

碱性脂肪酶测定方法的探讨

秦 日方

(无锡轻工大学中央研究所, 无锡 214036)

摘要 对碱性脂肪酶酶活的测定方法进行了研究, 对反应底物及其形态、反应的酸度、温度、稳定时间等条件进行了对比和选择。

关键词 脂肪酶; 橄榄油; 滴定; 乳化; 酶活力; 底物

中图分类号 Q55

0 前言

脂肪酶是分解油脂的酶类, 脂肪酶的水解底物一般为天然油脂, 其水解部位是油脂中脂肪酸和甘油相连接的酯键, 反应产物为甘油二酯、甘油单酯、甘油和脂肪酸。该反应的重要特征是异相系统反应, 即在油-水的界面上作用^[1], 再加上酶解反应本身是一个机制十分复杂的催化反应, 反应速度较慢, 这就决定了反应的不稳定性。许多因素都会影响酶解反应的速度, 如反应底物的种类及形态、稳定时间、反应体系的酸度、温度等。

1 材料与方法

1.1 材料

碱性脂肪酶(江苏省丹凤集团公司生产); 聚乙烯醇(分子量1750, 北京旭东化工厂产品); 三丁酸甘油酯; 橄榄油(cp)及其它无机试剂。

1.2 仪器

恒温水浴锅, 精密酸度计, 磁力搅拌器, 高速组织捣碎机等。

1.3 试验方法

1.3.1 反应底物乳化液的制备 称取30 g 聚乙烯醇(PVA), 加900 ml 水, 加热溶解, 冷却后用6 mol/L 氢氧化钠调至pH 为10.0, 过滤, 定容至100 ml。

量取上述PVA 溶液150ml, 加入橄榄油50ml, 用高速组织捣碎机搅拌6min, 4000 r/min, 前后各3 min, 间隔5 min, 液备用。

1.3.2 0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲溶液的制备 称取1.88 g 甘氨酸, 加入约480 ml 水溶解, 用6 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至10.0, 再定容至500 ml, 备用。需新鲜配置。

1.3.3 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液的制备 取4.5 g 固体氢氧化钠溶于1 L 水, 用邻苯二甲酸氢钾标定, 使用时再稀释一倍。

1.3.4 酶活的定义 在反应条件下, 每分钟催化脂肪水解产生1 μmol 脂肪酸的脂肪酶量定义为一个脂肪酶国际单位(u).

1.3.5 酶活的测定 在三角瓶中, 加入一定量缓冲溶液和乳化液, 放入一定温度的恒温水浴锅中, 再加入酶液反应并计时, 一定时间后终止反应, 用0.05 mol/L 氢氧化钠滴定游离出的脂肪酸, 同时做空白样(先加终止剂, 后加酶液, 其余同样品操作)^[2]。

1.3.6 酶活的计算
$$\text{酶活} = \frac{(V - V_0)}{t} \times 50 \times n$$

其中: V 为样品所耗碱的体积(ml)

V_0 为空白耗碱的体积(ml)

t 为反应时间(min)

n 为稀释倍数

50为1ml 0.05 mol/L 氢氧化钠的微摩尔数

2 结果与讨论

2.1 反应底物的影响

2.1.1 底物不同 分别用三丁酸甘油酯和橄榄油作底物, 与PVA 乳化后与酶作用测定酶活, 结果见表1.

由表1的数据可知, 用三丁酸甘油酯作为底物测得的酶活约为用橄榄油作底物时的

表1 不同底物的酶活测定结果 u•g⁻¹

三丁酸甘油酯	340	930	1260	1997	2520
橄榄油	136	378	502	812	1010

5倍左右. 因为前者其酸部分只有4个碳, 空间结构简单, 酶作用较容易, 而后者是长链的大分子结构, 酶对其的作用受到空间位阻效应, 相对而言比较困难, 这样在单位时间里底物与酶作用的几率就不同, 产生的游离酸的个数也不同, 最终表现为所测的酶活差别较大. 但严格地讲三丁酸甘油酯是不符合要求的底物, 因为在酶活的定义中要求的底物是油脂, 即其酸部分的含碳数应大于12个.

2.1.2 底物相同, 产地不同 分别用上海试剂总厂第二分厂出品的和北京芳草医药研制公司出品的橄榄油进行实验, 测得的酶活也不同, 见表2. 上海产品测得的酶活值明显高于北京产品. 其原因, 一是由于不同商家的产品,

表2 不同厂家的橄榄油测得的酶活 u•g⁻¹

上海厂家	380	384	540	560	1200	1300
北京厂家	308	316	440	440	1080	1100

其脂肪酸的结构不同, 空间立体构型也有差别, 对酶解这种有机物的大分子反应来讲, 空间位阻将大大影响反应程度, 从而影响单位

时间内脂肪酸的产率, 得出不同结果. 二是橄榄油试剂中的杂质也会对酶解反应甚至酸碱滴定产生影响, 由于橄榄油的试剂级别不高, 所以含杂质的情况不同, 也会导致结果的差别.

因此, 底物的选择, 应选橄榄油或十二碳酸以上的甘油酯, 并注明厂家, 以使各次测定值有可比性.

2.2 底物形态的影响

国外有报导^[3], 测定脂肪酶酶活时, 不将底物制成乳化液, 直接在搅拌状态下对油脂进行酶解反应, 然后用碱滴定生成的脂肪酸. 两种形态的底物其测得结果见表3.

表3 两种形态橄榄油的酶活测定结果 u•g⁻¹

乳 化	830	820	820	810	830	815
非乳化	900	940	960	900	910	890

由表3可知,非乳化的测得值略高于乳化态的,这是因为PVA对该酶解反应有抑制作用;再者,PVA增加了体系的粘度,使反应体系的流动性变差。对酸碱滴定也会产生一定影响。但不乳化测得的结果平行性较差,这可能是反应过程中的随机误差引起的。因为不乳化时,反应体系是酶的水溶液加入底物橄榄油中,水与油是互不相溶的,必然造成体系的不均匀,酶不能与底物充分接触,反应不完全,因此测定的平行性较差,可比性也差。综合考虑,虽然PVA对酶解的酸碱滴定有影响,但它能形成较均匀的乳化体系,使酶能与底物充分接触、反应,随机误差大大减小。平行测定中,PVA的影响作为系统误差可基本抵消,具有可比性,故宜采用加PVA制成乳化液这样的反应体系。

2.3 反应的酸碱条件

同一浓度的碱性脂肪酶在相同的温度下,对同样的底物作用,在不同的pH环境中,所测得的酶活也不同。结果见图1。

由图1可见,在pH 10~10.5范围内,测得的酶活最大。说明在pH 10~10.5范围内,是该酶的最佳酸碱范围,在该范围内酶解反应的速率达到最大,高于或低于该pH值,反应速率都会降低。这是由酶本身的性质决定的,因为体系的pH会影响酶分子的空间构象以及底物的分子状态,从而影响酶催化反应的速度,进而表现出酶活的变化。

2.4 反应温度的影响

同一浓度的碱性脂肪酶,在pH为10.0的环境中,对同样的底物作用,如果控制不同的反应温度,所测得酶活的结果也不同。见图2。

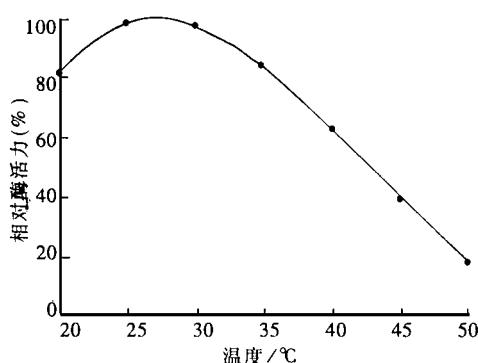


图2 测定体系温度对测定的影响

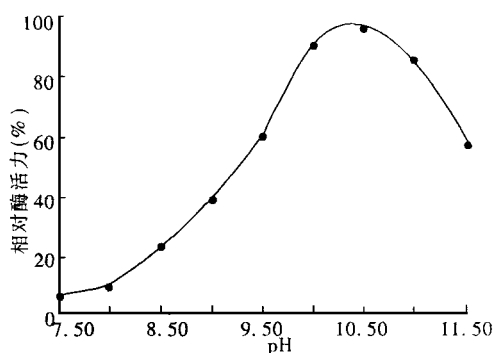


图1 测定体系pH值对测定的影响

由图2知,该碱性脂肪酶最适的反应温度为25°C;25~35°C之间,相对活力较好;超过35°C,其活力急剧下降;45°C以上,其活力仅存20%左右。

温度对酶活的影响包括两个方面:其一是对化学反应,反应速度随温度的升高而加快,酶活增加;其二是酶作为一种生物催化剂,温度升高将造成酶蛋白的热变性,使其失活,酶活降低。两个因素共同作用的结果是:在25°C时,其酶活相对最大^[4]。

2.5 稳定时间的影响

当反应终止后,间隔一定时间,再测定酶活,结果见图3。

由图3可见,反应终止后体系并不稳定,即还部分存在着酶解反应,放置25 min后,才基本达到稳定。这是因为反应体系是非均相的,反应发生在两相界面上,而且酶解反应又是大分子的催化反应,所以整体情况较复杂,并不能象无机反应一样迅速终止,需要一段时间才

能趋于稳定。

3 结 语

碱性脂肪酶的酶活测定是一个比较困难的问题,在测定时应明确指出所采用的乳化体系、底物、体系的 pH 条件、温度、反应时间和稳定时间,其中某条件发生变化,可能会使测定结果差别较大。除了本文中所讨论的因素外,象 PVA 的聚合度、乳化液制备时的搅拌速度、体系的离子强度及终止剂的不同等也会影响测定结果,并且由于反应过程的复杂性,还会带进许多随机误差,难以确保测定的精密度。目前,还没有公认的统一的测定方法,各产酶单位只能根据所产酶的特性制定出各自的产品检测方法。

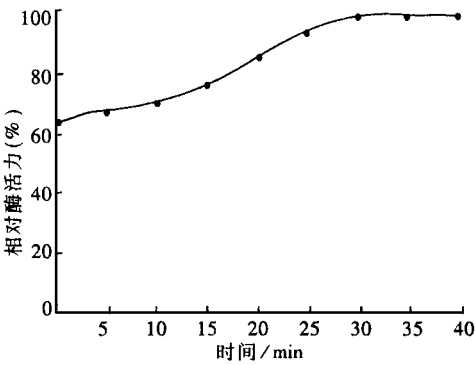


图3 体系稳定时间对测定的影响

参 考 文 献

1 郭显章. 酶的工业生产技术. 长春: 吉林大学出版社, 1988
2 郭敏辰. 碱性脂肪酶提取的探讨. 江苏食品与发酵, 1995, 4: 4~8
3 Tsuneo Yamane. J Jpn Oil Chem Soc, 1987, 36:402~408
4 李江华. 碱性脂肪酶菌种改良及其发酵工艺的研究: [硕士论文]. 无锡: 无锡轻工大学, 1992

Investigation into the Assay Method of Lipase

Qing Fang

(Centre Research and Design Institute, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract The assay method of alkaline lipase activity was studied in the paper. The comparison and selection of conditions on reaction substrate and its form, pH of reaction system, temperature, and stable time were carried out.

Key-words lipase; olive oil; titration; emulsification; enzyme activity; substrate

(责任编辑: 秦和平)