脂肪酶 GZEL 及其 C-端截断突变体对 磷脂单分子膜的吸附动力学研究

王方华¹, 陈吴翀¹, 魏瑞霞¹, 张慧¹, 杨博², 王永华¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2.华南理工大学生物科学与工程学院,广东广州 510006)

摘要:基于单分子层技术研究了禾谷镰孢菌脂肪酶 GZEL 对不同磷脂单分子膜的吸附动力学。同时,采用截断突变方法分析 C-端肽段(编号为 269-319 的氨基酸)缺失后对脂肪酶 GZEL 界面吸附动力学参数的影响。研究发现,脂肪酶 GZEL 对不同磷脂单分子 层的吸附动力学参数(吸附常数 k_a,解离常数 k_d,吸附平衡常数 K_{Ads})与磷脂单分子膜的种类及初始表面压力密切相关。尽管如此, 相比于野生型 GZEL,269-319 肽段缺失后导致酶蛋白对不同磷脂单分子膜的吸附常数 k_a均显著降低,而解离常数 k_d则显著升高,两 者共同导致酶蛋白对于磷脂单分子膜的亲和力 K_{Ads}显著降低。野生型 GZEL 对不同磷脂单分子膜的选择性顺序为磷脂酰丝氨酸>磷脂 酰胆碱>磷脂酰乙醇胺。而 269-319 肽段缺失后,酶蛋白对于这三种磷脂单分子膜的亲和力则表现为无显著差异。以上结果表明 269-319 肽段在脂肪酶 GZEL 的界面吸附及对磷脂选择性方面均发挥有重要作用。

关键词: 脂肪酶; 禾谷镰孢菌; 单分子层技术; 界面吸附动力学 文章篇号: 1673-9078(2019)03-26-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.005

Adsorption Kinetics of Lipase from Gibberellazeae (GZEL) and Its

C-terminal Truncated Mutant to Phospholipid Monolayers

WANG Fang-hua¹, CHEN Wu-chong¹, WEI Rui-xia¹, ZHANG Hui¹, YANG Bo², WANG Yong-hua¹

(1.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2.School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The adsorption kinetics of Gibberellazeae lipase (GZEL) onto different phospholipid monolayers was investigated based on monolayer technology. Meanwhile, was constructed to analyze the effect of deletion of C-terminal peptide (269-319 amino acids) on the adsorption kinetic parameters of GZEL onto various phospholipid monolayers was analyzed by the truncated mutation method. Results revealed that the adsorption kinetic parameters (adsorption constant k_a , dissociation constant k_d , adsorption equilibrium constant K_{Ads}) of GZEL onto different phospholipid monolayers were closely related to the type of phospholipid monolayer and initial surface pressure. Nonetheless, compared to the wild-type GZEL, a significant decrease of the adsorption constant k_a and a significant increase of the dissociation constant k_d towards different phospholipid monolayers were found after 269-319 peptide was deleted from GZEL. Both changes in adsorption and dissociation constants caused a significant reduction in the adsorption affinity (K_{Ads}) of the enzyme for various phospholipid monolayers. The order of preference for the wild-type GZEL for different phospholipid monolayers was: Phosphatidylserine > phosphatidylcholine > phosphatidylethanolamine. However, after the deletion of the 269-319 peptide, no significant difference was found in the affinity of the enzyme protein for the three phospholipid monolayers. The above results indicated that the 269-319 peptide played an important role in both the interfacial adsorption and selectivity of lipase GZEL to phospholipid monolayers.

Key words: Lipase; Gibberellazeae; Monolayer technology; Interfacial binding kinetics

收稿日期: 2018-07-19

基金项目:国家自然科学基金项目(31671791);广东省科技计划项目(2016B090920082);广州市珠江科技新星专项(201610010074);中央高校基本科研业务 费(2017ZD090)资助

作者简介:王方华(1982-),男,副研究员,研究方向:食品酶工程

通讯作者:王永华(1975-),女,教授,研究方向:工业酶与生物脂质及食品安全

脂肪酶(lipase, EC 3.1.1.3)是一类羧酸酯水解 酶,可催化水解甘油酯、转酯化等诸多反应,被广泛 应用于食品、生物、医药、环境和造纸等工业领域^[1-3]。 脂肪酶所催化的反应通常在油水界面上进行,且大多 数脂肪酶具有典型的界面激活现象^[4,5]。Momsen 和 Brockman(1981)提出对于水不溶性脂质的酶促水解 反应可以概括为两个基本步骤:首先,脂肪酶从水相 聚集吸附到油/水界面上,酶的构象发生一定变化;其 次,酶与底物分子发生反应,形成"酶-底物复合物", 催化生成相应产物^[6]。而作为催化反应的首要步骤, 界面吸附在酶蛋白整个催化过程中扮演着重要角色。

单分子层技术的问世, 使得研究蛋白与脂质相互 作用成为现实[7.8]。基于单分子层技术可实现对脂质单 分子层-水界面特性的精准控制,为从分子水平研究酶 蛋白在脂质-水界面上的吸附动力学奠定基础[9~11]。影 响蛋白与脂质单分子层结合的因素有很多,如下相中 缓冲液的组成、脂质膜性质、蛋白性质等^[12]。Momsen 和 Brockman (1981) 指出酶的活性与酶蛋白吸附程度 有关, 酶蛋白吸附到底物上, 底物头基的构象分布会 影响酶水解活性^[6]。后期研究者通过观察与脂质分子 面积的变化直接相关的表面压力的增加(ΔΠ)来精确 监测蛋白吸附动力学。通过改变初始表面压力 (Π_i), 可以分析脂质朝向和构象对蛋白界面结合的影响^[13]。 Bénarouche 等人提出了吸附常数 ka (adsorption constant)、解离常数 k_d (desorption constant)、吸附平 衡常数 KAds (adsorption equilibrium coefficient) 三个 参数来表征酶蛋白对磷脂单分子膜的吸附动力学[14], K_{Ads} 值越大,表明蛋白对磷脂单分子膜的亲和能力越 强。

禾谷镰孢菌脂肪酶 Gibberellazeae (GZEL) 是由 禾谷镰孢菌分泌的一种参与宿主感染的胞外酶。已报 道该菌对小麦和玉米有致病作用,能引起农作物病害, 对农业生产造成巨大的损失^[15~17]。目前,GZEL 的蛋 白晶体结构已被解析, 与其它脂肪酶结构相比, GZEL 盖子区域具有一个独特的"双锁"结构,"锁孔-铰链-锁 销"活性开关由 C-端肽链 α-螺旋以及盖子结构螺旋中 的 Arg86 和 Ile83 组成^[18]。前期研究中,采用滴定法 和单分子层技术方法分别对脂肪酶 GZEL 的酶学性质 进行表征^[19]。此外 GZEL 还具有独有的 C-端肽段 (269-319 位点氨基酸)。但目前该 C-端肽段的作用尚 不明确,本研究中,通过基因工程手段,构建了 GZEL 的C-端肽段缺失突变体,并尝试利用单分子层技术分 析C-端肽段对脂肪酶GZEL的底物选择性和界面吸附 特性的影响。相关研究为深入了解该脂肪酶的结构功 能关系及其工业化应用提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

来源于大豆的 L- α -磷脂酰胆碱 (PC, \geq 97%)、L- α -磷脂酰丝氨酸 (PS, \geq 97%)、L- α -磷脂酰乙醇胺 (PE, \geq 99%) 均购买自 Sigma 公司; 氨苄青霉素及异丙基硫 代半乳糖苷诱导剂 (IPTG) 购自 Invitrogen 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

恒温振荡培养箱(HYG-C型),江苏太仓市强乐 实验设备有限公司;超声破碎仪(JY92-IIN),宁波新 芝生物科技股份有限公司;蛋白层析仪(Biologic LP), Bio-Rad 公司;酶标仪(ELx800),BioTek 公司;LB 膜分析仪(Micro TroughX,配备有界面吸附专用反应 槽),芬兰 Kibron 公司,等。

1.2 方法

1.2.1 失活型 GZEL 及其 C-末端截断突变体大 肠杆菌重组表达菌株的构建

在前期研究中发现,脂肪酶 GZEL 除了具有脂肪 酶活性外,还具有一定的磷脂酶活性[19]。本研究中, 为了避免因酶蛋白水解磷脂而对酶蛋白的吸附动力学 研究造成干扰,因此,在前期已经构建的 pFL-B62cl-GZEL 表达载体基础上进一步引入了一个针对酶蛋白 催化活性位点 Ser144 的单点突变 (S144A), 从而使 所表达的酶蛋白丧失水解活性。S144A 单点突变体的 构建以上游引物 5'-TCGTTTCCGTTGGTCACGCTC TAGGAGGAGCTGTTG-3'和下游引物 5'-CAACAGC TCCTCCTAGAGCGTGACCAACGGAAACGA-3' 采 用重叠延伸法进行。将构建的突变体 pFL-B62cl-GZEL-S144A 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞并进行 测序验证。将测序正确的质粒,转化到 BL21Star™ (DE3) pLysS E. coli 感受态细胞中,阳性克隆鉴定成功 后,获得重组失活的野生型 GZEL 大肠杆菌表达菌株。 C-末端截断突变体(删除 269-319 位点的氨基酸)的 构建以构建的 pFL-B62cl-GZEL-S144A 表达载体为模 板,以上游引物 5'-TTGCATTACTTTCAAGCCACGG ATGCCTGTTCACACCACCACCAC-3'和下游引 物 5'-ACTTAATTAACATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTG GTGTGAACAGGCATCCGT-3'同样采用重叠延伸法 进行构建。将测序正确的质粒 pFL-B62cl-GZEL-△(269-319)-S144A,转化到 BL21 Star™ (DE3) pLysS E. coli 感受态细胞中,阳性克隆鉴定成功后,获得重组 表达菌株 pFL-B62cl-GZEL-Δ(269-319)-S144A-BL21 StarTM (DE3) pLysS.

1.2.2 GZEL 及其 C-末端截断突变体的表达与 纯化

将重组表达菌株接种到5 mL 含有氨苄青霉素抗 性的 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中, 37 ℃下过夜 培养,制备种子液。按 5%接种量接种放大于含有氨 苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中, 37 ℃、200 r/min 下培养 2~3 h 至 OD₆₀₀=0.6~0.8,加入诱导剂 IPTG, 至终浓度为 0.05 mM。调整培养温度到 20 ℃,继续 发酵培养 24 h。将诱导表达后的发酵菌液离心(8000 r/min, 6 min, 4 ℃), 去上清液, 菌体用 50 mM 磷酸 缓冲液 (pH 6.0) 重悬, 超声破碎 15 min, 离心 (10000 r/min, 15 min), 收集破碎上清, 用 0.45 µm 滤膜过滤。 将收集到的破碎上清液进行 Ni²⁺亲和层析。蛋白上样 层析柱后,用 Buffer A (50 mM 磷酸缓冲液 pH 6.0)冲 洗柱子,紧接着用 Buffer B (含有 100~500 mM 咪唑 的 Buffer A) 进行梯度洗脱, 收集出峰的蛋白样品。 将100 mM咪唑梯度洗脱收集的出峰样品用G-25 柱脱 盐后,继续上样至Q阴离子交换层析柱,最终用含有 300 mM 氯化钠的缓冲液(50 mM 磷酸缓冲液 pH 6.0) 洗脱得到目的蛋白样品,所得到的蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳检测其纯度。用 BCA 蛋白定量检测 试剂盒测定其蛋白浓度。

1.2.3 GZEL 及其 C-末端截断突变体对不同磷 脂单分子膜吸附动力学参数测定

利用 LB 膜分析仪测定酶蛋白对不同磷脂单分子 膜的吸附动力学参数。在蛋白吸附反应槽中加入 1.2 mL 经 0.45 μm 膜过滤的 50 mM 磷酸缓冲液(pH 6.0)。 将清洗干净的转子(直径为 0.5 cm)放入反应槽中, 设置转速为 100 r/min。将不同磷脂分别溶解于氯仿 中,配制成一定浓度的溶液。用微量注射器吸取适量 滴加在缓冲液表面,待氯仿挥发,磷脂单分子层膜稳 定后,记录初始表面压力(initial surface pressure, Π_i)。 在初始表面压力稳定的情况下,用微量进样器通过反 应槽的进样小孔将一定蛋白浓度的酶蛋白溶液注入水 相,表面压力探针持续监测磷脂单分子层上表面压力 随时间的变化曲线,直到表面压力重达平衡。根据郎 格缪尔吸附方程^[14](the Langmuir adsorption equation) (方程 1),将表面压力随时间变化曲线进行拟合:

$$\Pi_{t} = \Pi_{i} + \Delta \Pi_{\max} \cdot \theta \cdot [1 - \exp(-\sigma \cdot t)]$$

(1)

其中: Π_t 是在时间 t 对应的表面压力; Π_i 是初始表面压力; $\Delta \Pi_{max}$ 是吸附平衡后的表面压力; $\theta \to \sigma$ 计算方法如下公式(2)、(3)。

$$\theta = \frac{k_a \cdot C_{E0}}{k \cdot C_E + k_{e0}}$$
(2)

$$\sigma = k_a \cdot C_{E0} + k_d \tag{3}$$

其中: C_{E0} (mol/L) 是指酶液被注入到反应槽水相后在反 应体系中的最终蛋白浓度。

用 KaleidaGraph 软件对实验数据根据方程(1) 进行拟合处理,每个初始表面压力(Π_i)和蛋白浓度 (C_{E0})条件下对应唯一的 σ 值。以 C_{E0} 为横坐标, σ 为纵坐标,进行线性拟合,求出截距和斜率。其中, 斜率所对应的是吸附常数 k_a (adsorption constant),纵 轴截距所对应的是解离常数 k_d (desorption constant), 根据计算所得的 k_a和 k_d,计算出吸附平衡常数 K_{Ads} (adsorption equilibrium coefficient):

$$K_{Ads} = \frac{k_a}{k_d}$$
(4)

1.2.4 数据统计分析

将不同实验组计算所得的 k_a、k_d、K_{Ads}值分别用 SPSS13.0 统计学分析软件对应单因素方差分析 (One-Way ANOVA)中的最小显著性差异法(LSD) 进行显著性分析(*p*=0.05)。

2 结果与讨论



图 1 失活型 GZEL 及其 C-末端截断突变体的 SDS-PAGE 结果 Fig.1 Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel

electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of the purified inactive

wild-type GZEL

注: M: 蛋白 marker; 1: 野生型 GZEL(S144A); 2: C-末端截断突变体 GZEL-Δ(269-319)。

获得脂肪酶在脂质单分子层上的吸附动力学参数,有助于更好理解界面酶学及脂肪酶与脂质相互作用^[14]。由于脂质/水界面上的脂肪酶吸附必须发生在不溶性脂质底物水解之前,而脂肪酶属于丝氨酸水解酶,为避免水解过程对吸附过程的影响,在已经构建的脂肪酶 GZEL 野生型和两种截断突变体基础上,理性设计相应的催化活性中心关键位点突变(Ser144 Ala),用来研究脂质与蛋白质的相互作用。所构建的大肠杆菌重组表达菌株经诱导发酵和菌体破碎,所得上清液经过 Ni²⁺亲和层析、G-25 柱脱盐和 Q 阴离子交换层析柱层析蛋白纯化流程,最终获得电泳纯级目的蛋白(图1),用于下一步的磷脂单分子层吸附实验。



Modern Food Science and Technology

2019, Vol.35, No.3

(图 3),得到每个 Π_i 和每个磷脂底物条件下的吸附 常数 k_a (adsorption constant)和解离常数 k_d (desorption constant)。根据方程(4),最终计算获得吸附平衡常 数 K_{Ads} 。图 3 和图 4 分别为 GZEL-WT 和 GZEL- Δ (269-319)在不同表面压力下对 PC、PE、PS 的吸附过程根据吸附方程拟合最终获得的 σ 随蛋白浓 度变化的拟合曲线。



different initial surface pressure

不同初始表面压力条件下,所测定的野生型 GZEL (GZEL-WT)对于 PE 的吸附动力学参数存在 较大差异。在 10, 15, 20, 25 mN/m 的初始表面压力 条件下测得 GZEL-WT 对于 PE 的吸附常数 k_a 分别为 5.42(±0.57)×10⁴ M⁻¹s⁻¹, 6.35(±0.13)×10⁴ M⁻¹s⁻¹, 5.63(±0.34)×10⁴ M⁻¹s⁻¹和 5.13(±0.16)×10⁴ M⁻¹s⁻¹。其中,

在15 mN/m的初始表面压力条件下获得的ka值最大, 而在 25 mN/m 条件下测定的 ka值最小。表面压力反 映磷脂分子在界面上的浓度,浓度越大,表面压力则 越大^[11]。k_a越大,蛋白质越容易与底物单分子层结合。 同样的,不同初始表面压力条件下测得 GZEL-Δ (269-319)对于 PE 的 k。值之间也存在较大差异。但是, 相比于 GZEL-WT, 截断突变体 GZEL-Δ(269-319)的 k。值在不同表面压力条件下均有显著性降低 (p<0.05)。例如:在10 mN/m 的初始表面压力条件 下,测得的 GZEL-WT 为 5.42 (±0.57)×10⁴ M⁻¹s⁻¹,而 对于 GZEL-Δ(269-319)来说, 吸附常数 k。值则降低到 3.68 (±0.64)×10⁴ M⁻¹s⁻¹ (p<0.05);在15 mN/m条件下, GZEL-WT 为 6.35(±0.13)×10⁴ M⁻¹s⁻¹, 而对于 GZEL-Δ(269-319), k_a 值降低为 2.97(±0.41)×10⁴ M⁻¹s⁻¹ (p<0.05);同样的,在20 mN/m和25 mN/m条件下, GZEL-Δ(269-319)对于 PE 的k。分别降低到 2.83(±0.29) ×10⁴ M⁻¹s⁻¹ 和 3.03(±0.13)×10⁴ M⁻¹s⁻¹。同样的,对于 PC 和 PS 而言, GZEL-Δ(269-319)在不同初始表面压力条 件下测得的ka均显著低于GZEL-WT 在同等条件下所 测得的 k_a (图 5)。

对解离常数 kd 而言, 无论是 GZEL-WT 还是 GZEL-Δ(269-319), 所测定的对于 PE 的解离常数 k_d 值在不同初始表面压力条件下均有所差异。对于 GZEL-WT, 最大 kd 出现在 10 mN/m 条件下, 为 1.79(±0.35)×10⁻³ s⁻¹。而对于 GZEL-Δ(269-319),最大 ka表现在15 mN/m。然而,相比于GZEL-WT,不同 初始表面压力条件下测定的 GZEL-Δ(269-319)对 PE 的解离常数 kd均有显著升高。GZEL-WT 在 10、15、 20、25 mN/m 条件下测定的 kd 值分别为 1.79(±0.35) ×10⁻³ s⁻¹、9.31(±0.29)×10⁻⁴ s⁻¹、6.34(±0.30)×10⁻⁴ s⁻¹ 和 2.86(±0.12)×10⁻⁴ s⁻¹。而 GZEL-Δ(269-319)在相应表面 压力条件下的 k_1 值则分别增加到 3.21(±0.67)×10⁻³ s⁻¹、 $4.07(\pm 0.42) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $2.97(\pm 0.31) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $1.56(\pm 0.18)$ ×10⁻³s⁻¹。与 GZEL-WT 相比均有显著性差异 (p<0.05) (图6)。同样的,对于PC和PS而言,GZEL-Δ(269-319) 在不同初始表面压力条件下测得的 k_d 均显著高于 GZEL-WT(图6)。解离常数kd反映的是酶蛋白与脂 质界面的解离速率大小, kd 越大, 表明蛋白从脂质界 面脱离速度越快,结合越不稳定。

相比于野生型 GZEL,GZEL- Δ (269-319)的 k_a 值 均有显著性降低,同时,k_d有显著性增加。两者共同 作用下,导致 GZEL- Δ (269-319)在 10、15、20、25 mN/m 条件下测定对于 PE 的 K_{Ads} 值分别为: 1.15(±0.21)×10⁷ M⁻¹、7.30(±0.34)×10⁶ M⁻¹、9.52(±0.35)×10⁶ M⁻¹、 1.94(±0.03)×10⁷ M⁻¹,相比于 GZEL-WT 在该条件下测 定所得的 3.03(±0.23)×10⁷ M⁻¹、6.82(±0.42)×10⁷ M⁻¹、 8.89(±0.16)×10⁷ M⁻¹、1.79(±0.37)×10⁸ M⁻¹ 均有显著性 降低 (*p*<0.05)(图 7)。该结果表明: 269-319 肽段的 缺失导致酶蛋白对 PE 的亲和力显著降低。类似的, 对于 PS 和 PC 单分子膜来说,与 PE 的趋势相同,相 比于 GZEL-WT, GZEL-Δ(269-319)对于 PS 和 PC 的 亲和力有显著性降低(图 7)。以上结果进一步说明: 269-319 肽段的缺失导致酶蛋白对磷脂单分子层的亲 和力降低不依赖于脂质的种类以及界面上脂质的浓 度,是由酶蛋白自身的特性所决定。





图 6 不同初始表面压力条件下所测定的 GZEL-WT 和 GZEL-Δ (269-319) 对不同磷脂单分子膜的解离常数 k₀ Fig.6 Desorption constants of GZEL-WT and GZEL-Δ (269-319) for different phospholipid monolayers under different initial surface pressure

此外,从酶蛋白对于不同磷脂的亲和力大小来看, 对于 GZEL-WT,其对于 PS 的亲和力最大,其次是 PC,而对于 PE 的亲和力最小,该结果与之前所报道 的酶对这这种磷脂底物的酶活力大小趋势保持一致^[19],表明吸附对于酶活力具有较大的促进作用。对于 GZEL-Δ(269-319),虽然不同初始表面压力条件下其 对不同磷脂单分子层膜的亲和力有所差异,但统计学 分析表明不同组之间并无显著性差异(*p*>0.05)(图7)。 该结果表明,269-319 肽段的缺失导致酶蛋白对于磷 脂的选择性由原来的 PS 偏好转变为无磷脂底物偏好 性。提示该肽段在酶蛋白磷脂底物选择性方面可能发 挥重要的作用。



Fig.7 Adsorption equilibrium coefficient of GZEL-WT and GZEL-Δ (269-319) for different phospholipid monolayers under different initial surface pressure

3 结论

磷脂单分子膜的初始表面压力对于酶蛋白吸附动 力学具有重要影响。相比于 GZEL-WT, 269-319 肽段 缺失突变体导致酶蛋白对不同磷脂单分子层膜的吸附 常数ka值显著降低,解离常数kd升高,酶蛋白对不同 磷脂的亲和力有显著性降低。此外,269-319 肽段的 缺失还导致酶蛋白对于磷脂底物的偏好性发生显著改 变。下一步需结合分子生物学技术进一步分析确定该 肽段中对于酶蛋白磷脂单分子膜吸附发挥重要影响作 用的氨基酸位点信息。本研究结果也为下一步针对该 酶的分子改造以进一步提高其磷脂酶活性提供了重要 的靶点。

参考文献

- Woolley P, Steffen P. Lipases. Their Structure, Biochemistry and Application [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994
- [2] Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications-an overview [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004, 118(1-3): 155-170
- [3] Aarthy M, Saravanan P, Gowthaman M, et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview [J]. Chemical Engineering Research & Design, 2014, 92(8): 1591-1601
- [4] Raneva V, Ivanova T, Verger R, et al. Comparative kinetics of phospholipase A2 action on liposomes and monolayers of phosphatidylcholine spread at the air-water interface [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1995, 3(6): 357-369
- [5] Verger R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts[J]. Trends in Biotechnology, 1997, 15(1): 32-38
- [6] Momsen W, Brockman H. The adsorption to and hydrolysis of 1, 3-didecanoyl glycerol monolayers by pancreatic lipase. Effects of substrate packing density [J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(13): 6913-6916
- [7] Ransac S, Moreau H, Riviere C, et al. Monolayer techniques for studying phospholipase kinetics [J]. Methods in Enzymology, 1991, 197: 49-65
- [8] Brezesinski G, Möhwald H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces [J]. Advances in Colloid & Interface Science, 2003, 100(2): 563-584
- [9] Brockman H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions [J]. Current

Opinion in Structural Biology, 1999, 9(4): 438-443

- [10] Boucher J, Trudel E, Méthot M, et al. Organization, structure and activity of proteins in monolayers [J]. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2007, 58(2): 73-90
- [11] Magetdana R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes [J]. Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1999, 1462(1-2): 109-140
- [12] Boisselier É, Demers É, Cantin L, et al. How to gather useful and valuable information from protein binding measurements using Langmuir lipid monolayers [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2017, 243: 60-76
- [13] Phillips M, Sparks C. properties of apolipoprotens at the air-water interface [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1980, 348(1): 122-137
- [14] Bénarouche A, Point V, Parsiegla G, et al. New insights into the pH-dependent interfacial adsorption of dog gastric lipase using the monolayer technique [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 111: 306-312
- [15] Desjardins A, Proctor H, Bairoch A, et al. Reduced virulence of trichothecene nonproducing mutants of gibberellazeae in wheat field tests [J]. Mol. Plant Microbe Interact, 1996, 9: 775-781
- Mcmullen M, Jones R, Gallenberg D. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devasting impact [J]. Plant Disease, 1997, 81(12): 1340-1348
- [17] Nganje W, Bangsund D, Leistritz F, et al. Regional economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley [J]. Review of Agricultural Economics, 2004, 26(3): 332-347
- [18] Lou Z, Li M, Sun Y, et al. Crystal structure of a secreted lipase from gibberellazeae reveals a novel "double-lock" mechanism [J]. Protein & Cell, 2010, 1(8): 760-770
- [19] Wang F, Zhang H, Zhao Z, et al. Recombinant lipase from gibberellazeae exhibits broad substrate specificity: A comparative study on emulsified and monomolecular substrate [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(7): 1535