



Nur für persönlichen Gebrauch

# Eine modifizierte Hydroxamsäure-Methode zur Bestimmung der Lipaseaktivität

K. H. Park, R. Duden und A. Fricker

Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Institut für Chemie und Technologie Karlsruhe (BRD)

Eingegangen am 20. September 1974

## A Modified Hydroxamic Acid Method for the Estimation of the Activity of Lipase (E. C. 3. 1. 1. 3)

*Summary.* Optimal conditions for a modified hydroxamic acid method have been worked out with respect to the stability of the substrate emulsion; by systematically varying the ratios of the components of the solutions it was possible to develop a homogeneous reaction system which could be directly measured by spectrophotometry.

*Zusammenfassung.* Es wird über eine vereinfachte Hydroxamsäure-Methode zur Bestimmung der Aktivität von Lipase (E C 3.1.1.3) berichtet. Die günstigsten Bedingungen für die Stabilität der Substratemulsion wurden ermittelt; durch Optimierung der Mengenverhältnisse der Komponenten der Meßlösung gelang es, ein für die direkte spektrophotometrische Verfolgung der Reaktion erforderliches homogenes Reaktionssystem zu entwickeln.

### Einleitung

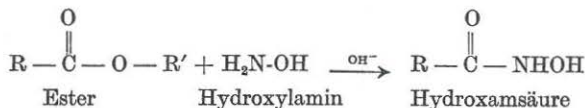
Die bisher am häufigsten benutzten Bestimmungsmethoden für die Lipaseaktivität basieren auf der Erfassung der durch die Enzymwirkung abgespaltenen Fettsäuren durch Titrations- und manometrische Verfahren [1, 2]; sie sind relativ unempfindlich. Die neuerdings vorgeschlagenen colorimetrischen Methoden — Bestimmung der Kupfersalze der freien Fettsäuren [3—5] oder des Acetaldehyds, der bei der enzymatischen Hydrolyse von Vinyloleat entsteht [6] — sind empfindlicher, aber zeitraubend; die Aktivitätskurven (Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Enzymmenge) gehen zudem nicht durch den Nullpunkt. Frank [7] beschrieb eine einfache Agardiffusionsmethode zur Bestimmung mikrobieller Lipasen, bei der Tributyrin als Substrat verwendet wurde. Diese für das „screening“ von Bakterien-, Hefe- und Pilzlipasen entwickelte Methode ist jedoch nicht spezifisch, da Tributyrin durch andere Esterasen ebenfalls abgebaut wird. Die Messung der Radioaktivität der aus markierten Triglyceriden freigesetzten Fettsäuren [8] ist wahrscheinlich die empfindlichste Methode zur Bestimmung der Lipaseaktivität. Die markierte Substanz ist jedoch teuer und die Methode nicht überall durchführbar.

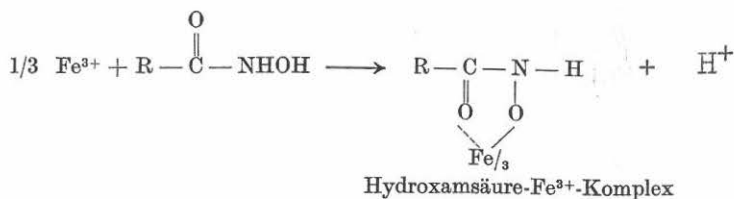
Galliard [9] berichtete über die Verwendung von Hydroxylamin zur Lipase-Aktivitätsbestimmung. Bei dieser Methode wird das nicht angegriffene Triglycerid mit dem Lösungsmittel aus dem Reaktionsgemisch extrahiert. Da die Extraktionsstufe eine Fehlerquelle bei der Aktivitätsmessung sein könnte [9] und zudem ziemlich umständlich ist, haben wir versucht, die Hydroxamsäuremethode zu vereinfachen.

Augustin u. Mitarb. [10] hatten auf analoge Weise bereits die Phospholipase A-Aktivität gemessen. Wegen der geringen Polarität der Triglyceride und der Instabilität der in Analogie zu den Angaben dieser Autoren angesetzten Substratemulsionen konnte diese Methode nicht unmittelbar zur Bestimmung der Lipaseaktivität eingesetzt werden.

### Prinzip der Methode

Es wird die Menge der nach einer bestimmten Reaktionszeit vom Enzym noch nicht angegriffenen Esterbindungen bestimmt. Dazu werden die Ester in die entsprechenden Hydroxamsäuren überführt. In Anwesenheit von  $Fe^{3+}$ -Salzen bildet sich aus der Hydroxamsäure ein blaurot gefärbter Komplex, dessen Absorption bei 525 nm gemessen wird:





Grundvoraussetzung für eine gute Reproduzierbarkeit der Lipase-Aktivitätsbestimmungen ist eine ausreichende Stabilität der Substratemulsion, da die Reaktionsgeschwindigkeit von der Größe der Wasser-Öl-Grenzflächen abhängt [11]. Dieses wurde durch Optimierung der Konzentrationen von Substrat und stabilisierenden Zusätzen (Gummi arabicum, Desoxycholat) gelöst. Durch Variation der Mengenverhältnisse der Komponenten der Meßlösung (Äther, Äthanol und Wasser) gelang es ferner, ein für die direkte spektrophotometrische Verfolgung der Reaktion erforderliches homogenes System zu entwickeln.

Die auf diese Weise modifizierte Methode hat folgende Vorteile gegenüber den in der Literatur beschriebenen Verfahrensweisen:

1. größere Empfindlichkeit.
2. Vermeidung der Extraktionsstufe.
3. Die Aktivitätskurve geht durch den Nullpunkt (vgl. [4, 6]).

#### Material und Methoden

**Reagentien:** Pankreaslipase, (2,5 U/mg, für biochemische Zwecke)—Triolein(purum).—Hydroxylamin-hydrochlorid (DAB 6).—Eisen-III-chlorid (pro anal.).—Calciumchlorid (pro anal.).—Gummi arabicum (DAB 6).—Desoxycholat; alle von der Firma Merck (Darmstadt).—Ölsäure-methylester (puriss.) der Fa. Roth (Karlsruhe).

**Hydroxylamin-Lösung:** 20 g Hydroxylamin-hydrochlorid durch Erwärmen in Methanol lösen und mit Methanol auf 220 ml (s. Augustin [10]) auffüllen (Stammlösung). 5 Teile dieser Lösung bei Bedarf mit 3 Teilen 3,5 n-NaOH mischen.

**Eisen(III)-Chlorid-Lösung:** 100 g  $\text{FeCl}_3$  in 100 ml 1,2 n-HCl lösen (Stammlösung); 1 Teil hier- von zur Reaktion mit 4 Teilen Äthanol verdünnen.

**Lipase aus *Geotrichum candidum*:** Der verwendete Stamm — En 0203 — wurde vom Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, TU Berlin, zur Verfügung gestellt; Kultur nach Alford [12]. Nach dem Filtrieren der Kulturlösung die Lipase mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (30—60% Sättigung) ausfällen und den in dest. Wasser gelösten Niederschlag durch Fällung mit Aceton ( $-50^\circ\text{C}$ ; Endgehalt der Lösung 75%) reinigen. Das ausgefallene Enzym im  $\text{N}_2$ -Strom trocknen und bei  $-25^\circ\text{C}$  lagern. Anreicherungs-faktor — bezogen auf den Proteingehalt — etwa 10.

**Substrat-Emulsion:** 0,25 g Triolein oder Ölsäuremethylester, 0,25 g Gummi arabicum, 4 ml 1%ige NaCl-Lösung und 6 ml 0,05 m-*Tris*-Puffer, pH 8,0, 3 min lang in „Biosonik III“ (Bronwill Scientific) ultrabeschallen (Einstellung des Gerätes auf „Intensität 50“).

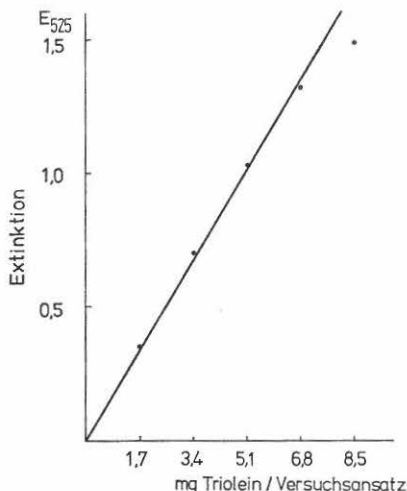


Abb. 1. Abhängigkeit der Extinktion von der Trioleinkonzentration (Versuchsbedingungen wie unter „Bestimmung der Estergruppen“ angegeben)

*Bestimmung der Estergruppen:* Substratgemisch: 0,25 ml Trioleinemulsion, 0,1 ml Desoxycho-  
lat (0,1%), 0,1 ml 0,1 m-CaCl<sub>2</sub>, mit 2,5 ml Äthanol, 2,5 ml Diäthyläther und 1,0 ml Hydroxylamin-  
lösung mischen und 40 min bei Zimmertemperatur stehen lassen (Bildung der Hydroxamsäuren),  
danach mit 0,45 ml 3,3 n-HCl und 0,5 ml FeCl<sub>3</sub>-Lösung versetzen (Bildung des FeCl<sub>3</sub>-Hydroxamat-  
komplexes). Die nach dem Abzentrifugieren der Trubteilchen des *Gummi arabicum*s erhaltene  
klare rot gefärbte Lösung bei 525 nm messen.

*Aktivitätsbestimmung:* Das oben beschriebene Substratgemisch mit 0,1 ml Enzymlösung bei  
30° C incubieren (10 ml Reagensglas, Magnetrührer) und nach der jeweiligen Reaktionszeit durch  
aufeinanderfolgendes Hinzufügen von Äthanol und Diäthyläther (Mengen wie oben) stoppen.  
Bestimmen der noch vorhandenen Estergruppen in der oben angegebenen Weise.

## Ergebnisse

### *Geschwindigkeit der Hydroxamatbildung*

Die Hydroxamatbildung geht mit Estern langkettiger Fettsäuren bei Raumtem-  
peratur sehr langsam vor sich [13]. Wie man aus Tab. 1, in der die in Abhängigkeit  
von der Zeit gefundenen Extinktionswerte zusammengestellt sind, ersieht, ist eine  
Reaktionszeit von etwa 40 min ausreichend; danach ändert sich die Extinktion nur  
noch sehr wenig.

Tabelle 1. Einfluß der Zeit auf die Bildung der Hydroxamate <sup>a</sup>

Zeit min	Extinktion
10	1,14
20	1,37
30	1,53
40	1,66
50	1,68

<sup>a</sup> Reaktionsbedingungen wie unter „Bestimmung der Estergruppen“ angegeben.

### *Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration der Estergruppen*

Die für die Messungen erforderliche Proportionalität ist bis zu einer Triglycerid-  
menge von etwa 7 mg/Versuchsansatz gegeben (Abb. 1).

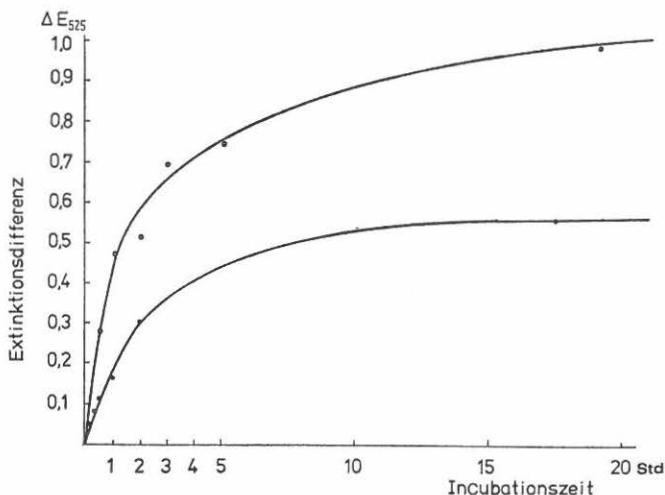


Abb. 2. Abhängigkeit der Extinktionsdifferenz von der Incubationszeit bei 30°C untere Kurve:  
Substrat: Triolein. — Enzym: Pankreaslipase (100 µg/ml). — obere Kurve: Substrat: Ölsäure-  
methylester. — Enzym: Pankreaslipase (1,0 mg/ml).

*Zeitverlaufskurven der Enzymreaktionen*

In Abb. 2 ist die Zunahme der Extinktionsdifferenz mit der Zeit für Triolein und Ölsäuremethylester dargestellt ( $\Delta E = E_{t_0} - E_t$ ;  $E_{t_0}$  = Extinktion zu Beginn der Reaktion,  $E_t$  = Extinktion nach der Reaktionszeit  $t$ ).

Die Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  ist der Menge enzymatisch gespaltenen Esters proportional. Nach der Abbildung verlaufen die Reaktionen während eines ausreichend langen Zeitraums nach der 0. Ordnung, so daß beide Substrate als für die Messung geeignet angesehen werden können.

*Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Enzymkonzentration, pH-Wert und NaCl-Konzentration*

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration ist in dem untersuchten Bereich linear, wie man aus Abb. 3 ersieht.

In Abb. 4 ist die pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit dargestellt. Pankreaslipase hat danach ein Optimum bei pH 8,0. Auch Natriumchlorid übt einen

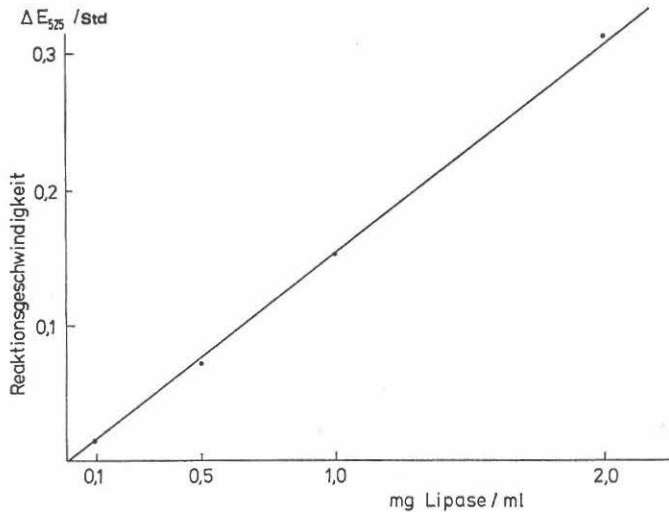


Abb. 3. Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. — Substrat: Triolein. — Enzym: Lipase aus *Geotrichum candidum*. Temp.: 30° C

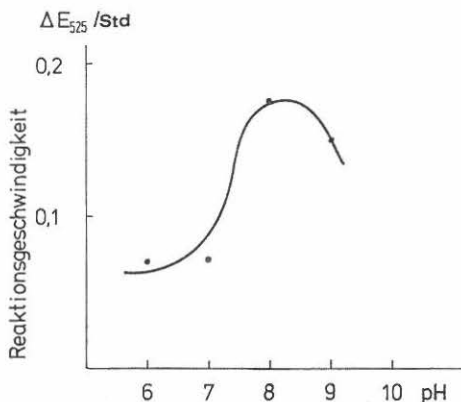


Abb. 4. Aktivität von Pankreaslipase in Abhängigkeit vom pH-Wert. — Substrat: Triolein, 0,05 m Tris-Puffer, Enzym: Pankreaslipase (100 µg/ml). Temp.: 30° C

Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus. Er beruht wahrscheinlich auf der Vergrößerung der Öberflächen (Emulgatoreffekt). Die Wirkung verschiedener NaCl-Konzentrationen veranschaulicht Tab. 2.

Tabelle 2. Einfluß von NaCl auf die Aktivität von Pankreaslipase (100 µg/ml)

NaCl-Konzentration in der Substratemulsion %	Aktivität Δ E/Std
0,18	0,08
0,36	0,14
0,4	0,14
0,8	0,13

Eine NaCl-Konzentration von 0,4% ist danach optimal.

### Diskussion

Bei der Verwendung von Triglyceriden als Substrat muß mit dem weiteren Abbau der entstandenen Diglyceride – und in der Folge auch der Monoglyceride – gerechnet werden; da deren Weiterreaktion mit geringerer Geschwindigkeit erfolgt [14], kann in einem gewissen (allerdings relativ engen) Bereich ein annähernd linearer Verlauf der Reaktion erwartet werden.

Nimmt man für den Idealfall an, daß die Weiterreaktion unterbleibt, so wären bei vollständigem Substratverbrauch noch zwei Drittel der Esterbindungen unangegriffen. Die relative Abnahme der Estermenge ist also bei gleichem Reaktionsumfang wesentlich geringer – der Meßfehler damit größer – als bei Verwendung von Estern einwertiger Alkohole (wie z. B. Ölsäuremethylester), wo je Molekül nur eine Esterbindung vorhanden ist.

Ein Nachteil der Verwendung von Ölsäuremethylester liegt dagegen in der geringeren Spaltungsgeschwindigkeit, die durch den Einsatz größerer Enzymmengen oder durch längere Reaktionszeit ausgeglichen werden muß.

### Literatur

1. Cherry, I.S., Crandall, L.A.: *Am. J. Physiol.* **100**, 266 (1932)
2. Marchis-Mouren, G., Sarda, L., Desnuelle, P.: *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 309 (1959)
3. Baker, D.: *Cereal Chem.* **38**, 47 (1961)
4. Mahadevan, S., Dillard, C.J., Tappel, A.L.: *Anal. Biochem.* **27**, 387 (1969)
5. Duncombe, W.G.: *Biochem. J.* **88**, 7 (1963)
6. Brockerhoff, H., Hoyle, R.J., Hwang, P.C.: *Anal. Biochem.* **37**, 26 (1970)
7. Frank, H.: *Zentralblatt f. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten u. Hygiene Suppl.* **2**, S. 189. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1967
8. Zieve, F.J.: *Anal. Biochem.* **51**, 436 (1973)
9. Galliard, T.: *Biochem. J.* **121**, 379 (1971)
10. Augustin, J.M., Elliott, W.B.: *Anal. Biochem.* **31**, 246 (1969)
11. Bergmeyer, H.U.: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Bd. I, 2. Aufl. Weinheim: Verlag Chemie 1970
12. Alford, J.A., Smith, J.L.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **42**, 1038 (1965)
13. Goddu, R.F., Leblanc, N.F., Wright, C.M.: *Anal. Chem.* **27**, 1251 (1955)
14. Desnuelle, P., Savary, P.: *J. Lipid Res.* **4**, 369 (1963)

Professor Dr. A. Fricker  
Bundesforschungsanstalt für  
Ernährung  
D-7500 Karlsruhe 1, Engesserstr. 20  
Bundesrepublik Deutschland