienky chromatografie na tenkých vrstvách

Vzorku po lipolýze sme naniesli v tvare pásu na vrstvu silikagélu (Kieselgel G, Merck), ktorý sme pred použitím aktivovali 30 min zahrevom na 110 °C. Sklené TLC platne (20 \times 20 cm) sme vyvinuli v sústave chloroform–metanol–voda, v objemovom pomere 70 : 30 : 3. Vyvinuté platne sme detegovali parami sublimujúceho jódu. Na identifikáciu produktov lipolýzy sme na platne zároveň naniesli tieto štandardné látky: fofatidylcholín, jeho lyzoderivát (Applied Science Lab.) a kyselinu olejovú (Lachema).

d) Podmienky prípravy metylesterov MK

Jednotlivé pásy separovaných lipidov sme z TLC platne spolu s adsorbentom vyškrabali a dali do sklených ampuliek objemu 10 ml. Po prídavku (3 ml) metanolovej HCl (6 %) sme reakčnú zmes v zatavených ampulkách zahrievali 2 h na vodnom kúpeli pri teplote 50–55 °C. Po skončení derivatizácie sme surové metylestery extrahovali zmesou petroléter–dietyléter (1 : 1), extrakt premyli 2 % vodným roztokom NaHCO₃ do neutrálnej reakcie a prefiltrovali cez bezv. Na₂SO₄. Rozpúšťadlo sme z filtrátu odparili prúdom dusíka, metylestery masných kyselín rozpustili v heptáne (200 μ l) a získaný roztok priamo použili na GLC analýzu.

e) Podmienky rozdeľovacej plynovej chromatografie

Na GLC analýzu metylesterov masných kyselín sme použili Research Gas Chromatograph Hewlett-Packard 7620 A s plameňovo-ionizačným detektorom a s pripojeným plnoautomatickým integrátorom HP 3380. A. Metylestery masných kyselín sme separovali na polyesterovej stacionárnej fáze dietylén-glykoljantarátu (Supelco) zakotvenej na nosiči Chromaton N-AW (Lachema). Pracovné podmienky GLC analýzy uvádza práca [23].

Výsledky a diskusia

Fosfolipáza A_2 z hadieho jedu sa vďaka polohovej špecifickosti hydrolýzy lipidov môže výhodne použiť pri štruktúrnej analýze fosfatidylcholínov a triacylglycerolov. Vlastnosti tohto enzýmu sú podrobne opísané v literatúre [14]. Vlastnosti fosfolipázy A_2 z včelieho jedu sa neštudovali v takom rozsahu.

Keďže dodávateľ n. p. Slovakofarma neuvádza vlastnosti enzýmového preparátu zo včelích žihadiel, určili sme najprv jeho aktivitu dvoma postupmi uvedenými v časti Materiál a metódy. Pri titračnej metóde [20] sme stanovili percentuálne množstvo uvoľnených MK hydrolýzou vaječného fosfatidylcholínu enzýmovým preparátom. Z piatich paralelných stanovení sme zistili:

$$\% \text{ MK} = 6,8 \quad (a = 199,9 \mu\text{l}, b = 108 \mu\text{l}, m = 24,13 \text{ mg}).$$

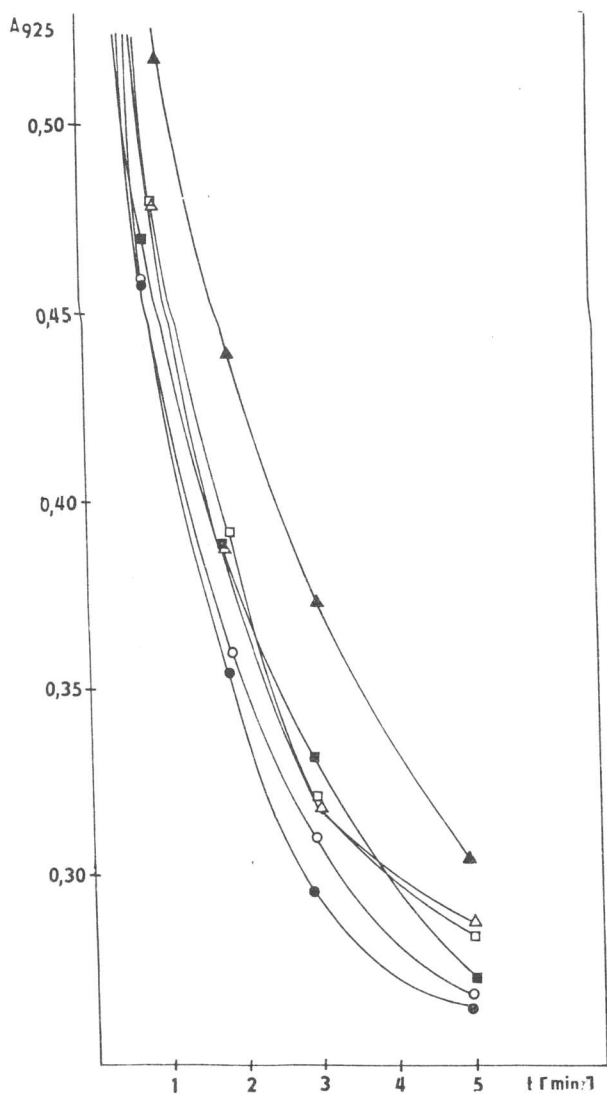
Keďže množstvo použitého substrátu PC zodpovedalo presne $30,7 \mu\text{mol}$ ($M_{\text{PC}} = 787$, ako 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-fosfocholín), stanovené percento MK zodpovedá $2,09 \mu\text{mol}$ PC. Podľa definície jednotky enzýmovej aktivity a koncentrácie enzýmového preparátu ($3,33 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) sme zistili, že štiepenie $1 \mu\text{mol}$ PC za 1 min katalyzuje $398,3 \mu\text{g}$ preparátu zo včelích žihadiel (resp. $0,25 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol PC} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ preparátu).

Časovú závislosť poklesu absorbancie suspenzie vaječného žltka (rýchlometóda [21]) v prítomnosti fosfolipázy A_2 znázorňuje obr. 3.

Priemerný rozdiel zo šiestich meraní medzi hodnotami A_{925} v časoch 0 až 5 min je 0,328. Z poklesu absorbancie možno takto jednoducho a rýchlo určiť relatívnu aktivitu fosfolipázy A_2 z včelieho jedu. Uplatnenie tejto rýchlometódy možno odporučiť najmä pri kontrole purifikačných krokov surových enzýmových preparátov.

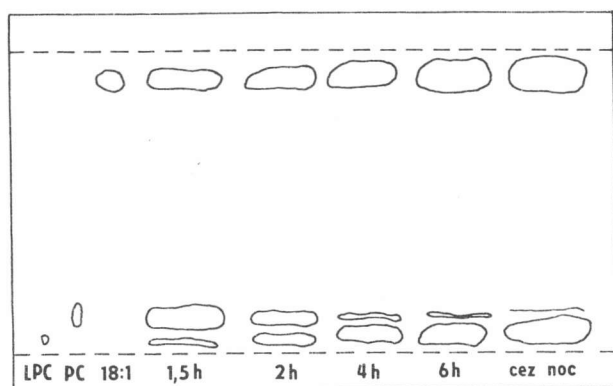
V ďalšej časti práce sme fosfolipázu A_2 z včelieho jedu použili na modelové deacylácie žltkového fosfatidylcholínu, pričom sme hľadali optimálny čas účinku enzýmu na substrát. Vybrali sme tieto reakčné časy: 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h a hydrolýzu fosfatidylcholínu v čase „cez noc“. Na obrázku 4 sú znázornené výsledky separácie reakčných produktov na tenkej vrstve adsorbentu. Z TLC chromatogramu separovaných lipidov je zjavný vzrast plochy pásov lyzofosfatidylcholínu (LPC) a mastných kyselín s dĺžkou reakčného času. Prirodzene, súvisí to s postupným rozkladom substrátu PC fosfolipázou A_2 . Pri lipolýze v čase „cez noc“ sme zistili iba stopy fosfatidylcholínu. Keďže zloženie MK v polohách sn-1 a sn-2 fosfatidylcholínu vaječného žltka bolo už opísané [24], podrobili sme frakcie LPC a VMK po derivatizácii na metylestery mastných kyselín GLC analýze. Priemerné výsledky z dvoch paralelných pokusov sú v tabuľke 1.

Z údajov uvedených v tabuľke je zrejماً dobrá zhoda zloženia MK vo frakciách LPC a VMK, získaných lipolýzou PC v časoch 4 h, ale najmä 6 h a „cez



Obr. 3. Časová závislosť poklesu absorbanie suspenzie vaječného žltka vplyvom fosfolipázy A_2 z včelieho jedu (šesť meraní pri rovnakých podmienkach).

Fig. 3. Time dependence of absorbancy decrease of egg yolk suspension under the influence of phospholipase A_2 from bee venom (six measurements in identical conditions).



Obr. 4. TLC rozdelenie lipidov po hydrolýze fosfatidylcholínu fosfolipázou A_2 v rôznych časových intervaloch (PC – fosfatidylcholí. LPC – lyzofosfatidylcholí. 18 : 1 – kyselina olejová).
Fig. 4. TLC separation of lipids after hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase A_2 at different time intervals (PC – phosphatidylcholine, LPC – lysophosphatidylcholine, 18 : 1 – oleic acid; ¹Overnight).

T a b u l k a 1. Zloženie mastných kyselín vo frakciách LPC a VMK po deacylácií žltkového fosfatidylcholínu A_2 v rôznych reakčných časoch

T a b l e 1. Composition of fatty acids in LPC and VMK fractions after deacylation of yolk phosphatidylcholine by phospholipase A_2 at different reaction times

MK ¹ [hm. %]	PC ²	Frakcia LPC ³					Frakcia VMK ⁴				
		1,5 h	2 h	4 h	6 h	cez noc ⁵	1,5 h	2 h	4 h	6 h	cez noc ⁵
16:0	31,1	55,0	65,3	64,5	65,1	66,3	8,3	5,3	3,6	2,5	2,3
16:1	1,6	1,4	1,7	1,8	1,3	1,0	1,8	1,6	1,9	1,4	1,5
18:0	14,6	24,5	26,2	28,3	28,6	29,1	3,2	2,8	1,3	0,9	0,7
18:1	37,2	9,9	3,7	3,1	3,3	2,6	53,6	56,3	57,2	57,8	58,3
18:2	10,6	4,1	0,6	0,4	st.	st.	25,7	26,5	28,2	29,2	30,7
18:3	0,7	0,2	st.	0	0	0	1,1	0,7	1,1	1,4	1,1
20:0	0,2	2,7	1,7	1,0	1,1	0,8	0,1	0,3	st.	st.	0
20:4	3,4	1,5	st.	0	0	0	5,3	5,9	5,8	6,2	5,1

PC – fosfatidylcholí. Phosphatidylcholine; LPC – lyzofosfatidylcholí. Lysophosphatidylcholine; VMK – voľné mastné kyseliny. Free fatty acids; 16:0 – kyselina palmitová, Palmitic acid; 16:1 – kyselina palmitolejová, Palmitoleic acid; 18:0 – kyselina stearová, Stearic acid; 18:1 – kyselina olejová, Oleic acid; 18:2 – kyselina linolová, Linoleic acid; 18:3 – kyselina linolénová, Linolenic acid; 20:0 – kyselina arachová, Arachidic acid; 20:4 – kyselina arachidónová, Arachidonic acid; st. – stopy, Traces.

¹Fatty acids; ²Phosphatidylcholine; ³Fraction of lysophosphatidylcholine; ⁴Fraction of free fatty acids; ⁵Overnight.

noc“. Údaje pre frakcie LPC zodpovedajú zloženiu MK v polohe 1 (sn-1) molekuly fosfatidylcholínu, kým údaje pre frakciu VMK zloženiu MK v polohe 2 (sn-2) pôvodnej molekuly PC.

Na rozdiel od tvrdenia autorov [14], že nezistili vplyv stupňa nenasýtenosti mastných kyselín na rýchlosť štiepenia fosfatidylcholínu fosfolipázou A_2 z hadieho jedu, v našej práci sme zistili nižší obsah nasýtených mastných kyselín a vyšší obsah nenasýtených mastných kyselín vo frakcii LPC v čase 1,5 h od začiatku účinku enzýmu. Svedčí to o prednostnej deacylácii nasýtených mastných kyselín z polohy sn-2 molekuly fosfatidylcholínu, resp. o určitej špecifickej aktivite fosfolipázy A_2 z včelieho jedu vzhľadom na typ mastnej kyseliny.

Získané výsledky sú ďalej porovnané v tabuľke 2 s literárnymi údajmi pre zloženie MK v PC vaječného žĺtka [24]. Uvádzame aj distribúciu MK v jednotlivých polohách triacylglycerolov vaječného žĺtka [25].

T a b u ľ k a 2. Polohová distribúcia mastných kyselín vo fosfatidylcholínach a triacylglyceroloch vaječného žĺtka

T a b l e 2. Position distribution of fatty acids in phosphatidylcholines and triacylglycerols of egg yolk

MK ¹ [hm. %]	PC vaj. žĺtka ²						TAG vaj. žĺtka ³ [25]		
	sn-1,2		sn-1		sn-2		sn-1	sn-2	sn-3
	A	B	A	B	A	B			
16:0	32	31,1	70	65,7	3	2,4	71	4	12
16:1	st.	1,6	0	1,2	0	1,5	5	3	6
18:0	10	14,6	24	28,8	0,6	0,8	4	3	14
18:1	48	37,2	5	3,0	61	58,0	17	63	67
18:2	9	10,6	0	st.	31	30,0	2	26	1
20:4	st.	3,4	0	0	4	5,6	–	–	–

Skratky a symboly ako v tabuľke 1; A – lit. [24]; B – vlastné výsledky; – nestanovené.

For explanations see Table 1.

A – Ref. [24]; B – our results; – non-determined.

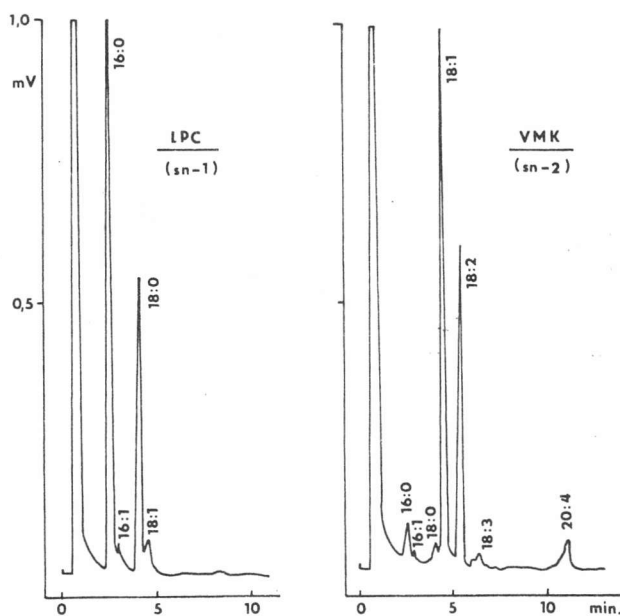
¹Fatty acids; ²Phosphatidylcholine of egg yolk; ³Triacylglycerols of egg yolk.

V tabuľke 2 v kolónke Vlastné výsledky sú priemerné hodnoty obsahov MK v polohách sn-1 a sn-2 stanovených po lipolýze v čase 6 h a „cez noc“. Opäť sme skonštatovali dobrú zhodu medzi nami zistenými (enzým z včelieho jedu) a literárnymi údajmi (enzým z hadieho jedu) pre distribúciu MK vo fosfatidylcholíne z vaječného žĺtka. Rozdiel 10 % v obsahu kys. olejovej (18 : 1) východiskového PC spôsobujú pravdepodobne mnohé faktory, ako sú plemeno nosníc, spôsob kŕmenia a pod.

Na vyhodnotenie reprodukovateľnosti študovanej analytickej metódy sme uskutočnili 6 opakovaných 6-hodinových štiepení fosfatidylcholínu za pod-

mienok navrhnuitej metódy. Získané výsledky sme vyhodnotili pre dominantné MK základnými štatistickými postupmi [26]. Pre frakciu LPC vyšlo rozpätie pre kys. palmitovú: $R_{16:0} = 5,1 \%$, s relatívnou smerodajnou odchýlkou, $s_r = 3,27 \%$ ($\bar{x}_{16:0} = 65,1$) a pre kyselinu stearovú $R_{18:0} = 2,5 \%$, $s_r = 3,25 \%$ ($\bar{x}_{18:0} = 28,6$). Pre frakciu VMK vyšlo rozpätie pre kyselinu olejovú $R_{18:1} = 6,2 \%$, s relat. smerodajnou odchýlkou, $s_r = 3,93 \%$ ($\bar{x}_{18:1} = 57,8$) a pre kyselinu linolovú $R_{18:2} = 5,0 \%$, $s_r = 6,8 \%$ ($\bar{x}_{18:2} = 29,2$). Na obrázku 5 je reprodukováný záznam GLC analýzy metylesterov MK z fosfatidylcholínovej frakcie a z frakcie voľných mastných kyselín po šesťhodinovej hydrolýze fosfolipázou A_2 z včelieho jedu. Z praktických dôvodov sme štatisticky nehodnotili hydrolýzu v najdlhšom časovom intervale (cez noc).

Výsledky GLC analýzy informujú o odlišnom zastúpení mastných kyselín v polohách sn-1 a sn-2 fosfatidylcholínových molekúl. Zistili sme dominantné zastúpenie nasýtených mastných kyselín v polohe sn-1, sumárne až 95 %. Naopak, stredný uhlíkový atóm je esterifikovaný predovšetkým nenasýtenými mastnými kyselinami, celkove takisto 95 %. Ďalej sme zistili, že esenciálna



Obr. 5. GLC záznam rozdelenia metylesterov mastných kyselín z lyzolecitínovej frakcie (LPC) a frakcie voľných mastných kyselín (VMK) po 6 h hydrolýze fosfolipázou A_2 .

Fig. 5. GLC separation of methyl esters of fatty acids from the lysolecithine fraction (LPC) and the fraction of free fatty acids (VMK) after 6 h hydrolysis with phospholipase A_2 .

kys. arachidónová (20 : 4) sa nachádza výhradne v polohe sn-2 PC molekúl slepačieho žltka. Nález kyseliny arachidónovej vo frakcii LPC po 1,5 h hydrolyze (pozri tab. 1) však naznačuje, že táto kyselina pravdepodobne pochádza z molekuly LPC s masťou kyselinou v polohe sn-2, ktorý môže vzniknúť z fosfatidylcholínu účinkom lipázy (EC. 3.1.1.3), resp. fosfolipázy A_1 a tenkovrstvou chromatografiou ho nemožno oddeliť od lyzoderivátu s MK v polohe sn-1. Táto skutočnosť naznačuje, že v nami overovanom enzýmovom preparáte môžu byť prítomné okrem fosfolipázy A_2 aj iné lipolytické enzýmy. Dosiahnuté výsledky poukazujú aj na to, že fosfolipáza A_2 z včelieho jedu špecificky atakuje esterové väzby v polohe sn-2 glycerolipidov za vzniku voľných masných kyselín a lyzoderivátu príslušného fosfolipidu s MK v polohe sn-1.

Záver

Z výživového hľadiska sú dôležité predovšetkým masné kyseliny viazané v polohe sn-2 glycerolipidov tukovej zložky konzumovaných potravín, pretože lipolýzou vzniknuté 2-monoacyl-sn-glyceroly (2-MAG) sú absorbované a utilizované v tenkom čreve ako také [27]. Metóda stereošpecifickej analýzy glycerolipidov umožňuje však stanoviť zloženie MK vo všetkých troch polohách TAG molekúl (býva často veľmi rozdielne), čo umožňuje hlbšie študovať nielen výživové aspekty, ale aj otázky súvisiace s biochemickými procesmi v organizme.

V práci overená metóda stereošpecifického štiepenia glycerolipidov fosfolipázou A_2 z lyofilizovaných včelích žihadiel poskytla výsledky, ktoré dobre korelovali s literárnymi údajmi opísanými pre účinok fosfolipázy A_2 z hadieho jedu na fosfatidylcholín izolovaný zo slepačieho žltka [24]. Zistili sme, že optimálny a z praktického hľadiska najvhodnejší čas hydrolyzy substrátu s enzýmom je šesť hodín. Dosiahnuté výsledky potvrdzujú, že fosfolipáza A_2 z včelieho jedu je vhodným prostriedkom na stereošpecifickú analýzu glycerolipidov. Nie zanedbateľná je aj skutočnosť, že enzýmový preparát je tuzemského pôvodu.

Za poskytnutie vzorky lyofilizovaných včelích žihadiel autori ďakujú Ing. Eve Komanovej, CSc., za technickú pomoc M. Bystrickej a V. Grmanovej.

Do redakcie došlo 3. 3. 1989

Literatúra

1. SCHMIDT, Š., Bull. PV, 27, 1988, č. 1–2, s. 73.
2. HIRSCHMANN, H., J. Biol. Chem., 235, 1960, s. 2762.
3. NOMENKLATÚRA LIPIDOV IUPAC-IUB, Chem. Listy., 81 1987, s. 715.
4. SCHMIDT, Š. – BYSTRICKÁ, M., Bull. PV, 27, 1988, č. 3–4, s. 439.
5. BROCKERHOFF, H., J. Lipid Res., 6, 1965, s. 10.
6. BROCKERHOFF, H., Lipids, 6, 1971, s. 942.
7. BROCKERHOFF, H., Lipids, J. Lipid Res., 8, 1967, s. 167.
8. CHRISTIE, W. W. – MOORE, J. H., Biochim. Biophys. Acta, 176, 1969, s. 445.
9. BRECKENRIDGE, W. C.: Handbook of Lipid Research. Vol. 1. New York, Plenum Press 1978.
10. CHRISTIE, W. W. – HUNTER, M. L., J. Biochem., 191, 1980, s. 637.
11. LANDS, W. E. M. – PIERINGER, R. A. – SLAKEY, P. M. – ZSCHOCKE, A., Lipids, 1, 1966, s. 444.
12. CHEMIN-DOUAUD, S. – KARLESKIND, A., Rev. Fr. Corps Gras, 29, 1982, s. 125.
13. MYHER, J. J. – KUKSIS, A., Can. J. Biochem., 57, 1979, s. 117.
14. IWANAGA, S. – SUZUKI, T.: Enzymes in Snake Venom. Berlin–New York, Springer-Verlag 1979.
15. CHRISTIE, W. W., Lipid Analysis. Oxford – New York – Toronto – Sydney – Paris – Frankfurt, Elsevier Applied Science 1982.
16. YAMADA, K. – IMURA, K. – TANIGUCHI, M. – SAKAGAMI, T., J. Biochem., 79, 1976, s. 809.
17. WAKU, K. – NAKAZAWA, Y., J. Biochem., 72, 1972, s. 149.
18. THOMPSON, W., Biochem. Biophys. Acta, 187, 1969, s. 150.
19. SINGELTON, W. S. – GRAY, M. S. – BROWN, M. L. – WHITE, J. L., J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 1965, s. 53.
20. WELLS, M. A. – HANAHAN, D. J., Biochemistry 8, 1969, s. 414.
21. MARINETTI, G. V., Biochim. Biophys. Acta, 98, 1965, s. 554.
22. ROBERTSON, A. F. – LANDS, W. E. M., Biochemistry, 1, 1962, s. 804.
23. SCHMIDT, Š.: Zmeny štruktúr a vlastností lipidov vo vybraných technologických procesoch výroby jedlých tukov. Kandidátska práca. Bratislava, Chemickotechnologická fakulta SVŠT 1986.
24. BERGELSON, L. D.: Lipid Biochemical Preparations. Amsterdam – New York – Oxford, Elsevier Applied Science 1980.
25. CHRISTIE, W. W. – MOORE, J. H., Biochim. Biophys. Acta, 218, 1970, s. 83.
26. ECKSCHLAGER, K. – HORSÁK, I. – KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. Praha, SNTL – Bratislava ALFA 1980.
27. LINDER, M. C.: Nutritional Biochemistry and Metabolism with Clinical Application. New York – Amsterdam – Oxford, Elsevier Applied Science 1985.

Структурный анализ липидов

III. Стереоспецифический анализ глицеролипидов фосфолипазой A_2 из пчелиного яда

Резюме

В работе описан новый метод стереоспецифического анализа глицеролипидов с применением фосфолипазы A_2 из лиофилизированных пчелных жал. Авторы определили активность энзиматического препарата двумя методами и оптимизировали условия стереоспецифического деацилирования положения *sn*-2 молекул фосфатидилхолина из куриного желтка.

Авторы обнаружили, что при условиях предлагаемого метода оптимальное время гидролиза фосфатидилхолина фосфолипазой A_2 из пчелиного яда является 6 часов. Это время уже гарантирует почти полное расщепление фосфатидилхолина на его лизо-производное и свободные жирные кислоты. Анализом полученных фракций авторы описали распределение жирных кислот в положениях *sn*-1 и *sn*-2 молекул желткового фосфатидилхолина. Результаты были в согласии с литературными данными.

Structural analysis of lipids

III. Stereospecific analysis of glycerolipids by phospholipase A_2 from bee venom

Summary

The work describes a new method of stereospecific analysis of glycerolipids using phospholipase A_2 from lyophilized bee stings. The activity of the enzyme preparation has been determined by two methods and the conditions of stereospecific deacylation of the *sn*-2 position of phosphatidylcholine molecules from egg yolk have been optimized.

Under the conditions of the suggested method, the optimum time of phosphatidylcholine hydrolysis by the phospholipase A_2 from bee venom has been found to be six hours. This time ensures a nearly complete splitting of phosphatidylcholine to its lyso-derivative and free fatty acids. By analysis of the obtained fractions, the distribution of fatty acids in the *sn*-1 and *sn*-2 positions of the yolk phosphatidylcholine molecules could be described. The results were in good accordance with literature data.