DOI:10.12441/spyswjs.20240725001 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0029-08

脂肪酶酶活力检测方法研究进展

杨 俊[1,3,4] 崔佳琦[1,3,4] 于鹏飞[2,3,4] 娄湘琴[5] 孔 玲[2,3,4] 陈志伟[1,3,4*]

(1. 山东理工大学农业工程与食品科学学院,山东 淄博 255000; 2. 山东理工大学生命与医药学院,山东 淄博 255000; 3. 山东省乳品技术创新中心,山东 淄博 255000; 4. 山东省食品快速分析技术工程研究中心,山东 淄博 255000; 5. 淄川区检验检测中心,山东 淄博 255100)

摘要:脂肪酶是一种关键的生物催化剂,在催化甘油三酯水解和脂肪酸酯化过程中发挥着重要作用,因此准确测定脂肪酶酶活力至关重要。传统方法中的平板检测法和滴定法是通过测定脂肪酶催化底物产生的脂肪酸来间接评估脂肪酶酶活力,而铜皂比色法、对硝基苯酚法和探针比色法则依据产物颜色的变化来测定脂肪酶酶活力。近年来出现的新兴方法中的液体泡沫检测法只能用于定性分析;相比之下,荧光探针法和基于生物传感器的检测方法灵敏度高,更适于复杂介质中脂肪酶酶活力的检测。作者简述了脂肪酶酶活力检测方法的原理、存在问题、适用条件和发展现状,并对脂肪酶酶活力检测方法进行了总结和对比,旨在为脂肪酶酶活力的检测研究提供参考。

关键词:脂肪酶;酶活力;检测方法

Research Progress of Lipase Enzyme Activity Detection Methods

YANG Jun[1,3,4] *CUI Jiaqi*[1,3,4] *YU Pengfei*[2,3,4] *LOU Xiangqin*[5] *KONG Ling*[2,3,4] *CHEN Zhiwei*[1,3,4*]

(1. School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo 255000, China; 2. School of Life Sciences and Medicine, Shandong University of Technology, Zibo 255000, China; 3. Shandong Provincial Innovation Center for Dairy Technology, Zibo 255000, China; 4. Shandong Engineering Research Center for Food Rapid Analysis Technology, Zibo 255000, China; 5. Zichuan District Inspection and Test Center, Zibo 255100, China)

Abstract: As key biocatalysts, lipases play essential roles in catalyzing the hydrolysis of triglycerides and the esterification of fatty acids. Therefore, accurate measurement of lipases enzyme activity is crucial. Traditional methods, such as plate assay and titration, indirectly assess lipase enzyme activity by measuring the fatty acids produced from the substrate catalyzed by lipases. Methods like the copper-soap colorimetric assay, *p*-nitrophenol assay, and probe colorimetric assay determine lipase enzyme activity based on changes in the color of the reaction products. Recently developed methods, such as liquid foam detection, are limited to qualitative analysis, whereas the fluorescence probe and biosensor-based detection methods offer higher sensitivity, making them more suitable for measuring lipase enzyme activity in complex media. The author provides a brief overview of the principles, limitations applicable conditions, and current developments of various lipase enzyme activity detection methods, along with a comprehensive comparison and summary, aiming to offer a reference for future research on lipase enzyme activity detection.

Keywords: lipase; enzyme activity; detection method

基金项目:山东省重大科技创新工程项目(2023CXGC010711);山东省自然科学基金重点项目(ZR2020KC030);山东省自然科学基金面上项目(ZR2021MC113)。

通信作者:陈志伟(1972—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品安全与生物分析研究。E-mail:chen@sdut.edu.cn

收稿日期:2024-07-25 **修回日期:**2024-10-16

脂肪酶全称三酰基甘油水解酶，能够催化甘油三酯或脂肪酸酯的水解反应，生成甘油单酯、甘油二酯和游离脂肪酸[1]。脂肪酶酶活力对催化反应的顺利进行至关重要。目前，通过测定脂肪酶底物水解速率来评估脂肪酶酶活力的方法已经得到了广泛应用，并且在化学、制药和环境工业等多个领域发挥着重要作用[2]。

传统的脂肪酶酶活力检测方法，如滴定法、平板检测法、比色法等，存在分析周期长、灵敏度低、操作过程复杂以及方法特异性有限等问题[3-4]。因此，迫切需要开发具有更低检测限、更高灵敏度且经济高效的新型脂肪酶酶活力检测方法。作者综述了当前用于评估脂肪酶酶活力的传统方法和新方法，并深入分析了每种方法的优缺点和适用条件，为开发新的脂肪酶酶活力检测方法提供参考。

1 脂肪酶酶活力检测的传统方法

1.1 平板检测法

平板检测法是通过脂肪酶催化显色底物与指示剂在平板上发生反应，反应中产生的水解圈大小与酶活力对数值呈线性关系，从而实现对酶活力的定性和定量检测。

张瑛等[5]采用平板检测法快速、灵敏地检测水稻种子中的碱性脂肪酶酶活力，并利用该方法筛选出具有不同碱性脂肪酶酶活力的材料。Samad等[6]使用平板检测法，通过强化区的指示剂颜色来确定脂肪酶酶活力，并实现对产脂肪酶微生物的初级筛选。Ülker等[7]使用平板检测法直接测定缓冲液和培养基中的微量脂肪酶，无需任何纯化步骤，但容易受滴定板塑料腐蚀的干扰。该方法操作简单、成本低廉，适用于脂肪酶的初步筛选或粗略定量。测定过程需要在无菌条件下进行，以避免污染，同时需要控制好pH、温度和时间等反应条件。

1.2 滴定法

滴定法是一种简单、直接且准确的脂肪酶酶活力检测方法。主要利用脂肪酶水解橄榄油产生游离脂肪酸，然后使用标准碱溶液结合指示剂进行滴定，通过耗碱量计算出脂肪酶酶活力。常见的滴定法包括pH-stat滴定法、溶剂萃取滴定法和电位滴定法。

pH-stat滴定法可以通过控制稀释的酸或碱的添加量来维持恒定的pH。Miksch等[8]改进了pH-stat滴定法，优化了环境条件和生物基聚合物，并用水稀释碱进行反滴定测定。电位滴定法则是利用pH计直接测量反应溶液的pH来判断滴定终点。Vahl等[9]使用电位滴定法在15 min内检测到南极念珠菌脂肪酶的水解活力，检出限低至0.07 U/mL。滴定法常用于实验室和工业生产中脂肪酶酶活力的测定，但由于其样品溶液体积较小且动态测量范围有限，不适合快速筛选脂肪酶，也不利于酶反应动力学的确定。

1.3 铜皂比色法

铜皂比色法利用脂肪酶水解底物产生游离脂肪酸，这些脂肪酸与显色剂中的铜离子反应生成铜皂蓝色络合物，该络合物在710 nm波长下有最大吸光度。通过对照脂肪酸吸光度标准曲线，可以得出脂肪酸的浓度，从而定量分析脂肪酶的酶活力。

用于评估非水性铜皂溶液中金属离子含量时，比色法通常比化学分析方法更可靠，尤其是在稀皂溶液中。铜皂在有机介质中的行为与铜盐截然不同，它们分别在不同的波长下表现出最大吸收率[10]。Saisuburamaniyan等[11]通过优化该方法的试验流程，实现了土壤脂肪酶酶活力的简便、快速、准确测定。然而，该检测体系易受阴离子表面活性剂双磺基琥珀酸钠（AOT）及其铜络合物的基质效应影响。试验表明，通过乙腈溶剂萃取预处理可有效消除上述干扰物的光学干扰[12]。铜皂比色法因准确性和重现性较高，广泛应用于纯化脂肪酶的定量动力学研究。

1.4 对硝基苯酚法

对硝基苯酚法是检测脂肪酶酶活力最常用的方法之一。其原理是以对硝基苯基羧酸酯为底物，通过脂肪酶水解产生淡黄色的对硝基苯酚，该产物在400~410 nm波长下有最佳吸光度。通过对照对硝基苯酚的吸光度工作曲线，可以确定脂肪酶酶活力。

脂肪酶催化系统是一种非均相体系，其反应发生在油相和水相的交界处。虽然脂肪酶是水溶性的，但其底物对硝基苯基羧酸酯是脂溶性的，因此需要将水不溶性底物乳化才能进行测定[13]。底物、有机溶剂和乳化剂是影响脂肪酶水解对硝基苯基羧酸酯速率的关键因素。该反应通常使用不同链长脂肪酸的对硝基苯酯作为底物，但这些底物在碱性水介质下容易发生自水解。对于有机溶剂的选择，Šibalić等[13]发现体积分数4%的乙腈有更好的溶解度和更高的底物转

化率。此外，该反应还容易受到胶束表面性质的影响。研究表明，曲拉通 X-100、阿拉伯树胶和异丙醇是稳定对硝基苯基棕榈酸酯水性悬浮液的合适乳化剂[14]。乳化剂的作用是使脂肪酶催化反应在不同的pH和温度下保持稳定的吸光度，并能有效稳定水性乳液中的对硝基苯酯。

对硝基苯酚法具有灵敏度高、特异性强等优点，但该方法不适合用于检测复杂介质中的脂肪酶酶活力，且反应时间不可控[15]。Palacios等[16]通过添加氯仿-异戊醇（体积比为24∶1）作为变性剂来终止酶促反应，并通过离心除去沉淀物，从而更准确地测定水性介质中的脂肪酶酶活力。不同微生物来源的脂肪酶的最适选择性底物、最适酶反应条件和热稳定性见表1。

表1　不同微生物来源的脂肪酶特性

Table 1　Characteristics of lipases from different microbial sources

来源	最适选择性底物	最适酶反应条件	热稳定性	参考文献
Pichia pastoris GS115	月桂酸4-硝基苯酯	温度60 ℃、pH 8.0	60 ℃、3 h，酶活力残留率50%	[17]
Bacillus licheniformis KM12	癸酸4-硝基苯酯	温度35 ℃、pH 8.0	50 ℃、2 h，酶活力残留率75% 60 ℃、2 h，酶活力残留率45%	[18]
Mycobacterium tuberculosis rv1400c	4-硝基苯丁酸酯	温度37 ℃、pH 8.0	45 ℃、30 min，酶活力残留率20% 55 ℃、30 min，酶活力残留率0	[19]
Natronococcus sp. strain TC6	棕榈酸对硝基苯酯	温度50 ℃、pH 7.0	50 ℃、1 h，酶活力残留率大于90%	[20]
Pseudomonas aeruginosa HFE733	—	温度40 ℃、pH 8.5	40 ℃、1 h，酶活力残留率70% 60 ℃、1 h，酶活力残留率30% 70 ℃、1 h，酶活力残留率小于20%	[21]
Acinetobacter sp. K5b4	4-硝基苯基辛酸酯	温度27 ℃、pH 7.0	60 ℃、1 h，酶活力残留率小于20%	[22]
Anoxybacillus flavithermus HBB 134	—	温度50 ℃、pH 9.0	40 ℃、24 h，酶活力残留率92% 50 ℃、24 h，酶活力残留率85%	[23]
Geobacillus thermodenitrificans AV-5	—	温度65 ℃、pH 9.0	70 ℃、1 h，酶活力残留率60% 70 ℃、2 h，酶活力残留率40%	[24]
Yarrowia lipolytica Wt-11	—	温度30 ℃、pH 8.0	40 ℃、1 h，酶活力残留率90.0% 50 ℃、1 h，酶活力残留率54.8% 50 ℃、140 min，酶活力残留率6.9%	[25]
Pseudomonas reinekei	—	温度35 ℃、pH 5.0	50 ℃、1 h，酶活力残留率小于25% 80 ℃、1 h，酶活力残留率小于20%	[26]
Pseudomonas fluorescens BJ-10	棕榈酸对硝基苯酯	温度40 ℃、pH 8.0	135 ℃、5 s，酶活力残留率14.7% 135 ℃、10 s，酶活力残留率5.2% 135 ℃、30 s，酶活力残留率1.2%	[27]
Psychrophilic azotoformans B15-1	棕榈酸对硝基苯酯	—	135 ℃、5 s，酶活力残留率17.76% 135 ℃、10 s，酶活力残留率20.77% 135 ℃、15 s，酶活力残留率18.95%	[28]
Bacillus licheniformis NCU CS-5	棕榈酸对硝基苯酯	温度40 ℃、pH 10.0	40 ℃、96 h，酶活力残留率80%以上	[29]
Micrococcus luteus EMP48-D	月桂酸4-硝基苯酯	温度40 ℃、pH 5.0	50 ℃、3 h，酶活力残留率79.1% 65 ℃、3 h，酶活力残留率37.5%	[30]
Pseudomonas aeruginosa LX1	—	温度40 ℃、pH 7.0	40 ℃、1 h，酶活力残留率大于90% 60 ℃、1 h，酶活力残留率小于20%	[31]
Bacillus thuringiensis CZW001	—	温度25 ℃、pH 8.0	60 ℃、30 min，酶活力残留率30% 60 ℃、1 h，酶活力残留率0	[32]

注：“—”表示文献未提及。

1.5　探针比色法

Zhang等[33]开发了一种基于金纳米颗粒的比色法，用于实时监测脂肪酶酶活力。该方法通过构建一种吐温20-金纳米颗粒（GNPs）探针，利用脂肪酶催化水解吐温20-GNPs的酯键，使GNPs在高盐溶液中快速聚集，通过观察红色到紫色的颜色变化来间接测定脂肪酶酶活力，探针比色法试验原理见图1[33]。这种方法以吐温20为两亲性稳定剂，利用脂肪酶底物的多功能特性，克服了脂肪酶酶活力测定中脂质-水界面导致的局限性，具

有测定快速、稳定性好、操作简单等优点，但不适合在乳化条件下进行脂肪酶酶活力的测定。

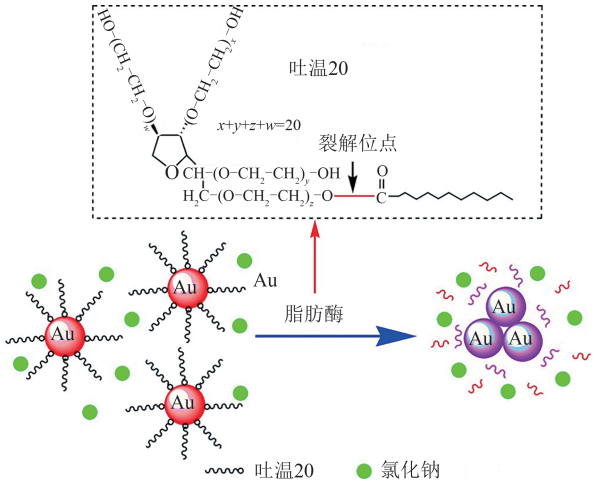


图 1　探针比色法试验原理

Fig. 1　Experimental principle of probe colorimetric assay

1.6　电化学流动注射分析法

电化学流动注射分析法通过使脂肪酶吸附至底物表面，催化底物水解并引起电化学氧化还原信号降低，信号降低速率与脂肪酶酶活力成正比，从而间接测定脂肪酶酶活力。

传统电化学方法使用的非特异性底物价格昂贵，且分析时间较长。Sarakhman 等[34]使用电化学流动注射分析法成功检测了药物制剂中的脂肪酶酶活力。Fuse 等[35]通过优化样品预处理、流动系统和电化学条件，使用 1,3-二亚油酰甘油作为底物，将分析时间缩短至 25 min；当酶活力为 0.8~18.0 U/L 时，流速信号和脂肪酶酶活力呈线性关系，LOD、LOQ 分别为 0.3、1.0 U/L。

电化学流动注射分析法具有灵敏度高、重现性好的优点，即使样品有颜色或浑浊均不会影响分析结果。这种方法有利于脂肪酶酶活力的快速即时检测，有望成为常规药物分析中测定脂肪酶酶活力的替代方法。然而，该方法存在效率低、试剂消耗和废物产生较多的缺点，并且存在电极钝化的问题。

2　脂肪酶酶活力检测的新兴方法

2.1　荧光探针法

荧光探针法是将荧光探针作为脂肪酶的特异性底物，当脂肪酶水解探针中的烷基时，会产生具有荧光的物质。通过检测荧光强度的变化对脂肪酶酶活力进行定性和定量分析，试验原理见图 2[36]。

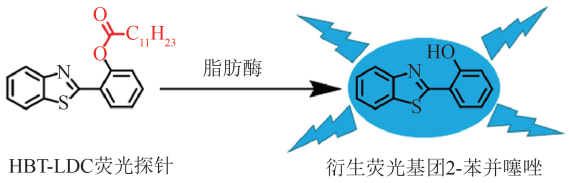


图 2　荧光探针法试验原理

Fig. 2　Experimental principle of probe fluorescent assay

在过去的几年里，研究者已陆续开发了基于聚集诱导发射（AIE）和自组装胶束的脂肪酶酶活力荧光探针。然而，两相系统限制了这些探针在细胞和组织中的应用。大多数酶特异性 AIE 荧光探针需要很高的水溶性才能确保其具有低背景信号，只有高亲水性的底物才能在 AIE 荧光探针上偶联，这限制了 AIE 在脂肪酶酶活力检测中的应用[36]。

脂肪酶是急性胰腺炎早期诊断的重要生物标志物，检测血清中脂肪酶酶活力对急性胰腺炎的诊断和评估具有重要作用。Qiao 等[37]使用荧光探针法检测血清中脂肪酶的水解活力，当荧光强度为 0~280 U/L 时，脂肪酶酶活力与荧光强度之间表现出良好的线性关系，检测限为 0.06 U/L。Luo 等[38]开发了一种新的荧光共振能量转移（FRET）探针，不需要前处理即可测量人血清中的脂肪酶酶活力。Yin 等[39]成功开发了一种新型近红外荧光探针，能够准确实时地监测急性胰腺炎发病过程中胰脂肪酶的波动，还可用于可视化活细胞和生物体中胰脂肪酶的变化。荧光探针法具有高选择性、高灵敏度和生物相容性等优点，并且能够在复杂生物样品中进行脂肪酶酶活力的快速检测。

2.2　基于生物传感器的检测方法

生物传感器是一种由生物识别元件和传感器组成的用于选择性检测生物标志物的分析设备[40]，目前已有多种生物传感器用于脂肪酶酶活力的检测。工业生产中需要相对简单、快速和精确的传感器来检测高酶活力的脂肪酶[41]。

2.2.1　基于光电化学（PEC）生物传感器的检测方法

PEC 生物传感器是一种新兴的生物传感器，是将 PEC 技术与生物识别技术结合，以光为激发源，利用光敏材料产生的光电流为检测信号，从而实现脂肪酶酶活力的检测。其原理为：在光照条件下脂肪酶和底物发生氧化还原反应，将化学信号转化为电信号，通过电信号的变化间接计算脂

肪酶酶活力。

PEC生物传感器因其低背景信号和易于小型化的特点，成为生物分析化学领域的研究热点。陈杰[42]构建了一种PEC生物传感器用于检测溶液体系中的脂肪酶酶活力，通过测定溶液中催化产生的抗坏血酸的电信号差异来反映脂肪酶酶活力，其线性相关系数为0.990 9，检测限为35 μmol/L。常慧琴[43]开发了一种基于TiO_2@Au的PEC生物传感器，通过优化酶浓度和反应时间等因素，仅需几分钟就完成了对微生物脂肪酶酶活力的检测。Wang等[44]构建了一种检测限低、检测范围广的PEC生物传感器，用于检测籽油精炼过程中的脂肪酶酶活力，检测范围为0.1~6.0 U/mL，检测限为0.069 U/mL，标准添加回收率为98.68%~105.41%，相对标准偏差为2.1%~3.5%。基于PEC生物传感器的脂肪酶酶活力检测方法具有设备简单、选择性好、易于小型化和集成化等优点，可广泛应用于食品中脂肪酶酶活力的检测。

2.2.2　基于液晶生物传感器的检测方法

液晶生物传感器检测技术通过将脂肪酶催化甘油三油酸酯的水解反应引入向列型液晶4-氰基-4'-戊基联苯体系，基于酶促反应引起的液晶分子取向变化所导致的光学信号响应，实现了酶促反应过程的实时动态监测，试验原理见图3[45]。

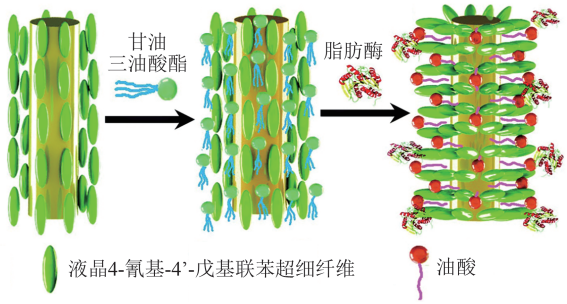


图3　液晶生物传感器原理

Fig. 3　Principle of liquid crystal biosensor

液晶生物传感器能将发生在表面或流体界面的化学和生物相互作用放大，并转化为肉眼可见的光学信号。Duan等[45]利用液晶超细纤维生物传感器在200 s内能检测到水溶液中质量浓度低至0.01 μg/mL的脂肪酶。Hussain等[46]结合液晶光学特性与脂肪酶酶活力检测原理，实现了对脂肪酶酶活力的快速、灵敏检测。

2.2.3　基于其他生物传感器的检测方法

2019年，Zlatev等[41]基于脂肪酶催化的降解反应，利用水解薄纳米复合基材敏感层原理，开发了一种基于阻抗生物传感器的简单、快速检测脂肪酶酶活力的方法。在2021年，他们又构建了一种电容式脂肪酶酶活力生物传感器，并通过标准化滴定证明了该方法的可行性。该方法的相对标准偏差为1.36%，响应时间低至70~140 s[47]。

Xia等[48]建立了一种通过相分离引起黏度变化的纸基脂肪酶生物传感器，用于人血清样品中脂肪酶的定量分析。该传感器具有灵敏度高、检测限低的优点，检测限为0.052 U/mL。其原理是脂肪酶催化三油酸甘油酯产生油酸和甘油，通过测量pH试纸上的溶液流动距离，可以量化由相分离过程引起的水溶液的黏度变化，进而实现对脂肪酶酶活力的检测。

2.3　液体泡沫检测法

液体泡沫检测法通过脂肪酶水解发泡表面活性剂的酯键，将其转化为不起泡的分子，通过观察泡沫含量的变化，实现对脂肪酶酶活力的定性分析。该方法的优点是不需要专门的设备或使用荧光探针等标记物，可以用作检测由脂肪酶引起的疾病或生物膜的快速筛选，具有简便、直观和快速等优点[49]。

2.4　基于微流控芯片技术的检测方法

微流控芯片技术结合了微尺度流体控制和高效分析功能，集成了样品制备、反应和检测的全过程，实现了脂肪酶酶活力检测的微型化和自动化。通过设计微流控通道和反应区域，可以在极少量样品的情况下快速检测脂肪酶酶活力，显著提升了检测效率。

Jankowski等[50]开发的液滴式微流控平台为脂肪酶酶活力分析提供了新方法，其通过微型化反应环境，在降低试剂消耗的同时，显著提高了检测效率和精度。Oliveira等[51]将微流控技术与微生物固定化技术相结合，开发了高效、稳定的枯草芽孢杆菌固定化系统，显著提高了脂肪酶的生产率。该技术不仅简化了试验操作流程，还提高了数据获取的质量和速度，为相关领域的研究工作提供了强有力的技术支持。

3　脂肪酶酶活力检测方法比较

进行脂肪酶酶活力测定时，需要根据不同的环境和脂肪酶的特性选择合适的检测方法。不同脂肪酶酶活力检测方法的优缺点和应用范围见表2。

表 2 脂肪酶酶活力检测方法对比

Table 2 Comparison of lipase enzyme activity detection methods

分类	检测方法	优点	缺点	应用范围
传统方法	平板检测法	操作简单、可大量筛选样品	检测限较高、灵敏度较低	适用于脂肪酶的初步筛选或粗略定量
	滴定法	简单便宜、精确度较高	操作过程耗时	常用于实验室和工业生产中脂肪酶酶活力的测定
	铜皂比色法	简单、快速、样品量少	灵敏度低、适用范围有限	常用于纯化脂肪酶的定量动力学研究
	对硝基苯酚法	简单快速、精确度高	试剂有毒、需要标准品	适合实验室对脂肪酶酶活力的精确测定
	探针比色法	测量快速、稳定性好、操作简单	不适合乳化条件下的脂肪酶酶活力的测定	可进行两相环境中的脂肪酶酶活力的检测
	电化学流动注射分析法	灵敏度高、重现性好、简单快捷	效率低，易产生试剂消耗和废物，并且存在电极钝化的问题	适用于不透明（浑浊）和有色介质溶液中的脂肪酶酶活力检测
新兴方法	荧光探针法	灵敏度高、可快速检测	探针设计复杂、易受干扰	适合在复杂生物样品中进行脂肪酶酶活力的快速检测
	基于生物传感器的检测方法	可实时监测和快速响应	稳定性差、操作复杂	广泛应用于食品领域中的脂肪酶酶活力检测
	液体泡沫检测法	操作简单、直观性强	灵敏度低、重复性差	适合脂肪酶酶活力的粗略测定
	基于微流控芯片技术的检测方法	自动化、样品损耗少、多参数同时检测	成本和技术门槛高	适合少量样品的脂肪酶酶活力测定

4 展望

对脂肪酶进行酶活力检测具有重要的科学意义和经济意义。目前的检测方法通常是利用特定的底物对其进行快速检测，并根据颜色、电信号、荧光强度的变化来测定酶活力。但常用的检测方法（如滴定法、对硝基苯酚法、探针比色法）存在一定的局限性。另外，由于脂肪酶催化底物的多样性和试验目的不同，导致检测方法也是多样的。随着科技的进步和新方法的建立，将会有灵敏度高、简单便捷的方法用于脂肪酶酶活力的检测。

脂肪酶作为一种绿色催化剂，因其对环境友好、催化效率高的特点广泛应用于食品行业。在未来的脂肪酶酶活力检测研究中，通过建立脂肪酶底物指纹谱和改进技术手段，可以更好地揭示未知脂肪酶的底物选择性和特异性，实现复杂脂肪酶体系的靶向分析。

参考文献

[1] BANSAL S，SARDAR S，SINHA K，et al. Identification and molecular characterization of rice bran-specific lipases [J]. Plant Cell Reports，2021，40（7）：1215-1228.

[2] POHANKA M. Biosensors and bioassays based on lipases，principles and applications，a review[J]. Molecules，2019，24（3）：616.

[3] REJEB I，ARDUINI F，AMINE A，et al. Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination[J]. Analytica Chimica Acta，2007，594（1）：1-8.

[4] STARODUB N F. Biosensors for the evaluation of lipase activity[J]. Journal of Molecular Catalysis B：Enzymatic，2006，40（3/4）：155-160.

[5] 张瑛，吴跃进，何成芳，等. 一种新的水稻种子碱性脂肪酶活性快速检测方法及其应用[J]. 中国农业科技导报，2009，11（Suppl. 2）：43-45，59.
ZHANG Y，WU Y J，HE C F，et al. A new method for rapid detection of alkaline lipase activity in rice seeds and its application[J]. Journal of Agricultural Science and Technology，2009，11（Suppl. 2）：43-45，59.（in Chinese）

[6] SAMAD M Y A，RAZAK C N A，SALLEH A B，et al. A plate assay for primary screening of lipase activity[J]. Journal of Microbiological Methods，1989，9（1）：51-56.

[7] ÜLKER S，PLACIDI C，POINT V，et al. New lipase assay using Pomegranate oil coating in microtiter plates[J]. Biochimie，2016，120：110-118.

[8] MIKSCH L，GUTOW L，SABOROWSKI R. pH-stat titration：a rapid assay for enzymatic degradability of bio-based polymers[J]. Polymers，2021，13（6）：860.

[9] VAHL K，KAHLERT H，BÖTTCHER D，et al. A potential high-throughput method for the determination of lipase activity by potentiometric flow injection titrations[J]. Analytica Chimica Acta，2008，610（1）：44-49.

[10] MEHROTRA K N，MEHTA V P，NAGAR T N. Studies on colorimetry，solubility and thermodynamic properties of copper soap solutions[J]. Journal Für Praktische

Chemie，1971，313(4)：607-613.
[11] SAISUBURAMANIYAN N，KRITHIKA L，DILEENA K P，et al. Lipase assay in soils by copper soap colorimetry [J]. Analytical Biochemistry，2004，330(1)：70-73.
[12] KWON C W，PARK K M，CHOI S J，et al. A reliable and reproducible method for the lipase assay in an AOT/isooctane reversed micellar system：modification of the copper-soap colorimetric method[J]. Food Chemistry，2015，182：236-241.
[13] ŠIBALIĆ D，ŠALIĆ A，ZELIĆ B，et al. A new spectrophotometric assay for measuring the hydrolytic activity of lipase from *Thermomyces lanuginosus*：a kinetic modeling[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering，2020，8(12)：4818-4826.
[14] SYEDD-LEÓN R，SANDOVAL-BARRANTES M，TRIMIÑO-VÁSQUEZ H，et al. Revisiting the fundamentals of *p*-nitrophenol analysis for its application in the quantification of lipases activity：a graphical update[J]. Uniciencia，2020，34(2)：31-43.
[15] STEMLER C D，SCHERF K A. Comparative characterization of baking lipase substrate specificities using emulsions and the *p*-nitrophenyl assay[J]. LWT-Food Science and Technology，2022，168：113914.
[16] PALACIOS D，BUSTO M D，ORTEGA N. Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media[J]. LWT-Food Science and Technology，2014，55(2)：536-542.
[17] NURUL FURQAN B R，AKHMALOKA. Heterologous expression and characterization of thermostable lipase (Lk1) in *Pichia pastoris* GS115[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology，2020，23：101448.
[18] MALEKABADI S，BADOEI-DALFARD A，KARAMI Z. Biochemical characterization of a novel cold-active，halophilic and organic solvent-tolerant lipase from *B. licheniformis* KM12 with potential application for biodiesel production [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2018，109：389-398.
[19] LIN Y P，LI Q M，XIE L X，et al. *Mycobacterium tuberculosis* rv1400c encodes functional lipase/esterase [J]. Protein Expression and Purification，2017，129：143-149.
[20] BOUTAIBA S，BHATNAGAR T，HACENE H，et al. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon，*Natronococcus* sp.[J]. Journal of Molecular Catalysis B：Enzymatic，2006，41(1/2)：21-26.
[21] HU J，CAI W H，WANG C G，et al. Purification and characterization of alkaline lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* HFE733 and application for biodegradation in food wastewater treatment [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment，2018，32(3)：583-590.
[22] AL-LIMOUN M O，KHLEIFAT K M，ALSHARAFA K Y，et al. Purification and characterization of a mesophilic organic solvent tolerant lipase produced by *Acinetobacter* sp. K5b4 [J]. Biocatalysis and Biotransformation，2019，37(2)：139-151.
[23] BAKIR Z B，METIN K. Purification and characterization of an alkali-thermostable lipase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology，2016，26(6)：1087-1097.
[24] CHRISTOPHER L P，ZAMBARE V P，ZAMBARE A，et al. A thermo-alkaline lipase from a new thermophile *Geobacillus thermodenitrificans* AV-5 with potential application in biodiesel production [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology，2015，90(11)：2007-2016.
[25] PING L F，YUAN X L，ZHANG M，et al. Improvement of extracellular lipase production by a newly isolated *Yarrowia lipolytica* mutant and its application in the biosynthesis of *L*-ascorbyl palmitate[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2018，106：302-311.
[26] PRIYANKA P，KINSELLA G，HENEHAN G T，et al. Isolation，purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei* [J]. Protein Expression and Purification，2019，153：121-130.
[27] 张维清. 原料奶中荧光假单胞菌耐热性脂肪酶周质表达及酶学特性研究[D]. 北京：中国农业科学院研究院，2018.
[28] DAI L C，HU S Z，PANG X Y，et al. Community diversity of psychrophilic bacteria in dairy farm raw milk and its characteristic enzyme production at different temperature[J]. Food Bioscience，2023，54：102921.
[29] ZHAO J X，MA M M，YAN X H，et al. Expression and characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for application in enhancing fatty acids flavor release for low-fat cheeses[J]. Food Chemistry，2022，368：130868.
[30] NUR N，SUWANTO A，MERYANDINI A，et al. Cloning and characterization of an acidic lipase from a lipolytic bacterium in tempeh[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology，2023，21(1)：157.
[31] 肖素静，曹艳，孙磊，等. 耐有机溶剂脂肪酶产生菌的筛选及其酶学性质[J]. 食品与生物技术学报，2009，

28(6):816-821.
XIAO S J, CAO Y, SUN L, et al. Isolation of an organic solvent-tolerant lipase producing strain and characterization of the crude lipase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2009, 28(6): 816-821. (in Chinese)
[32] 王春雨,迟乃玉,张庆芳,等. 低温脂肪酶的分离纯化及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(8):809-813.
WANG C Y, CHI N Y, ZHANG Q F, et al. Purification and enzymatic properties of cryogenic lipase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(8): 809-813. (in Chinese)
[33] ZHANG W, TANG Y, LIU J, et al. Colorimetric assay for heterogeneous-catalyzed lipase activity: enzyme-regulated gold nanoparticle aggregation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(1): 39-42.
[34] SARAKHMAN O, WENNINGER N, ROGALA A, et al. Electrochemical flow injection approach for routine screening of lipase activity in pancreatic preparations[J]. Talanta, 2023, 260: 124588.
[35] FUSE T, ODA G, ARAI K, et al. Electrochemical determination of lipase activity in pharmaceutical preparations[J]. Electrochimica Acta, 2000, 45(18): 2933-2937.
[36] ZHANG F, DU T, JIANG L, et al. A combined "AIE + ESIPT" fluorescent probe for detection of lipase activity [J]. Bioorganic Chemistry, 2022, 128: 106026.
[37] QIAO Z, ZHANG H Y, ZHANG Y R, et al. Detection of lipase activity in cells by a fluorescent probe based on formation of self-assembled micelles[J]. iScience, 2020, 23(7): 101294.
[38] LUO J J, ZHANG H Y, GUAN J L, et al. Detection of lipase activity in human serum based on a ratiometric fluorescent probe[J]. New Journal of Chemistry, 2021, 45(21): 9561-9568.
[39] YIN Q Y, YANG W J, HUANG Y Z, et al. Near-infrared imaging of acute pancreatitis with a pancreatic lipase-monitoring fluorescence probe[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2024, 414: 135970.
[40] VIGNESHVAR S, SUDHAKUMARI C C, SENTHILKUMARAN B, et al. Recent advances in biosensor technology for potential applications: an overview [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2016, 4: 11.
[41] ZLATEV R, STOYTCHEVA M, VALDEZ B, et al. Simple impedimetric sensor for rapid lipase activity quantification[J]. Talanta, 2019, 203: 161-167.
[42] 陈杰. 牛奶脂肪酶生物传感器检测方法研究[D]. 淄博:山东理工大学,2019.
[43] 常慧琴. 乳品典型脂肪酶酶型生物传感分析方法研究[D]. 淄博:山东理工大学,2023.
[44] WANG L Q, ZHANG H R, LI Z Y, et al. Development of a three-dimensional graphene-based photoelectrochemical biosensor and its use for monitoring lipase activity [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 170: 114076.
[45] DUAN R, LI Y Z, HE Y C, et al. Quantitative and sensitive detection of lipase using a liquid crystal microfiber biosensor based on the whispering-gallery mode[J]. Analyst, 2020, 145(23): 7595-7602.
[46] HUSSAIN Z, ZAFIU C, KÜPCÜ S, et al. Liquid crystal based sensors monitoring lipase activity: a new rapid and sensitive method for cytotoxicity assays[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 56: 210-216.
[47] ZLATEV R, STOYTCHEVA M, GOCHEV V, et al. Rapid disposable lipase activity sensor for automatic industrial application[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2021, 35(1): 315-324.
[48] XIA S, YIN F C, XU L L, et al. Paper-based distance sensor for the detection of lipase *via* a phase separation-induced viscosity change [J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(49): 17055-17062.
[49] SCHAD T, ZAUSER D, FAMEAU A L, et al. Detection of lipase activity with liquid foams [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2024, 683: 132995.
[50] JANKOWSKI P, SAMBORSKI A, OSTASZEWSKI R, et al. Evaluation of droplet-based microfluidic platforms as a convenient tool for lipases and esterases assays[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2019, 49(7): 727-734.
[51] OLIVEIRA A F, BASTOS R G, TORRE L G. *Bacillus subtilis* immobilization in alginate microfluidic-based microparticles aiming to improve lipase productivity[J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 143: 110-120.

(责任编辑:刘冬梅)