

# 基于酶反应动力学理论优化脂肪酶活力测定体系

张帆<sup>1,2</sup>,程路峰<sup>1</sup>,曹红<sup>2</sup>,何德飞<sup>3</sup>,郑兰兰<sup>2</sup>,李春<sup>4</sup>

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 嘉兴学院生物与化学工程学院, 浙江嘉兴 314001;

3. 浙江格蕾斯生物科技有限公司, 浙江嘉兴 314000; 4. 清华大学化学工程系, 北京 100084)

**摘要:** 为了提高棕榈酸对硝基苯酯(*p*-NPP)法测定脂肪酶活力的灵敏度和准确度, 以来源于 *Rhizopus oryzae* 的脂肪酶 Lipase F-AP 15 为研究对象, 首先对其最适反应 pH 和反应温度进行优化, 然后将表面活性剂作为激活因子引入酶活力测定体系, 探究影响机制, 并依据酶反应动力学理论优化测定条件(底物浓度、酶质量浓度、反应时间), 对优化的 *p*-NPP 法的重复性和准确性进行了检验, 最后以另一个来源的脂肪酶 Lipase-PPL 为模型, 以同样思路与方法改进与优化其酶活力测定体系, 以考察优化方法和思路的适用性。结果表明: 表面活性剂 PEG 8000 的引入使得覆盖在脂肪酶活性位点的  $\alpha$ -螺旋结构被重排而打开, 脂肪酶由封闭构象转为并保持在活化构象, 脂肪酶活性增强; 优化测定体系的最适条件为 pH 8.0、反应温度 30 °C、酶质量浓度 1.00 mg/mL、底物浓度 6 mmol/L、反应时间 5 min, 在此条件下测得的酶活力是常用 *p*-NPP 法(pH 8.0、反应温度 30 °C、酶质量浓度 2.50 mg/mL、底物浓度 10 mmol/L、反应时间 8 min)测得酶活力的 1.4 倍; 重复性和准确性试验显示, 优化 *p*-NPP 法重复测定结果的相对标准偏差为 1.21%, 加标回收率为 95.60%, 均优于常用 *p*-NPP 法; 优化方法和思路适用于其他来源的脂肪酶活力测定体系的优化。综上, 通过将表面活性剂引入 *p*-NPP 法的脂肪酶活力测定体系, 以酶反应动力学理论为指导优化测定条件, 明显提高了方法的灵敏度, 并有效保证了测定结果的重复性和准确性, 缩短了检测时间, 节省了检测成本。

**关键词:** 脂肪酶; 酶活力测定; 酶反应动力学; 表面活性剂

中图分类号: TQ925+.6; Q55 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)05-0146-07

## Optimization of lipase activity assay system based on enzyme reaction kinetics theory

ZHANG Fan<sup>1,2</sup>, CHENG Lufeng<sup>1</sup>, CAO Hong<sup>2</sup>, HE Defei<sup>3</sup>, ZHENG Lanlan<sup>2</sup>, LI Chun<sup>4</sup>

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. College of Biological

Chemical Sciences and Engineering, Jiaying University, Jiaying 314001, Zhejiang, China;

3. Zhejiang Gress Biotechnology Co., Ltd., Jiaying 314000, Zhejiang, China; 4. Department of

Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** In order to improve the sensitivity and accuracy of *p*-nitrophenol palmitate (*p*-NPP) method for the assay of lipase activity, the Lipase F-AP 15 from *Rhizopus oryzae* was taken as the research object, and the optimum reaction pH and reaction temperature were firstly optimized, then surfactant was introduced into the enzyme activity assay system as an activating factor, and the influence mechanism was explored. The assay conditions (substrate concentration, enzyme mass concentration, reaction time)

were optimized according to the theory of enzyme reaction kinetics. The repeatability and accuracy of the optimized *p*-NPP method were examined. Finally, Lipase-PPL, another source of lipase, was used as a model to improve and optimize its enzyme activity assay system with the same idea and method to examine the applicability of the optimization method and idea. The

收稿日期: 2022-04-14; 修回日期: 2023-03-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(21266029); 浙江省自然科学基金项目(LY17B060011)

作者简介: 张帆(1995), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物催化与食品药品检测(E-mail) 1909418695@qq.com。

通信作者: 程路峰, 教授, 博士(E-mail) lewis\_clf@163.com;

曹红, 研究员, 博士(E-mail) chyf\_ch@126.com。

results showed that with the introduction of surfactant PEG 8000, the  $\alpha$ -helix structure covering the active site of lipase was rearranged and opened, and the lipase changed from closed conformation to and remained in the active conformation. The optimum conditions of the assay system were as follows: pH 8.0, reaction temperature 30 °C, enzyme mass concentration 1.00 mg/mL, substrate concentration 6 mmol/L, and reaction time 5 min. Under the optimized conditions, the enzyme activity measured was 1.4 times that of the common  $p$ -NPP method (pH 8.0, reaction temperature 30 °C, enzyme mass concentration 2.50 mg/mL, substrate concentration 10 mmol/L, and reaction time 8 min). The repeatability and accuracy experiments of the optimized  $p$ -NPP method showed that the relative standard deviation of the repeated assay results was 1.21%, and the recovery rate of standard addition was 95.60%, which was better than that of the common  $p$ -NPP method. The optimization method and idea was applicable to the optimization of lipase activity assay system from other sources. In conclusion, the introduction of surfactant in the lipase activity assay system of  $p$ -NPP method and the optimization of the assay conditions under the guidance of enzyme reaction kinetics theory can significantly improve the sensitivity of the method, effectively ensure the repeatability and accuracy of the assay results, shorten the assay time, and save the assay cost.

**Key words:** lipase; enzyme activity assay; enzyme reaction kinetics; surfactant

随着生物催化技术的深入研究,脂肪酶在功能化油脂领域的应用前景非常广阔<sup>[1-2]</sup>,建立准确、灵敏、高效的脂肪酶活力测定方法也愈加重要<sup>[3]</sup>。近年来,脂肪酶活力检测方法多采用棕榈酸对硝基苯酯( $p$ -NPP)法<sup>[4]</sup>,其原理是以 $p$ -NPP为底物,脂肪酶将其催化水解生成对硝基苯酚( $p$ -NP), $p$ -NP在碱性条件下显黄色,在405 nm波长处有吸收<sup>[5]</sup>。目前,大多数文献中涉及的酶活力测定直接引用其他文献的酶活力测定条件,而文献中的测定条件并不一定适用于其他来源脂肪酶活力的测定;同时文献中常用的脂肪酶活力测定方法中,配制的底物 $p$ -NPP溶液的浓度较高,多为10 mmol/L,如Zhong<sup>[6]</sup>、Altinkaynak<sup>[7]</sup>等测定不同来源脂肪酶活力时,配制底物 $p$ -NPP溶液的浓度均为10 mmol/L,在储存或使用过程中常析出晶体,若利用超声加热的方法促使底物溶解,可能会使底物在溶液中自分解,从而导致酶活力测定结果不准确。

研究表明,脂肪酶活性位点通常被 $\alpha$ -螺旋“盖子”覆盖,若 $\alpha$ -螺旋“盖子”被打开,脂肪酶将转变为活化构象,酶活力明显提高<sup>[8]</sup>,而适宜的表面活性剂的存在有助于脂肪酶稳定在活化构象<sup>[9]</sup>。因此,在脂肪酶活力测定体系中引入表面活性剂,有助于提高 $p$ -NPP法检测的灵敏度和准确度。

本文拟将适当的表面活性剂引入Lipase F-AP 15脂肪酶活力测定体系,同时减小配制的底物 $p$ -NPP溶液的浓度,并以酶反应动力学理论为指导,系统研究Lipase F-AP 15催化过程中反应速率与反

应条件的关系,以此优化测定体系中的底物浓度、加酶量和反应时间,以期获得更为准确的酶活力测定条件,最后以另一个来源的脂肪酶Lipase-PPL为模型,以同样思路与方法改进与优化其酶活力测定体系,探讨基于酶反应动力学理论改进与优化酶活力测定体系的方法对其他来源脂肪酶的适用性,以期脂肪酶在功能性油脂研发领域的应用提供支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

脂肪酶Lipase F-AP 15(来源于*Rhizopus oryzae*)、Lipase-PPL(来源于*Aspergillus oryzae*,活力 $\geq 30$  U/mg),Sigma Aldrich公司; $p$ -NPP、 $p$ -NP、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、氯化钾、聚乙二醇8000(PEG 8000)、硫酸镁、硫酸锌、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、二甲苯磺酸钠(SXS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;椰油酰胺丙基甜菜碱(CAB-35)、硫酸铝和硫酸锰,上海麦克林生化科技有限公司;无水乙醇、十二烷基硫酸钠(SDS),国药集团化学试剂有限公司;氯化钙、硫酸铜、曲拉通X-100(Triton X-100)、司盘80(Span 80)、聚乙烯醇(PVA),上海凌峰化学试剂有限公司。除 $p$ -NP为标准品外,其余试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

Cary-60型紫外-可见分光光度计,美国FEI公司;Chirascan V 100型圆二色光谱仪,英国应用光

物理公司;ME204E型万分之一天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;TG16G型台式高速离心机,北弘仪器有限公司;HSJ型恒温水浴搅拌器,江苏科析仪器有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 溶液配制

6、10 mmol/L  $p$ -NPP 溶液的配制:分别准确称取 0.23、0.38 g 的  $p$ -NPP 于 100 mL 容量瓶中,以异丙醇为溶剂进行溶解定容,配制浓度约为 6、10 mmol/L 的  $p$ -NPP 溶液,于 4 °C 保存备用。

50 mmol/L 不同 pH 的 Tris-HCl 缓冲液配制:准确称取 6.05 g 的 Tris 于烧杯中,加入 800 mL 纯化水,用稀盐酸调节溶液至所需 pH,然后转移至 1 000 mL 容量瓶中,用纯化水定容,于 4 °C 保存备用。

含表面活性剂的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0)的配制:分别准确称取 3 份 0.30 g Tris 于三只烧杯中,分别加入 0.50、2.50、5.00 mL 50 mmol/L 的表面活性剂溶液(纯化水配制),再用纯化水补足至 40 mL,用稀盐酸调节溶液 pH 至 8.0。然后,将 3 份混合溶液分别转移至 3 只 50 mL 容量瓶中,分别用纯水定容,使缓冲液中所含表面活性剂终浓度分别为 0.5、2.5、5.0 mmol/L,于 4 °C 保存备用。

1.00 mg/mL 脂肪酶 Lipase F-AP 15 溶液配制:准确称取 0.10 g 的脂肪酶 Lipase F-AP 15 于 100 mL 容量瓶中,用磷酸盐(PBS)缓冲液(10 mmol/L, pH 7.5)定容,于 4 °C 保存备用。

### 1.2.2 $p$ -NP 标准曲线的绘制

以 50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液为溶剂,分别配制浓度为 10、20、30、40、50、60  $\mu$ mol/L 的  $p$ -NP 标准溶液,在 405 nm 处测定吸光度,以吸光度( $y$ )为纵坐标,标准溶液浓度( $x$ )为横坐标,绘制标准曲线,得标准曲线方程为  $y = 0.016 3x - 0.006 3$ ,  $R^2 = 0.999 8$ 。

### 1.2.3 $p$ -NPP 法测定脂肪酶活力

准确移取 4.50 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液于 10 mL 离心管中,加入一定体积一定质量浓度的脂肪酶溶液,混匀后,加入 0.5 mL 一定浓度的  $p$ -NPP 溶液,于一定温度下反应一定时间后,迅速加入 2.50 mL 无水乙醇终止反应,离心(6 000 r/min, 5 min)取上清液,于 405 nm 处测定吸光度。再根据  $p$ -NP 的标准曲线方程以及酶活力单位( $X$ )定义(每分钟水解底物  $p$ -NPP 生成 1  $\mu$ mol  $p$ -NP 所需要的酶量为 1 个酶活力单位,单位为 U/mg)计算酶活力,计算公式见式(1)。

$$X = CV/tm \quad (1)$$

式中: $C$  为脂肪酶溶液质量浓度,mg/mL; $V$  为脂肪酶溶液的体积,mL; $t$  为反应时间,min; $m$  为由标准曲线方程计算的  $p$ -NP 生成量, $\mu$ mol。

### 1.2.4 表面活性剂对 Lipase F-AP 15 酶活力影响的机制分析

分别采用紫外光谱和圆二色谱对含表面活性剂和不含表面活性剂的 Lipase F-AP 15 溶液进行表征分析。

紫外光谱表征:利用紫外-可见吸收光谱(UV)对含有不同浓度(0、0.5、2.5、5.0 mmol/L) PEG 8000 的质量浓度 0.50 mg/mL 的 Lipase F-AP 15 溶液进行扫描,记录 200~800 nm 范围内吸光度( $A$ )的变化。

圆二色谱表征:利用圆二色谱分别对 0.10 mg/mL Lipase F-AP 15 溶液及含 2.5 mmol/L PEG 8000 的 Lipase F-AP 15 溶液进行扫描,记录 190~260 nm 范围内的图谱。

### 1.2.5 方法的重复性和准确性试验

按 1.2.3 方法重复测定 8 次脂肪酶活力,通过相对标准偏差(RSD)评价测定方法的重复性。以加标回收率评价方法的准确性,具体操作:按 1.2.3 方法进行酶促反应后,移取 5.00 mL 反应后的溶液于 50 mL 容量瓶中,用 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0)定容,作为待测样品溶液。然后,移取 3.00 mL 待测样品溶液 5 份,分别加入 100  $\mu$ mol/L  $p$ -NP 标准溶液(以 50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液为溶剂配制)30、90、150、210、270  $\mu$ L,于 405 nm 处测定加标前后的吸光度,再根据 1.2.2 的标准曲线方程计算  $p$ -NP 的质量及加标回收率。

### 1.2.6 改进与优化其他来源脂肪酶活力测定体系的适用性试验

按照 Lipase F-AP 15 酶活力测定体系优化方法,对实验室保存的来源于 *Aspergillus oryzae* 的脂肪酶 Lipase-PPL 的酶活力测定体系进行优化,以评价优化  $p$ -NPP 法的思路对其他来源脂肪酶的适用性。

### 1.2.7 数据分析

除 1.2.5 外,本文所有试验均为 3 个平行。使用 Microsoft Excel 2020 软件进行数据的录入和统计,结果用“平均值 $\pm$ 标准差”表示,采用 Origin 9.0 绘图。

## 2 结果与分析

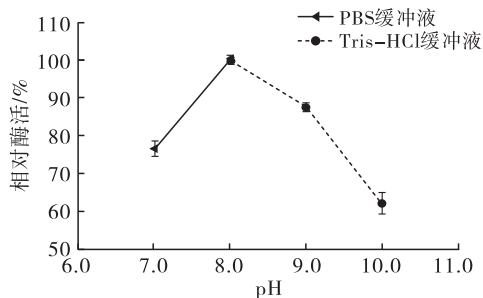
### 2.1 $p$ -NPP 法测定 Lipase F-AP 15 酶活力优化单因素试验

#### 2.1.1 pH 和反应温度的选择

##### 2.1.1.1 pH 的选择

在  $p$ -NPP 溶液浓度 10 mmol/L、1.00 mg/mL

Lipase F-AP 15 溶液用量 25  $\mu\text{L}$ 、反应温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、反应时间 8 min 条件下,采用不同 pH 的 Tris-HCl 缓冲液,按 1.2.3 方法测定 Lipase F-AP 15 酶活力,结果如图 1 所示。



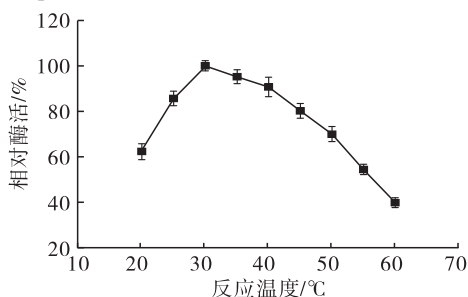
注:以 pH 8.0 时的酶活力为 100% 计算其他 pH 下的相对酶活力

图 1 pH 对 Lipase F-AP 15 酶活力的影响

由图 1 可知,Lipase F-AP 15 在 pH 7.0~9.0 之间酶活力较高,且在 pH 8.0 时表现出最高的酶活力。因此,选择 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液为 Lipase F-AP 15 酶活力测定的最适条件。

#### 2.1.1.2 反应温度的选择

在 *p*-NPP 溶液浓度 10 mmol/L、Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0、1.00 mg/mL Lipase F-AP 15 溶液用量 25  $\mu\text{L}$ 、反应时间 8 min 条件下,在不同反应温度下按 1.2.3 方法测定 Lipase F-AP 15 酶活力,结果如图 2 所示。



注:以 30  $^{\circ}\text{C}$  时的酶活力为 100% 计算其他反应温度下的相对酶活力

图 2 反应温度对 Lipase F-AP 15 酶活力的影响

由图 2 可知:在 20~30  $^{\circ}\text{C}$  的范围内,随着反应温度的升高,酶分子与底物分子的碰撞概率增大,酶活力迅速上升;在 30  $^{\circ}\text{C}$  之后继续升高反应温度,酶活力开始下降。因此,选择 30  $^{\circ}\text{C}$  为 Lipase F-AP 15 酶活力测定的最适条件。

2.1.2 表面活性剂对 Lipase F-AP 15 酶活力测定的影响

#### 2.1.2.1 表面活性剂的筛选

在 *p*-NPP 溶液浓度 10 mmol/L、1.00 mg/mL Lipase F-AP 15 溶液用量 25  $\mu\text{L}$ 、反应温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、反应时间 8 min 条件下,采用含不同表面活性剂的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0),按 1.2.3 方法测定

Lipase F-AP 15 酶活力,并以未添加表面活性剂所测得的酶活力为 100%,计算添加不同表面活性剂时 Lipase F-AP 15 的相对酶活力,结果如图 3 所示。

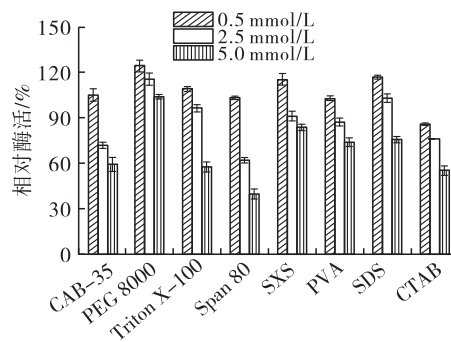


图 3 表面活性剂对 Lipase F-AP 15 酶活力的影响

由图 3 可知:表面活性剂浓度为 0.5 mmol/L 时,除 CTAB 对 Lipase F-AP 15 表现出抑制作用外,其他均表现出促进作用,其中 PEG 8000 的促进作用最强,使 Lipase F-AP 15 酶活力提高了近 30%;随着表面活性剂浓度由 0.5 mmol/L 升至 2.5 mmol/L,其对酶活力的促进作用逐渐减弱,甚至有的转为抑制,如 2.5 mmol/L 的 CAB-35 使 Lipase F-AP 15 的相对酶活力从 0.5 mmol/L 时的 107% 下降到 71%;随着表面活性剂浓度的进一步增大 (从 2.5 mmol/L 升至 5.0 mmol/L),其对 Lipase F-AP 15 酶活力的抑制作用均显著增强,如 5.0 mmol/L Span 80 使 Lipase F-AP 15 的相对酶活下降至 39%,分析原因,可能是过多的表面活性剂会占据脂肪酶的活性中心,与底物产生竞争作用<sup>[10]</sup>,因此引入表面活性剂的浓度不宜过高。

以 PEG 8000 为表面活性剂,考察 PEG 8000 浓度为 0.25、0.50、0.75 mmol/L 时 Lipase F-AP 15 的相对酶活力,结果分别为 118%、124% 和 113%。因此,选择将 0.5 mmol/L 的 PEG 8000 引入酶活力测定体系。

#### 2.1.2.2 表面活性剂提高脂肪酶活力的作用机制

为了进一步探究 PEG 8000 提高脂肪酶活力的作用机制,分别采用紫外光谱和圆二色谱进行表征分析,结果分别如图 4、图 5 所示。

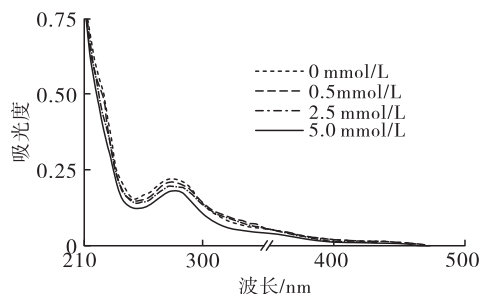


图 4 含不同浓度 PEG 8000 的 Lipase F-AP 15 溶液的紫外吸收谱图

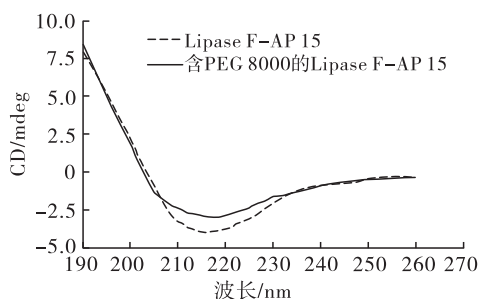


图5 Lipase F-AP 15 溶液和含 0.5 mol/L PEG 8000 的 Lipase F-AP 15 溶液的圆二色谱图

在脂肪酶分子中,具有共轭双键结构的氨基酸(例如位于 $\alpha$ -螺旋结构域内的苯丙氨酸<sup>[11]</sup>)在吸收紫外光和可见光后会产生 $\pi-\pi$ 跃迁,并于260~280 nm 波长处出现特征吸收峰。由图4可知,随着表面活性剂 PEG 8000 的加入及其浓度的增加,脂肪酶溶液在275 nm 处的吸收峰强度降低。分析原因是覆盖脂肪酶活性位点的 $\alpha$ -螺旋结构域内含有苯环结构的苯丙氨酸,表面活性剂与 $\alpha$ -螺旋结构域内的苯丙氨酸发生相互作用引起了脂肪酶紫外吸收光谱中峰强度减弱,并促使覆盖在脂肪酶活性位点的 $\alpha$ -螺旋结构重排而打开。

由图5可知,加入表面活性剂 PEG 8000 后,在代表 $\alpha$ -螺旋的208 nm 和222 nm 处的负峰峰强度减弱,即显示蛋白质二级结构中的 $\alpha$ -螺旋含量<sup>[12]</sup>下降,进一步验证了图4的分析结果。综合图4和图5的表征结果,说明表面活性剂通过与脂肪酶 $\alpha$ -螺旋结构域中的氨基酸相互作用,使得 $\alpha$ -螺旋结构重排,覆盖脂肪酶活性位点的“盖子”被打开,脂肪酶活性中心被暴露,酶活性增强。

### 2.1.3 基于酶反应动力学优化 $p$ -NPP 法测定体系

#### 2.1.3.1 最适底物浓度的确定

脂肪酶反应动力学参数根据米氏方程底物浓度( $c$ )与反应速率( $v$ )的关系式( $1/v = K_m/v_{max} \times 1/c + 1/v_{max}$ ,式中: $v_{max}$ 为最大反应速率; $K_m$ 为米氏常数),以及 Lineweaver-Burk 双倒数作图法推导得到。根据酶反应动力学理论,反应体系的底物浓度通常选择为5~10 倍的 $K_m$ <sup>[13]</sup>。为此,对 Lipase F-AP 15 酶活力  $p$ -NPP 法测定体系中 $K_m$ 值进行了推导计算。在常用的  $p$ -NPP 法(pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液、1.00 mg/mL Lipase F-AP 15 溶液用量 25  $\mu$ L、反应温度 30  $^{\circ}$ C、反应时间 8 min)以及优化的  $p$ -NPP 法(含 0.5 mmol/L PEG 8000 的 pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液、1.00 mg/mL Lipase F-AP 15 溶液用量 10  $\mu$ L、反应温度 30  $^{\circ}$ C、反应时间 5 min)测试条件下,按 1.2.3 方法测定不同底物  $p$ -NPP 溶液浓度(0.5、1、2.5、5、8、10、30、50 mmol/L)下脂肪

酶的酶活力,以底物浓度的倒数为横坐标,反应速率(以反应体系中每分钟生成的  $p$ -NP 的量计)的倒数为纵坐标作图,经线性拟合计算得到 $K_m$ 和 $v_{max}$ ,结果见表1。

表1 常用的和优化的  $p$ -NPP 法的动力学参数比较( $n=3$ )

方法	$K_m/(mmol/L)$	$v_{max}/(mmol/(L \cdot min))$
常用的 $p$ -NPP 法	0.19	0.04
优化的 $p$ -NPP 法	0.13	0.07

由表1可见,与常用的  $p$ -NPP 法相比,优化的  $p$ -NPP 法测得脂肪酶的 $K_m$ 值较低, $v_{max}$ 值较高,说明表面活性剂 PEG 8000 的引入使脂肪酶表现出更强的底物亲和力<sup>[9]</sup>,提高了 Lipase F-AP 15 的催化活性。

本研究发现,当体系中底物  $p$ -NPP 溶液浓度减小至 0.6 mmol/L(约为5 倍的 $K_m$ )时,即配制  $p$ -NPP 溶液为 6 mmol/L 时(因在 5 mL 的酶活力测定体系中, $p$ -NPP 溶液的加入量为 0.50 mL),简单涡旋或者振摇即可使 6 mmol/L 的  $p$ -NPP 母液快速溶解,取用方便,避免了高浓度的  $p$ -NPP 母液因结晶使其取用时需要长时间超声或加热导致的  $p$ -NPP 母液自分解。同时,在引入表面活性剂 PEG 8000 的酶活力测定体系中,底物  $p$ -NPP 浓度为 0.6 mmol/L 时,测得吸光度为 0.5 左右,较好地处于检测器的检测限内;而在常用的  $p$ -NPP 法测定酶活力体系中,底物  $p$ -NPP 浓度为 0.6 mmol/L 时,测得吸光度仅为 0.3 左右,接近检测器的检测下限,可能会造成测定结果不稳定。上述结果说明在酶活力测定体系中引入合适的表面活性剂,不仅有效地提高了脂肪酶的催化活性,还降低了体系中底物的使用浓度。因此,本文选择 6 mmol/L 的  $p$ -NPP 溶液进行脂肪酶活力的测定。

#### 2.1.3.2 最适酶质量浓度的确定

在  $p$ -NPP 溶液浓度 6 mmol/L、含 0.5 mmol/L PEG 8000 的 pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液、Lipase F-AP 15 溶液用量 10  $\mu$ L、反应温度 30  $^{\circ}$ C、反应时间 5 min 条件下,改变 Lipase F-AP 15 溶液的质量浓度,按 1.2.3 方法测定 Lipase F-AP 15 酶活力,考察 Lipase F-AP 15 溶液质量浓度对反应速率的影响,结果如图6所示。

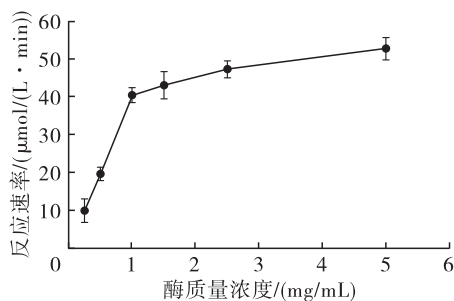


图6 Lipase F-AP 15 在不同质量浓度下的反应速率



由图6可知:当酶质量浓度在0.25~1.00 mg/mL范围时,反应速率快速上升,并与酶质量浓度呈线性关系,在酶质量浓度为1.00 mg/mL时达到42  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ;再继续增加酶质量浓度,反应速率增加幅度下降,在酶质量浓度从1.00 mg/mL升至5.00 mg/mL时,反应速率仅增加了13  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。这是因为当底物浓度远大于酶浓度时,随着酶浓度的上升会使反应体系中的产物迅速增多,因此反应速率迅速上升;而当反应体系达到酶饱和现象时,再增加酶浓度会使反应速率增加幅度变小,不再与酶浓度呈线性关系<sup>[14]</sup>。因此,选择Lipase F-AP 15溶液质量浓度为1.00 mg/mL进行脂肪酶活力的测定。

### 2.1.3.3 最适反应时间的确定

在脂肪酶活力测定过程中,随着脂肪酶催化反应的进行,底物浓度不断降低,反应速率会越来越低,因此测定酶活力时反应时间不能太长,但反应时间过短,产物浓度较低,则会导致检测的灵敏度下降,测定误差变大。在 $p$ -NPP溶液浓度6 mmol/L、含0.5 mmol/L PEG 8000的pH 8.0 Tris-HCl缓冲液、1.00 mg/mL Lipase F-AP 15溶液用量10  $\mu\text{L}$ 、反应温度30  $^{\circ}\text{C}$ 条件下,改变反应时间,按1.2.3方法测定Lipase F-AP 15酶活力,考察反应时间对反应速率的影响,结果如图7所示。

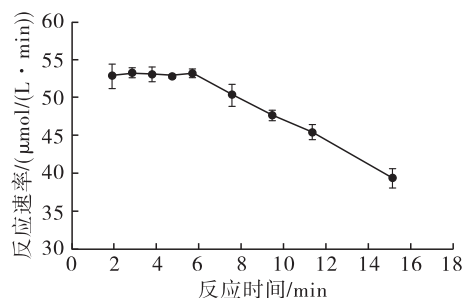


图7 Lipase F-AP 15在不同反应时间下的反应速率

由图7可知:反应时间在5 min以内,反应速率均在53  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ;反应5 min后,反应速率开始下降,反应15 min时,反应速率仅为42  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。因此,选择反应时间为5 min进行脂肪酶活力的测定。

### 2.2 方法的重复性和准确性

按照1.2.5的方法,考察优化的 $p$ -NPP法测试Lipase F-AP 15酶活力的重复性和准确性,并与常用的 $p$ -NPP法<sup>[6,11,14]</sup>进行比较,结果见表2。

由表2可知:优化的 $p$ -NPP法测得酶活力为44.663 U/mg,是常用的 $p$ -NPP法测定结果(32.20

U/mg)的1.4倍,显示出较好的灵敏度;无论是RSD还是极差,优化的 $p$ -NPP法均显著小于常用的 $p$ -NPP法,说明优化的 $p$ -NPP法更稳定;优化的 $p$ -NPP法加标回收率为95.60%,比常用的 $p$ -NPP法(93.55%)略高,说明其准确性较好。此外,与常用的 $p$ -NPP法相比,优化的 $p$ -NPP法所用底物浓度减小了40%,酶质量浓度减少了60%,反应时间缩短了37.5%。可见,本文在酶活力测定体系中引入合适的表面活性剂,并基于酶反应动力学理论优化的测定条件,使测定结果更为稳定,检测时间也明显缩短。

表2 常用的 $p$ -NPP法和优化的 $p$ -NPP法的比较( $n=8$ )

项目	常用的 $p$ -NPP法	优化的 $p$ -NPP法
测试条件		
$p$ -NPP溶液浓度/(mmol/L)	10	6
酶质量浓度/(mg/mL)	2.50	1.00
反应时间/min	8	5
方法学考察		
重复性试验 酶活力/(U/mg)	32.20	44.66
RSD/%	1.85	1.21
极差	5.13	3.52
加标回收率/%	93.55	95.60

注:试验发现常用 $p$ -NPP法中酶液质量浓度2.50 mg/mL、加量10  $\mu\text{L}$ 与酶液质量浓度1.00 mg/mL、加量25  $\mu\text{L}$ 测定结果没有差异,为便于比较,两种方法酶液加量均以10  $\mu\text{L}$ 计

### 2.3 优化其他来源脂肪酶活力测定体系的适用性

按1.2.6方法,对 $p$ -NPP法测定Lipase-PPL酶活力的测定条件进行优化,并与常用的 $p$ -NPP法进行对比,结果见表3。

表3 Lipase-PPL酶活力测定( $n=3$ )

方法	平均酶活力/(U/mg)	RSD/%
常用的 $p$ -NPP法	20.13	1.66
优化的 $p$ -NPP法	30.87	1.34

由表3可知,优化的 $p$ -NPP法测得Lipase-PPL的平均酶活力为30.87 U/mg,比常用的 $p$ -NPP法测定结果(20.13 U/mg)提高了0.5倍,且优化的 $p$ -NPP法的RSD比常用的 $p$ -NPP法小,说明优化的 $p$ -NPP法测定结果更稳定。由此说明,本文将适当表面活性剂引入脂肪酶活力测定体系中的思路,以及利用酶反应动力学理论优化 $p$ -NPP测定体系的方法,同样适用于对其他来源的脂肪酶活力测定方法的改进与优化。

### 3 结论

本文以Lipase F-AP 15为研究对象,通过紫外光谱和圆二色谱探究了表面活性剂提高脂肪酶活力的作用机制,筛选出的最适表面活性剂PEG 8000在

酶活力测定体系中,激活了脂肪酶的活性位点,提高了 $p$ -NPP法检测的灵敏度和检测效率,并使检测所需底物浓度明显降低,解决了高底物浓度不易溶解和不稳定的问题。同时,检测所需酶量和底物用量明显减少,检测时间显著缩短,节省了检测成本,提升了检测效率。本文的适用性试验表明,通过引入适当的表面活性剂和基于酶反应动力学理论优化测定体系的思路与方法,同样适用于对其他来源脂肪酶活力测定体系的优化。

#### 参考文献:

- [1] ZHANG Z, LEE W J, WANG Y. Evaluation of enzymatic interesterification in structured triacylglycerols preparation; a concise review and prospect [J]. Crit Rev Food Sci, 2021, 61(19): 1-15.
- [2] 沈佳奇,李志,周梭波,等. 薏苡仁油主要成分及其功能性研究进展[J]. 中国油脂, 2020, 45(8): 90-95.
- [3] 徐文迪, 缪智诚, 王小三, 等. 酶法合成中长碳链甘油三酯[J]. 中国油脂, 2019, 44(8): 51-56.
- [4] SALGADO C A, ALMEIDA F A, BARROS E, et al. Identification and characterization of a polyurethanase with lipase activity from *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw cow's milk[J/OL]. Food Chem, 2021, 337: 127954 [2022-04-14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127954>.
- [5] 苏伟,李青云,刘幽燕,等. ZIF-8原位合成法固定化脂肪酶CRL[J]. 中国油脂, 2021, 46(2): 107-113.
- [6] ZHONG L, JIAO X, HU H, et al. Activated magnetic lipase-inorganic hybrid nanoflowers; a highly active and recyclable nanobiocatalyst for biodiesel production [J]. Renew Energ, 2021, 171: 825-832.
- [7] ALTINKAYNAK C, GULMEZ C, ATAKISI O, et al. Evaluation of organic-inorganic hybrid nanoflower's enzymatic activity in the presence of different metal ions and organic solvents[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 164: 162-171.
- [8] LI C, ZHAO J, ZHANG Z, et al. Self-assembly of activated lipase hybrid nanoflowers with superior activity and enhanced stability[J/OL]. Chem Eng J, 2020, 158: 107582 [2022-04-14]. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107582>.
- [9] GAO J, WANG Y, DU Y, et al. Construction of biocatalytic colloidosome using lipase-containing dendritic mesoporous silica nanospheres for enhanced enzyme catalysis [J]. Chem Eng J, 2017, 317: 175-186.
- [10] ALTINKAYNAK C, TAVLASOGLU S, OZDEMIR N, et al. A new generation approach in enzyme immobilization; organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability [J]. Enzyme Microb Technol, 2016, 93/94: 105-112.
- [11] 张悦. 低温脂肪酶 Lip ZC12 理性改造及纳米花固定化研究[D]. 辽宁大连: 大连理工大学, 2019.
- [12] SONI S, DWIVEDEE B, PBANERJEE U C. An ultrafast sonochemical strategy to synthesize lipase-manganese phosphate hybrid nanoflowers with promoted biocatalytic performance in the kinetic resolution of  $\beta$ -aryloxyalcohols [J]. Chem Nano Mat, 2018, 4(9): 1007-1020.
- [13] 郑明亮, 郑浑龙, 孟春, 等. 海藻酸钠裂解酶酶活测定方法研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 246-251.
- [14] MICHAELIS L, MENTEN M L, JOHNSON K A, et al. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper[J]. Biochemistry, 2011, 50(39): 8264-8269.
- [15] 苏霁玲,林昕,杨宝钦,等. 蒜头果种仁的营养成分分析[J]. 中国油脂, 2021, 46(12): 108-111.
- [16] 杨绪强,解小锋,孟晓晔,等. 文冠果油与常见食用油营养成分及脂肪酸组成分析比较[J]. 山东林业科技, 2022, 52(2): 42-46.
- [17] 马柏林,梁淑芳,赵德义,等. 含神经酸植物的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(12): 2362-2365.
- [18] 赵国志,刘喜亮,中里真人,等. 中碳链脂肪酸甘油酯的研究概况(II)以MCT为主要构成成分的结构油脂的合成[J]. 粮油加工与食品机械, 2005(3): 12-15.
- [19] 王性炎,王姝清. 新资源食品:元宝枫籽油[J]. 中国油脂, 2011, 36(9): 56-59.
- [20] 顾强,石晶,袁大炜,等. 常见植物油中8种生育酚和生育三烯酚含量分析[J]. 食品工业, 2017, 38(2): 304-307.
- [21] FERREIDON S, ADRIANO D C. Tocopherols and tocotrienols in common and emerging dietary sources; occurrence, applications, and health benefits[J/OL]. Int J Mol Sci, 2016, 17(10): 1745 [2022-07-26]. <https://doi.org/10.3390/ijms17101745>.

(上接第132页)