

利用酯合成测定脂肪酶活性，  
PLU(Propyl-Laureate  
Synthesis, 丙基月桂酸脂合成)

## 1. 适用范围

本方法应用酯合成原理测定固定化脂肪酶的活性。

## 2. 原理

固定化脂肪酶能利用 1-丙醇酯化月桂酸，生成丙基月桂酸脂。通过毛细管气相色谱测定生成的丙基月桂酸脂和消耗的月桂酸的量计算脂肪酶的活性。

## 3. 单位定义

在标准反应条件下每分钟生成  $1 \mu\text{mol}$  的丙基月桂酸脂所需的酶的量为一个单位，用 PLU 表示。

## 4. 反应条件

温度:  $60^{\circ}\text{C}$   
反应时间: 20 分钟  
W: 0.030 g 催化剂干底物  
M: 各  $40\,000 \mu\text{mol}$  1-丙醇和月桂酸  
水合剂: 3%w/w 的水

## 5. 化学试剂

月桂酸 (>99%, Merck art.no.808333)  
1-丙醇 (>99.5, Merck art.no.997)  
去离子水  
庚烷 (>99%, Merck)  
丙基月桂酸脂 (>99%, Sigma)

## 6. 仪器

带紧扣瓶盖的 20 ml 的玻璃试管 ( $7.5 \times 2 \text{ cm}$  直径)，或带塞的 100 ml 锥型烧瓶振动式热水浴 (150 rpm)

## 7. 月桂酸-丙醇底物

例如: 10 个样品的底物

1-丙醇 ..... 24.0 g  
月桂酸 ..... 80.1 g  
水 ..... 3.2 g

将水溶于 1-丙醇中，在加热的状态下（保持在约  $50^{\circ}\text{C}$ ）慢慢加入月桂酸溶解。底物保存在  $60^{\circ}\text{C}$  下，每个样品取用 10.73 g。

## 8. 反应

振荡水浴保温在  $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。将相应的干物质约为 30 mg 的催化剂

称入到小瓶中，然后加入 10.73 g 的底物。将小瓶盖紧，立即放入到水浴中，开始计时。

20 分钟后将小瓶移出水浴，从上清液中取出 5  $\mu$ l，用 995  $\mu$ l 庚烷稀释。每个样品需做平行样。

## 9. 毛细管气相色谱分析

检测采用装有 FID 检测器（衰减 32，量程 12）的 Virian Star 3400 CX 型的毛细管气相色谱仪。毛细管柱选用 Restek Stabilwax DA 柱（长 15 m，0.25 mm ID，膜厚 0.25  $\mu$ m）。自动进样器选用 Varian 8200 CX。

进样量 0.7  $\mu$ l。

载气为氦气，流速 1.7 ml/min（46.2cm/sec），分流 50（60°C）

### 方法：

进样器温度：280°C

检测器温度：280°C

柱温程序：

0-1 分钟 60°C

1-4.8 分钟 60-250°C，升温 50°C /分钟

4.8-7 分钟 250°C

试验结束后在以下温度下清洗仪器 3 小时：

进样器：350°C

检测器：350°C

柱：250°C

毛细管气相色谱仪会把 1-丙醇、丙基月桂酸脂和月桂酸都分离出来，相应的保留时间为 0.9、4.8 和 6.3 分钟。

## 10. 气相色谱标准

各物质的标准品储备液的如下：

1-丙醇：200 mM；月桂酸：200 mM；丙基月桂酸脂：50 mM

混合标准品由以上三个储备液进一步稀释到 4 个 10 ml 的小瓶中制得，参见下表：

标准号	每个储备液的体积	1-丙醇, mM	月桂酸, mM	丙基月桂酸脂, mM
0	0	0	0	0
1	250	5	5	1.25
2	500	10	10	2.5
3	1000	20	20	5
4	1500	30	30	7.5

## 11. 计算

从标准品的分析结果做出三种物质的标准曲线。

月桂酸到丙基月桂酸脂的转换因子计算如下：

$$C = \frac{PL}{PL + LA} = \frac{\frac{areaPL}{RFPL}}{\frac{areaPL}{RFPL} + \frac{areaLA}{RFLA}}$$

其中:

C: 转化成丙基月桂酸脂的月桂酸的量

LA: 月桂酸的浓度

PL: 丙基月桂酸脂的浓度

Area PL: 色谱图上丙基月桂酸脂的面积

Area LA: 色谱图上月桂酸的面积

RF PL: 标准曲线上丙基月桂酸脂的响应因子

RF LA: 标准曲线上月桂酸的响应因子

转换因子将用于下式中计算酶活性 (0.05 < C < 0.20)

$$\text{酶活性 (PLU/g)} = \frac{M \times C}{W \times t}$$

其中:

M: 1-丙醇和月桂酸的初始量

C: 转化成丙基月桂酸脂的月桂酸的量

W: 催化剂干物质的量, g

t: 反应时间 (分钟)



**Novozymes China Headquarters**  
14 Xinxi Lu,  
Shangdi Zone,  
Haidian Dist.,  
Beijing  
100085  
P.R. China

**诺维信中国总部**  
北京市海淀区上地信息路 14 号  
邮编: 100085  
Tel. +86 10 6298 7888  
Fax +86 10 6298 1281  
www.novozymes.com.cn

**Novozymes A/S**  
Krogshoejvej 36  
2880 Bagsvaerd  
Denmark

Tel. +45 8824 9999  
Fax +45 8824 9998  
info@novozymes.com  
www.novozymes.com

有关法律、法规和第三方权利可能禁止客户以某种方式进口、加工、应用和/或转售某些产品。客户有责任在具体使用诺维信产品时, 做到不违反相关的法律和法规, 而且不侵犯专利权或其它第三方权利。  
本文档内容如有更改, 恕不另行通知。