

文章编号:1673-1689(2011)06-0928-06

无患子提取物对 *Fusarium* sp. 发酵产脂肪酶的影响及其双水相萃取分离

张海蓉¹, 蔡宇杰¹, 廖祥儒^{*1}, 张峰¹, 张大兵²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏汉邦科技有限公司, 江苏 淮安 223001)

摘要: 研究了表面活性剂对 *Fusarium* sp. 的发酵产脂肪酶的影响。结果表明, 添加无患子提取物的酶活为最高, 说明无患子提取物是最佳的表面活性剂, 并且确定提取无患子提取物的液固比为 6 : 1 (mL : g) 时酶活达到最高。粗酶液经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后进行双水相萃取分离, 结果表明, 采用质量浓度为 30 g/dL 的 PEG(M 4000) 和质量浓度为 20 g/dL 的 NaH_2PO_4 时纯化系数 F 和萃取率 S_f 达到最高; 经过双水相萃取后, 该脂肪酶的纯化倍数可以达到 7.92, 回收率为 48.30%。

关键词: 脂肪酶; 发酵; 无患子; 酶活; 双水相

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Effect of Soapberry Extraction on Lipase Activity of *Fusarium* sp. and Lipase Extraction by Aqueous Two-Phase Systems

ZHANG Hai-rong¹, CAI Yu-jie¹, LIAO Xiang-ru^{*1}, ZHANG Feng¹, ZHANG Da-bing²
(1. Educational Ministry Key Laboratory of Industrial Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiang Su Hanbon Science & Technology Co. Ltd, Huai'an 223001, China)

Abstract: Effect of surfactant on lipase production of *Fusarium* sp. was investigated in this manuscript. The results showed that lipase activity was achieved at the maximum value in adding soapberry extraction, which indicated that soapberry extraction is the best surfactant, and lipase activity was the highest when the liquid-to-solid ratio is 6 : 1 (mL : g). Lipase extraction by Aqueous Two-phase System following the precipitation of the crude enzymes by ammonium sulfate was also studied. The results indicated that the highest of decontamination factor F and extraction rate S_f achieved when the conditions of extraction showed as follows: the molecular weight of PEG was 4000, the concentration of PEG(M 4000) was 30 g/dL, and the concentration of NaH_2PO_4 was 20 g/dL. At last, the lipase was purified 7.92 folds and the recovery was 48.30% by Aqueous Two-phase Systems.

Key words: lipase, fermentation, soapberry, enzyme activity, aqueous two-phase

收稿日期: 2010-10-20

基金项目: 国家 863 计划项目 (2010AA101501)。

* 通信作者: 廖祥儒 (1964—), 男, 江西南康人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生化及分子生物学研究。Email: 13771104596@163.com

脂肪酶,又称三酰基甘油酰基水解酶,是一种作用于甘油三酯的酯键水解酶^[1]。鉴于脂肪酶水解和合成反应的能力,它们有着重要的商业价值,应用极广泛,包括洗涤剂、化妆品、药物、和乳制品等^[2]。微生物来源的脂肪酶品种丰富,生产条件可人为控制,成本低等优点,而被大量研究^[3]。

无患子的主要化学成分是无患子皂苷、脂肪油、蛋白质^[4]。无患子可作为天然表面活性物质用于天然洗发香波及各种洁肤护肤化妆品中^[5];无患子皂苷还具有降血压、抗真菌、杀虫等多种生物活性,如 Tamura^[6]等发现从无患子果皮中提取的皂苷混合物 SP-mix 有明显的抗菌活性;Ojha^[7]等研究表明,无患子皂苷对乳酸杆菌的毒性低,可用于女性卫生用品。本实验通过在培养基中添加无患子提取物,大大的提高了酶活,为工业化大生产提供了很好的科学意义。

双水相萃取技术是近年来出现的很有发展前途的新型生化分离技术,其原理是利用物质在互不相溶的两相中分配系数的差异进行分离纯化^[8],与传统脂肪酶的提纯方法相比,操作简单、产品活性损失量小、适合大规模应用等特点^[9]。本文研究了双水相萃取体系对脂肪酶粗酶液的萃取,并对该系统进行了优化,对脂肪酶的工业化大生产有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌体 真菌 *Fusarium* sp. SYBC Lz,由本实验室人筛选并保藏在 -20°C 的冰箱中。

1.1.2 主要试剂 吐温 20、吐温 80、聚氧乙烯辛基苯基醚(乳化剂 OP)、无患子; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、PEG (M 1000)、PEG (M 2000)、PEG (M 4000)、PEG (M 6000); K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaH_2PO_4 ; 对硝基苯丁酸酯(*p*-NPB)、Tris-HCl 缓冲液(pH 9.5)、Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)、考马斯亮蓝 G-250 等。

1.1.3 主要仪器 无菌超净工作台购于苏州安泰空气技术有限公司产品;回转式恒温调速摇瓶柜购于上海苏坤实业有限公司产品;电子天平购于上海民桥精密仪器有限公司产品;pH 计购于梅特勒-特利多仪器(上海)有限公司;低温高速离心机购于日本日立(HITACHI)公司;恒温水浴锅购于上海一恒科技有限公司;紫外可见分光光度计购于尤尼科(上海)仪器有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅购于上海医用核子仪器厂;恒温培养箱购于广东仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 培养基

1) 平板培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基 PDA。

2) 种子培养基:蛋白胨 5 g/L,酵母膏 3 g/L,蔗糖 12 g/L,麦芽糖 3 g/L。500 mL 的三角瓶装液量为 50 mL, 121°C 蒸汽灭菌 20 min。

3) 发酵培养基:蛋白胨 5 g/L,酵母膏 6 g/L, NaH_2PO_4 3 g/L,羊油 20 g/L,无患子提取液 20 mL/L。500 mL 的三角瓶装液量为 50 mL, 121°C 蒸汽灭菌 20 min。

1.2.2 无患子提取物的获得 将无患子果洗净、晾干、剥壳、粉碎,采用不同的固液比, 55°C 去离子水,水提液静置约 3 h^[10],离心除沉淀,留上清液。

1.2.3 粗酶液的制备 低温贮存的菌种经过平板活化后,接种于种子培养基中,摇床培养(30°C , 120 r/min, 1 d);然后接种于摇瓶发酵培养基中,接种量为 3%~4%,摇床培养(30°C , 120 r/min, 3 d);低温高速冷冻离心机离心,8 000 r/min,离心 15 min;收集上清液,然后在脱脂棉上脱脂,除去多余的油脂,收集这些酶液,冷冻干燥得到干粉,每 1 g 的该干粉用 10 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)溶解,得到粗酶液, 4°C 贮存备用。

1.2.4 脂肪酶活性测定方法 脂肪酶活性的测定以对硝基苯丁酸酯(*p*-NPB)为底物,参考 Margesin^[11]等人的测定方法并略作修改。每 4 mL 测定体系中含:3.7 mL Tris-HCl(pH 9.5)缓冲液, 30°C 水浴锅保温 15 min 后,加入 0.1 mL 酶液,再加入 0.1 mol/L 对硝基苯丁酸酯 0.2 mL,快速震荡,在 405 nm 下测定吸光值。利用对硝基酚的消光系数为 18 600 L/(mol $\times$ cm)计算对硝基酚的产生量,以 1 min 内催化产生 1 μmol 的对硝基酚所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.5 蛋白质含量的测定 蛋白含量的测定本实验采用 Bradford 检测法。在试管中加入 0.1 mL 酶液,对照为 100 μL 双蒸水替代相应的酶液,再加入 4 mL 0.01 g/L 考马斯亮蓝 G-250 溶液,振荡摇匀。5 min 后在 595 nm 处测定吸光度。测量在 1 h 内完成。

1.2.6 盐析范围的确定 取一定体积的粗酶液,分级加入不同量的硫酸铵,第一次加完硫酸铵后,静置 2 h 左右,离心得到第一个分级沉淀,上清液以同样的操作加入硫酸铵,得到第二个分级沉淀,如此连续进行便可得到多个分级沉淀,将每个分级沉淀重新溶解于一定体积的 pH 值 7.0 的 Tris-HCl

缓冲液中,分别测定蛋白含量和脂肪酶酶活^[12]。

1.2.7 双水相萃取 制备 20 mL 一定浓度的双水相体系^[13],加入经过 40 g/L~60 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 处理后的 4 mL 粗酶液,混匀,于冰箱 4 °C 静置分相。读出上下相体积。

1.2.8 双水相萃取体系的优化方法

1) PEG 分子量对脂肪酶分离的影响:分别制取浓度为 20 g/L 的 PEG (M 1000)、PEG (M 2000)、PEG (M 4000)、PEG (M 6000), KH_2PO_4 浓度为 20 g/L 构成的双水相体系,萃取、用 Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.0)透析 1 d,每 6 h 更换一次缓冲液,然后进行测定。

2) PEG(M 4000)浓度对脂肪酶分离的影响:制取 KH_2PO_4 浓度为 20 g/L,PEG (M 4000)浓度分别为 10、20、30、40 g/L 构成的双水相体系,萃取、用 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)透析 1 d,每 6 h 更换一次缓冲液,然后进行测定。

3) 盐对脂肪酶分离的影响。制取 PEG (M 4000)浓度为 30 g/L,20 g/L 的 NaH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 构成的双水相体系,萃取、透析同上,测定。

4) NaH_2PO_4 浓度对脂肪酶分离的影响:制取 PEG (M 4 000)浓度为 30 g/L, NaH_2PO_4 浓度分别为 10、15、20、25 g/L 构成的双水相体系,萃取、透析同上,测定。

1.2.9 数据处理方法

1) 分配系数: $K = (U_T/P_T)/(U_B/U_B)$

(U_T :上相中总酶活力; P_T :上相中总蛋白; U_B :下相中总酶活力; U_B :下相中总蛋白)。

2) 两相体积比: $R = V_T/V_B$
(V_T :上相体积; V_B :下相体积)。

3) 脂肪酶萃取率: $S_f = RK/(1 + RK)$

4) 脂肪酶纯化系数: $F = (U_T/P_T)/U_1$,
(U_1 :原始酶液的脂肪酶活力)

2 结果与分析

2.1 脂肪酶提取条件的确定

2.1.1 无患子提取物对脂肪酶酶活的影响 在发酵培养基中添加不同表面活性剂进行酶活的比较,如图 1。

从图中得知,添加无患子提取物的酶活远远高于对照,近达到前者的 6.4 倍,也远远高于常用的表面活性剂乳化剂 OP、吐温-20、吐温-80 的酶活。说明无患子提取物是很好的表面活性剂,这对提高脂肪酶的酶活提供了很好的信息。

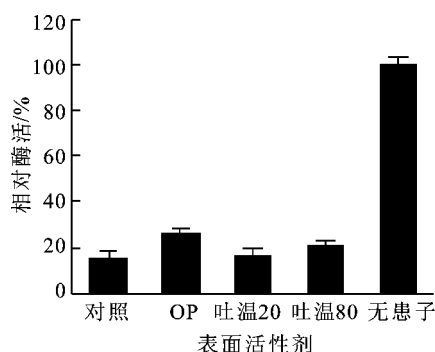


图1 表面活性剂对脂肪酶酶活的影响

Fig. 1 Effect of surfactants on lipase activity

然后,对无患子提取物的液固比做了进一步的实验,如图 2 所示。

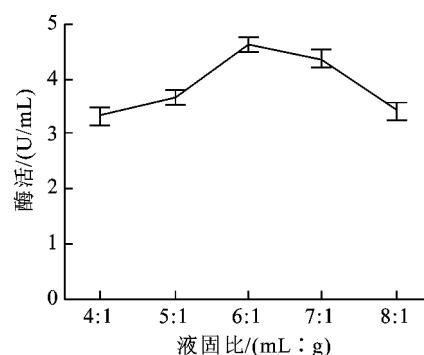


图2 无患子提取物液固比对脂肪酶酶活的影响

Fig. 2 Effect of the liquid-to-solid ratio of soapberry extraction on lipase activity

从图中可以看出,随着液固比的增大,提取物加入后对酶活的影响趋势是先增加,当液固比为 6:1(mL:g)时,酶活达到最高 4.61(U/mL),随着水的继续加入,酶活开始降低。当液固比为 4:1 和 8:1(mL:g)时,分别为最高酶活的 72.2% 和 74.0%。

鉴于此,所以在对下面的酶的纯化过程时选用添加液固比为 6:1 的无患子提取物的发酵液。

2.1.2 盐析范围的确定 为了方便双水相萃取操作,先在萃取前进行简单的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀,除去其他杂质。最后得出, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 40~60 g/L 时,酶活达到了粗酶的 50% 以上,如图 3 所示,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度低于 40 g/L 或高于 60 g/L 时,沉淀的酶活不及粗酶酶活的 40%。所以确定盐析范围为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度 40~60 g/L。

2.2 脂肪酶双水相萃取条件的优化

2.2.1 最适 PEG 相对分子量的确定 以 20 g/L 不同相对分子质量的 PEG 和 20 g/L 的 KH_2PO_4 组成的双水相萃取体系,按 1.2.7 条件下进行萃取、透析,最后分别测定该脂肪酶的比活、两相间分配系数 K 、体积比 R 、纯化系数 F 和萃取率 S_f 。

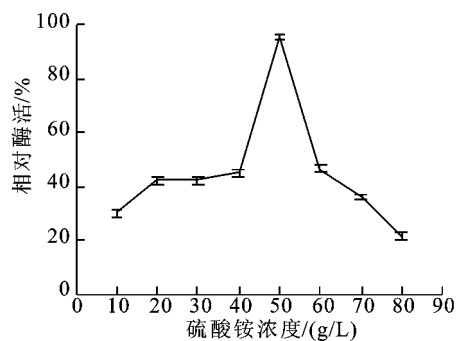


图 3 硫酸铵分级沉淀

Fig. 3 Ammonium sulfate fractional precipitation

成相聚合物的平均分子质量是影响分配平衡的重要因素。通过计算,分配系数 K 均大于 1,说明脂肪酶主要分配于上相。如图 4,随着 PEG 分子量的增加,脂肪酶的萃取率 S_f 。呈现先增大后减小的趋势,在 PEG (M 4000)时萃取率为最高。一般当聚合物平均分子质量较低时,蛋白质更易分配于富含该聚合物的相中,随 PEG 平均分子质量的增大,黏度大,分子间相应碰撞下降,分相困难,对目标蛋白的选择性也会随之降低。纯化系数却呈现先减小后增大再减小的趋势,但仍以 PEG (M 4000)的纯化系数为最高,并且 PEG (M 4000)的比活也最高(表 1),所以选择 PEG (M 4000)进行下一步实验。

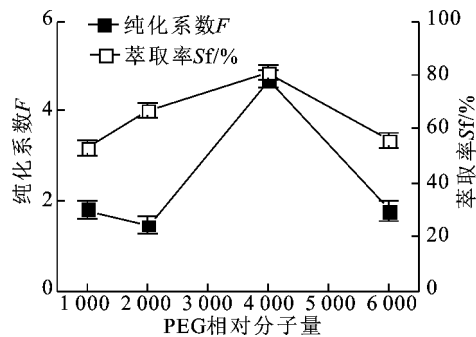


图 4 PEG 分子量对双水相萃取的影响

Fig. 4 Effect of PEG molecular weight on aqueous two-phase systems

表 1 PEG 分子量对脂肪酶比活的影响

Tab. 1 Effect of PEG molecular weight on specific activity of Lipase

PEG 相对分子量	分层	体积/(mL)	总酶活/(U/mL)	总蛋白质量浓度/(mg/mL)	比活/(U/mg)
1000	上相	5.5	1 405.8	50.33	27.93
	下相	18.5	7 216.85	362.43	19.91
2000	上相	8.9	2 540.95	112.42	22.60
	下相	15.1	5 413.35	285.31	18.97
4000	上相	13.5	6 960.60	95.36	72.99
	下相	10.5	4 093.95	183.78	22.28

续表 1

PEG 相对分子量	分层	体积/(mL)	总酶活/(U/mL)	总蛋白质量浓度/(mg/mL)	比活/(U/mg)
6000	上相	7.8	3 170.70	114.81	27.62
	下相	16.2	4 192.56	396.29	10.58

2.2.2 PEG(M 4000)最适浓度的确定 制取浓度为 20 g/L KH_2PO_4 ,不同浓度的 PEG (M 4000)的双水相体系。在 1.2.7 条件下对脂肪酶进行萃取,然后分别测定该酶的比活、两相间分配系数 K 、相比 R 、纯化系数 F 和萃取率 S_f 如图 5。

表 2 PEG (M4000)浓度对脂肪酶比活的影响

Tab. 2 Effect of concentration of PEG (M4000) on specific activity of Lipase

PEG4000 质量浓度/(g/L)	分层	体积/(mL)	总酶活/(U/mL)	总蛋白质量浓度/(mg/mL)	比活/(U/mg)
10	上相	8.0	2 764.80	101.05	27.36
	下相	16.0	5 208.00	280.05	18.60
20	上相	10.2	4 066.74	100.44	40.49
	下相	13.8	4 142.82	231.94	17.78
30	上相	16.2	9 272.88	114.43	81.03
	下相	7.8	1 993.68	120.24	16.58
40	上相	10.5	4 455.15	96.09	46.36
	下相	13.5	4 379.40	245.69	17.83

结果表明:当 PEG(M 4000)浓度增加时,萃取率和纯化效率均呈现先增大后减小的趋势,当 PEG (M 4000)浓度达到 30 g/L,二者均达到最大值。产生此现象可能是由于随着 PEG(M 4000)浓度在一定范围内增加,系统远离临界点,有利于目标蛋白富集于 PEG(M 4000)相中。但当 PEG (M 4000)浓度增大到一定程度时,成相物质分子间的作用力增大,相界面张力也增大,系统黏度也增大,溶质在相间的传递和在相内的扩散阻力大大增加,反而不利于目标蛋白分子进入 PEG (M 4000)相。且从表 2 可以看出,当质量浓度为 30 g/L 比活也为最高。因此,综合分析确定 PEG(M 4000)的最适质量浓度为 30 g/L。

2.2.3 最适盐成分的确定 固定 PEG (M 4000)的质量浓度为 30、20 g/L 的 NaH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 制取不同的双水相体系。仍然按 1.2.7 条件操作,并计算各值。计算结果如图 6。

从图中看出 NaH_2PO_4 的纯化系数与萃取率为最高,同时比活也为最高(表 3)。此外还可以看出, K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 的纯化系数、萃取率和比活差

别不大,但 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的3个数值却比较小,说明 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为盐来进行双水相萃取对该脂肪酶的效果不好,会抑制酶活。所以确定以 NaH_2PO_4 作为盐来进行后面的双水相萃取。

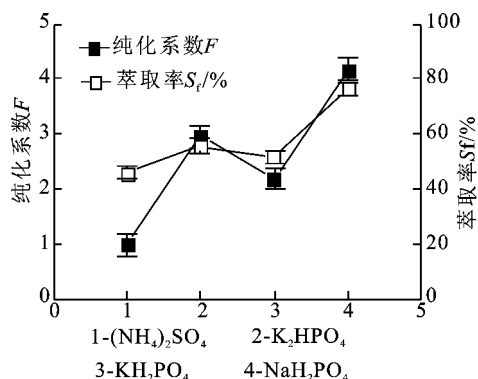


图6 盐对双水相萃取的影响

Fig. 6 Effect of salt on aqueous two-phase systems

表3 盐对脂肪酶比活的影响

Tab. 3 Effect of salt on specific activity of Lipase

盐成分	分层	体积/ (mL)	总酶活/ (U/mL)	总蛋白 质量浓度/ (mg/mL)	比活/ (U/mg)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	上相	5.6	1 062.88	70.74	15.03
	下相	18.4	1 880.48	347.67	5.41
K_2HPO_4	上相	7.2	3 474.00	75.91	45.76
	下相	16.8	4 236.96	270.67	15.65
KH_2PO_4	上相	7.8	2 981.16	87.67	34.01
	下相	16.2	4 518.18	294.82	15.03
NaH_2PO_4	上相	12.1	6 077.83	93.89	64.73
	下相	11.9	4 230.45	280.29	20.31

2.2.4 NaH_2PO_4 最适浓度的确定 固定 PEG(M 4000)的质量浓度为 30 g/L,以不同浓度的 NaH_2PO_4 制取双水相体系。仍然按 1.2.7 条件操作,并计算各值。

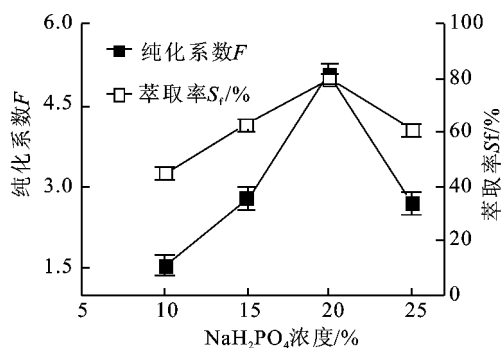


图7 NaH_2PO_4 浓度对双水相萃取的影响

Fig. 7 Effect of concentration of NaH_2PO_4 on aqueous two-phase systems

随着 NaH_2PO_4 浓度不断增大,纯化系数与萃

取率均呈现先增大,当 NaH_2PO_4 质量浓度为 20 g/L 时,纯化系数与萃取率均达到最高(图 7),同时比活同样为最高(见表 4),当继续加大浓度,纯化系数与萃取率开始减小,说明浓度太高,反而不利于该脂肪酶的双水相萃取。所以确定 NaH_2PO_4 质量浓度为 20 g/L。

表4 NaH_2PO_4 浓度对脂肪酶比活的影响

Tab. 4 Effect of concentration of NaH_2PO_4 on specific activity of Lipase

NaH_2PO_4 浓度/%	分层	体积/ (mL)	总酶活/ (U/mL)	总蛋白 质量浓度/ (mg/mL)	比活/ (U/mg)
10	上相	9.8	3 134.04	130.61	24.00
	下相	13.2	5 000.16	231.04	21.64
15	上相	10.5	4 783.80	110.71	43.21
	下相	13.5	4 097.25	208.10	19.69
20	上相	11.9	5 976.18	75.77	78.87
	下相	12.1	3 631.21	186.52	19.47
25	上相	10.5	4 036.20	96.09	42.00
	下相	13.5	4 756.05	226.90	20.96

2.2.5 双水相萃取的结果 通过以上双水相体系优化的实验,最后确定双水相萃取体系为 30 g/L 的 PEG (M4000)和 20 g/L 的 NaH_2PO_4 。该体系对脂肪酶萃取分离的结果如表 5。

表5 双水相萃取纯化的结果

Tab. 5 The result of aqueous two-phase extraction

纯化 过程	总酶活/ (U/mL)	总蛋白 质量浓度/ (mg/mL)	比活/ (U/mg)	纯化 倍数	回收 率/%
粗酶液	6 212.00	700.12	8.87	0.00	100
硫酸铵 沉淀	5 181.78	225.91	22.94	2.59	83.42
双水相 萃取	3 000.25	42.67	70.33	7.92	48.30

从表中看出,经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀和双水相萃取后,该脂肪酶被纯化了 7.92 倍,酶的回收率达到了 48.30%,总酶活为 3 000.25 (U/mL),比活为 70.33 (U/mg)。

3 讨论

由于脂肪酶产生菌的特性不同,表面活性剂对其产脂肪酶的作用也有所不同。通过研究在真菌 *Fusarium* sp. 的发酵培养基中添加不同的表面活性剂,与对照相比,虽然乳化剂 OP、吐温 20、吐温 80 对该菌均有作用,但作用效果不明显;而无患子

提取物的作用显著,确定它是最佳的表面活性剂,对该菌产脂肪酶具有巨大作用。目前,对无患子作为表面活性剂的研究还比较少,这对以后的研究提供了很大的科学价值,而且无患子提取物对该菌的作用机制也有待于进一步研究。

此外,双水相萃取分离纯化脂肪酶,由于具有

操作简便、分离效果好、所用试剂常见、条件温和、酶活损失少、回收率高等特点近年来得到越来越多的应用。从本实验也可以看出,该方法非常适合于脂肪酶的分离纯化,但由于 pH 也对双水相萃取有影响,还需在这方面加以考虑分析。

参考文献(References):

- [1] Rapp P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*[J]. *Enzyme Microbial Technol*, 1995, 17: 832—838.
- [2] Camargo-de-Morais MM, Maia MMD, Borba1 FFS, et al. Oil/mineral-salts medium designed for easy recovery of extra-cellular lipase from *Fusarium oxysporum* AM3[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2003, 19: 17—20.
- [3] Hoshino T, Ohgiya S, Shimanukil T, et al. Production of low temperature active lipase from the pink snow mold[J]. *Biotechnol Lett*, 1996, 18(15): 509—510.
- [4] 谢辉. 无患子皂苷分离纯化的研究[D]. 合肥:合肥工业大学, 2007.
- [5] 孙洁如, 陈孔常, 周鸣方, 等. 无患子表面活性物及其复配体系的性质研究[J]. *日用化学工业*, 2002, 32(4): 16—18.
SUN Jie-ru, CHEN Kong-chang, ZHOU Ming-fang, et al. Study on surface active substrate of soapberry and characterization of its mixed system[J]. *Industrial Daily Chemical*, 2002, 32(4): 16—18. (in Chinese)
- [6] Tamura Y. 无患子果皮中皂苷的抗皮真菌活性[J]. *国外医学中医中药册*, 2004, 24(5): 300—301.
Tamura Y. Antifungal activity of soapberry saponin[J]. *The Volume of Foreign and Traditional Chinese Medicine*, 2004, 24(5): 300—301. (in Chinese)
- [7] Ojha J, Maikhuri P, Gupta G. Effect of spermicides on *Lactobacillus acidophilus* in vitro-nonoxynol-9 vs. *Sapindus saponins*[J]. *Contraception*, 2003, 68: 135—138.
- [8] 恽丽红. *Burkholderia manna* SYBC LI-1 产脂肪酶发酵条件优化及酶学性质研究[D]. 无锡:江南大学, 2008.
- [9] Bandmann N, Collet E, Leijen J, et al. Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems[J]. *J Biotechnol*, 2000, 79: 161—172.
- [10] 魏凤玉, 余锦城, 解辉. 天然无患子皂苷的提取分离[J]. *安徽化工*, 2007, 33(3): 15—16.
WEI Feng-yu, YU Jin-chen, XIE Hui. Extraction separation of natural soapberry saponin[J]. *Anhui Chemical Industry*, 2007, 33(3): 15—16. (in Chinese)
- [11] Margesin R, Feller G, Hammerle M, et al. A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil[J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24: 27—33.
- [12] 王蕾. *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 产脂肪酶发酵条件优化及酶学性质研究[D]. 无锡:江南大学, 2008.
- [13] 陈利梅, 李德茂. 产脂肪酶菌株的筛选及其脂肪酶的双水相分离[J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(2): 433—435.
CHEN Li-mei, Li De-mao. Screening of lipase-producing microorganism and lipase extraction by two aqueous two-phase systems[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2010, 49(2): 433—435. (in Chinese)