

超高压处理对蛹虫草汁纤维素酶活性的影响

朱双杰^{1,2}, 潘见^{*1}, 杨俊杰¹, 周安^{1,3}

(1. 合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009; 2. 滁州学院 生物与食品工程学院, 安徽 滁州 239012; 3. 安徽中医学院 中药学系, 安徽 合肥 230038)

摘要: 为了明确超高压加工技术对纤维素酶活性的影响, 分别研究了压力、保压时间、温度、乙醇体积分数、加压次数和 pH 值等对蛹虫草汁中纤维素酶的羧甲基纤维素酶活性(CMC)和滤纸酶活(FPA)的影响。结果表明, 纤维素酶的最适压力、保压时间、温度、乙醇体积分数、pH 值和加压次数分别为: 400 MPa、10 min、35 ℃、30 %, pH 4.0~7.0, 加压 1 次, 在最适条件下, CMC 酶活比处理前分别提高了 82.07%、52.41%、87.22 %、54.48%、67.52%和 66.67 %; FPA 酶活比处理前分别提高了 97.37%、61.4 %、69.4 %、61.4%、1.31%和 33.91 %。因此, 利用超高压处理能有效提高蛹虫草汁中的纤维素酶活性。

关键字: 超高压处理; 纤维素酶; 蛹虫草; 滤纸酶活性(FPA); 羧甲基纤维素酶活性(CMC)

中图分类号: TS 201.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)01—0062—06

Effect of Ultrahigh Pressure Processing on the Activities of Cellulose in *C. militaris* Juice

ZHU Shuangjie^{1,2}, PAN Jian^{*1}, YANG Junjie¹, ZHOU An^{1,3}

(1. Institute of Natural Medicine, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 2. School of Biotechnology and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou 239012, China; 3. Department of Pharmaceutics, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

Abstract: In order to clarify the effects of ultrahigh pressure processing (UHP) on the activities of cellulose, the CMC and FPA enzyme activities of cellulose in *C. militaris* juice were studied by pressure, holding time, temperature, ethanol concentration, times of pressure and pH. The result showed that the optimal pressure, holding time, temperature, ethanol concentration, times of pressure and pH of the enzyme were 400 MPa, 10 min, 35 ℃, 30 %, pH 4.0–7.0 and pressure for 1 times, respectively. Under the optimum conditions, the CMC enzyme activity were enhanced by 82.07%, 52.41%, 87.22 %, 54.48%, 67.52% and 66.67 %, and the FPA enzyme activity was enhanced by 97.37%, 61.4 %, 69.4 %, 61.4%, 1.31% and 33.91 %, respectively. The experiment illustrated that the ultra-high pressure treatment could enhance the activity of cellulose in *C. militaris* juice.

Keywords: ultrahigh pressure processing, cellulase activity, *Cordyceps militari*, enzyme activity (FPA), enzyme activity (CMC)

收稿日期: 2014-05-14

基金项目: 安徽高校省级优秀青年人才基金重点项目(2013S0RL094ZD)。

作者简介: 朱双杰(1978—), 男, 安徽安庆人, 工学博士, 讲师, 主要从事农产品加工与贮藏研究。E-mail: zhushuangjie@163.com

* 通信作者: 潘见(1955—), 男, 安徽六安人, 工学博士, 教授, 主要从事农产品加工与贮藏研究。E-mail: panjian78@sina.cn

纤维素酶是一类能够将纤维素降解为葡萄糖的多组分酶系的总称,广泛的存在于植物的细胞壁中。由于该酶能有效地降解植物细胞壁中的纤维素,促进细胞壁中的多糖和黄酮等活性物质的释放,因此该酶常用于植物活性物质的提取^[1-2]。生产中纤维素酶常用于活性物质的提取,该法简单易行,但提取率不高,且加入的酶会增加后续处理成本^[2];酶协同超声法虽然能够显著增加活性物质的溶出,但其热效应会导致热敏性活性物质的损失。因此,研究如何增强植物本身纤维素酶的活性,对提高植物活性物质的提取率具有重要意义。

超高压技术为食品冷加工技术,该技术能有效杀灭食品中的微生物^[3],不改变食品の色香、味及营养价值^[4],已被应用于活性物质的提取研究中^[5]。已有的研究表明,该技术对酶活性的影响较复杂,取决于压力、温度、时间、加压次数、溶剂的性质、酸度值和处理对象的化学组成等^[6],如 100~400 MPa 的压力能钝化鲜橘汁的果胶甲基酯酶活性(PME)^[7],而 300~500 MPa 的压力明显提高了胡萝卜 PME 的活性^[8],杏、草莓和葡萄汁中的 PPO 在 100、400 和 600 MPa 时才会钝化,而苹果 PPO 钝化程度还取决于 pH,且在压力达到 100~700 MPa 时才将其钝化^[9-11]。可见,研究超高压对酶活性影响时,具体问题需要具体分析。

作者首次采用超高压技术,研究超高压、保压时间、保压温度、乙醇体积分数、加压次数以及 pH 值对蛹虫草纤维素酶活性的影响,旨在为蛹虫草新产品的开发与利用提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

鲜蛹虫草:辽宁丹东虫草合作社提供,由辽东学院刘晓红副教授鉴定。3,5-二硝基水杨酸(DNS)(分析纯),冰醋酸(分析纯)、醋酸钠(分析纯)、葡萄糖(分析纯),滤纸(定性)、羧甲基纤维素钠(试剂级):国药集团化学试剂有限公司产品。

高效液相色谱仪:Waters 公司产品;高速分散均质机:上海标本模型厂产品;超高压设备:天津华泰森淼生物工程有限公司产品;离心机:北京医用离心机厂产品。

1.2 实验方法

1.2.1 超高压处理纤维素酶样品的制备

虫草 10 g,加 10 mL 一定体积分数的乙醇溶液,并调节 pH 值到一定值,于 4 000 r/min 匀浆 5 min,浆液用耐高压聚乙烯塑料袋包装。采用超高压单因素实验条件处理后,于 25 mL 离心管中,6 000 g 离心 15 min,取上清液测酶活性。

1.2.2 单因素实验条件 在保压时间 10 min、温度 25 ℃、乙醇体积分数 30%、加压 1 次、pH 7.0 的条件下,考察压力对纤维素酶活性的影响;在压力 300 MPa、温度 25 ℃、乙醇体积分数 30%、加压 1 次、pH 7.0 的条件下,考察保压时间对纤维素酶活性的影响;在压力 300 MPa、时间 10 min、乙醇体积分数 30%、加压 1 次、pH 7.0 的条件下,考察温度对纤维素酶活性的影响;在压力 300 MPa、时间 10 min、温度 25 ℃、加压 1 次、pH 为 7.0 的条件下,考察乙醇体积分数对纤维素酶活性的影响;在压力 300 MPa、时间 10 min、温度 25±2 ℃、乙醇体积分数 30%、pH 7.0 的条件下,考察加压次数对纤维素酶活性的影响;在压力 300 MPa、保压时间 10 min、温度 25 ℃、乙醇浓度 30%、加压 1 次的条件下,考察温度对纤维素酶活性的影响。

1.2.3 葡萄糖标准曲线 标准曲线以葡萄糖质量浓度(0、0.20、0.40、0.60、0.80 和 1.00 mg/mL 水溶液)为横坐标,与 DNS 共热反应显色后,测吸光度值为纵坐标,得标准曲线 $y=2.0666x+0.1362$ ($R^2=0.9991$)

1.2.4 纤维素酶 FPA 酶活性的测定 滤纸酶活性(FPA)参考 GB/T 23881-2009 的方法:吸取 1 mL 酶液,37 ℃平衡 10 min。Whatman 滤纸条(1×6 cm)对称剪成 32 片后加入已编号的 25 mL 具塞的比色管中,用 1 mL 的 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液浸润滤纸片,37 ℃平衡 10 min。再依次加入 2 mL DNS 溶液(空白对照组),0.5 mL 酶液,5 mL 水。漩涡振动 5~10 s,37 ℃水浴 60 min,然后与沸水浴 5 min,用水定容值 5 mL。与 540 nm 测吸光度。滤纸酶活力(U/mL)即为酶催化作用下,每分钟生成 1 mol 葡萄糖所需的酶量。

1.2.5 纤维素酶 CMC 酶活性的测定 羧甲基纤维素酶活性(CMC)的测定参考 NY/T 912-2004 的方法:吸取 10 mL 羧甲基纤维素钠溶液,37 ℃平衡 10 min;吸取 10 mL 酶液,37 ℃平衡 10 min。吸取 2 mL 经过适当稀释的酶液,加入已编号的 25 mL 具塞的比色管中,再加 2 mL 羧甲基纤维素钠溶液(空白对照组加 4 mL DNS 溶液),电磁振动 3~5 s,37 ℃水

浴 30 min, 再加入 4 mL DNS 溶液终止酶解反应。然后与沸水浴 5 min, 用水定容值 5 mL。于 540 nm 测吸光度。羧甲基纤维素酶活力(U/mL)即为酶催化作用下, 每分钟生成 1 mol 葡萄糖所需的酶量。

1.2.6 数据处理与分析 每组实验重复 3 次, 实验结果采用平均值±标准差表示, 采用 SPSS 统计软件进行显著性分析, Origin 8.0 作图, Design-Expert 8.0 进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 压力对对蛹虫草汁纤维素酶活性的影响

图 1 为压力对纤维素酶活性的影响。在 300~400 MPa, 纤维素酶的活性随着压力的增加而增大; 其中在 400 MPa 时, 酶活性最大, 当压力超过 400 MPa 时, 纤维素酶的活性反而降低, 此研究结果与 Murao 等^[12]研究结论一致。Murao 等研究发现, 纤维素酶的活性随着压力的增加而增加, 300 MPa 酶活力是常压的 1.5 倍, 400 MPa 酶活力最大, 是常压的 1.7 倍。

压力增加纤维素酶的活性可能与其活性中心的微环境密切相关, 在一定的压力范围内, 酶分子活性中心的催化基团和结合基团相互靠近并定向, 有利于其余底物分子迅速形成过渡态, 加速酶促反应。此外, 有报道称低浓度的金属离子可激活纤维素酶的活性^[13]。Salvador 等^[14]研究证实了这一结论, 在缓冲溶液中, 压力对酶活力的影响是先降低(50~200 MPa), 再升高(20~400 MPa), 然后再降低(40~675 MPa)。进一步研究发现, 纤维素酶的活性与溶液的水活度具正向关性, 离子浓度低时水活度高。实验中随着压力的增加, 细胞内的细胞器被破坏, 原先被隔离的金属离子释放出来, 增加了溶液的离子浓度, 低浓度的离子增加了纤维素酶的活性。当压力进一步升高时, 超高压会改变酶活性中心的体积^[14], 使酶活性中心的空间变小, 影响了底物与进入活性中心, 或使活性中心的色氨酸从羧基或咪唑基的附近离开^[15], 酶与底物结合力降低, 导致酶促反应降低。

2.2 保压时间对蛹虫草汁纤维素酶活性的影响

图 2 显示了在压力 300 MPa、温度 25 ℃、乙醇体积分数 30%、加压 1 次、pH 7.0 的条件下, 时间对纤维素酶活性的影响。纤维素酶的 CMC 酶活在 5 min 时接近最大值, 纤维素酶的 FPA 酶活在 10 min

时达到最大, 之后随着保压时间的延长, CMC 酶活和 FPA 酶活基本稳定。保压时间增加纤维素酶的活性是因为超高压使微纤维链间氢键结合减弱, 吸水力增加, 纤维溶胀^[16], 细胞壁中的纤维素酶开始溶出, 并与溶胀的纤维结合进行酶促反应, 5 min 后, 纤维素酶已基本溶出, 酶促反应饱和, 因此变化不明显。FPA 酶活在 10 min 活性最大, 这可能与底物的不同有关^[17], 随着保压时间的延长, 溶胀纤维结构变得更加松散, 可及区增多, 非还原性末端也增多, 容易同时被内切酶和外切酶降解^[18]。

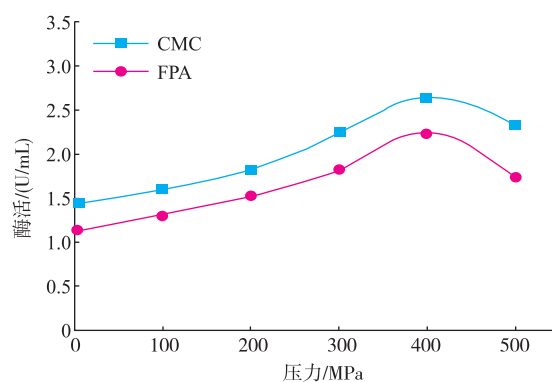


图 1 压力对蛹虫草汁中纤维素酶活性的影响

Fig. 1 Effect of pressure on cellulase activity in *C. militaris* juice

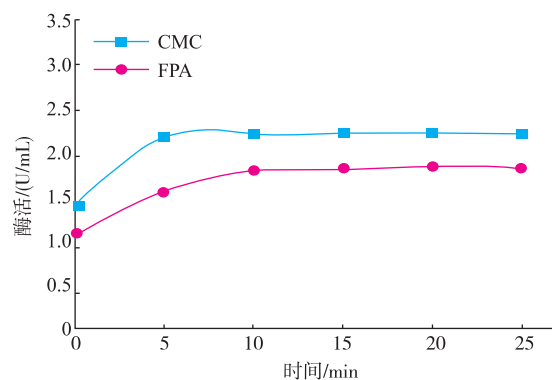


图 2 保压时间对蛹虫草汁中纤维素酶活性的影响

Fig. 2 Effect of holding time on cellulase activity in *C. militaris* juice

2.3 保压温度对蛹虫草汁纤维素酶活性的影响

为了考察超高压处理时不同温度对蛹虫草纤维素酶活性影响的变化规律, 在压力 300 MPa、保压时间 10 min、乙醇体积分数 30%、pH 7.0、加压 1 次条件下, 对蛹虫草汁采用 6 个水平的温度(15、25、35、45、55 和 65 ℃)与高压共同处理, 结果如图 3 所示。在 35 ℃时, 纤维素酶的 CMC 酶活性和 FPA 酶

活性最高,高于 35 ℃时,酶的活性开始迅速降低,在 65 ℃,CMC 酶活性和 FPA 酶活性分别为 0.32 U/mL 和 0.53 U/mL。

低温和高温都会抑制酶的活性,低温时,酶促反应低;提升温度会增加酶促反应,但会引起蛋白质的变性,并导致酶的活性降低。本实验中,温度高于 40 ℃,酶的活性迅速降低,而张敬辉等^[19]研究认为纤维素酶的最适温度为 50 ℃,这可能是温度升高引起了蛋白质的变性,超高压力和乙醇协同作用增强了酶蛋白的变性效果,从而导致酶解活性迅速降低。

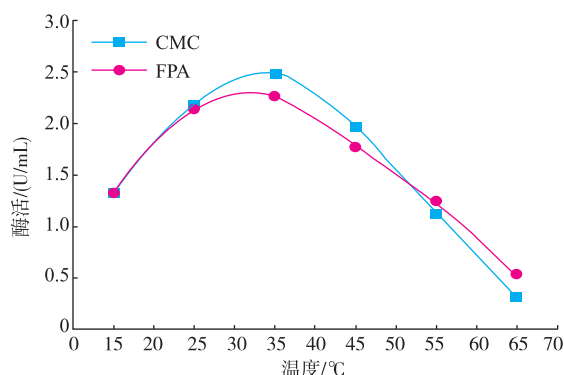


图3 温度对蛹虫草中 β -葡萄糖苷酶活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on cellulase activity in *C. militaris* juice

2.4 加压次数对蛹虫草汁纤维素酶活性的影响

为了考察加压次数对纤维素酶活性的影响,在压力 300 MPa、保压时间 10 min、乙醇体积分数 30%、pH 7.0、保压温度 25 ℃、对加压 1、2、3、4、5 次条件下纤维素酶活性的变化,结果如图 4 所示。加压次数对纤维素酶活性的影响显著,加压 1 次时,纤维素酶的 CMC 酶活性和 FPA 酶活性最高,之后随着加压次数的增加,纤维素酶的 CMC 酶活性和 FPA 酶活性迅速降低,加压 5 次时已基本测不出酶的活性。这是因为压力能改变酶蛋白的分子结构。加压 1 次时,促使酶活性中心靠近并定向,活性中心底物浓度相对增加,从而,加速了酶促反应;随着加压次数的增加,酶蛋白分子的构象不断微调,导致酶活性中心的空间不断减小,结合基团与催化基团过分靠近,且基团间的定向开始偏移,不利于酶蛋白与底物的结合与反应,当加压到一定次数时,酶蛋白活性中心结构解体,酶的催化活性不可逆地丧失^[20]。

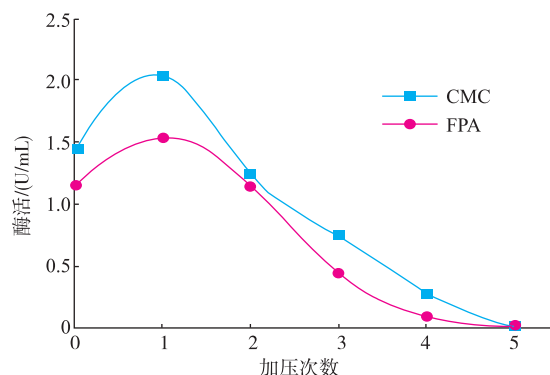


图4 加压次数对蛹虫草汁中纤维素酶活性的影响

Fig. 4 Effect of times of pressure on cellulase activity in *C. militaris* juice

2.5 乙醇体积分数对蛹虫草汁纤维素酶活性的影响

乙醇溶液通常作为活性物质的提取溶剂,而乙醇会促使蛋白质变性,因此考察乙醇体积分数对纤维素酶活性的影响是必要的。在压力 300 MPa、保压时间 10 min、pH 7.0、温度 25 ℃、加压 1 次的条件下,考察不同体积分数的乙醇溶液对纤维素酶活性的影响。结果如图 5 所示,在乙醇体积分数低于 30% 的范围内,纤维素酶的 CMC 酶活性和 FPA 酶活性随着乙醇体积分数的增加而增高,当乙醇体积分数高于 30% 时,酶活性开始下降。这是因为适当的乙醇浓度可以改变酶蛋白分子的二级结构,使肽链 α -螺旋增加而无规则卷曲减少,酶蛋白分子构象更有利于与底物接触并进行催化反应,当乙醇体积分数进一步增加时,引起酶蛋白质构象的改变超过酶分子所能承受的范围,虽然更有利于酶蛋白与底物的结合,但活力上升的幅度减小^[21]。此外,水可以赋予酶一定的柔性,以维持酶的分子构象和催化功能,乙醇作为极性溶剂,当体积分数达到一定值时,可以破坏酶反应必须的水层,从而降低酶的活性^[22]。

2.6 pH 值对蛹虫草汁纤维素酶活性的影响

pH 值是影响纤维素酶水解纤维素反应速率的重要因素之一。由于纤维素酶蛋白分子上有许多碱性和酸性的氨基酸侧链基团,因此随着 pH 的不同,这些基团解离状态就会不同,不同解离状态直接影响着酶的活性中心和催化中心与底物的结合与反应,或者影响酶蛋白的空间构象,从而改变酶的活性。因此在采用纤维素酶协同超高压提取的过程中,考察一定的压力下 pH 值的变化对纤维素酶活性的影响是必要的。结果如图 6 所示。纤维素酶在

pH 4.0~7.0 的范围内, 纤维素酶的 CMC 酶活性和 FPA 酶活性是增高的, 而当 pH 大于 7.0 后, 酶的活性迅速降低。与常压处理相比, 纤维素酶的最适 pH 范围变宽, 可能的因素有: ① 由于压力破坏了细胞的结构, 使得细胞内的金属离子释放出来, 从而提高了酶的活性^[13]; ② 压力改变了酶蛋白的分子构象, 使得酶蛋白更有利于与底物的结合并进行反应^[23]; ③

高压使纤维素的结构发生改变, 暴露了更多的还原性末端, 有利于其与酶蛋白结合^[18]。在 pH 过高时, 酶的活性下降, 这是因为: ① 碱性会引起酶蛋白分子空间构象的改变, 导致酶蛋白的变性, 使其失去催化功能; ② 影响酶蛋白分子的解离状态, 不利于酶蛋白与底物的结合^[24]。

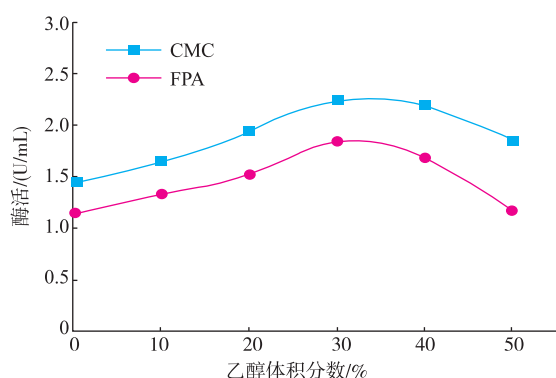


图 5 加压次数对蛹虫草汁中纤维素酶活性的影响

Fig. 5 Effect of ethanol concentration on cellulase activity in *C. militaris* juice

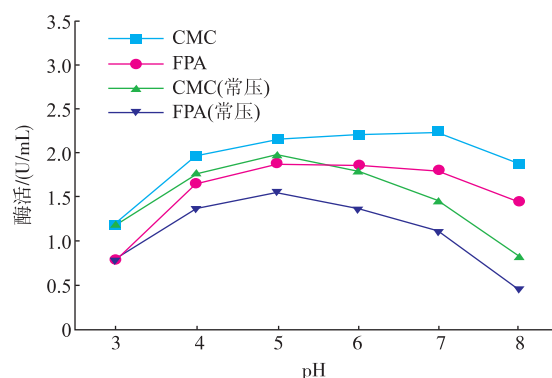


图 6 PH 值对蛹虫草汁中纤维素酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on cellulase activity in *C. militaris* juice

3 结 语

纤维素酶存在最适超高压、保压时间、温度、乙醇体积分数、加压次数和 pH 值, 高于或低于最适

值, 纤维素酶的 CMC 酶活和 FPA 酶活性均降低。

研究表明, 采用超高压技术加工蛹虫草汁时, 选择合适的加工参数可有效的提高蛹虫草汁中纤维素酶的活性。

参考文献:

- [1] 许婧, 欧阳嘉, 何冰芳. 组成型纤维素酶高产菌的筛选及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4): 85-89.
XU Jin, OUYANG Jie, HE Bingfang. Screening of an Efficient constitutive producing strain and fermentation optimization for cellulose production[J]. *J Food Sci Biotech*, 2008, 27(4): 85-89. (in Chinese)
- [2] 王岩岩, 李文娟. 纤维素酶提取陈皮黄酮的工艺条件[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(2): 71-76.
WANG Yanyan, LI Wenjuan. Study on conditions of extracting flavone from *pericarpium citri* reticulate by cellulose [J]. *J Food Sci Biotech*, 2008, 27(2): 71-76. (in Chinese)
- [3] Rendueles E, Omer M K, Alvseike, O. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review[J]. *LWT*, 2011, 44(2): 1251-1260.
- [4] Oey I, Lille M, Loey AV, and Hendrickx M. Effect of high pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: a review[J]. *Trends Food Sci Tech*, 2008, 19(5): 320-328.
- [5] Xi J, Wang B S. Optimization of ultrahigh-pressure extraction of polyphenolic antioxidants from Green tea by response surface methodology[J]. *Food Bioprocess Technol*, 2013, 6(2): 2538-2546.
- [6] 陈井旺, 木泰华. 超高压技术对食品中酶的作用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(1): 178-180.
CHEN Jinwang, MU Taihua. Researches of high pressure treatment technology on food enzyme [J]. *Food Resear and Develop*, 2010, 31(1): 178-180. (in Chinese)

- [7] Cano M P,Hernandez A,De Ancos B. High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products[J]. **J Food Sci**,1997,62(1):85-88.
- [8] Sila D N,Chantal Smout,Yusuf sata. Combined thermal and High pressure effect on carrot pectinmethylesterase stability and catalytic activity[J]. **J Food Engineer**,2007,78(2):755-764.
- [9] Jolibert F,Tonello C,Sagegh P. Effects des Hautes Pressions sur la Polyphenol Oxydases des Fruits [J]. **Bios Boissous**,1994,251(1):27-35.
- [10] Amati A,Castellari M,Matriardi L. Effects of High Pressure on Grape Musts Composition [J]. **Industria delle Bevande**,1996,25(2):324-328.
- [11] Anese M,Nicoli M C,Dallaglio G. Effect of High Pressure Treatments on Pectinase and Polyphenoloxidase Activities[J]. **J Food Biochem**,1995,18(2):285-293.
- [12] Murao S,Nomura Yu,Yushikawa M,et al. Enhancement of activities of cellulases under higher hydrostatic pressure [J]. **Bioscience Biotech Biochem**,1992,56(8):1366-1367.
- [13] 张洪鑫,陈小泉,蒋玲玲. 金属离子对纤维素酶内切酶和外切酶活性的影响[J]. 纤维素科学与技术,2011,9(4):6-13.
ZHANG Hongxin,CHEN Xiaoquan,JIANG Linlin. Influence of the metal ions on the activity of Endo-1,4-β-D-glucanase and Exo-1,4-β-D-glucanase[J]. **J Cellulose Sci Tech**,2011,9(4):6-13.(in Chinese)
- [14] Salvador A C,Santos M C,Saraiva J A. Effect of the ionic liquid[bmim]Cl and high pressure on the activity of cellulose[J]. **Green Chem**,2010,12:632-635.
- [15] 阎伯旭,孙迎庆,高培基. 有限酶切拟康氏木霉纤维素酶分子研究其结构域的结构与功能 [J]. 纤维素科学与技术,1998,6(3):1-8.
YAN Boxu,SUN Yingqing,GAO Peiji. Analysis of domain's structure and function of cellulases from *Trichoderma pseudokoningii* S-38 by Limited proteolysis[J]. **J Cellulose Sci Tech**,1998,6(3):1-8.(in Chinese)
- [16] Sugiyama J,Persson J,Chanzy H. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses[J]. **Macromolecules**,1991,24(9):2461-2466.
- [17] 刘洁,李宪臻,高培基. 纤维素酶活力测定方法评述[J]. 工业微生物,1994,2(4):27-31.
LIU Jie,LI Xianzheng,GAO Peiji. Evaluation of Methods for determination of cellulase activity [J]. **Industrial Microorganism**,1994,2(4):27-31.(in Chinese)
- [18] 张瑞萍. 纤维素酶的滤纸酶活和 CMC 酶活的测定[J]. 印染助剂,2002,19(2):51-54.
ZHANG Ruiping. Determination of filter paper enzyme activity and CMC enzyme activity of cellulose [J]. **Textile Auxiliaries**,2002,19(2):51-54.(in Chinese)
- [19] 张敬辉,蓝强,李公让,等. 纤维素酶降解影响因素研究[J]. 钻采工艺,2010,33(5):104-107.
ZHANG Jinghui,LAN Qiang,LI Gongrang,et al. Study on the factors affecting cellulose degradation [J]. **Drill Product Tech**,2010,33(5):104-107.(in Chinese)
- [20] 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展[J]. 自然科学进展,2003,13(1):21-29.
GAO Peiji. The research advances the degradation mechanism,the molecular structure and function of cellulases [J]. **Pro Nat Sci**,2003,13(1):21-29.(in Chinese)
- [21] 初志战,黄卓烈,巫光宏,等. 乙醇溶液对木瓜蛋白酶催化活性的影响[J]. 热带亚热带植物学报,2005,13(4):329-331.
CHU Zhizhan,HUANG Zuolie,WU Guanghong,et al. Effect of ethanol on catalytic activity of papain [J]. **J Trop Subtrop Bot**,2005,13(4):329-331.(in Chinese)
- [22] Wehtje E,Costes D,Adlercreutz P. Enantioselectivity of lipases:effect of water activity [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**,1997,3(5):221-230.
- [23] 曾庆梅,潘见,谢慧明,等. 超高压处理对辣根过氧化物酶二级结构及其活力的影响[J]. 食品科学,2005,26(5):29-33.
ZENG Qingmei,PAN Jian,XIE Huiming,et al. Effect of Ultra High Pressure (UHP) Treatment on the Secondary Structure and Activity of Horseradish Peroxidase(HRP)[J]. **Food Sci**,2005,26(5):29-33.(in Chinese)
- [24] Saha B C. Production,purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides* [J]. **Process Biochemistry**,2004,39(12):1871-187.