

## 对硝基苯酚法

## 对雅致放射毛霉脂肪酶特性的研究

李蓓 李晓晖 衣杰荣\*  
(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

**摘要:**以不同碳链长度的对硝基苯酚酯为底物对雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans* AS 3.27)脂肪酶的酶学特性和其发酵的腐乳在发酵过程中脂肪酶活力的变化进行研究,结果表明:分别以对硝基苯酚正辛酸酯(pNPC)和对硝基苯酚棕榈酸酯(pNPP)为反应底物所测得的脂肪酶酶学特性有所不同。以pNPC和pNPP为反应底物时,雅致放射毛霉脂肪酶的最适作用温度分别为30、35℃,最适作用pH为7.5、7.0,最适盐浓度都为0.20mol/L。以两种底物分别测定雅致放射毛霉接种的腐乳在发酵过程中的脂肪酶活力,均显示在后期发酵过程中脂肪酶活力呈现出不断下降的趋势,然而在第20~25d脂肪酶活力呈现出小幅度的反复。使用碱滴定法以聚乙二醇-橄榄油为底物进行验证,得到相同的趋势。  
**关键词:**对硝基苯酚法,对硝基苯基正辛酸酯,对硝基苯基棕榈酸酯,脂肪酶,雅致放射毛霉

## Determination on lipase enzymatic characteristics and activity of *Actinomucor elegans* by pNP method

LI Bei, LI Xiao-hui, YI Jie-rong\*

(College of Food, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** *Actinomucor elegans* AS 3.27 lipase activities after cultivation and during sufu mature process were determined by pNP method with substrates of different carbon length. Differences in enzymatic characteristics were observed with different substrates—pNPC and pNPP. The optimum temperature was 30, 35℃, and the optimum pH was 7.5, 7.0 for pNPC and pNPP, respectively. While the optimum concentrations of NaCl were the same (0.20mol/L). No significant differences in lipase activity of sufu during the mature process existed between pNPC and pNPP method. The lipase activity of sufu decreased gradually during the ripening process, but during the period of 20~25 days, activity recurrent by a small margin. Simultaneously, the titrimetric method (substrate: PVA—olive oil) was applied to verify. The same trend was proved.

**Key words:** pNP; pNPC; pNPP; lipase; *Actinomucor elegans* AS 3.27

中图分类号: TS201.2<sup>+</sup>5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)11-0220-04

雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans* AS 3.27), 异名匍匐放射毛霉, 是我国目前腐乳酿造中最常用的一种菌种。在腐乳前期培菌的过程中, 毛霉除了分泌大量的蛋白酶之外, 同时还生成了大量的脂肪酶。这些脂肪酶在腐乳的后期发酵过程中对坯体的脂肪进行降解, 产生游离脂肪酸, 从而进一步酯化呈香, 形成腐乳独特的风味<sup>[1]</sup>。长期以来, 人们都习惯使用碱滴定法来测定各种微生物脂肪酶的活力, 然而在国外, 更多的是使用对硝基苯酚法来测定。但对硝基苯酚法测定雅致放射毛霉脂肪酶活力的研究未见报道。本文结合腐乳的生产实际, 运用对硝基苯酚法对雅致放射毛霉胞外脂肪酶的酶学特性以及后

期发酵过程中毛霉脂肪酶活力进行研究, 旨在探讨对硝基苯酚法测定脂肪酶活力的可行性, 以及采用亲水亲油性不同的作用底物时毛霉脂肪酶作用的特点, 以期进一步探讨乳状液微观体系对脂肪酶作用的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

1.1.1 用于雅致放射毛霉酶学特性研究的粗酶液 AS 3.27 培养条件: 接种在马铃薯培养液中, 接种量为0.5%, 160r/min 摇床培养 48h。粗酶液直接以发酵原液进行测定。单位为 μmol/(min·mL) (mL 指发酵原液体积)。

1.1.2 用于腐乳后期发酵过程中脂肪酶活力测定的粗酶液 加入2倍腐乳样品质量的0.15mol/L 氯化钠溶液 4000r/min 下冷冻离心5min 即为粗酶液。

收稿日期: 2010-10-25 \* 通讯联系人

作者简介: 李蓓(1986-), 女, 硕士在读, 研究方向: 食品加工和食品化学。

1.2 实验方法

1.2.1 碱滴定法测定脂肪酶活力 参见江慧芳<sup>[2]</sup> 碱滴定法测定。

1.2.2 对硝基苯酚法测定脂肪酶活力<sup>[3]</sup>

1.2.2.1 底物溶液配制 溶液 A: 取对硝基苯基正辛酸酯 (pNPC)、对硝基苯基棕榈酸酯 (pNPP) 30mg, 加入 10mL 异丙醇 (3mg · mL<sup>-1</sup>); 溶液 B: Tritox X-1002g, 阿拉伯胶 0.5g 溶解于 450mL Tris - HCl (50mmol/L, pH8.0)。

P-NP 底物溶液配制: 按溶液 A: 溶液 B = 1:9 的比例配成乳状液, 将此溶液稳定 2h。

1.2.2.2 测定方法 参见 Thomas Vorderwulbecke 对硝基苯酚法测定。

1.2.2.3 酶活定义及计算公式 脂肪酶酶活力单位定义为: 在一定条件下, 每分钟释放出 1μmol 对硝基苯酚的酶量定义为 1 个脂肪酶活力单位 (U)。计算公式:  $X = CV / (Tv)$

式中: X-脂肪酶活力, U · mL<sup>-1</sup>; C-对硝基苯酚浓度, μmol · mL<sup>-1</sup>; V-酸碱调节后的反应液终体积, mL; v-酶液的用量, μL; T-反应时间, min。

1.2.3 雅致放射毛霉脂肪酶酶学特性研究

1.2.3.1 最适作用 pH<sup>[4]</sup> 分别以 pNPC 和 pNPP 为底物, 以不同 pH (5.8、6.2、6.5、6.8、7.0、7.5、8.0、9.0) 的缓冲液配制底物, 按 1.2.2 的方法测定脂肪酶活力, 并绘制 pH-绝对酶活曲线。

1.2.3.2 酸碱稳定性 将粗酶液置于不同 pH (5.8、6.2、6.5、6.8、7.0、7.5、8.0、9.0) 的缓冲液中, 于 4℃ 下放置不同时间, 按 1.2.2 的方法测定脂肪酶活力, 以最高酶活力为 100%, 将其余各 pH 下的酶活力换算成相对酶活, 并绘制 pH-相对酶活曲线。

1.2.3.3 最适作用温度<sup>[4]</sup> 分别以 pNPC 和 pNPP 为底物, 以 pH 7.0 和 7.5 的缓冲液配制底物, 在不同温度条件下 (25、30、35、40、45、50、55、60、70℃) 按 1.2.2 的方法测定脂肪酶活力, 并绘制温度-绝对酶活曲线。

1.2.3.4 热稳定性<sup>[5]</sup> a. 以 pNPC 为底物, 以 pH7.0 的缓冲液配制底物, 在不同温度下 (30、35、40、50、60℃) 分别保温不同时间, 按 1.2.2 的方法在 30℃ 测定脂肪酶活力, 其余同 1.2.3.2。b. 以 pNPP 为底物, 以 pH7.5 的缓冲液配制底物, 在不同温度下 (35、40、45、50、60℃) 分别保温不同时间后, 按 1.2.2 的方法在 35℃ 测定脂肪酶活力, 其余同 1.2.3.2。

1.2.3.5 不同氯化钠浓度对脂肪酶活力的影响<sup>[4]</sup> 分别以 pNPC 和 pNPP 为底物, 以 pH7.0 和 7.5 的缓冲液, 不同浓度 NaCl 溶液 (0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.5mol/mL) 配制底物, 按 1.2.2 的方法测定脂肪酶活力。

1.2.4 腐乳后期发酵过程中脂肪酶活力测定 在后期发酵过程中取 5、8、10、13、15、18、20、23、25、28、30、33、35、38、40、45d 腐乳样品按 1.1.2 提取粗酶液, 按 1.2.1 和 1.2.2 方法分别测定脂肪酶活力。

2 结果与讨论

2.1 雅致放射毛霉脂肪酶酶学性质的研究

2.1.1 雅致放射毛霉脂肪酶最适 pH 和酸碱稳定性

如图 1 所示, 当采用 pNPP 为底物时, 在 pH 为 7.0 时脂肪酶表现出最高活力 (0.1004U · mL<sup>-1</sup>), 之后随着 pH 的增加, 酶活迅速下降, 在 pH8.0 时, 酶活低至 10%。然而, 当底物为 pNPC 时, pH 为 7.5 时脂肪酶才呈现出最高活力 (0.09967U · mL<sup>-1</sup>), 此后逐渐下降, 在 pH8.0 时酶活仍达到 87.95%。由此表明脂肪酶作用于不同的底物时其最适 pH 不同, 对短链底物 pNPC 的水解作用较长链底物 pNPP 更倾向于在碱性条件下进行。与肖春玲<sup>[6]</sup> 报道的毛霉 M<sub>2</sub> 脂肪酶的最适 pH 为 8.0 相比, 用 pNP 方法测得的最适 pH 要低一些。在后面测定雅致放射毛霉脂肪酶活力时, 以 pNPC 为底物, 取最适 pH = 7.5; pNPP 为底物, 取最适 pH = 7.0。

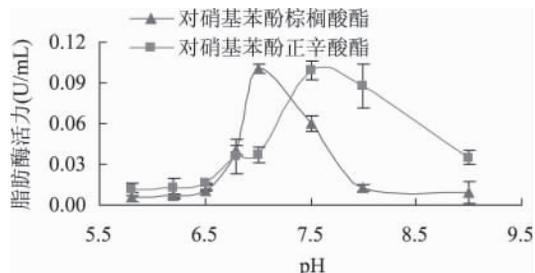


图 1 不同 pH 对脂肪酶活力的影响

从图 2、图 3 中可以看出, 无论底物是 pNPC 还是 pNPP 粗酶液在 pH7.0~8.0 范围内脂肪酶活力呈现出较高的稳定性, 在 30h 时, pNPC 和 pNPP 酶活力均达到 85% 以上, 然而在酸性条件下 (pH = 6.2), 60h 后酶活力仅为 25%。由此表明, 雅致放射毛霉脂肪酶在中性偏碱性的条件下具有较好的稳定性, 而在酸性条件下, 酶活迅速下降。

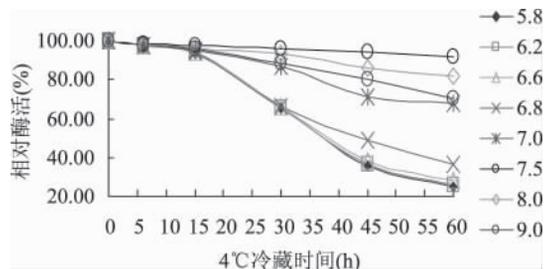


图 2 雅致放射毛霉脂肪酶酸碱稳定性研究 (对硝基苯酚正辛酸酯)

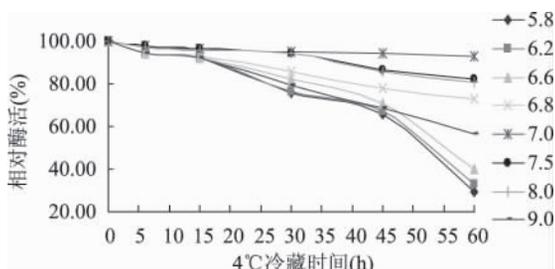


图 3 雅致放射毛霉脂肪酶酸碱稳定性研究 (对硝基苯酚棕榈酸酯)

pNPP 是长链底物, 而 pNPC 是短链底物, 前者比后者的亲油性更强, 可以推测在 o/w 乳状液的反应体系中, 亲水亲油性的差异会影响该底物在乳状液中的位置, 从而会影响到与酶的不同结合性和酶活力。Kierkels<sup>[7]</sup> 研究表明, 脂肪酶活力大小与界面的

属性特征有直接的关系。Lima<sup>[8]</sup>报道中提到的脂肪酶活力不但取决于 pH,而且与使用的缓冲液类型也存在一定关系。Lima 在文献中报道了接触面面积的大小决定了脂肪酶反应的快慢,然而接触面面积却是由不同底物类型所决定的,不同类型的底物决定了乳化液的性质。

2.1.2 雅致放射毛霉脂肪酶的最适作用温度及耐温的稳定性 从图 4 中可以看出,当底物为 pNPC 时,雅致放射毛霉脂肪酶在 30~40℃ 温度范围内具有相对较高的酶活力,在 30℃ 时酶活力表现最高(0.2902U·mL<sup>-1</sup>),当温度高于 30℃ 时,其水解酶活随着温度的升高开始下降,70℃ 时,基本失活。采用 pNPP 为底物时,大致变化趋势与 pNPC 相同,但是其在 35℃ 时脂肪酶的活力表现最高(0.2803U·mL<sup>-1</sup>),随着作用温度升高和降低,酶活力均呈现出减弱的趋势。

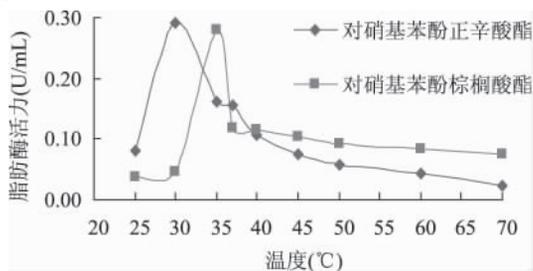


图4 不同温度对雅致放射毛霉脂肪酶的影响

从图5、图6中可知,雅致放射毛霉 AS 3.27 脂肪酶在 30℃ 恒温 4h,保持 85% 左右的水解酶活力。在 40℃ 时则保持酶活 60%。而在 60℃ 恒温处理 4h 时,其水解活力下降至 20% 以下。在低于 50℃ 的保温条件下,脂肪酶在以长链的 pNPP 为作用底物时较之以短链的 pNPC 为作用底物,表现出了更好的耐温稳定性。

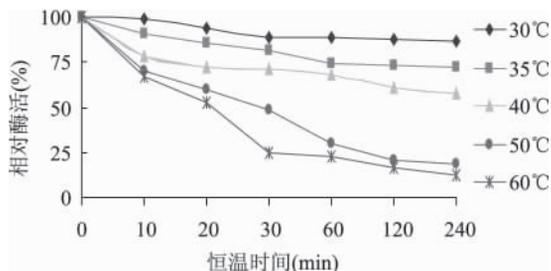


图5 雅致放射毛霉脂肪酶热稳定性的影响(pNPC)

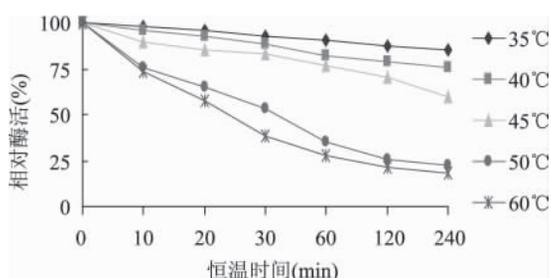


图6 雅致放射毛霉脂肪酶热稳定影响研究(pNPP)

关于脂肪酶温度的研究报道各不相同,Lima<sup>[8]</sup>中叙述到总的来说,霉菌的脂肪酶在温度高于 40℃ 时,脂肪酶表现出不稳定性。然而 Costa<sup>[9]</sup>关于 P.wortmanii 脂肪酶的报道中叙述到此酶在 50℃ 恒温

60min 时,脂肪酶的相对活力仍旧保持在 55% 以上。肖春玲<sup>[6]</sup>报道了毛霉 M<sub>2</sub> 脂肪酶的酶最适温度为 50℃,在 50~60℃ 温度范围内脂肪酶活力较为稳定。

2.1.3 雅致放射毛霉脂肪酶的最适盐浓度 以 pNPP 和 pNPC 为底物在其最适条件下(pNPC: pH7.5, 30℃; pNPP: pH7.0, 35℃)比较了不同浓度 NaCl 对维持脂肪酶活性的作用。结果表明(图7),pNPC 和 pNPP 的最适盐浓度均为 0.20mol/L,对应的脂肪酶活力分别为 0.09376、0.1247U·mL<sup>-1</sup>。随着 NaCl 浓度的增加,脂肪酶活力呈现出逐渐减少的趋势。从图7中可以看出,以对硝基苯酚棕榈酸酯为底物,当 NaCl 浓度大于 0.20mol/L 之后,随着 NaCl 浓度的增加,酶活力下降比对硝基苯酚正辛酸酯的要迅速。

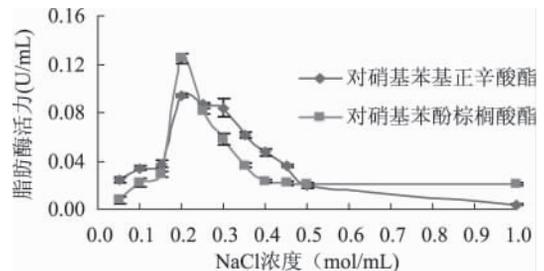


图7 NaCl 浓度对脂肪酶活力的影响

## 2.2 AS 3.27 腐乳后期发酵过程中脂肪酶活力研究

腐乳后期发酵过程中脂肪酶活力分别采用了以对硝基苯酚法和碱滴定法两种方法进行测定,脂肪酶活力变化如图8所示,随着后期发酵的进行,脂肪酶活力基本都呈现不断下降的趋势。这可能是因为在后期发酵过程中腐乳的 pH 低于 6.8,且持续下降(第 5d pH 为 6.71,第 10d pH 为 6.66,第 15d pH 6.63 到第 40d pH 6.53),而 AS 3.27 脂肪酶稳定性的结果表明,在该 pH 范围内脂肪酶活力很不稳定(图2)。

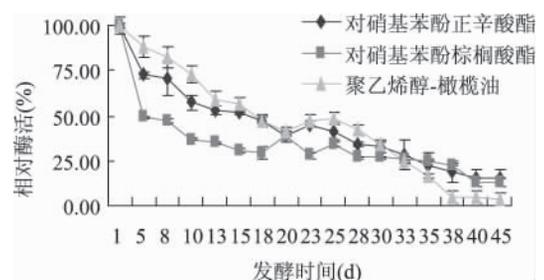


图8 后期发酵过程中雅致放射毛霉脂肪酶活力变化

由图8中可见,聚乙烯醇-橄榄油和对硝基苯酚正辛酸酯的变化趋势基本相同,然而对硝基苯酚棕榈酸酯在 1~18d 内的下降幅度更加大。在 20~25d 的后酵阶段,脂肪酶活力均出现很小幅度的增加现象。这与鲁维<sup>[10]</sup>的报道中脂肪酶活力在整个发酵过程中表现出的极其不稳定的结论不同。我们推测可能是在此阶段其它参与发酵的微生物如乳酸菌分泌的脂肪酶所致。这一趋势在相关文献中未见报道,需要进一步的研究。

## 3 结论

本文首次使用对硝基苯酚法采用 pNPC 和 pNPP 两种不同底物对 AS 3.27 脂肪酶学性质及腐乳后 (下转第 263 页)

的抗营养成分,通过超滤法纯化菜籽蛋白,生产食用级菜籽蛋白产品是可行的。

### 3 结论

3.1 与传统的碱提酸沉法相比,超滤法浓缩菜籽蛋白提取液得到的菜籽蛋白,纯度高达90%,硫苷、异硫氰酸酯、恶唑硫烷酮、植酸、单宁等有害成分明显降低,达到国家食品标准,而且功能特性也有一定程度的改善。

3.2 本研究先通过单因素实验探讨流速、操作压力、温度、pH等因子对菜籽蛋白提取液膜通量的影响,再采用正交实验优化超滤工艺参数。结果表明,超滤法浓缩菜籽蛋白最佳工艺条件为流速2m/s,操作压力为0.1MPa,温度为40℃,pH为9。在此工艺条件下,菜籽蛋白得率为53.4%。

### 参考文献

[1]陈刚,彭建.菜籽饼粕抗营养因子研究进展[J].畜禽业,2001(1):14-16.  
 [2]曾晓波,吴谋成,王海英.丙酮浸提法制取菜籽浓缩蛋白[J].中国粮油学报,2001,16(4):10-13.  
 [3]L Xu, L L Diosady. The production of Chinese rapeseed protein isolates by membrane processing [J]. JAOCS, 1994, 71(9): 935-939.  
 [4]R D Siy, D F Talbot. Preparation of low-phytate rapeseed protein by ultrafiltration: I. The aqueous extraction of phytate from deoiled rapeseed meals [J]. JAOCS, 1982, 59(4): 191-194.  
 [5]金晶,徐志宏,魏振承,等.超声微波辅助法提纯菜籽蛋白的研究[J].现代食品科技,2009,25(3):275-278.  
 [6]席鹏彬,李德发,龚丽敏.菜籽饼粕营养品质及其在猪日粮中的应用[J].饲料工业,2002,23(6):5-9.  
 [7]B Pastuszewska, G Jablecki, L Buraczewska, et al. The protein value of differently processed rapeseed solvent meal and cake

assessed by in vitro methods and in tests with rats [J]. Animal Feed Science and Technology, 2003, 106: 175-188.

[8]任国谱,董新伟,刘富堂.食用菜籽蛋白的提取及其功能特性的研究[J].烟台大学学报,1994(4):29-34.

[9]胡志和,庞广昌,王凤玲.萃取超滤技术制备食用菜籽蛋白[J].食品科学,1999(1):34-37.

[10]黎娇凌,黄永光.菜籽饼脱毒方法及其饼粕利用研究进展[J].贵州农业科技,2007,35(6):136-138.

[11]臧海军,张克英.菜籽饼粕中硫代葡萄糖苷对动物的抗营养作用[J].兽药与饲料添加剂,2008,13(1):25-28.

[12]金晶,徐志宏,魏振承,等.菜籽粕中抗营养因子及其去除方法的研究进展[J].中国油脂,2009,34(7):18-21.

[13]Rodney J Mailer, Amanda Mc Fadden, Jamie Ayton, et al. Anti-Nutritional Components, Fibre, Sinapine and Glucosinolate Content, in Australian Canola (Brassica napus L) Meal [J]. JAOCS, 2008, 85(10): 937-944.

[14]张宁,张志英.中空纤维超滤膜浓缩胞外多糖PS-9415发酵液的研究[J].食品工业科技,2003,24(2):24-27.

[15]胡志和,庞广昌,王凤玲.萃取超滤技术制备食用菜籽蛋白[J].食品科学,1999(1):34-37.

[16]刘志强,曾云龙,吴苏喜,等.水相酶解法菜籽蛋白提取液超滤工艺研究[J].中国粮油学报,2004,19(1):52-56.

[17]Siy R D, Talbot F D. Preparation of low phytate rapeseed protein by ultrafiltration [J]. JAOCS, 1981, 58(12): 1021-1023.

[18]Tzeng Y M, Diosady L L, Rubin L J. Preparation of rapeseed protein isolates using ultrafiltration, precipitation and diafiltration [J]. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 1988, 21(4): 19-24.

[19]褚庆华,倪昕路.油菜籽及其饼粕中硫代葡萄糖苷总量快速测定方法的研究[J].中国粮油学报,2004,19(1):79-81.

[20]傅启高,李慧荃.三氯化铁比色法测定植酸含量的研究[J].营养学报,1997,19(2):216-220.

(上接第222页)

期发酵时的脂肪酶活力进行了研究。结果表明,采用pNPC和pNPP两种不同的底物,测得的脂肪酶最适作用条件有所不同,耐温稳定性也有差异。腐乳后期发酵过程中脂肪酶活力呈现出不断下降的趋势,20~25d这个阶段有小幅度的反复,这与碱滴定法测定的结果相同,但是与鲁绯已报道的脂肪酶活力研究结果大不相同,还有待于进一步研究。

### 参考文献

[1]王瑞芝.论影响腐乳后发酵的主要因素[J].中国调味品,2005(7):4-9.  
 [2]江慧芳,王雅琴,刘春国.三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J].化学与生物工程,2007,24(8):72-75.  
 [3]Thomas Vorderwulbecke. Comparison of lipases by different assays [J]. Enzyme Microbiology Technology, 1992(14): 631-635.  
 [4]张萌.嗜盐脂肪酶产生菌的筛选及粗酶性质[J].微生物学

通报,2009,36(1):14-19.

[5]戴斐,张雍容,江正兵.酿酒酵母表面展示脂肪酶LipB52的酶学性质[J].华东理工大学报:自然科学版,2007,33(2):177-181.

[6]肖春玲.毛酶脂肪酶的研究[J].微生物学通报,1998,25(5):274-277.

[7]JGT Kierkels et al. Pseudomonas fluorescens lipase adsorption and the kinetics of hydrolysis in a dynamic emulsion system [J]. Enzyme Microbe Technology, 1994(16): 513-521.

[8]V M G Lima et al. Activity and stability of a crude lipase from Penicillium aurantiogriseum in aqueous media and organic solvents [J]. Biochemical Engineering, 2004(18): 65-71.

[9]MAF Costa, RM Perelta. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain [J]. Basic Microbiology, 1999(39): 11-15.

[10]鲁绯.对腐乳后酵过程中一些成分变化的研究[J].中国酿造,2003(6):14-17.