

## 脂肪酶活力测定中终止反应方法的比较分析\*

# Comparative Analysis of Termination Reaction Methods in Lipase Activity Assay

滕 昆<sup>1,2</sup>,张吉福<sup>1,2</sup>,牛福星<sup>1,2</sup>,杜丽琴<sup>1,2</sup>,韦宇拓<sup>1,2\*\*</sup>

TENG Kun<sup>1,2</sup>,ZHANG Ji-fu<sup>1,2</sup>,NIU Fu-xing<sup>1,2</sup>,DU Li-qin<sup>1,2</sup>,WEI Yu-tuo<sup>1,2</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530005;2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室,广西南宁 530005)

(1. College of Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China;

2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi, 530005, China)

**摘要:**【目的】寻找一种准确有效的脂肪酶活力测定中的终止反应方法,以进行脂肪酶酶学性质研究。【方法】比较分析前人研究脂肪酶常用的终止方法(无水乙醇法、EDTA法、三氯乙酸法、碳酸钠法、沸水浴法)对酶活力的抑制效果和吸光值的稳定性。【结果】无水乙醇法对酶活的抑制率为97.56%,终止反应后5min内净吸光值减少5%;EDTA法对酶活抑制率为32.94%,终止反应后10min内净吸光值增加5%;三氯乙酸法对酶活的抑制率为99.46%,终止反应后10min内净吸光值增加了0.47%;碳酸钠法对酶活抑制率为76.44%,终止反应后10min内净吸光值增加了0.53%;沸水浴法对酶活抑制率为99.51%,终止反应后10min内净吸光值减少0.77%,但沸水浴会导致剩余底物的大量分解。【结论】三氯乙酸法是一种准确有效的终止脂肪酶活力测定反应的方法,可用于脂肪酶酶学性质的研究。

**关键词:**脂肪酶 酶活测定 终止反应 抑制效果

中图分类号:Q-31 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2014)02-0115-04

**Abstract:**【Objective】Searching an accurate and effective termination reaction method in lipase activity assay for studying lipase enzymatic characters. 【Methods】Comparative analyses were conducted in inhibiting effect and result stability of termination methods(absolute ethanol, EDTA, trichloroacetic acid, sodium carbonate and boiling water bath), which predecessors used generally in lipase activity assay. 【Results】Inhibition ratio of termination by absolute ethanol was 97.56%, and net absorbance reduced by 5% within 5min after termination; Inhibition ratio of termination by EDTA was 32.94%, and net absorbance increased by 5% within 10min after termination; Inhibition ratio of termination by trichloroacetic acid was 99.46%, and coloration net absorbance increased by 0.47% within 10min after termination; Inhibition ratio of termination by sodium carbonate was 76.44%, and net absorbance increased by 0.53% within 10min after termination; Inhibition ratio of termination by boiling water was 99.51%, and net absorbance reduced by 0.77% within 10min after termination, but it would result in the decomposition of most remaining substrates. 【Conclusion】The termination method of trichloroacetic acid is an accurate and effective one in lipase activity assay, and can be adopt in analyzing lipase enzymatic characters.

**Key words:** lipase, activity assay, termination reaction, inhibiting effect

收稿日期:2013-10-10

修回日期:2013-12-11

作者简介:滕 昆(1988-),男,硕士研究生,主要从事基因工程菌的构建和酶工程方向的研究。

\* 广西科学研究与技术开发计划项目(No. 11107008-3),广西研究生教育创新计划项目(YCSZ2012027)资助。

\*\* 通讯作者:韦宇拓(1971-),男,教授,主要从事发酵与酶工程方向的研究。

**【研究意义】**脂肪酶是一类能水解油脂的酶类,广泛存在于动物、植物和微生物中<sup>[1,2]</sup>。脂肪酶在食品工业、农业、造纸业、纺织品、皮革处理、药物合成、化妆品、废水处理以及燃料酒精、生物柴油等诸多领域有着广泛的应用<sup>[3~6]</sup>,具有重要的经济价值,是紧随蛋白酶和糖酶之后占据第三大销售份额的酶类<sup>[7]</sup>。在利用脂肪酶进行科学实验和工业生产中,酶活力是一个非常重要的指标,具有很重要的参考价值,因此确保酶活力测定的精确性和可比性十分重要。如何准确测定酶活力的大小,对于研究该酶的特性及应用具有重要的意义。**【前人研究进展】**在许多研究中,脂肪酶活力测定通常采用分光光度法,即以对硝基苯酚酯作为底物,反应生成黄色的对硝基苯酚(p-NP)在410nm处有吸收峰,根据测定产物生成量来计算酶活力<sup>[8]</sup>。在终止反应环节,前人提供的方法有无水乙醇、EDTA、三氯乙酸、碳酸钠、沸水浴等<sup>[9~13]</sup>。**【本研究切入点】**虽然对脂肪酶的酶学性质存在较多的研究,但是大部分研究均未提及终止反应环节。因此,亟需提供一种准确有效的终止反应方法进行脂肪酶酶学性质研究。**【拟解决的关键问题】**本文以对硝基苯酚正辛酸酯(p-NPO)作为底物进行酶催化反应,采用无水乙醇、EDTA、三氯乙酸、碳酸钠、沸水浴五种终止反应方法分别对酶活抑制效果和吸光值稳定性进行了比较实验,以期寻找简单快捷、准确有效的终止反应方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

试剂:脂肪酶 LIP8(脂肪酶 LIP8 由本实验室克隆自链霉菌 GXT-6,表达于大肠杆菌),对硝基苯酚正辛酸酯(p-NPO)购自 sigma 公司,甲醇,Tris 碱,盐酸,无水乙醇,碳酸钠,三氯乙酸,EDTA 均为国产分析纯。

仪器:水浴锅 SHEL LAB W20M-2,台式离心机 Eppendorf Centrifuge 5415D,酶标仪 U Quamt TM,电磁炉。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 酶活力测定方法

酶活力测定参考 Ulrich K. Winkler<sup>[14]</sup>的方法,稍作修改。将溶有 20mM p-NPO 的甲醇溶液与 pH 值为 8.5 的 50mM Tris-HCl 缓冲液按体积比 1:9 混匀,配成底物溶液,取 190 $\mu$ L 底物溶液加入 EP 管中,45 $^{\circ}$ C 预热 3min,加入 10 $\mu$ L 稀释适当倍数的酶液进行反应,10min 后终止反应并稀释适当倍数后在 410nm 条件下测定吸光值。每个反应做 3 个平行实

验,以加不含酶缓冲液的反应作为空白对照。根据不同的终止方法做出相应的标准曲线计算水解释放出的 p-NP 量。将每分钟水解 p-NPO 释放出 1 $\mu$ mol p-NP 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位,以 U 表示。按下式计算酶活力:

$$X = \frac{cV}{tv}$$

式中: X 为脂肪酶活力, U  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>; c 为对硝基苯酚浓度,  $\mu$ mol  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>; V 为终止后总体积, mL; v 为酶液用量, mL; t 为反应时间, min。

#### 1.2.2 终止反应方法

无水乙醇终止:向反应体系中加入 200 $\mu$ L 无水乙醇,混匀后于 12000rpm 离心 1min。

EDTA 终止:向反应体系中加入 200 $\mu$ L, 1mol/L 的 EDTA 溶液,混匀后于 12000rpm 离心 1min。

三氯乙酸终止:向反应体系中加入 200 $\mu$ L, 0.5mol/L 的三氯乙酸溶液混匀,再加 200 $\mu$ L, 0.5mol/L 的碳酸钠溶液显色,混匀后于 12000rpm 离心 1min。

碳酸钠终止:向反应体系中加入 200 $\mu$ L, 0.5mol/L 的碳酸钠溶液,混匀后于 12000rpm 离心 1min。

沸水浴终止:将反应体系置于沸水中煮沸 5min 后于 12000rpm 离心 1min。

#### 1.2.3 抑制效果比较

将酶液分别与各终止液等体积混匀,置于 45 $^{\circ}$ C 水浴中处理 10min,沸水浴法则将酶液置于沸水中处理 5min。分别将处理后的酶液稀释适当倍数,以 p-NPO 为底物在 pH 值为 8.5,反应温度为 45 $^{\circ}$ C 的条件下测定各残余酶活力。以不加终止液且在 45 $^{\circ}$ C 处理 10min 酶液的残余活力作为 100%。

$$\text{抑制率}(\%) = 100\% - \text{残余酶活力}(\%)$$

#### 1.2.4 吸光值稳定性比较

以 p-NPO 作为底物,将稀释适当倍数的酶液加入反应体系,反应 10min 后分别用无水乙醇法、EDTA 法、三氯乙酸法、碳酸钠法以及沸水浴法终止反应,经离心后立即测定吸光值。每间隔 5min 测一次吸光值,计算终止后反应混合物的净吸光值 ( $OD_{\text{加酶样}} - OD_{\text{空白}}$ ) 随时间的变化趋势,以终止反应后第一次测定的净吸光值作为 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 抑制效果比较

如图 1 所示,采用不同的终止方法在 45 $^{\circ}$ C 水浴处理 10min 后,等体积的无水乙醇和浓度为 0.5mol/L

L的三氯乙酸对酶活力均有较好的抑制效果,抑制率分别为97.56%和99.46%;同时5min的沸水浴对酶也有很好的抑制作用,抑制率为99.51%。可见无水乙醇、三氯乙酸及沸水浴均起到了在较短时间内有效抑制酶活力的作用。浓度为1mol/L的EDTA和0.5mol/L的碳酸钠分别与酶液在45℃水浴处理10min后,对酶活力的抑制效果并不理想。碳酸钠法对酶活力的抑制率为76.44%,而EDTA法只有32.94%。

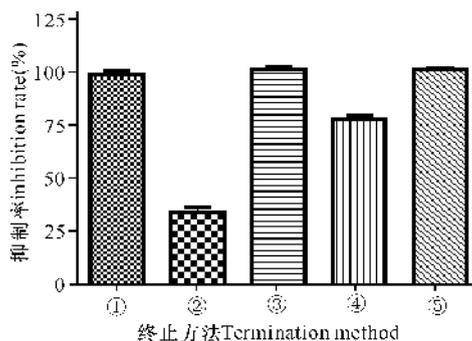


图1 各终止方法的抑制效果比较

Fig. 1 Comparison of inhibiting effect of each termination method

①无水乙醇法,②EDTA法,③三氯乙酸法,④碳酸钠法,⑤沸水浴法。

①Absolute ethanol method,②EDTA method,③Trichloroacetic acid method,④Sodium carbonate method,⑤Boiling water bath method

## 2.2 吸光值稳定性比较

由图2可知,用三氯乙酸法、碳酸钠法及沸水浴法终止反应后的净吸光值比较稳定,采用三氯乙酸法终止反应后的5min内,净吸光值几乎没有增加,10min时增加了0.47%,30min时增加1.57%;采用碳酸钠法终止反应后的5min内,净吸光值仅增加了

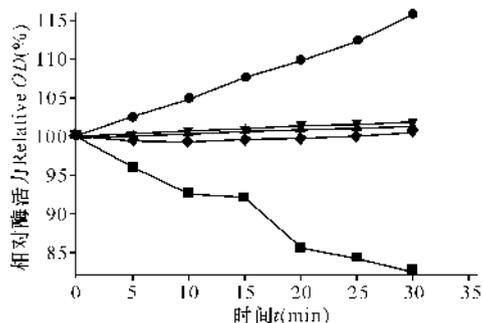


图2 各终止方法的净吸光值稳定性

Fig. 2 Net absorbance stability of each termination method

●:EDTA法,■:无水乙醇法,▲:碳酸钠法,▼:三氯乙酸法,◆:沸水浴法。

●:EDTA method,■:Absolute ethanol method,▲:Sodium carbonate method,▼:Trichloroacetic acid method,◆:Boiling water bath method.

0.13%,10min时增加0.53%;采用沸水浴终止反应后,反应混合物的净吸光值有很微弱的减小,在10min时减少了0.77%,10min后净吸光值微弱的增加,到25min左右恢复到100%相对酶活力。表明反应混合物采用三氯乙酸法和碳酸钠法终止反应后均能有效终止脂肪酶催化反应,终止反应后10min内测定吸光值所得的数据是准确的;采用沸水浴法处理之后的净吸光值仅有非常微弱的波动,测得的净吸光值在一定程度上也是比较准确的。而EDTA法和无水乙醇法对酶催化反应的终止效果并不理想,用终浓度为0.5mol/L的EDTA溶液未能完全终止反应,在200 $\mu$ L反应混合物中加入200 $\mu$ L,1mol/L的EDTA溶液后其净吸光值仍以约每分钟0.5%的速率增加;而等体积的无水乙醇在加入反应混合物后,其净吸光值则以较快的速率减小,5min时已减小5%。可见,用EDTA法和无水乙醇法来终止反应未能得出相对稳定的实验结果。

## 3 结论

不同的pH值对p-NP显色会产生不同的效果,在酸性溶液中p-NP为无色,而在中性和碱性溶液中则显黄色<sup>[15]</sup>。三氯乙酸是一种蛋白变性剂,可有效的使反应混合物中的酶变性失活;同时它又是一种强酸,浓度为0.5mol/L的三氯乙酸其pH值在0.7左右,与50mmol/L pH值为8.5的Tris-HCl等体积混匀后pH值约为0.8,加入0.5mol/L的碳酸钠将反应混合物调回碱性即可使p-NP显色。因此三氯乙酸法适用于大部分脂肪酶活力测定的终止反应。

在比较抑制效果的实验中,0.5mol/L的碳酸钠溶液与酶液等体积混合再于45℃水浴处理10min后,酶活力并未完全抑制;而在吸光值稳定性实验中,等体积的0.5mol/L碳酸钠溶液却能较好的终止反应且净吸光值稳定性良好。这是因为终止反应后反应混合物pH值约为11.2,而脂肪酶LIP8在此pH条件下的酶活力几乎为零,所以碳酸钠溶液能较好的终止反应。而LIP8与碳酸钠溶液混合后构象发生改变,当重新回到pH值8.5的环境中反应时构象在一定程度上又得到恢复,这可能是碳酸钠法对脂肪酶抑制效率不高的原因。

在碱性环境中,羧酸酯会发生水解反应<sup>[16]</sup>,当反应混合物处在沸水中时,剩余底物水解速度会加快,因此反应体系中底物浓度过低或者沸水浴的时间过长有可能引起剩余底物的大量水解而导致得到的净吸光值不准确,因此采用沸水浴法终止反应时需要选择合适的反应条件。

在 S. S. Kanwar 等人的研究中,终浓度为 200mmol/L 的 EDTA 溶液能够 100% 抑制来自 *B. coagulans* 的脂肪酶活力<sup>[17]</sup>。而本研究中,终浓度为 500mmol/L 的 EDTA 溶液对来自嗜热链霉菌 GXT-6 的脂肪酶 LIP8 的抑制效果并不理想,且终止后净吸光值仍以较快速度增加。

在本研究中,无水乙醇虽然能较好的抑制 LIP8 的酶活力,但是在终止反应后测定的吸光值变化速率较快。实验表明,在加入等体积的无水乙醇后加酶样和空白样的吸光值均随时间增加,且空白样吸光值增加的速率比加酶样快,因而造成了净吸光值随时间减小。推测可能是在无水乙醇加入后反应混合物中剩余底物的自分解速度加快。

综上所述,采用对硝基苯酚酯测定脂肪酶活力过程中,综合比较分析 5 种前人用到的终止反应法对脂肪酶的抑制效果和吸光值稳定性,认为使用三氯乙酸法终止反应较其他方法得出的实验结果更准确有效。

#### 参考文献:

[1] Paques F W, Pio T F, Carvalho P O, et al. Characterization of the lipase from *Carica papaya* residues[J]. Brazilian Journal of Food Technology, 2008(11): 20-27.

[2] Paques F W, Macedo G A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications[J]. Quimica Nova, 2006(29): 93-99.

[3] Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology[J]. Current opinion in biotechnology, 2002, 13(4): 390-397.

[4] 孙新城, 马淑玲, 张玲丽, 等. 一株高产脂肪酶产生菌 16S rDNA 的序列分析[J]. 南方农业学报, 2012, 43(9): 1269-1272.

Sun X C, Ma S L, Zhang L L, et al. Sequence analysis of 16S rDNA derived from a high yield lipase strain[J]. 2012, 43(9): 1269-1272.

[5] 张博. 响应面法优化醋酸钙不动杆菌菌株 23 的脂肪酶产酶条件[J]. 广西科学, 2008, 15(4): 419-423, 430.

Zhang B. The lipase production optimization of *Acinetobacter calcoaceticus* 23 using response surface methodology[J]. Guangxi Sciences, 2008, 15(4): 419-423, 430.

[6] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 235-251.

[7] Contesini F J, Lopes D B, Macedo G A. *Aspergillus* sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use[J]. Journal of molecular catalysis B: enzymatic, 2010(67): 163-171.

[8] 张博, 王青艳. 导入脂肪酶基因提高荧光假单胞菌 26-2 的产酶效率[J]. 广西科学, 2009, 16(2): 185-187.

Zhang B, Wang Q Y. Improving the lipase production of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 through transform its lipase gene into the originally strain [J]. Guangxi Sciences, 2009, 16(2): 185-187.

[9] Rúa L M, Schmidt-Dannert C, Wahl S, et al. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*: Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity[J]. Biotechnol, 1997 (56): 89-102.

[10] Lee S H, Choi J, Park S J. Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using FadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis[J]. Applied and environmental microbiology, 2004, 70(9): 5074.

[11] Zheng X M, Chu X Y, Zhang W. A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: gene cloning and characterization [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011(90): 971-980.

[12] Chou S H, Wu W T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups[J]. Biomaterials, 2004(25): 197-204.

[13] Daisuke S, Kota K, Yusaku M. Purification, characterization, molecular cloning and extracellular production of a phospholipase A1 from *Streptomyces albidoflavus* NA297[J]. FEBS Open Bio, 2012(2): 318-327.

[14] Winkler U, Stuckmann M. Glycogen. Hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens* [J]. Bacteriol, 1979(138): 663-670.

[15] 中国医药公司上海化学试剂采购供应站. 试剂手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1984: 898.

Shanghai Chemical Reagent Procurement and Supply Station of China Pharmaceuticals Company. Handbook of reagents [M]. Shanghai: Science and Technology Press of Shanghai, 1984: 898.

[16] 邢其毅, 徐瑞秋, 周政. 基础有机化学: 上册 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1980: 454.

Xing Q Y, Xu R Q, Zhou Z. Foundation organic chemistry: Volume 1 [M]. Beijing: Higher Education Press, 1980: 454.

[17] Kanwar S S, Kaushal R K, Reena A J. Methods for inhibition of residual lipase activity in colorimetric assay: A comparative study[J]. Indian journal of biochemistry and biophysics, 2005(42): 233-237.

(责任编辑: 陆 雁)