

固定化嗜热嗜碱土芽孢杆菌 T1 脂肪酶的制备及其催化特性研究

汪璞¹, 王方华², 唐庆芸², 王永华², 杨博¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)(2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要:以葡聚糖填料作为载体, 采用共价结合法对嗜热嗜碱土芽孢杆菌 T1 脂肪酶进行固定化, 在获得固定化酶制备的最佳方案的基础上进一步考察固定化酶的催化特性。在单因素实验中, 2-碘酰基苯甲酸终浓度 1.23%、固定化温度 50 °C、固定化时间 2 h 的条件下效果最好, 酶活力达到 50.25 U/mg 基质。利用该固定化酶催化橄榄油和甲醇进行醇解反应生成脂肪酸甲酯, 60 h 后得率为 14.08%。同时, 对固定化脂肪酶的热稳定性以及有机溶剂耐受性进行了研究, 结果发现固定化 T1 脂肪酶在 60 °C 孵育 7 h 后依然保持 70% 以上的酶活性; 且除甲醇、乙醇外, 固定化 T1 脂肪酶在经过正丁醇、正丙醇、异丙醇处理后酶活力能够增加到 120%~140%。以上催化特性研究的结果表明, 该固定化酶具有催化甲醇生成生物柴油的潜力, 具有良好的热稳定性和有机溶剂耐受性, 是一种具有良好工业应用前景的脂肪酶。

关键词: T1 脂肪酶; 固定化; 生物柴油; 耐受性

文章编号: 1673-9078(2015)5-175-180

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.028

Preparation and Catalytic Properties of Immobilized Thermoalkaliphilic T1 Lipase from *Geobacillus* sp. Strain T1

WANG Pu¹, WANG Fang-hua², TANG Qing-yun², WANG Yong-hua², YANG Bo¹

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Using glucan as carrier, thermoalkaliphilic T1 lipase from *Geobacillus* sp. strain T1 was immobilized via covalent binding. The optimized conditions for enzyme preparation were established and catalytic properties of the immobilized T1 lipase were determined. In a single-factor experiment, specific activity of immobilized T1 lipase reached 50.25 U/mg matrix by using optimal conditions including 1.23% 2-iodoxy benzoate, immobilization temperature of 50 °C and time for 2 h. Immobilized T1 lipase was used to catalyze the alcoholysis of olive oil and methanol, yielding 14.08% fatty acid methyl esters after 60 h. Meanwhile, the thermostability and organic solvent tolerance of the immobilized T1 lipase were also studied. The results indicated that the immobilized T1 lipase could maintain more than 70% of its activity after a 7-h incubation at 60 °C, and the activity increased to 120% to 140% after treatment with n-butanol, n-propanol, and isopropanol, in addition to methanol and ethanol. These results demonstrate that immobilized T1 lipase has a potential to catalyze the reaction involving methanol to produce biodiesel and exhibits good thermostability and organic solvent tolerance; therefore, it has potential for industrial application.

Key words: T1 lipase; immobilization; biodiesel; tolerance

广泛存在于动植物和微生物、具有广谱催化能力的脂肪酶已成为有机合成中重要的生物催化剂, 它能在油-水界面上催化水解、醇解、酯合成、酯交换、内酯合成、多肽合成和高分子聚合物的合成, 以及手性

收稿日期: 2014-08-19

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目 (S2012040007734); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2014ZM0062)

作者简介: 汪璞 (1990), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物催化

通讯作者: 杨博 (1973-), 男, 教授, 研究方向: 酶催化; 王永华 (1973-),

女, 教授, 研究方向: 食品科学

化合物的拆分等反应^[1], 其反应具有较高的底物专一性、区域选择性或对映选择性^[2]。在实际应用中, 考虑到游离酶具有反应后不能回收利用、产物中混杂酶蛋白、分离纯化操作困难、且反应过程中热稳定性差等不足^[3], 使其难以实现大规模的工业化应用, 从而将酶进行固定化, 即用固体材料或液体试剂等将其束缚或限制在一定区域内, 仍能保证其特有的催化能力的一种方法^[4]。至今研究较为透彻的固定化脂肪酶有 Novozym 435、Lipozyme TLIM、Lipozyme RM IM 和脂肪酶 PS-C、CRL^[5]。宗敏华等^[6]研究了固定化脂肪

酶 Novozym 435 催化餐饮业废油脂转酯生产生物柴油。刘元法等^[7]研究了 Lipozyme RM IM 催化棕榈酸和山茶油酸解反应生成甘油三酯。钱俊青^[8]研究了 214 型离子交换树脂固定化假丝酵母脂肪酶(CRL)。鉴于目前的脂肪酶制剂由于种类缺少、催化效率低及价格等方面的限制和不足,继续筛选和获得能够用于生产的酶制剂具有重要的意义。

来源于嗜热嗜碱土芽孢杆菌的 T1 脂肪酶是一个典型的耐热碱性脂肪酶,Leow 等^[9]对该酶进行原核表达并对其酶学性质进行了研究。目前对于该酶的固定化及利用该酶催化反应合成生物柴油的应用方面还未见有相关报道。本研究基于已有工作基础上,探究该酶的固定化方案及固定化酶的催化特性,同时对该酶催化醇解反应生成生物柴油的潜力进行评价,为进一步扩大其应用范围奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

重组嗜热嗜碱土芽孢杆菌 T1 脂肪酶大肠杆菌表达菌株由本实验室构建并保存,3C 蛋白酶由本实验室表达并制备。氨苄抗生素、诱导剂 IPTG 均购于 Invitrogen 公司;异丙醇、正己烷、对硝基苯酚月桂酸酯(pNPD)等均购于 Sigma 公司;葡聚糖基质购自 GE 公司;其他试剂均为市售国产分析纯。BCA 蛋白定量试剂盒购于上海生工生物工程有限公司。主要仪器有 Waters 2695 型高压液相色谱系统配备, Waters 2414 型示差检测器, Tecan Sunrise 酶标仪, 超声破碎仪等。

1.2 方法

1.2.1 重组嗜热嗜碱土芽孢杆菌 T1 脂肪酶的表达纯化

1.2.1.1 菌株培养及破碎

取构建好的大肠杆菌重组蛋白表达菌株,以5%的接种量接种到5 mL LB培养基(Amp⁺),37 °C 震荡培养至OD为0.8~1.2,得种子液。按10%接种量接种于500 mL LB培养基中(Amp⁺),37 °C 培养2 h后,加入诱导剂IPTG(终浓度0.2 mM),200 r/min、20 °C 震荡培养18 h,离心(8000 r/min,10 min,4 °C)收菌,沉淀菌体用PBS溶液(预冷)重悬,超声破碎15 min(4 s/4 s),10000 r/min 离心15 min得破碎菌液上清。SDS-PAGE 电泳检测其纯度。

1.2.1.2 纤维素的预处理与酶的纯化

参照Lan^[10]等报道的方法进行微晶纤维素的预处理,以及酶的吸附与纯化试验。

1.2.1.3 酶切与电泳检测

向吸附蛋白的纤维素中加入适量50 mM Tris-甘氨酸缓冲液(pH 9.0),加入1% 3C蛋白酶,及DTT(终浓度1 mM),混匀后室温下震荡孵育,酶切4 h后离心取上清,即为纯化后的T1蛋白。SDS-PAGE电泳检测其纯度。

1.2.2 固定化T1脂肪酶的酶活测定

以10 mmol/L的pNPD为底物,采用分光光度法测定固定化T1脂肪酶对pNPD的水解活力,略做改动^[11]。准确称取0.01 g固定化酶(含水量为1%),加入100 μ L 50 mM Tris-甘氨酸缓冲液(pH 9.0),于50 °C预热5 min,然后再加入10 μ L pNPD,反应5 min立即加入100 μ L的1% SDS终止酶促反应,10000 r/min离心1 min后取上清测定其OD₄₀₅。以基质载体代替固定化酶作为空白对照,计算出固定化酶的酶活(U/mg基质)。

1.2.3 T1 脂肪酶固定化条件优化

1.2.3.1 最佳2-碘酰基苯甲酸(IBX)用量的确定

精确称取基质0.4 g,加入1 mL经50 mM Tris-甘氨酸缓冲液(pH 9.0)适量稀释后的酶液,混匀后,分别加入一定量的10% IBX,使其终浓度在0.01%~2%之间。于室温下摇床中震荡进行固定化反应,2 h后取样,10000 r/min 离心10 min后取上清,采用BCA蛋白定量试剂盒测定其蛋白浓度,计算出酶液的蛋白吸附量。载体的蛋白吸附量计算公式如下:

$$\text{载体的蛋白吸附量} = (X1 - X2) / W1$$

注: X1: 吸附前酶液的蛋白含量, mg; X2: 吸附后酶液的蛋白含量, mg; W1: 加入载体的量, g。

同时,固定化反应后基质用 Tris-甘氨酸缓冲液洗两次后,离心去除上层溶液,即得到固定化酶。于室温下自然晾干后参照 1.3.2 的方法测定固定化酶的酶活。

1.2.3.2 最佳固定化反应温度

在最佳IBX浓度下,分别于4 °C、20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C下固定化反应2 h。分别计算不同温度条件下所得固定化酶样品的载体蛋白吸附量和固定化酶活,比较反应温度对固定化效果的影响。

1.2.3.3 最佳固定化时间

在上述得出的最佳IBX浓度和温度条件下,固定化反应不同时间段(0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h),然后取样测定载体蛋白吸附量和固定化酶活,得出最佳固定化时间。

1.2.4 固定化T1脂肪酶的催化特性研究

1.2.4.1 固定化T1脂肪酶的热稳定性研究

取0.1 g处理好的固定化酶,60 °C下每隔1 h取样。按上述1.3.2的方法进行固定化酶活的测定,以未进行

热处理的样品酶活作为100%，以此为参照计算其余各组样品的相对酶活。

1.2.4.2 固定化T1脂肪酶的有机溶剂耐受性研究

取0.1 g处理好的固定化酶，分别加入1 mL不同的有机溶剂（甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、正丁醇），处理2 h后。按上述1.3.2的方法进行固定化酶活的测定，以未进行处理的样品酶活作为100%，以此为参照计算其余各组样品的相对酶活。

1.2.4.3 醇解反应实验

醇解反应参照程振民和黄磊研究的转酯条件，略做改动^[12]。准确称量橄榄油4.5 g，甲醇0.16 g，置于50 mL的具塞三角瓶中，30 °C恒温水浴磁力搅拌器中搅拌15 min。混匀后添加0.12 g固定化脂肪酶，开始酯交换反应，定时取样，HPLC分析反应混合物的组成。

1.2.5 HPLC 分析方法

采用高效液相色谱法，条件为：色谱柱，Phenomenex Luna 5u silico (2) 100 Å (250 mm×4.6 mm)；流动相，正己烷-异丙醇（体积比15:1）；流速，1.0 mL/min；柱箱温度，30 °C；检测器温度，35 °C；进样量，10 μL。采用HPLC检测时，用外标法定量，根据标样保留时间定性，记录产物中各物质峰面积。

2 结果和讨论

2.1 T1 脂肪酶的表达纯化

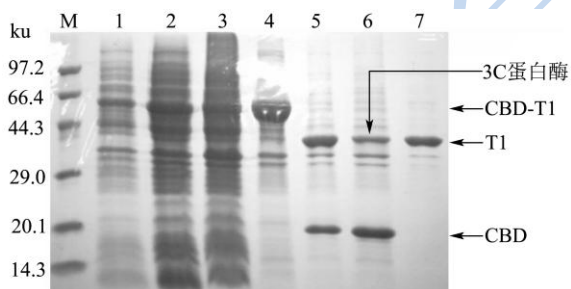


图1 T1 脂肪酶表达和纯化的 SDS-PAGE 图

Fig.1 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (15%) gel electrophoresis image showing expression and purification of T1 protease

注：M，Marker；1，发酵液；2，浓缩后的发酵液；3，超声破碎后的离心上清液；4，纤维素吸附蛋白；5，3C蛋白酶切后的总蛋白；6，3C蛋白酶；7，T1纯化蛋白。

由于所构建的表达载体在目的蛋白的基因序列的上游带有 CBD 标签，而纤维素对 CBD 标签具有较高的亲和力，因此可以用其对表达蛋白进行特异性吸附，从而将表达的目的蛋白从破碎上清中进行分离纯化，然后用 3C 蛋白酶特异性地切除 CBD 标签，从而得到纯化后的目的蛋白。T1 脂肪酶纯化效果如图 1，

由图可知 T1 纯化蛋白所在第 7 泳道有一个明显的蛋白条带，证明本实验对 T1 脂肪酶进行表达纯化后得到较纯的 T1 脂肪酶，可以用于下一步的固定化操作。

2.2 最佳 IBX 用量

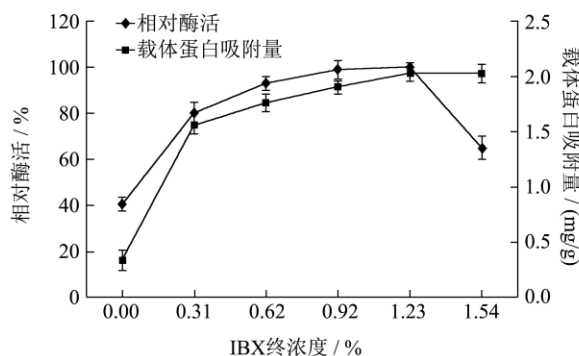


图2 IBX 浓度对载体蛋白吸附量和固定化 T1 脂肪酶的酶活力的影响

Fig.2 Effects of 2-iodoxy benzoate (IBX) concentration on absorption capacity of the carrier protein and immobilized T1 lipase enzyme activity

2-碘酰基苯甲酸 (IBX)，是典型的高价碘试剂，于 1994 年被 Frigerio 发现。IBX 在固定化反应中既是一个催化剂，又具有氧化性，能对酶蛋白造成损害，所以需要优化确定一个合适的浓度，既能发挥催化作用同时又不伤害酶本身。从图 2 可以看出，在 IBX 添加量为 0.31%、0.62%、0.93%、1.23%、1.54% 时，随着 IBX 浓度的增加，载体的蛋白吸附量逐渐上升，到 1.23% 后至最大值，此时的 1g 基质可以吸附 1.98 mg 目的蛋白。而相对酶活曲线一开始很低，随着 IBX 浓度增加而逐渐上升，到某一浓度达到高峰，酶活力达到了 29.45 U/mg。再增加 IBX 浓度，酶活会明显下降。原因是 IBX 本身作为一种氧化剂，到达一定浓度后对酶蛋白会造成氧化损伤，导致活力降低。由实验可知当 IBX 浓度为 1.23% 时，固定化效果最好。

2.3 最佳固定化反应温度

从图3可以看出，随着温度的变化，固定化T1脂肪酶的活力呈现一个抛物线变化的趋势。从4 °C到50 °C，固定化酶活力急剧上升，到50 °C达到最大值。而载体蛋白吸附量也随着温度的变化逐渐增加，至50 °C达到稳态状态。由此可知，T1脂肪酶固定化的最佳反应温度是50 °C。

2.4 最佳反应时间

由图 4 可以看出，从开始反应至 2 h 时，固定化 T1 脂肪酶的酶活随时间的增加而增大，在 2~4 h 后所

测数值无明显变化, 在 4 h 之后所测数值甚至出现随时间增大而减小的趋势, 这表明基质与酶液发生吸附固定化反应的过程中, 2 h 时酶活力已经达到了最大值, 此时的固定化酶酶活力为 50.25 U/mg 基质, 载体蛋白吸附的酶量也达到了 2.12 mg/g 基质。继续延长反应时间, 固定化酶的酶活力会下降。从载体蛋白吸附量的维度分析, 在反应 2 h 后, 载体和蛋白之间吸附作用也达到了最大值, 且至 6 h 的时候数值都基本保持不变。

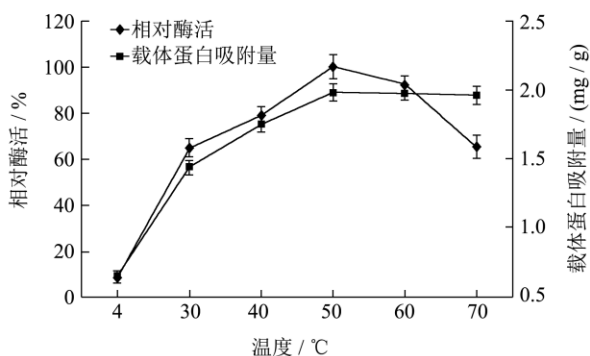


图 3 温度对载体蛋白吸附量和固定化 T1 脂肪酶的酶活力的影响

Fig.3 Effects of temperature on absorption capacity of the carrier protein and immobilized T1 lipase enzyme activity

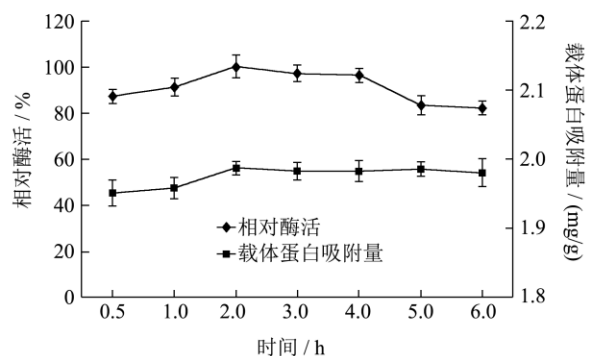


图 4 反应时间对载体蛋白吸附量和固定化 T1 脂肪酶的酶活力的影响

Fig.4 Effects of reaction time on absorption capacity of carrier protein and immobilized T1 lipase enzyme activity

通过对 T1 脂肪酶的固定化进行单因素优化实验得到最佳固定化条件为 IBX 终浓度 1.23%、固定化温度 50 °C、固定化时间 2 h, 且在此条件下优化获得的固定化酶活力为 50.25 U/mg 基质, 载体蛋白吸附量为 2.12 mg/g 基质。黄磊等^[12]制备了一种具有纳米-微米复合孔结构的无机多孔材料-泡沫陶瓷, 用硅烷偶联剂对其进行表面改性处理后, 经 1 h 的固定化, 活力 1215.39 U/g。金杰等^[13]以二氧化硅纳米材料为载体, 采用吸附法对脂肪酶进行固定化, 作用 10 h 后酶活力约为 3867 U/g 载体, 固定化酶的最适反应温度为

45 °C。温小荣等^[14]以大孔硅胶为材料, 用碳化二亚胺 (EDC) 将氨基化硅胶与 Pancreas porcine 脂肪酶进行共价固定化, 在 EDC 与蛋白摩尔比为 50:1、载体与粗酶质量比为 10:1、固定化 pH 为 6.0, 固定化时间为 8 h 的优化条件下获得最大固定化酶酶活为 86.67 U/g。梁欣欣等^[15]研究了交联剂三羟甲基磷(THP), 是以纯棉浴巾载体, 聚乙烯亚胺 (PEI) 为吸附剂来进行固定化脂肪酶的制备, 固定化温度为 40 °C 酶活力最高, 达到 15.80 U/g。相当于其它脂肪酶的固定化, 本实验制备的固定化酶载体蛋白吸附量低、固定化时间短、比酶活高, 且可于较高温度下进行固定化。

2.5 固定化 T1 脂肪酶的热稳定性

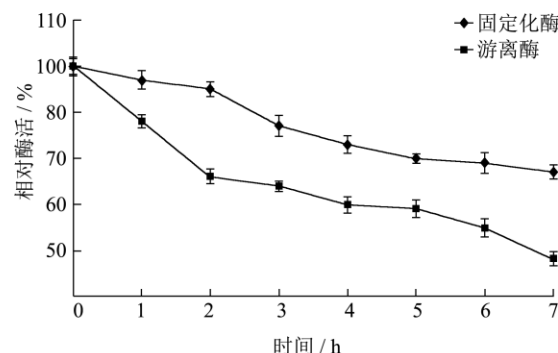


图 5 固定化 T1 脂肪酶的热稳定性

Fig.5 Thermostability of immobilized T1 lipase

固定化 T1 脂肪酶热失活曲线如图 5 所示, 由图可知, 相对于游离的 T1 脂肪酶, 其固定化酶在 60 °C 孵育 7 h 后, 相对酶活依然保持在 70% 以上, 而游离酶孵育 2 h 后, 酶活迅速下降, 至 7 h 后, 相对酶活低于 60%。表明所制备的固定化酶在 60 °C 条件下具有良好的热稳定性, 可以在反应体系温度较高的环境下进行催化反应。

2.6 固定化 T1 脂肪酶的有机溶剂耐受性

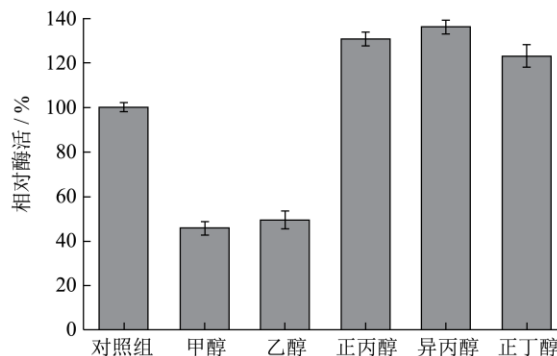


图 6 固定化 T1 脂肪酶的有机溶剂耐受性

Fig.6 Organic solvent tolerance of immobilized T1 lipase

有机溶剂耐受性相对酶活的数据如图 6 所示, 可

以看出,固定化酶经过正丁醇、正丙醇、异丙醇处理后所测的酶活均比对照组高,相对酶活高达对照组120%~140%;而经过甲醇、乙醇处理后所测的相对酶活远远低于对照组,仅为对照组的50%以下。有实验可知此固定化酶在正丁醇、正丙醇、异丙醇3种有机溶剂中具有非常好的耐受性,甚至经过有机溶剂处理后,固定化酶的酶活力会有所增加。对于一般的未固定化的酶来说,有机溶剂会使酶变性或使酶活力下降,但是对本文研究制造的固定化酶来说,具有非常好的有机溶剂耐受性。

2.7 固定化 T1 脂肪酶催化醇解反应

生物柴油,即长链脂肪酸单酯,是指利用各类动物和植物油脂作为原料,与低碳醇如甲醇、乙醇等醇类物质经过酯化反应改性,使其最终变成可供使用的可再生燃料资源^[16]。随着国内外工业的飞速发展,石油能源消耗剧增且其资源有限,而生物柴油因其原料易得、可再生性强、环保效益显著,引起了国际社会的强烈关注。本文对制备的固定化 T1 脂肪酶催化醇解反应生成生物柴油的潜力进行应用评估,结果如下:

醇解反应 24 h 后,液相色谱法检测显示有 5 种物质存在,分别是甘油三酯、脂肪酸甲酯、1, 3-甘油二酯、1, 2-甘油二酯、单甘油酯。其中,甘油三酯的量最多,峰面积达到 89.86%,脂肪酸甲酯峰面积为 4.96%。甲醇醇解反应 60 h 后,液相色谱检测显示有 4 种物质存在,分别是甘油三酯、脂肪酸甲酯、1, 3-甘油二酯、1, 2-甘油二酯。其中甘油三酯的量最多,峰面积达到 77.51%,脂肪酸甲酯峰面积为 14.08%。对比甲醇醇解反应 24 h 和 60 h 的液相色谱检测结果显示,甘油三酯的峰面积由 89.86%减少为 77.51%,脂肪酸甲酯的峰面积由 4.96%增加为 14.08%。峰面积代表的是各种物质的得率,脂肪酸甲酯的量逐渐增加,表明甘油三酯与甲醇不断反应,在反应 60 h 后得率达到 14.08%。表明本研究制备的固定化脂肪酶可以催化醇解反应生成生物柴油。

3 结论

通过对 T1 脂肪酶的固定化进行单因素优化实验得到最佳固定化条件为 IBX 终浓度 1.23%、固定化温度 50 °C、固定化时间 2 h,且在此条件下优化获得固定化酶酶活力为 50.25 U/mg 基质,载体蛋白吸附量为 2.12 mg/g 基质。同时对该固定化酶催化醇解反应生成生物柴油的潜力进行应用评估,反应 60 h 后甲醇酯得率达到 14.08%,表明本研究制备的固定化脂肪酶可以催化醇解反应生成生物柴油。而且该固定化酶的有机

溶剂耐受性实验表明其具有较好耐受正丁醇、正丙醇和异丙醇的能力。热稳定性实验中,在 60 °C 孵育 7 h 后,其相对酶活依然保持在 70% 以上,表明其具有较好的温度耐受性。本实验制备的固定化 T1 脂肪酶是一种具有良好应用前景的脂肪酶。

参考文献

- [1] 周换景,何腊平,张义明,等.脂肪酶产生菌的筛选及其产酶条件优化[J].酿酒科技,2014,1:6-11
ZHOU Huan-jing, HE La-ping, ZHANG Yi-ming, et al. Screening of a lipase-producing microbial strain and optimization of its lipase-producing conditions [J]. Liquor Making Science and Technology, 2014, 1: 6-11
- [2] 王婷婷.学酶促法拆分洛芬酯类及高分子前药合成[D].浙江杭州:浙江大学,2012
- [3] 王艳君,卓少玲,陈盛.纳米 SiO₂ 改性壳聚糖载体的制备及固定化壳聚糖酶的研究[J].食品工业科技,2012,21:104-108
WANG Yan-jun, ZHUO Shao-ling, CHEN Sheng. Study on nano-SiO₂ modified chitosan carrier and immobilization of chitinase [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 21: 104-108
- [4] Meier C, Snflee T, Petereit H, et al. Production of carriers in the form of porous polymer beads: American, 9940122 [P]. 1999
- [5] 杨建军,关卫省.脂肪酶催化合成生物柴油的现状与展望[J].食品研究和开发,2013,34(16):128-131
YANG Jian-jun, GUAN Wei-sheng. Perspectives and progress of lipase catalyzed production of biodiesel [J]. Food Research and Development, 2013, 34(16): 128-131
- [6] 吴虹,宗敏华,娄文勇.无溶剂系统中固定化脂肪酶催化废油脂转酯生产生物柴油[J].催化学报,2004,25(11):903-908
WU Hong, ZONG Min-hua, LOU Wen-yong. Transesterification of waste oil to biodiesel in solvent free system catalyzed by immobilized lipase [J]. Chinese Journal of Catalysis, 2004, 25(11): 903-908
- [7] 陈琰,孟宗,刘元法.无溶剂体系 Lipozyme RM IM 催化棕榈酸和山茶油酸解反应的研究[J].中国油脂,2013,38(10): 23-26
CHEN Yan, MENG Zong, LIU Yuan-fa. Acidolysis of palmitic acid and oil tea camellia seed oil catalyzed by lipozyme RM IM in solvent-free system [J]. China Oils and Fat, 2013, 38(10): 23-26
- [8] 钱俊青,蒋盛蓝,秦德怀,等.214 型离子交换树脂固定化假丝酵母脂肪酶的研究[J].浙江工业大学学报,2013,41(3): 244-249

- QIAN Jun-qing, JIANG Sheng-lan, QIN De-huai, et al. Research of immobilized candida rugosa lipase on ion exchange resin 214 [J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2013, 41(3): 244-249
- [9] Thean Chor Leow, Raja Noor Zaliha Raja Abd Rahman, Mahiran Basri, et al. A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus sp.* T1 [J]. Extremophiles, 2007, 11: 527-535
- [10] LAN Dong-ming, TAI Yan, SHEN Yan-fei, et al. Efficient purification of native recombinant proteins using proteases immobilized on cellulose [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 113(4): 542-544
- [11] GAO Chong-liang, LAN dong-ming, LIU Lu, et al. Site-directed mutagenesis studies of the aromatic residues at the active site of a lipase from *Malassezia Globosa* [J]. Biochimie, 2014, 102: 29-36
- [12] 黄磊,程振民.微孔陶瓷固定化酶载体的合成[J].化工学报,2006,57(4):912-918
HUANG Lei, CHENG Zhen-min. Fabrication of microporous ceramic supports for enzyme immobilization [J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2006, 57(4): 912-918
- [13] 金杰,杨艳红,吴克,等.二氧化硅纳米材料固定中性脂肪酶的条件优化及其特性[J].生物工程学报,2009,25(12): 2003-2007
JIN Jie, YANG Yan-hong, WU Ke, et al. Optimize conditions and activities for neutrophil lipase immobilized by nano-silica dioxide [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(12): 2003-2007
- [14] 温小荣,夏小乐,杨海麟,等.氨基化大孔硅胶共价固定 Pancreas porcine 脂肪酶的研究[J].现代食品科技,2013, 29(10):2487-2491
WEN Xiao-rong, XIA Xiao-le, YANG Hai-lin, et al. Covalent immobilization of pancreas porcine lipase on aminated mesoporous silica [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(10): 2487-2491
- [15] 梁欣欣,魏东.新型交联剂三羟甲基磷固定化脂肪酶的研究 [J].现代食品科技,2012,28(1):47-51
LIANG Xin-xin, WEI Dong. Lipase immobilization with a new crosslinking reagent tris (hydroxymethyl) phosphine [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(1): 47-51
- [16] 茅羽佳,欧先金,杜伟,等.大肠杆菌高水平表达脂肪酶 BTL2 及其催化油脂制备生物柴油 [J].化工学报,2012,63(7): 2100-2105
MAO Yu-jia, OU Xian-jin, Du Wei, et al. High-level expression of lipase from bacillus thermocatenulatus BTL2 in *E.coli* and its application in biodiesel production [J]. Journal of Chemical Industry and Technology, 2012, 63(7): 2100-2105