

磷脂酶 A₁ 酶活测定方法的研究

李脉¹, 杨继国², 杨博²

(1. 广东化工制药职业技术学院, 广东 广州 510520) (2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 本文针对脂肪酶 Lecitase[®]Ultra 的特殊性 (同时具有脂肪酶活性和磷脂酶活性), 采用无油磷脂为底物的酸碱滴定法测定 Lecitase[®]Ultra 的磷脂酶酶活, 探讨了测定中的几个关键因素对酶活测定值的影响, 建立了一套快捷可靠的磷脂酶酶活测定方法。

关键词: 脂肪酶; 磷脂酶 A₁; Lecitase[®]Ultra; 酶活测定; 酸碱滴定

中图分类号: TS201.2⁺5; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)08-0080-03

Studies on the Measurement of the Enzymatic Activity of Phospholipase A

LI Mai¹, YANG Ji-guo², YANG Bo²

(1. Guangdong Vocation & Technical College of Chemical Engineering Pharmaceutics, Guangzhou 510520, China) (2. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A method for measurement of the phospholipase A₁ activity by acid-base titration with deoiled phospholipid as substrate was adopted in this paper, according to the characteristic of lipase Lecitase[®]Ultra which had both high lipase and phospholipase activity. The effect of some key factors on the measurement of enzymatic activity was evaluated, and a rapid and reliable method for measuring the phospholipase A₁ activity of Lecitase[®]Ultra was established.

Key words: lipase; phospholipase A₁; lecitase[®]Ultra; assaying the enzyme activity

Lecitase[®]Ultra 是一种羧酸酯水解酶, 经基因改造的米曲霉深层发酵而得的, 其基因供体为尖孢镰刀霉 (*Fusarium oxysporum*) 和棉状嗜热丝孢菌 (*Thermomyces lanuginosus*), 它具有既对磷脂结构又对三甘油酯结构的固有活力, 因此同时具有脂肪酶活性和磷脂酶活性, 但是在一定的反应体系中, Lecitase[®]Ultra 会优先表现出一种特定的酶活。

在磷脂酶酶活的测定中, 常使用普通的大豆磷脂或蛋黄磷脂作为测定的底物, 但是这些磷脂常含有为数不少的甘油三酯, 将会对测定那些能够同时作用于磷脂和甘油三酯的酶的酶活测定造成一定的干扰, 这是因为经过酶的作用以后, 磷脂和甘油三酯都将产生游离脂肪酸, 而这两种酶活的测定都是以反应过程中产生的游离脂肪酸的量来计算的, 因此在对这类酶进行其中一种酶活的测定时, 需要使用特定的或处理过的底物。在进行磷脂改性和植物油酶法脱胶的研究和生产中, 需要对所用酶 Lecitase[®]Ultra 的活力尤其是磷脂酶活力进行有效的监控, 因此为了更加准确的反应出 Lecitase[®]Ultra 的磷脂酶活性, 减少甘油三酯对测定结果的影响, 需要对所购得大豆浓缩磷脂进行去油处理, 以获得的较纯无油磷脂作为酶活测定的底物。

目前仍然缺少针对 Lecitase[®]Ultra 的系统研究和其磷脂酶酶活测定的简单可靠的方法。供应商诺维信公司推荐的方法使用的是一种特殊的硫代底物, 通过分光光度法进行定量分析, 但是此种方法所用底物来源有限, 不利于日常使用。文献报道的测定磷脂酶的方法还有醋酸铜络合法、酚红分光光度法等, 但也存在着消耗药品量大、操作繁琐等问题^[1,2]。

由于磷脂在水解后产生了大量的游离脂肪酸, 在反应过程中可以通过用 NaOH 来滴定酸, 间接算出即时反应速率等参数, 因此酸碱滴定法可以作为磷脂酶酶活测定的一种方法, 而且简单快速, 但是由于终点判定的困难, 造成了实验结果重复性差、误差大等问题。自动滴定仪是一种分析精度高、重现性好的实验室仪器, 它的使用将较有效地解决这一问题, 使用自动滴定仪的酸碱滴定法将可能是一种快捷可靠的磷脂酶酶活测定方法。本文采用自动滴定仪的酸碱滴定进行脂肪酶 Lecitase[®]Ultra 的磷脂酶活 A₁ 测定, 并系统研究了测定过程中几种关键因素对测定结果的影响。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

Lecitase[®]Ultra: 一种羧酸酯水解酶, 经基因改造的米曲霉深层发酵而得的, Novozyme 公司提供; 大豆

收稿日期: 2007-05-31

作者简介: 李脉, 硕士, 助教, 主要从事生物工艺方面的研究

浓缩磷脂: Centrol[®] 3F-UB, 美国中央大豆公司, 购自上海康诺执信有限公司; 其他试剂: 聚乙烯醇(PVA)、乙醇等皆为分析纯试剂。

1.2 溶液的配制

1.2.1 NaOH 标准溶液 (0.05 mol/L) 的配制

按 GB601 配制和标定 $c(\text{NaOH})=0.05 \text{ mol/L}$ 的标准溶液, 使用时, 准确稀释 10 倍。

1.2.2 缓冲液的配制

0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液与 0.1 mol/L 柠檬酸溶液按不同比例配制, 并在酶活测定的温度下进行微调以获得所需 pH 值的缓冲液。

1.3 大豆浓缩磷脂的预处理

为获得无油的大豆浓缩磷脂, 将购得的大豆磷脂进行三次以上的丙酮脱油处理, 真空脱溶后获得无油大豆磷脂。

1.4 磷脂酶酶活测定过程

一定量的底物无油磷脂、0.5% PVA 溶于预定 pH 值的缓冲液中, 用高速均质机在 10000 r/min 的条件下均质 3 min, 得到底物溶液。

取 4 个 100 mL 高型烧杯, 2 个作为空白瓶, 2 个作为样品瓶, 各加底物溶液 25 mL, 再于空白瓶中加入 95%乙醇 15 mL, 于预定温度的水浴中预热 5 min, 然后在各瓶中加入 Lecitase[®] Ultra 酶液预定稀释倍数的稀释液 1 mL (用缓冲液稀释), 立即混匀计时, 在预定温度的水浴中 180 r/min 的条件振荡准确反应一定时间, 于样品瓶中立即补加 95%乙醇 15 mL 终止反应, 取出, 于自动滴定仪 (法国 Radiometer TitraLab 845) 下用 NaOH 标准溶液滴定, 计算标准碱液平均消耗量。

1.5 磷脂酶酶活力单位定义及计算公式

磷脂酶酶活力定义为: 在特定条件下 1 min 水解磷脂产生 1 微摩尔 (μmol) 量游离脂肪酸所需的酶量即为一个磷脂酶活力单位 (U)。Lecitase[®] Ultra 为液体酶制剂, 其磷脂酶活力表示为每 g 酶液所测得的磷脂酶活力单位, 即 U/g。

$$\text{计算公式: } X=(V-V_0)*c*50*n/(0.05*t)$$

其中: X - 样品的酶活力, U/g; V - 滴定样品时消耗的 NaOH 标准溶液体积, mL; V_0 - 滴定空白时消耗的 NaOH 标准溶液体积, mL; c - NaOH 标准溶液的浓度, mol/L; 50 - 0.05 mol/L NaOH 标准溶液 1.00 ml 相当于脂肪酸 50 μmol ; n - 酶液样品的稀释倍数; t - 测定酶活时的反应时间。

2 实验结果

2.1 底物浓度对反应速度的影响

在酶活的测定中, 在温度、pH 及酶浓度恒定的条件下, 底物浓度对酶促反应的速度有很大的影响。在底物浓度很低时, 酶促反应的速度随底物浓度的增加而成比例的迅速增加; 随着底物浓度的继续增加, 反应速度的增加开始减慢, 到一定程度, 反应速度趋于恒定为一常数, 实际上就是趋向最大反应速度, 测定此处的反应速度, 最能准确地反映酶量多少。在此处底物浓度变化, 对反应速度影响很小。

因为无油磷脂在水中的溶解度有限, 要配制浓度大于 5% 的溶液比较困难, 因此在研究底物浓度对酶活测定值的影响时, 底物无油磷脂的浓度分别取 1%、2%、3%、4%、5%, 按 1.4 进行, 其它条件为: 缓冲液 pH 7.0, Lecitase[®] Ultra 酶液 100 倍稀释, 反应温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间 10 min。反应结果如图 1 所示。

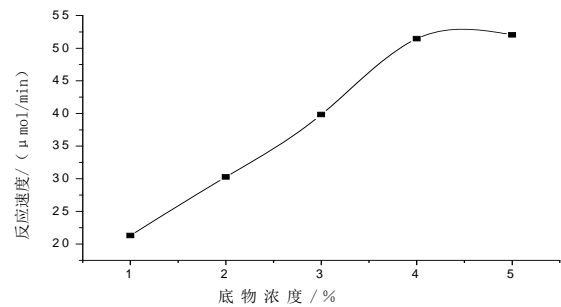


图 1 底物浓度对反应速度的影响

由图 1 可知, 底物浓度达到 4% 时酶促反应速度最快, 低于 4% 酶活下降, 表现为底物量不足; 高于 4% 酶活很少增加, 表现为酶已基本被底物所饱和, 所以在以后的研究中, 底物都配制为 4% 浓度的溶液。

2.2 反应时间的确定

进行酶活力测定, 要确定适宜的酶反应时间。从酶反应的时间—产物生成量进程曲线可知, 在曲线起始一段时间内为直线 (其斜率代表初速度)。随反应时间延长, 曲线趋于平坦, 斜率变小, 反应速度下降。酶催化反应的动力学也表明, 酶反应的产物达到一定浓度后会对酶产生反馈抑制作用, 因而反应速度随着时间延长会越来越慢, 只有反应的初速度才与酶量成正比, 因此要真实反映出酶活力大小, 就应底物过量的情况下在初速度时间内测定。

目前, 测定酶活时酶反应时间采用的有 5 min、10 min、15 min、20 min、30 min 等, 本次实验测定了酶反应开始至 60 min 内的产物脂肪酸的生成量, 具体条件为: 底物浓度 4%, 缓冲液 pH 7.0, 酶液 100 倍稀释, 反应温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 。得到的酶促进程曲线如图 2 所示, 20 min 内产物的生成量随反应时间几乎呈线性增长, 其斜率代表了酶反应的初速度, 此后反应速度

减慢(单位时间内产生的脂肪酸量呈下降趋势)。由此可见,酶活力测定时反应时间以 15 min 为宜,而且此时底物的消耗量为原有底物量的 5%左右,也符合酶活测定经典理论的要求(一般认为,原有底物量被消耗 5%以内,此时反应速度为真正的初速度)。

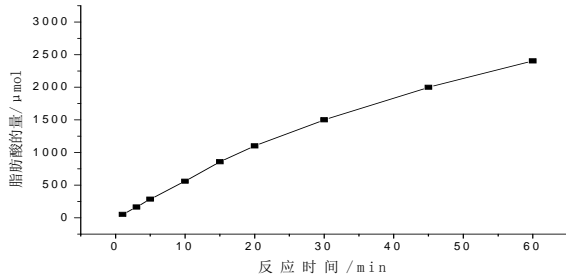


图 2 酶促磷脂反应的进程曲线

2.3 温度对反应速度的影响

温度对酶的影响具有双重作用。一方面,温度加速酶反应的速度;另一方面酶是蛋白质,温度升高会加速酶蛋白的变性。因此,在较低温度范围内,酶反应速度随温度升高而增大;超过一定温度后,反应速度下降。酶反应速度达到最大值时的温度称酶反应的最适温度。

本次实验保持其它反应条件恒定(底物浓度 4%,缓冲液 pH 7.0,酶液 100 倍稀释,反应时间 15 min),而在一系列变化的温度(30 °C、40 °C、50 °C、60 °C)下测酶活力,结果如图 3 所示。由图可知,50 °C、60 °C 时所测酶活较高,但是高温不利于酶的稳定,所以测定 Lecitase® Ultra 磷脂酶活力的较宜温度为 50 °C。

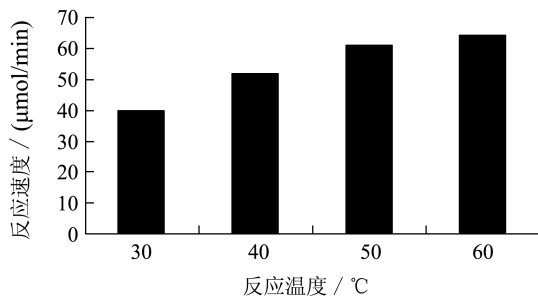


图 3 反应温度对反应速度的影响

2.4 反应体系 pH 对酶反应速度的影响

反应体系 pH 对酶催化活力的影响极为显著,这很可能是因为 pH 改变了酶活性部位有关基团的解离状态。在最适 pH 时,酶分子上活性基团的解离状态,

最适于酶与底物的结合;而高于或低于最适 pH 时,酶活性部位基团解离状态不利于酶与底物的结合,酶活力也相应降低。pH 也可影响底物的解离及反应系统中其它组分的解离。

本次实验考察缓冲液 pH 对酶活测定值时反应速度的影响,在其它反应条件恒定(底物浓度 4%,酶液 100 倍稀释,反应时间 15 min,反应温度 50 °C),缓冲液 pH 分别取 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 按 1.4 步骤测定反应速度,结果如图 4 所示。由结果可知,Lecitase® Ultra 为偏酸性磷脂酶,在反应体系 pH 为 5.0 时表现出最大反应速度,因此测定酶活时采用 pH 5.0 的缓冲液来配制底物溶液和稀释酶液。

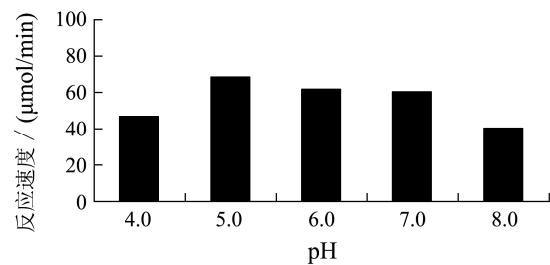


图 4 pH 对反应速度的影响

3 结语

酶活力测定是进行酶的研究、应用、生产的基础,探寻一个精确、快速、简便的测定方法十分重要,但在实际测定中,测定的结果常与所采用的各项测定条件有关,采用不同的测定条件,会得出不同的结果。综合上述试验结果,测定 Lecitase® Ultra 酶的磷脂酶 A₁ 酶活应采用以下测定条件为宜:底物无油磷脂,底物浓度 4%,缓冲液 pH 5.0,反应时间 15 min,反应温度 50 °C。在适宜的条件下,采用自动滴定仪检测的酸碱滴定法是一种快捷可靠的测定 Lecitase® Ultra 磷脂酶酶活的方法。

参考文献

- [1] 赵树铭. 磷脂酶 A₂ 测定方法进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1995, 16(6): 242-245
- [2] 李严, 张英华, 王琛, 等. 磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂研究的新方法[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2003, 26(3): 44-46