

# 米曲霉As-W6脂肪酶的分离纯化及酶学性质研究

王开萍,李红卫,吴 娱,唐正江,汤 飞,刘国庆\*  
(合肥工业大学生物与食品工程学院,安徽合肥 230009)

**摘要:**米曲霉As-W6的脂肪酶发酵上清液经硫酸铵分级沉淀、透析、DEAE-52纤维素离子交换层析和Sephadex G-75葡聚糖凝胶过滤层析纯化后得到电泳纯的脂肪酶,纯化倍数为86.7倍,回收率为23.2%,相对分子质量为40.8 ku,酶学性质研究表明,该脂肪酶最适反应温度和最适pH分别为40 ℃和7,在40 ℃以下和pH6~8之间有较好的稳定性;Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>和丙酮能够明显促进提高脂肪酶的活性,而Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和SDS对其有显著抑制作用;当大豆油作为底物时该脂肪酶的酶活力最高,表明其对大豆油具有显著的特异性。

**关键词:**米曲霉,脂肪酶,分离纯化,酶学性质

## Study on purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae* As-W6

WANG Kai-ping, LI Hong-wei, WU Yu, TANG Zheng-jiang, TANG Fei, LIU Guo-qing\*

(College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** A lipase from *Aspergillus oryzae* As-W6 was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, dialysis, DEAE-52 cellulose column anion exchange chromatography and Sephadex G-75 gel filtration chromatography. The purification protocol resulted in a 86.7-fold purification with a yield of 23.2%, the relative molecular weight of the purified lipase was 40.8 ku. The optimum temperature and pH of the purified lipase was 40 ℃ and 7, respectively. The lipase was stable over ranges of pH(6~8) and under the temperature 40 ℃. The lipase activity was enhanced by Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Acetone, while inhibited by Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and SDS. It achieved maximum values when soybean oil used as substrate, which indicated that the lipase showed a significant specificity toward soybean oil.

**Key words:** *Aspergillus oryzae*; lipase; purification; properties

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)18-0229-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.18.037

脂肪酶(acylglycerol hydrolases, EC 3.1.1.3)是一类能催化水解脂肪酸和油脂为甘油和游离脂肪酸的生物催化剂,广泛存于动物、植物各种组织和微生物中<sup>[1]</sup>。脂肪酶因具有巨大的生理意义和工业应用范围而受到广泛关注,近年来,脂肪酶已广泛应用于食品、药品、化妆品、洗涤剂、制革、有机合成等行业<sup>[2]</sup>。生物来源的脂肪酶具有比动植物更广的作用pH、作用温度范围,以及底物专一性,且微生物来源的脂肪酶一般都是分泌性的胞外酶,适合于工业化大生产和获得高纯度样品,因此微生物脂肪酶是工业用脂肪酶的重要来源<sup>[3]</sup>。最常用的脂肪酶生产菌有曲霉、根霉、毛霉、青霉菌属等<sup>[4-6]</sup>。米曲霉是脂肪酶生产者之一,且米曲霉脂肪酶具有良好的生物安全性,因而

被广泛应用在脂肪酶生产行业或其他相关行业<sup>[7-8]</sup>。*Aspergillus oryzae* As-W6是本实验室筛选保存的一株产脂肪酶菌,产酶量高,培养要求简单,可进行大批量生产,国内外有关米曲霉产脂肪酶的研究相对较少,文献报道的米曲霉所产脂肪酶的温度、pH作用范围不大,稳定性不高<sup>[9-10]</sup>。本文对该米曲霉脂肪酶的分离纯化进行研究,提供了一种有关脂肪酶分离纯化的方法,该脂肪酶具有良好的温度稳定性和pH稳定范围,其具有良好的工业应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

*Aspergillus oryzae* As-W6 本实验室选育保存菌种; DEAE纤维素、Sephadex G-75葡聚糖凝胶、聚

收稿日期: 2014-11-14

作者简介: 王开萍(1989-),女,硕士研究生,研究方向:食品科学,E-mail: paigewang0919@163.com。

\* 通讯作者: 刘国庆(1963-),男,博士,教授,研究方向:食品质量与安全,动物营养研究,E-mail: liugq\_168@163.com。

基金项目:安徽省皖江禽产业研究院基金项目(1401c063015)。

丙烯酰胺 Marker Sigma公司; SDS-PAGE凝胶配制试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司; 硫酸铵、甲醇、乙醇、丙醇、聚乙烯醇、橄榄油 国药化学试剂有限公司, 分析纯。

SW-CJ-1D型超净工作台 苏州净化有限公司; SPX-150B型生化恒温培养箱 上海博泰实验设备有限公司; 752型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; SYQ-DSX-280B型高压灭菌锅 上海申安医疗器械厂; THZ-92B型摇床 上海博泰实验设备有限公司; HH-2型数显恒温水浴锅 金坛市杰瑞尔电气有限公司; TDL-50B型台式离心机 上海安亭科学仪器厂; SBE-6003型电泳仪 上海博彩生物技术有限公司; GmbH紫外凝胶成像系统 美国Biostep公司。

## 1.2 脂肪酶的发酵生产与制备

脂肪酶的发酵生产参照陈林林等<sup>[11]</sup>的报道。菌株在PDA培养基上活化后, 用无菌水制成孢子悬浮液, 每毫升含 $10^5 \sim 10^6$ 个孢子。按2%的接种量接到发酵培养基(酵母浸膏1%, 葡萄糖1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%,  $\text{KCl}$  0.05%,  $\text{NaNO}_3$  0.05%, 橄榄油乳化液4%)中, 在32℃, 180 r/min发酵培养72 h。

## 1.3 脂肪酶酶活的测定

脂肪酶酶活的测定采用聚乙烯醇橄榄油乳化液水解滴定法<sup>[12]</sup>。酶活力单位定义: 在40℃, pH7.0条件下水解橄榄油乳化液, 每分钟产生1  $\mu\text{mol}$ 游离脂肪酶所需要的酶量, 即为1个脂肪酶活力单位(1U)。

## 1.4 蛋白质含量的测定

蛋白质含量的测定采用Bradford法<sup>[13]</sup>测定, 用牛血清蛋白(BSA)作为标准蛋白。

## 1.5 脂肪酶的分离纯化

1.5.1 硫酸铵沉淀 参考舒正玉等<sup>[14]</sup>的方法加以改进, 将发酵液用双层纱布过滤后, 4℃, 12000 r/min离心20 min得到发酵上清液, 用0.45 mm的微孔滤膜过滤上清液除去橄榄油。收集滤液, 将其作为酶液的粗提取, 酶活被定义为100%, 用来计算纯化过程中的回收率, 回收率=每步总活力/原液总活力, 比活力=总活力/总蛋白。先将粗酶液中加入硫酸铵细粉末至30%饱和度, 去除杂蛋白沉淀, 再向上清液中加入硫酸铵细粉末至80%饱和度, 离心收集沉淀, 透析脱盐后冷冻干燥保存备用。

1.5.2 离子交换层析 将上述保存的酶溶解于0.05 mol/L, pH=7的Tris-HCl缓冲液中, 然后上样于装有DEAE-52纤维素的层析柱中(1.8 cm $\times$ 100 cm), 以0~1.0 mol/L NaCl线性梯度洗脱, 洗脱液流速为1.0 mL/min。在280 nm波长下, 测定每管洗脱液的酶活力, 收集合并有活性部分, 真空冷冻干燥。

1.5.3 凝胶过滤层析 将上一步冷冻干燥的酶粉溶解于0.05 mol/L, pH=7的Tris-HCl缓冲液中, 然后上样于装有Sephadex G-75葡聚糖凝胶的层析柱中(2.6 cm $\times$ 10 cm), 以0~1.0 mol/L NaCl线性梯度洗脱, 洗脱液流速为1.0 mL/min。按上述方法测定每管洗脱液的酶活性, 收集合并有活性部分, 真空冷冻干燥。

1.5.4 脂肪酶分子量的测定 采用聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳法(SDS-PAGE)测定纯化酶的分子量, 参照1970年Laemmli的方法<sup>[15]</sup>, 根据胶浓度与最佳分离分子量范围的关系, 选取分离胶的浓度为12%, 浓缩胶的浓度为5%, 用考马斯亮蓝G-250染色。蛋白质标准Marker的分子质量为19~117 ku。

## 1.6 酶学性质研究

1.6.1 不同温度对脂肪酶活性及其稳定性的影响 将反应体系分别置于在20、30、40、50、60℃的水浴中, 分别测定脂肪酶的酶活力, 确定最适反应温度。取同样浓度的脂肪酶分别置于20、25、30、35、40、45、50、55、60℃的水浴中保温4 h, 每隔1 h取样测定残留酶活, 用未经处理的酶液的酶活为100%。

1.6.2 不同pH对脂肪酶活性及其稳定性的影响 将酶液分别与等量的pH4~10的系列缓冲液混合, 测定脂肪酶的酶活。系列缓冲液为: 50 mmol/L醋酸盐缓冲液(pH4~5), 50 mmol/L柠檬酸缓冲液(pH5~6), 50 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH6~8), 50 mmol/L Tris缓冲液(pH8~9), 50 mmol/L碳酸盐缓冲液(pH9~10)。脂肪酶在pH4~10条件下分别在40℃保温1 h后, 测定脂肪酶残留酶活, 以最适条件下的酶活为100%。

1.6.3 不同金属离子对脂肪酶活性的影响 在测酶活反应体系中, 分别加入终浓度为1 mmol/L和5 mmol/L的 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 金属盐离子, 阴离子均为氯离子, 30℃下放置30 min, 分别测定脂肪酶的残留酶活, 以不加金属离子的酶液作对照(100%)。

1.6.4 不同有机溶剂对脂肪酶活性的影响 将甲醇、乙醇、丙酮、EDTA、SDS、Tween-80 6种有机溶剂分别按1%、5%的量加入酶反应体系, 然后反应30 min, 分别测定脂肪酶的残留酶活, 以未加入有机溶剂的酶液作为对照组(100%)。

1.6.5 脂肪酶对不同底物的水解特异性 参照Rigo等<sup>[16]</sup>的方法测定脂肪酶对不同底物的水解特异性, 将橄榄油、大豆油、棕榈油、丁酸甲酯、辛酸甲酯、月桂酸甲酯、棕榈酸甲酯和硬脂酸甲酯作为脂肪酶水解反应的底物, 分别测定脂肪酶的酶活, 以橄榄油为底物测得的酶活为100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 脂肪酶的纯化

牛血清蛋白标准曲线如图1所示,  $y=5.93x-0.01$ ,  $R^2=0.9978$ , 蛋白质浓度和吸光度呈良好的线性相关, 根据标准曲线计算样品蛋白的含量。经硫酸铵分级沉淀、DEAE-52纤维素阴离子交换层析和Sephadex G-75凝胶过滤层析纯化后, 脂肪酶蛋白纯化了86.7倍, 回收率为23.2%, 比活力为528.7。其中Sephadex G-75凝胶过滤层析效果最佳, 这一步纯化了6.9倍, 纯化结果见表1。采用聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳法(SDS-PAGE)测定纯化酶的分子量, 结果见图2, 图中第1列为蛋白质标准Marker, 第2列为粗酶液; 第3列为纯酶。从图2中可以看出, 第2列的粗酶液电泳所得的条带不止一条, 除目标酶外还有三条颜色和清晰度均比较暗的条带, 而纯化后的酶的条带如第3列所示, 呈现明亮清晰的单一条带, 目标蛋白位于34~49 ku

表1 米曲霉脂肪酶的纯化  
Table 1 Purification of lipase from *Aspergillus oryzae* As-W.6

纯化倍数	总蛋白含量(mg)	总活力(U)	比活力(U/mg)	回收率(%)	纯化倍数
粗酶液	3620.6±74	22100±143	6.1	100.0	1.0
硫酸铵沉淀	846.2±28	18700±112	22.1	84.6	3.6
DEAE-52纤维素层析	125.9±6	9640.8±89	76.6	43.6	12.6
Sephadex G-75凝胶过滤	9.7±0.1	5128.4±42	528.7	23.2	86.7

之间,这说明目标脂肪酶得到了较好的纯化,回收率较高。通过Quantity One软件对凝胶图像分析计算,得出目标脂肪酶蛋白的分子量约为40.8 ku。

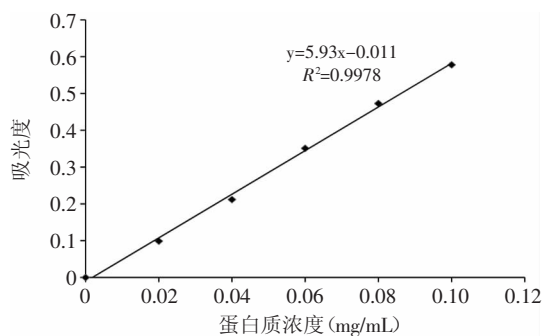


图1 牛血清蛋白标准曲线  
Fig.1 The standard curve of BSA

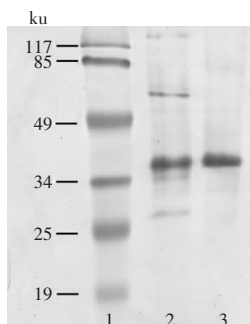


图2 米曲霉脂肪酶的SDS-PAGE凝胶电泳分析图  
Fig.2 SDS-PAGE analysis of lipase  
注: 1: 蛋白质标准Marker; 2: 粗酶液; 3: 纯酶。

## 2.2 米曲霉脂肪酶的最适温度及温度稳定性

在20~60 °C下分别测定脂肪酶的酶活力,结果见图3,酶的最适反应温度为40 °C,在温度不高于40 °C时,酶活力随温度的升高而增加,当温度高于40 °C

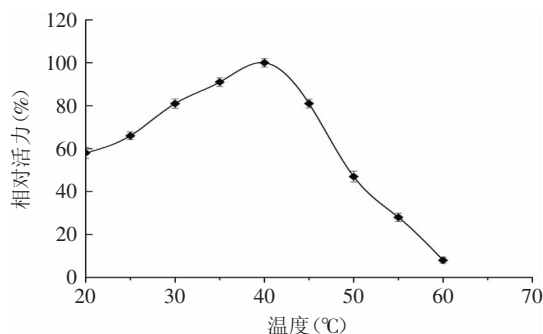


图3 温度对脂肪酶酶活力的影响  
Fig.3 Effect of temperature on enzyme activity

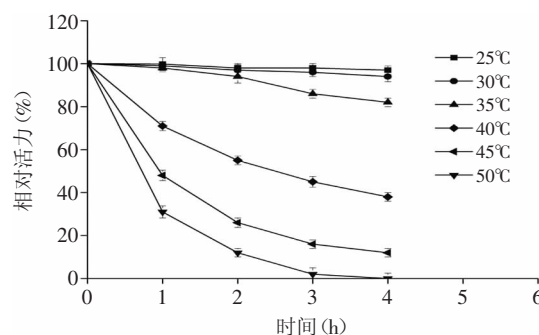


图4 脂肪酶的温度稳定性  
Fig.4 Heat stability of lipase

时,酶活力会随着温度的升高而降低,当温度达到60 °C时,酶活力仅为最适反应温度酶活力的8.6%。从图4中可以看出,该酶在35 °C下保温4 h后还有83.2%的残余酶活,所以该酶在25~35 °C具有较好的稳定性。

## 2.3 脂肪酶的最适pH和pH稳定性

由图5可知,脂肪酶作用的最适pH为7,且在pH在6~7.5范围内,酶活力均在80%以上。将脂肪酶酶液加入上述不同pH的缓冲液中,在40 °C下保温1 h后测定脂肪酶酶活,结果见图5。观察酶的pH稳定性曲线可知,在1 h的保温时间内,在pH<7时,pH的稳定性会随着pH的增大而增强;在pH>7时,pH的稳定性会随着pH的增大而减弱。在pH=4时保温1 h后,酶活力为保温前的酶活力的32.5%,但是在pH=10时保温1 h后,酶活力仅为保温前的酶活力的28.7%。由以上可知,该脂肪酶的最适反应pH为7,在pH 6~8时有较高的活力且在保温1 h后能保存70%以上的酶活。

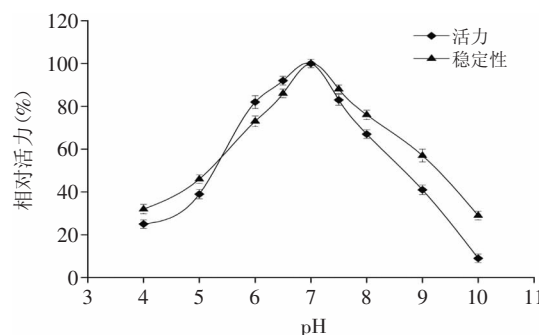


图5 pH对脂肪酶的酶活力和稳定性的影响  
Fig.5 Effect of pH on enzyme activity and stability

## 2.4 金属离子对脂肪酶活性的影响

如图6所示,在常见的几种二价金属离子中,浓度为1 mmol/L的Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>均能够激活酶的活

性,金属离子浓度增加为5 mmol/L时, $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 对酶活性的激活性降低,而 $\text{Zn}^{2+}$ 则抑制酶的活性, $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 对酶活性的抑制作用增强,这可能是由于金属离子浓度升高对酶活性起抑制作用。不同金属离子对酶活力的影响不同,其中 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 对酶活力的抑制作用极强, $\text{Mn}^{2+}$ 对酶活力也有抑制作用。此外,酶活力会随着几种金属离子浓度的增加均有所降低。因此,可以选择适当浓度的 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 作为该酶的活化剂,提高该脂肪酶的活力。

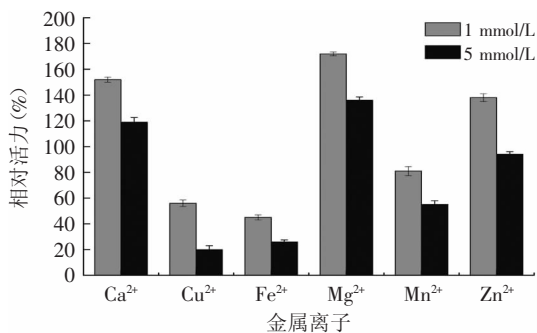


图6 不同金属离子对脂肪酶活性的影响

Fig.6 Effect of various metal ions on enzyme activity

## 2.5 有机溶剂对脂肪酶活性的影响

如图7所示,在常见的几种有机溶剂中,甲醇(1%)、丙醇(1%)和Tween-80(1%)能够进一步激活酶的活性,而乙醇、SDS和EDTA则抑制酶的活性。不同浓度的有机溶剂对酶活力的影响不同,但当浓度为5%时,这6种有机溶剂均对酶的活性起抑制作用。和金属离子相比,有机溶剂对酶活力的影响较小。由此可知,该脂肪酶是一种金属酶,金属离子对酶活的影响非常明显。

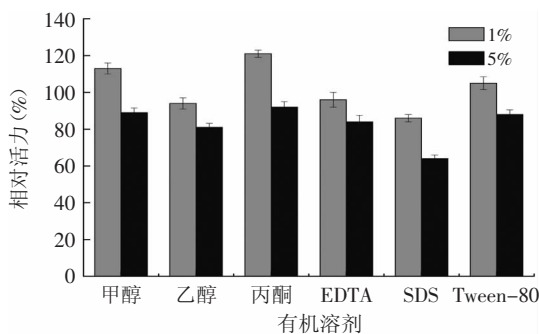


图7 不同有机溶剂对酶活的影响

Fig.7 Effect of various organic solvents on enzyme activity

## 2.6 脂肪酶对不同底物的水解特异性

从图8中可以看出,该脂肪酶对植物油的水解酶活力明显高于几种甲酯酸,其中大豆油表现最为明显的特异性。在5种甲酯酸中,该脂肪酶对C12、C16、C18显现出较高的酶活力,其中在C12时达到最高酶活力,这表明该脂肪酶对于长链甲酯酸表现出较好的水解酶活力,这与Rigo报道的从青霉菌(*Penicillium crustosum*)中纯化得到的脂肪酶的性质相似<sup>[6]</sup>。

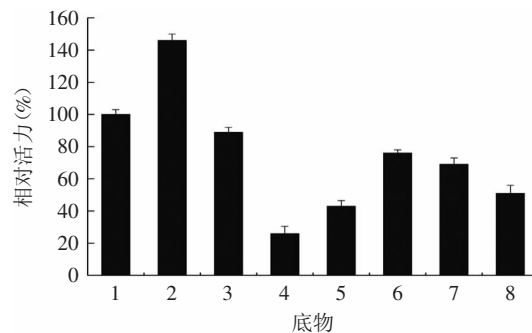


图8 脂肪酶水解不同底物的特异性

Fig.8 Substrate specificity of enzyme

注:1:橄榄油;2:大豆油;3:棕榈油;4:丁酸甲酯(C4);  
5:辛酸甲酯(C8);6:月桂酸甲酯(C12);7:棕榈酸甲酯(C16);  
8:硬脂酸甲酯(C18)。

## 3 结论

*Aspergillus oryzae* As-W6的脂肪酶发酵上清液经硫酸铵分级沉淀、透析、DEAE-52纤维素离子交换层析和Sephadex G-75葡聚糖凝胶过滤层析纯化后得到电泳纯的脂肪酶,SDS-PAGE电泳结果分析计算出其相对分子质量为40.8 ku,该脂肪酶的最适反应温度和最佳反应pH分别为40℃和7,在40℃以下和pH6~8之间具有较好的稳定性。该脂肪酶的酶学性质研究结果表明, $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 和丙酮能够明显促进提高脂肪酶的活性,其中 $\text{Ca}^{2+}$ 的活化效果最好,可使酶活提高30%,而 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 和SDS对其具有明显的抑制作用;此外该脂肪酶对大豆油表现出显著的特异性。

## 参考文献

- [1] 王颖,陈吉祥,王冰,等.热稳定性脂肪酶生产菌的筛选及其酶学性质研究[J].食品工业科技,2014,35(19):156-161.
- [2] Treichel H, Oliveira D, Marcio A, et al. A Review on Microbial Lipases Production[J]. Food Bioprocess Tech, 2010, 3(2): 182-196.
- [3] 徐岩,李建波,王栋.解脂假丝酵母脂肪酶的纯化及性质研究[J].无锡轻工大学学报,2001,20(6):257-260.
- [4] Godtfredsen SE. Microbial lipases[M]. Microbial Enzymes and Biotechnology, 1990: 255-274.
- [5] Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, et al. Microbial lipases: production and applications[J]. Sci Prog, 1996, 79: 119-157.
- [6] Rubin B, Dennis EA. Methods in Enzymology: Lipases, Part B: Enzyme Characterization and Utilization[M]. Maryland Heights: Academic Press, 1997: 509-519.
- [7] El-Atta H A, Aref I M, Khalil S A. Increased gum Arabic production after infestation of *Acacia Senegal* with *Aspergillus flavus* and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Transmitted by *Agrilus nubeculosus*[J]. Biotechnol, 2011, 10: 159-166.
- [8] Elbashedi T, Fayyad A, Elkichaoui A. Isolation and identification of *Aspergillus oryzae* and the production of soy sauce with new aroma[J]. Pak J Nutr, 2010, 9: 1171-1175.
- [9] Contesini FJ, Lopes DB, Macedo GA, et al. *Aspergillus sp.*

(下转第243页)

25-26.

- [2] 徐怀德,唐菊,刘立芳. 猪胰脂肪酶水解花椒籽油动力学及条件优化[J]. 食品科学, 2010, 31(15):55-59.
- [3] 甘争艳. 无溶剂及微乳液体系中脂肪酶催化油脂水解反应研究[D]. 乌鲁木齐:新疆大学, 2006.
- [4] 刘亚轩. 超声波作用下脂肪酶催化豆油水解反应的研究[D]. 无锡:江南大学, 2008.
- [5] Zhao L L, Xu J H, Pan J, et al. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010[J]. Process Biochem, 2008, 43(6):626-633.
- [6] Rogalska E, Cudrey C, Ferrato F, et al. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases [J]. Chirality, 1993, 5(1):24-30.
- [7] 臧佳辰,陶莎,薛璟怡,等. 大麻油脂肪酶水解条件的优化研究[J]. 中国油脂, 2013, 38(7):56-59.
- [8] 徐怀德,唐菊,刘立芳. 猪胰脂肪酶水解花椒籽油动力学及条件优化[J]. 食品科学, 2010, 31(15):55-59.
- [9] 高巍,杨立昌,洪鲲,等. TLIM脂肪酶对油脂水解特性的研究[J]. 粮油加工, 2010(4):14-18.
- [10] Ramachandran K B, Al-Zuhair S, Fong C S, et al. Kinetic study on hydrolysis of oils by lipase with ultrasonic emulsification[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 32(1):19-24.
- [11] Meenal S Puthli, Virendra K Rathod, Aniruddha B Pandit. Enzymatic hydrolysis of castor oil: Process intensification studies [J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 31(1):31-41.
- [12] 向小乐,黄群,杨万根,等. 超声波辅助脂肪酶水解茶叶籽油条件的优化与动力学研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(2):

141-146.

- [13] 向小乐,余伎,杨万根,等. 探头式超声乳化催化脂肪酶 TLIM水解C茶叶籽油工业优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(3):167-171.
- [14] Dike Teng, Rensi Le, Fang Yuan, et al. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Chicken Fat in Emulsion by Response Surface Methodology[J]. J Am Oil Chem Soc, 2009, 86(5):485-494.
- [15] 董恒涛. 粗状假丝酵母脂肪酶的分离纯化水解乳脂的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2010.
- [16] 黄卓烈,林茹,何平,等. 超声波对酵母过氧化氢酶及多酚氧化酶活性的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4):89-93.
- [17] 甘争艳,吾满江·艾力,贾殿增,等. 无溶剂体系中脂肪酶催化红花油水解反应[J]. 应用化学, 2006, 23(8):902-906.
- [18] K Ramani, L John Kennedy, M Ramakrishnan, et al. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(10):1683-1691.
- [19] 黄甫. 酶促油脂水解-酯化两步法合成生物柴油的研究[D]. 北京:北京化工大学, 2012.
- [20] 张玉霞. 单一AOT微乳液与AOT/TritonX-100混合微乳液体系中假丝酵母脂肪酶催化蓖麻油水解的研究[D]. 兰州:兰州大学, 2007.
- [21] Martinek K, Klyachko N L, Kabanov A V, et al. Micellar Enzymology: its Relation to Membranology [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 981(2):161-172.

(上接第228页)

- [15] 汤斌,张莹莹,杨亚平. 葡枝根霉TP-02内切葡聚糖酶基因eg2的克隆表达及功能分析[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(7):13-17.
- [16] 程抒劫,郑兰娟,林俊芳,等. 纤维素酶活力测定研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(7):334-336.
- [17] 赵梅,魏喜换,王春娟,等. 耐热 $\beta$ -甘露聚糖酶基因的克隆与表达及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(6):590-596.
- [18] Lee H J, Irwin B W. Enzymatic parameters measurement of

V and  $K_m$  [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Enzymology, 1971, 242:519-522.

- [19] 刘洋,王一琰,白黎婧,等. 一株酸性淀粉酶产生菌的分离鉴定及其酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(4):174-178.
- [20] Zhong L H, Matthews J F, Hansen P I, et al. Computational simulations of the *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I acting on microcrystalline cellulose I  $\beta$ : the enzyme-substrate complex [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(15):1984-1992.

(上接第232页)

- lipase: Potential biocatalyst for industrial use [J]. J Mol Catal B: Enzym, 2010, 67:163-171.
- [10] Jing Zhou, Wen-Wei Chen, Zheng-Bao Jia, et al. Purification and Characterization of Lipase Produced by *Aspergillus oryzae* CJLU-31 Isolated from Waste Cooking Oily Soil [J]. Am J Food Technol, 2012, 7(10):596-608.
- [11] 陈林林,辛嘉英,张颖鑫,等. 粗状假丝酵母产脂肪酶发酵条件的优化[J]. 食品工业科技, 2010(1):183-185.
- [12] 何耀强,王炳武,谭天伟. 假丝酵母99-125脂肪酶的发酵工艺研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(6):918-921.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72:248-254.

- [14] 舒正玉,杨江科,闫云君. 黑曲霉F044脂肪酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. 生物工程学报, 2007, 23(1):96-100.
- [15] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nat, 1970, 227:680-685.
- [16] Rigo E, Ninow JL, Tsai SM, et al. Preliminary characterization of novel extra-cellular lipase from *Penicillium crustosum* under solid-state fermentation and its potential application for triglycerides hydrolysis [J]. Food Bioprocess Technol, 2012, 5:1592-1600.