

华根霉胞内脂肪酶同功酶酶学性质研究*

阮振华 王 栋 徐 岩**

(江南大学教育部工业生物技术重点实验室 无锡 214036)

摘要 华根霉(*Rhizopus chinensis* CCTCCM201021)细胞破碎液经硫酸铵分级盐析、Phenyl-Sepharose FF 疏水层析、DEAE-Sepharose FF 离子交换层析和 Sephadex G100 凝胶层析得到两种脂肪酶同功酶:Lip1 和 Lip2。SDS-PAGE 显示其亚基分子量分别为 59.2kD 和 39.4kD。Lip1 和 Lip2 的最适反应 pH 和最适反应温度相近,分别为 8.0、8.5 和 40℃、35℃。但底物专一性差异明显:Lip1 对 *p*-NP 脂肪酸酯的长链脂肪酸有较高的专一性,Lip2 对 *p*-NP 脂肪酸酯的短链脂肪酸专一性较好,Lip1 对三油酸甘油酯表现 1,3-位置特异性,而 Lip2 没有位置选择性。1mmol/L 的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对 Lip1、Lip2 有较好的激活作用,SDS 强烈抑制酶活力。Lip1、Lip2 在环己烷、正己烷、正庚烷和异辛烷(30% V/V)中稳定性良好。

关键词 华根霉,脂肪酶,同功酶,性质

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1042-05

Purification and Characterization of Lipases from *Rhizopus chinensis**

RUAN Zhen-Hua WANG Dong XU Yan**

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education
School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract Two lipase active fractions Lip1 and Lip2 were purified from the cell extract of *Rhizopus chinensis* CCTCCM201021. Both gave a single band on SDS-PAGE after using ammonium sulfate precipitation, Phenyl-Sepharose FF, DEAE-Sepharose FF and Sephadex G100 gel filtration chromatographies. The molecular masses of two lipases were 59.2kD and 39.4kD respectively. Lip1 and Lip2 showed optimal pH at 8.0 and 8.5 and their optimal temperatures were 40℃ and 35℃ respectively. The substrate specificity of the two lipases was obviously different. Lip1 was more specific to long chain fatty acid of *p*-nitrophenyl esters while Lip2 had a preference for the hydrolysis of short chain fatty acid of *p*-nitrophenyl esters. Lip1 had 1,3-position specificity for triacylglycerols hydrolysis while Lip2 had nonspecific position. Both lipases were stimulated by Ca^{2+} 、 Mg^{2+} while SDS had strong inhibition on their activities. Lip1 and Lip2 had good stability in cyclohexane, hexane, heptane and isooctan(30% V/V).

Key words: *Rhizopus chinensis*, Lipases, Isoenzymes, Characterization

微生物脂肪酶具有重要的工业应用价值。目前许多广泛应用的真核微生物商品脂肪酶制剂^[1~3]包含多种脂肪酶活性组分,即脂肪酶同功酶。根霉属微生物(*Rhizopus* sp.)是脂肪酶的重要生产菌。早期研究发现一些根霉也能产多种不同形式性质各异的脂肪酶^[4~6]。由于来源不同、生产方式及批次不同,脂肪酶制剂中同功酶的组成比例存在较大差异,使得酶制剂在生物催化反应中缺少可重复性,反应

结果常常难以预测。因此,对于脂肪酶同功酶进行分离纯化及酶学性质进行研究不仅有利于指导脂肪酶的工业应用,更为有目的的选择性生产脂肪酶提供理论依据。

真核微生物脂肪酶同功酶的产生具有不同的机制,在 *Candida rugosa* 脂肪酶同功酶产生过程中至少涉及 7 个基因^[7],而根霉产生的不同形式脂肪酶一般认为主要是单一基因翻译后修饰和蛋白质部分

* 国家自然科学基金项目(No. 130470046) 教育部长江学者和创新团队发展计划(No. IRT0532) 江苏省高技术研究计划工业项目(No. BG2006011)

** 通讯作者 Tel: 0510-85918196, E-mail: yxu@sytu.edu.cn

收稿日期:2007-2-14 修回日期:2007-4-16

水解的产物,这些不同形式的脂肪酶在蛋白特性、催化特性以及不同脂肪酶活性组分的定位等方面存在一定差异^[8]。对根霉微生物脂肪酶进行研究及不同催化特性的脂肪酶的发现不仅有助于加深对根霉微生物脂肪酶代谢合成的理解和选择性地生产;也可进一步拓展脂肪酶在不同工业领域的应用。

本研究室在前期研究中从酿造浓香型大曲酒的酒曲中筛选到1株华根霉(*Rhizopus chinensis*) CCTCC M201021,其全细胞脂肪酶具有很强的催化短链芳香酯合成能力^[9]。研究发现其催化酯合成能力主要由胞膜脂肪酶活性组分所表现^[10]。进一步研究^[11]表明该华根霉胞内可能存在多种脂肪酶活性组分或脂肪酶同功酶。本文对华根霉胞内脂肪酶进行分离纯化和基本酶学性质研究,为更好的研究、应用及生产华根霉脂肪酶进行初步的理论探讨。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

华根霉(*Rhizopus chinensis* CCTCCM201021)。

1.2 发酵培养基

葡萄糖 10g,豆饼粉 40g,蛋白胨 60g, CaCl₂ 6g, ZnSO₄ 1.5g,橄榄油 20g,定容至 1L, pH5.5,灭菌待用。

1.3 主要试剂与amp;仪器

Phenyl-Sepharose 6 FF、DEAE-Sepharose FF、Sephadex G100、蛋白低分子量标准试剂均购自 Amersham;对硝基苯酚丙酸酯(*p*-nitrophenyl propionate, *p*NPC3)对硝基苯酚棕榈酸酯(*p*-nitrophenyl palmitate, *p*NPC16)等一系列酯均购自 Sigma 公司,超滤膜(截留分子量为 10kD)购自美国 Millipore,牛血清白蛋白购自中国医药集团上海化学试剂公司,其它试剂都为分析纯。冷冻离心机 3K15 购自 Sigma 公司,凝胶成像系统购自 BIO-RAD 公司。

1.4 摇瓶发酵培养:取 0.6mL 孢子密度为 10⁸ 个/mL 的华根霉孢子悬液接种于装有 30mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶, 30℃, 150r/min 振荡培养 48h。

1.5 脂肪酶活力的测定

参考文献[12],以 *p*NPC16 为底物,每分钟释放 1nmol 对硝基苯酚的酶量定义为 1 个脂肪酶水解酶活国际单位。

1.6 蛋白浓度的测定

参照 Lowry^[13],以牛血清白蛋白为标准,绘制标准曲线。

1.7 脂肪酶的分离纯化

1.7.1 硫酸铵盐析:将液氮研磨破壁后的胞内酶液在冰浴中进行 40% ~ 70% 硫酸铵分级盐析, 15000r/min 离心 30min,收集蛋白沉淀物。

1.7.2 Phenyl-Sepharose 6 FF 疏水层析:将步骤 1.7.1 得到的蛋白沉淀物用 0.05 mol/L pH7.5 的磷酸钾缓冲液复溶后进行 Phenyl-Sepharose 6 FF 疏水层析(Φ1.6cm × 20cm),平衡缓冲液为含 1.6mol/L 硫酸铵的 0.05 mol/L pH7.5 的磷酸钾缓冲液。用硫酸铵浓度梯度差为 0.4mol/L 的 0.05mol/L pH7.5 的磷酸钾缓冲液洗脱吸附蛋白,最后用 H₂O 洗脱,收集脂肪酶活性组分。

1.7.3 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析:将上述步骤得到的酶液调整离子强度和 pH 后进行 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析(Φ1.6cm × 20cm),平衡缓冲液为 0.02mol/L pH8.0 的磷酸钾溶液,用 NaCl 浓度梯度为 0mol/L ~ 0.3mol/L 的 0.02mol/L pH8.0 的磷酸钾缓冲液洗脱吸附蛋白,收集脂肪酶活性组分。

1.7.4 Sephadex G100 凝胶层析:将步骤 1.7.3 得到的酶液用 0.05mol/L pH8.0 的磷酸钾缓冲液透析后进行 Sephadex G100 凝胶层析(Φ1.6cm × 60cm)。平衡和洗脱缓冲液都为 0.05mol/L pH8.0 的磷酸钾缓冲液。

1.7.5 SDS-PAGE:SDS-PAGE 方法参考文献[14],其中分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%。

1.8 脂肪酶基本酶学性质的研究

1.8.1 pH 对脂肪酶活力和稳定性的影响:将酶液分别加在不同 pH(pH6.0 ~ 10.0)的缓冲液中,按标准方法测脂肪酶活力,以最高酶活为相对酶活 100%。将酶液用不同 pH(6.0 ~ 10.0)的缓冲液稀释 25℃保温 1h,测残余酶活,以未保温的酶液的酶活力为 100%。

1.8.2 温度对脂肪酶活力和稳定性的影响:在不同的温度(20℃ ~ 60℃)下按标准方法测定脂肪酶活力。酶液在不同的温度下(20℃ ~ 60℃)分别保温 1h,迅速冷却,按标准方法测残余脂肪酶活力,以未保温的酶液的酶活力为 100%。

1.8.3 脂肪酶的脂肪酸链长专一性:以不同脂肪酸

链长的 *p*NP 脂肪酸酯为底物,在标准条件下测定 Lip1 和 Lip2 对这些酯的水解活力,以酶活力最高值为相对酶活 100%。

1.8.4 脂肪酶的位置选择性 5mL 反应体系中加入 1mL 三油酸甘油酯和 4mL 酶液,40℃ 下 150r/min 反应 9h,产物用 5mL 正己烷和异丙醇 (9:1 V/V) 萃取, HPLC 检测分析条件参考文献 [15], 确定水解产物。

1.8.5 金属离子、蛋白酶抑制剂、表面活性剂对脂肪酶活力的影响 酶反应体系中加入不同的上述化合物,37℃ 下保温 30min,各种化合物的终浓度为 1mmol/L,测残余酶活,以不加化合物的反应液为空白。

1.8.6 脂肪酶的有机溶剂稳定性 参考文献 [16] 的方法作了修改,酶液中加入 30% (V/V) 的不同有机溶剂,37℃ 下 150r/min 振荡 1h,按标准方法测残余酶活,以不加有机溶剂的酶液的酶活力为空白。

2 结果与分析

2.1 脂肪酶的分离纯化

经过液氮研磨后的细胞破碎液用 0.05mol/L pH7.5 的磷酸钾缓冲液溶解抽提得到胞内脂肪酶粗酶液。粗酶液经过 40% ~ 70% 硫酸铵分级盐析、Phenyl-Sepharose FF 疏水层析得到两个脂肪酶活性组分 F1 和 F2。两组分分别通过 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析(所得组分命名为 D1 和 D2),Sephadex G100 凝胶过滤层析得到样品 Lip1 和 Lip2。通过 SDS-PAGE 检测,两个样品均显示一条带(图 1),说明纯化后的两个脂肪酶样品 Lip1 和 Lip2 均为单一组分,已达到电泳纯。用 Quantity one 软件(BIO-RAD)对 SDS-PAGE 进行分析,计算得到脂肪酶 Lip1 和 Lip2 的分子量分别为 59.2kD 和 39.4kD,与其它已报道的 *Rhizopus* sp.^[17] 脂肪酶分子量都不相同。F1 经分离纯化后的脂肪酶样品 Lip1 的纯化倍数为 21.06, F2 经分离纯化后的脂肪酶样品 Lip2 的纯化倍数为 13.11 纯化结果如表 1 所示。根据上述纯化结果,初步推测 Lip1 和 Lip2 是两种华根霉脂肪酶同功酶。在根霉微生物中存在脂肪酶同功酶并且分子量差异较大的文献报道很少。

2.2 pH 对脂肪酶活力和稳定性的影响

不同来源的根霉脂肪酶的最适反应 pH 有差异^[6, 16, 18, 19],一般为中性。根据图 2 所示的研究结果, Lip1 和 Lip2 的最适反应 pH 略有差异,分别为

8.0 和 8.5 较其它根霉脂肪酶更偏碱性一些。由图 2 容易发现反应 pH 显著影响脂肪酶活力。Lip1 在 pH7.0 和 pH10.0 的酶活力分别为最大值的 40% 和 32%。

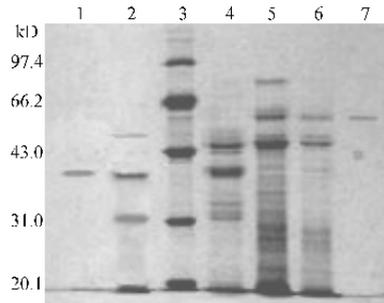


图 1 各步分离产物的电泳图谱

1 脂肪酶 Lip2 2 Lip2 对应 DEAE 洗脱活力峰, 3 标准蛋白 4 Lip2 对应苯基洗脱活力峰, 5 Lip1 对应苯基洗脱活力峰, 6 Lip1 对应 DEAE 洗脱活力峰, 7 脂肪酶 Lip1

表 1 脂肪酶的分离纯化结果

纯化步骤	总酶活 /U	总蛋白 /mg	比活 (U/mg)	回收率 /%	纯化倍数
细胞破碎粗酶液	249	456	0.66	100	1.0
硫酸铵分级盐析	83.4	82.4	1.01	33.49	1.53
Phenyl Sepharose FF (F1)	25.3	4.18	6.05	10.16	9.17
Phenyl Sepharose FF (F2)	7.25	1.51	4.79	2.91	7.26
DEAE Sepharose FF (D1)	10.1	1.26	8.00	4.06	12.12
DEAE Sepharose FF (D2)	3.62	0.53	6.83	1.45	10.35
Sephadex G100 (Lip1)	2.39	0.172	13.9	0.96	21.06
Sephadex G100 (Lip2)	0.54	0.062	8.65	0.22	13.11

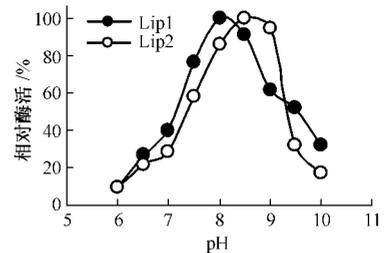


图 2 pH 对 Lip1、Lip2 活力的影响

磷酸盐缓冲 pH6 ~ 7, Tris-HCl 缓冲 pH7 ~ 9, 碳酸盐缓冲 pH9 ~ 10

由图 3 所示的 pH 对脂肪酶稳定性的影响结果, Lip1 在 pH8.0 稳定性最好,在 pH7.0 ~ 8.7 下保持 1h 后残余酶活高于 75%,而在 pH < 7 的情况下,酶活迅速降低; Lip2 在 pH8.5 稳定性最高,在 pH 7.5 ~ 8.7 下保持 1h 后残余酶活高于 78%,但在 pH < 7.5 的情况下,酶活明显下降,说明 pH 对脂肪酶稳定性的影响也较为明显。我们发现两脂肪酶同功酶 Lip1 和 Lip2 对 pH 比较敏感,这可能是酶的分

纯化过程中酶活回收率较低的原因之一。

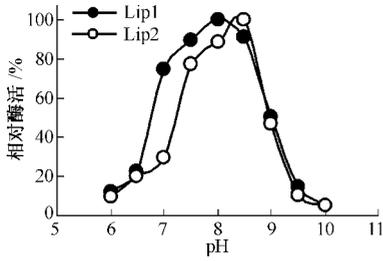


图3 pH对Lip₁、Lip₂稳定性的影响

2.3 温度对脂肪酶活力和稳定性的影响

温度对两脂肪酶同功酶活力和稳定性的影响结果如图4、5所示。由图4可知,Lip₁和Lip₂的最适反应温度有所不同,分别为40℃和35℃。在60℃时Lip₁的残余酶活为酶活最大值的22%,而Lip₂完全失活。温度对脂肪酶的稳定性研究结果表明(图5),Lip₁和Lip₂在低于40℃下保温后仍保持原有活力的80%以上,说明两同功酶具有一定的耐高温能力,但温度高于40℃,酶活下降明显,说明温度对两脂肪酶同功酶的稳定性有较大的影响,从整体情况来看,温度对Lip₁和Lip₂的影响基本相似。

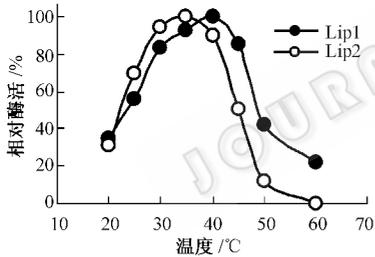


图4 温度对Lip₁、Lip₂活力的影响

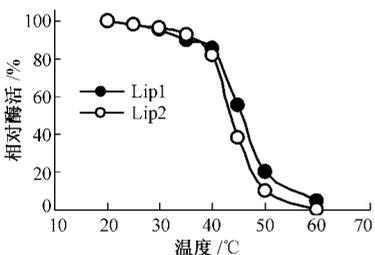


图5 温度对Lip₁、Lip₂稳定性的影响

2.4 脂肪酶的脂肪酸链长专一性

不同来源的微生物脂肪酶的催化作用底物有差异,但通常底物专一性较高。不同脂肪酸链长专一性的脂肪酶在乳制品等工业中具有不同的应用价值。分别以不同脂肪酸链长的pNP脂肪酸酯为底物,对两脂肪酶同功酶的脂肪酸链长专一性进行研究,结果如表2所示,Lip₁和Lip₂对pNP脂肪酸酯

的脂肪酸链长专一性差异明显。Lip₁对pNPC16的水解活力最高,但对短链的脂肪酸酯完全没有水解活力,表明Lip₁对pNP脂肪酸酯的长链脂肪酸有较高的底物专一性。Lip₂对pNPC6的水解活力最高,对长链的pNP脂肪酸酯也具有一定的水解活力。但很明显,脂肪酶Lip₂对pNP脂肪酸酯的短链脂肪酸专一性较高。在分离纯化过程中,脂肪酶活力的测定都是以长链的pNPC16为底物,这可能是Lip₂酶活回收率较低的原因之一。

表2 Lip₁和Lip₂的脂肪酸链长专一性

底物	脂肪酸碳链数	相对酶活(%)	
		Lip ₁	Lip ₂
pNPC3	3	0	82.6
pNPC6	6	0	100
pNPC8	8	2.40	72.0
pNPC12	12	84.0	34.8
pNPC16	16	100	19.6

2.5 脂肪酶的位置选择性

根霉脂肪酶大多具有高度的1,3-位置特异性,因而常用于油脂的加工,以提高油脂的品质。通过特定的脂肪酶催化含不同类型的脂肪酸酯的水解将产生特定的水解产物脂肪酸,可推测三甘酯的结构。以三油酸甘油酯为底物,对脂肪酶Lip₁和Lip₂的位置选择性进行研究。由表3所示的研究结果,发现Lip₁和Lip₂的水解产物中1,2(2,3)-二油酸甘油酯、1,3-二油酸甘油酯的浓度差异明显。Lip₁的水解产物中1,2(2,3)-二油酸甘油酯的浓度是1,3-二油酸甘油酯的10倍以上,表明Lip₁强烈作用于三油酸甘油酯的1,3位酯键,是1,3位置特异性脂肪酶,此研究结果与大多数根霉脂肪酶具有1,3位置特异性的研究结果相符^[16,20,21]。而且2-单甘酯的含量也相对较高,少量1-单甘酯的产生可能是酰基转移的结果^[22,23]。

与大多数根霉脂肪酶具有1,3位置特异性的研究结果不同,Lip₂不仅能水解三油酸甘油酯的1,3位酯键,还能水解其2位酯键,这与J.C. Mateos Diaz^[18]的研究结果一致。两同功酶的位置特异性差异明显,这在脂肪酶同功酶的研究报道中很少见。上述研究结果进一步说明,这两种脂肪酶同功酶催化特性差异显著。

2.6 不同化合物对脂肪酶活力的影响

由表4所示的研究结果,EDTA对Lip₁、Lip₂活力没有明显影响,说明Lip₁、Lip₂是非金属酶,在催

化过程中不需要金属离子的参与。实验浓度下, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对 Lip1、Lip2 活力均表现出促进作用, 表面活性剂 SDS 强烈抑制 Lip1、Lip2 的活力, Zn^{2+} 对 Lip1 活力基本没有影响而对 Lip2 活力抑制较明显。

表3 Lip1 和 Lip2 对三油酸甘油酯的位置选择性

反应产物	峰面积 %		浓度(mg/mL)	
	Lip1	Lip2	Lip1	Lip2
1-β-二油酸甘油酯	7.01	30.02	0.014	0.06
1-γ-二油酸甘油酯	80.07	61.06	0.16	0.12
1-单甘酯	1.60	2.62	0.0032	0.0052
2-单甘酯	7.32	4.28	0.0146	0.0085

表4 不同化合物对 Lip1、Lip2 活力的影响

化合物	浓度 (1mmol/L)	相对酶活(%)	
		Lip1	Lip2
空白	-	100	100
KCl	1	101	98
MgSO ₄	1	136.8	110
CaCl ₂	1	111.0	118
CuSO ₄	1	74.7	79
ZnSO ₄	1	101.0	52
EDTA	1	105	106
SDS	1	21.0	31
PMSF	1	110	92

2.7 脂肪酶的有机溶剂稳定性

良好的有机溶剂稳定性使脂肪酶在非水相催化中具有良好的应用潜力。因此, 考察了 Lip1 及 Lip2 在不同的有机溶剂中的稳定性, 得到表 5 所示的研究结果。由表 5 可知, 极性较大的有机溶剂对 Lip1 及 Lip2 的活力有显著影响, 极性较小的有机溶剂对 Lip1 及 Lip2 的活力基本没有影响, 并且异辛烷对 Lip1 及 Lip2 的酶活均有一定的活化作用, 此研究结

表5 Lip1 及 Lip2 的有机溶剂稳定性

有机溶剂	相对酶活(%)	
	Lip1	Lip2
空白	100	100
甲醇	65.3	69.0
乙醇	4.31	20.6
丁醇	4.52	11.6
甲苯	38.4	99.8
环己烷	100	99
正己烷	101	100
正庚烷	114	103
异辛烷	120	123.8

果与 Abel Hiof^[16] 的研究结果相似。从研究结果来看, Lip1 及 Lip2 在非水相催化中具有一定的应用潜力。

3 讨论

本文对华根霉 (*Rhizopus chinensis* CCTCCM-201021) 胞内脂肪酶进行分离纯化, 得到两种脂肪酶活性组分, 推测两组分是两种脂肪酶同功酶, 并且两

同功酶的分子量和催化特性差异比较显著, 这在关于根霉属微生物脂肪酶的研究报道中比较少见。可能有助于我们加深对该菌株脂肪酶代谢合成的理解, 并且两同功酶可能是由不同基因编码的。

通过研究这两种脂肪酶同功酶的酶学性质, 我们发现两种脂肪酶的催化特性特别是在底物选择性和位置选择性方面具有明显的差异, 这为指导华根霉的工业应用提供了理论基础。

由于脂肪酶同功酶催化特性的差异, 对该菌株脂肪酶发酵机制的进一步研究, 进而实现脂肪酶发酵的调控, 选择性的生产不同应用目的的脂肪酶, 无论在理论研究还是在实际生产中都具有重要意义。

参考文献

- [1] de Maria, Alcantara P D, Carballeira A R, et al. Curr Org Chem, 2006, **10**(10): 1053 ~ 1066.
- [2] Segura R L. Biotechnol Progr, 2004, **20**(3): 825 ~ 829.
- [3] Fernandez-Lorente G. Biotechnol Bioeng, 2005, **92**(6): 773 ~ 779.
- [4] Iwai M, Okumura S, Tsujisaka Y. Agric Biol Chem, 1975, **39**: 1063 ~ 1070.
- [5] Aisaka K, Terada O. J Biochem, 1981, **89**(3): 817 ~ 822.
- [6] Kohno M, Kugimiya W, Hashimoto Y, et al. Biosci Biotech Bioch, 1994, **58**(6): 1007 ~ 1012.
- [7] de Marí P D, Sánchez-Montero J M, Sinisterra J V, et al. Biotechnol Adv, 2006, **24**: 180 ~ 196.
- [8] Hama S, Tamalampudi S, Fukumizu T, et al. J Biosci Bioeng, 2006, **101**(4): 328 ~ 333.
- [9] Xu Y, Wang D, Mu X Q, et al. J Mol Catal B-Enzym, 2002, **18**: 29 ~ 37.
- [10] Wang D, Xu Y, Teng Y. Bioprocess Biosyst Eng, 2006, Accepted.
- [11] 孙舒扬, 王 栋, 徐 岩. 微生物学通报, 2006, **33**(4): 10 ~ 14.
- [12] Winker U K, Stuckmann M. J Bacteriol, 1979, **138**(3): 663 ~ 670.
- [13] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. J Biol Chem, 1951, **193**: 265 ~ 275.
- [14] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学技术出版社, 2000 pp. 42 ~ 47.
- [15] Berner D, Dieffenbacher A. Pure Appl Chem, 1999, **71**: 1983 ~ 1991.
- [16] Hiof A, Jonzo M D, Rugani N, et al. Enzyme Microb Tech, 2000, **26**: 421 ~ 430.
- [17] Saxena R K, Sheoran A, Giri B, et al. J Microbiol Meth, 2003, **52**: 1 ~ 18.
- [18] Mateos Diaz J C, Rodri'guez J A, Roussos S, et al. Enzyme Microb Tech, 2006, **39**: 1042 ~ 1050.
- [19] Yasuda M, Ogino H, Kiguchi T, et al. J Biosci Bioeng, 1999, **88**(5): 571 ~ 573.
- [20] Rogalska E, Cudrey C, Ferrato F, et al. Chirality, 1993, **5**(1): 24 ~ 30.
- [21] Haas M J, Bailey D G, Baker W, et al. Fett-lipid, 1999, **101**(10): 364 ~ 370.
- [22] Yesiloglu Y. J Am Oil Chem Soc, 2004, **81**(2): 157 ~ 160.
- [23] Kaieda M, Samukawa T, Matsumoto T, et al. J Biosci Bioeng, 1999, **88**(6): 627 ~ 631.