

黑曲霉 F044 脂肪酶的分离纯化及酶学性质研究

Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus niger* F044

舒正玉 杨江科 闫云君*

SHU Zheng-Yu, YANG Jiang-Ke and YAN Yun-Jun*

华中科技大学生命科学技术学院 武汉 430074

College of Life Science & Technology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China

摘 要 黑曲霉 F044 脂肪酶发酵上清液经硫酸铵沉淀、透析、DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤层析得到电泳纯的脂肪酶。纯化倍数为 73.71 倍, 活性回收率为 34%。对纯化脂肪酶性质研究表明: 该脂肪酶分子量约为 35~40kD, 水解橄榄油的最适温度和 pH 分别为 45°C 和 7.0, 在 60°C 以下和 pH 2.0~9.0 之间有很好的稳定性。该脂肪酶的水解活性对 Ca^{2+} 表现明显的依赖性, 而 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 对脂肪酶则有显著的抑制作用。在最适条件下水解 pNPP 的 K_m 和 V_{max} 分别为 7.37mmol/L 和 25.91 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。其 N-端的 15 个氨基酸序列为 Ser(Glu/His)-Val-Ser-Thr-Ser-Thr-Leu-Asp-Glu-Leu-Gln-Leu-Phe-Ala-Gln。

关键词 黑曲霉, 脂肪酶, 分离纯化, 理化性质

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0096-05

Abstract A lipase from *Aspergillus niger* F044 was purified to homogeneity using ammonium sulfate precipitation, dialysis, DEAE-Sepharose Fast Flow anion exchange chromatography and Sephadex G-75 gel filtration chromatography. This purification protocol resulted in a 73.71-fold purification of lipase with 33.99% final yield, and the relative molecular weight of the enzyme was determined to be approximately 35~40kD using SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for lipolytic activity of the lipase was 7.0 and 45°C, respectively. It was extremely stable at 60°C and retained 98.70% of its original activity for 30min. The stability declined rapidly as soon as the temperature rose over 65°C. The lipase was highly stable in the pH range from 2.0 to 9.0 for 4h. Ca^{2+} and Mg^{2+} ions stimulated lipolytic activity, whereas Mn^{2+} , Fe^{2+} and Zn^{2+} ions caused inhibition. The values of K_m and V_{max} calculated from the Lineweaver-Burk plot using pNPP as hydrolysis substrate were 7.37mmol/L and 25.91 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectively. The N-terminal sequence of the lipase was Ser/Glu/His-Val-Ser-Thr-Ser-Thr-Leu-Asp-Glu-Leu-Gln-Leu-Phe-Ala-Gln, which is highly homogeneity with that of lipase, as reported by Torossian.

Key words *Aspergillus niger*, lipase, purification, enzyme characterization

脂肪酶(triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3, 甘油三酯酯水解酶)是一类能催化长链脂肪酸甘油酯水解为甘油和长链脂肪酸(或者是此反应的逆反

应)的生物催化剂,在食品加工、新型生物材料合成、精细化工、去污剂、皮革加工和造纸等诸多领域有着广泛的应用^[1]。黑曲霉脂肪酶因其具有良好的生物

Received: July 12, 2006; Accepted: August 18, 2006.

This work was supported by a grant from the National High Technology R&D Program of China (No. 2003AA214061).

* Corresponding author. Tel: +86-27-87792214; E-mail: yanyunjun@tom.com

国家高技术研究与发展计划项目(No. 2003AA214061)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

安全性,催化水解(或合成)三酰甘油酯具有 1-、3-位选择性^[2-4],最适底物脂肪酸碳链长度为 $C_6 \sim C_{12}$,一直是传统食品加工中的重要食品添加剂^[5]。近年来,发现黑曲霉脂肪酶能酰基化多糖(纤维素)分解赭曲霉毒素 A,进一步拓宽了黑曲霉脂肪酶的应用领域^[6,7]。不同黑曲霉菌株产生的脂肪酶性质差异较大^[2,8,9],甚至同一菌株也可以产生不同性质的脂肪酶^[10,11]。我们从含油土壤中分离到一株脂肪酶高产菌株^[12],经鉴定为黑曲霉。本文对该黑曲霉脂肪酶的分离纯化、理化性质进行了研究。该脂肪酶具有较好的温度稳定性和较宽的 pH 稳定性,工业应用前景广阔。N-端氨基酸序列的测定为脂肪酶基因的克隆及大量表达奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

脂肪酶高产菌株由本实验室从武汉市黄浦区浸储油厂油污土壤中分离筛选得到。结合菌落(包括菌丝体)形态、rDNA 序列同源聚类分析和 ITS 序列限制性内切酶(*Rsa* I)酶切电泳图等特征,参照齐相同^[13]和 Accensi^[14]的方法鉴定并命名为黑曲霉 F044(*Aspergillus niger* F044)。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶的发酵生产:脂肪酶的发酵生产参照陈晖等^[12]的报道。接种适量的黑曲霉 F044 孢子于产酶培养基中(麦芽糖 1.5%,牛肉浸膏 1.25%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%,橄榄油乳化液 4%(V/V)),28℃ 250r/min 培养 80h。发酵培养物 4℃ 8000r/min 离心 15min,收集上清液。

1.2.2 硫酸铵沉淀:将 250mL 发酵上清液在冰浴中边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末至 60% 饱和度,4℃ 静置 3~4h。离心收集沉淀,重新溶于 50mL 0.02mol/L pH6.5 的 His-HCl 缓冲溶液中,并用相同的缓冲溶液彻底透析脱盐。

1.2.3 离子交换层析:将上述经透析脱盐后的粗酶液,高速离心收集上清液。加到已用 0.02mol/L

pH6.5 的 His-HCl 缓冲溶液平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow(2.0cm × 20cm)阴离子交换柱上,250mL 0~1mol/L 的 NaCl 线性梯度洗脱。脂肪酶活性用平板定性检测,收集合并有酶活性部分,冻干。

1.2.4 凝胶过滤层析:Sephadex G-75(1.6cm × 60cm)凝胶柱预先用 0.05mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲溶液平衡。用相同的缓冲溶液 3~5mL 充分溶解脂肪酶冻干粉后上柱,并用相同缓冲液洗脱,收集有酶活性部分。

1.2.5 蛋白质浓度的测定:采用 Bradford 法^[15]进行测定,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.6 脂肪酶活性的测定:滴定法参照 Saxena^[16]的方法。在 45℃ 0.05mol/L pH7.5 Tris-HCl 2mmol/L $CaCl_2$ 的条件下,将每毫升脂肪酶酶液水解橄榄油每分钟释放出 1 μ mol 游离脂肪酸定义为一个脂肪酶活力单位(u)。比色法参照 Korde^[17]的方法。脂肪酶活性平板定性检测法参照 Hio^[18]的方法。除特殊说明之外,脂肪酶活性测定均采用滴定法。

1.2.7 脂肪酶分子量及纯度的检测:脂肪酶分子量用 SDS-PAGE 法定^[19],分离胶浓度为 12%。脂肪酶的纯度用 HPLC 进行检测。

2 结果与分析

2.1 黑曲霉 F044 脂肪酶的分离纯化

黑曲霉 F044 脂肪酶发酵液经过硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤层析等纯化步骤后,脂肪酶纯化了 73.71 倍,活性回收率为 34%。其中 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱效果最佳,仅此一步就纯化了 50 倍(纯化效果见表 1)。SDS-PAGE 凝胶电泳显示纯化后的脂肪酶为单一条带,由于黑曲霉脂肪酶均为单亚基分子^[2,8,9],因此黑曲霉 F044 脂肪酶的分子量在 35~40kD 之间(图 1),与报道的其它黑曲霉脂肪酶^[2,8,9]分子大小基本相同,但比活力远高于 Torossian^[8]报道的 170u/mg 和 Van Heerden^[20]报道的 729u/mg。

表 1 黑曲霉 F044 脂肪酶的纯化

Table 1 Purification of *Aspergillus niger* F044 lipase

| Step | Total activity /u | Total protein /mg | Specific activity (u/mg of protein) | Yield /% | Purification (fold) |
|------------------------------|----------------------|----------------------|--|-------------|------------------------|
| Crude enzyme solution | 2745 | 104.10 | 26.37 | 100 | 1 |
| $(NH_4)_2SO_4$ precipitation | 2608 | 72.38 | 36.03 | 95 | 1.37 |
| DEAE-Sepharose F. F. | 1071 | 0.59 | 1810.25 | 39 | 68.65 |
| SephadexG-75 | 933 | 0.48 | 1943.75 | 34 | 73.71 |

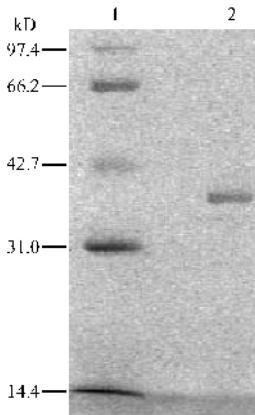


图1 黑曲霉 F044 脂肪酶纯酶的 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig.1 SDS-PAGE of purified lipase
1: marker; 2: purified lipase.

2.2 不同二价金属离子和 EDTA 对黑曲霉 F044 脂肪酶活性的影响

向纯化后的黑曲霉 F044 脂肪酶酶液中, 分别加入不同的二价金属盐离子和 EDTA, 使其终浓度为 2mmol/L。同时以不加金属离子的酶液作为对照, 测定脂肪酶的活性, 结果如图 2 所示。Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 能提高脂肪酶的活力, 尤其是 Ca²⁺ 作用最为明显, 达到 252%。Mn²⁺、Fe²⁺ 和 Zn²⁺ 对黑曲霉 F044 脂肪酶有显著的抑制作用, 尤其是 Fe²⁺ 和 Zn²⁺, 仅保留 41% 和 39% 的残余酶活力, 这与 Sugihara 报道的实验结果一致^[9]。Cu²⁺ 和 EDTA 对黑曲霉 F044 脂肪酶活力的影响不明显。

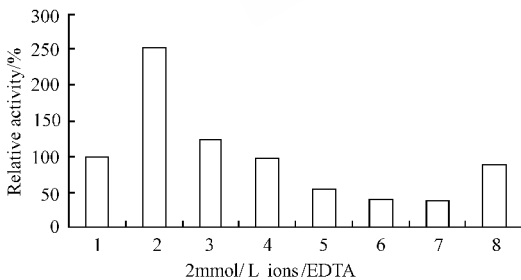


图2 不同盐离子和 EDTA 对黑曲霉 F044 脂肪酶活性的影响

Fig.2 Effect of various cations and EDTA on lipase activity

1: control; 2: CaCl₂; 3: MgCl₂; 4: CuCl₂; 5: MnCl₂; 6: FeCl₂; 7: ZnCl₂; 8: EDTA.

2.3 黑曲霉 F044 脂肪酶的最适温度和温度稳定性

在 20~70℃ 下分别测定脂肪酶的活力, 结果见图 3。脂肪酶作用的最适温度为 45℃。将脂肪酶酶液在不同温度 (30~65℃) 下保温 30min, 然后测定残留脂肪酶活力, 结果见图 3。此脂肪酶在 60℃ 以下

较稳定, 超过此温度, 酶活性急剧下降。在 65℃ 下处理 30min 后, 脂肪酶残留活力仅为 49.40%。黑曲霉 F044 脂肪酶的温度稳定性明显高于已报道的其它黑曲霉脂肪酶的温度稳定性: Nambodiri 纯化的黑曲霉脂肪酶仅能在 50℃ 以下保持稳定^[21], 而 Hatzinikolaou 纯化的黑曲霉脂肪酶仅能在 40℃ 以下保持稳定^[21]。

2.4 黑曲霉 F044 脂肪酶的最适 pH 和 pH 稳定性

在 pH3.0~10.0 的缓冲液中测定脂肪酶的酶活力, 结果见图 4。脂肪酶作用的最适 pH 为 7.0。向上述不同 pH 值的缓冲液中按照 1:4 (V/V) 的比例加入脂肪酶酶液, 室温处理 4h, 测定脂肪酶酶活力, 结果见图 4。脂肪酶在 pH2.0~9.0 的范围内保持性质稳定, 说明其酸稳定性较好。黑曲霉 F044 脂肪酶的 pH 稳定性明显高于已报道的其他黑曲霉脂肪酶的 pH 稳定性: Hatzinikolaou 纯化的黑曲霉脂肪酶在 pH > 8 的缓冲溶液中迅速失活, 在 pH > 9 的缓冲溶液中瞬间失活^[21], 而 Nambodiri 纯化的黑曲霉脂肪酶 pH 稳定性更差, 仅能在 5.0~7.5 的范围内保持稳定^[21]。

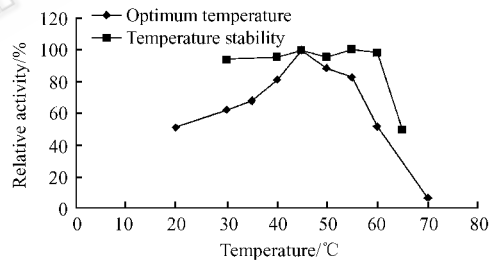


图3 温度对黑曲霉 F044 脂肪酶活力和稳定性的影响

Fig.3 Effects of temperature on lipase activity and stability

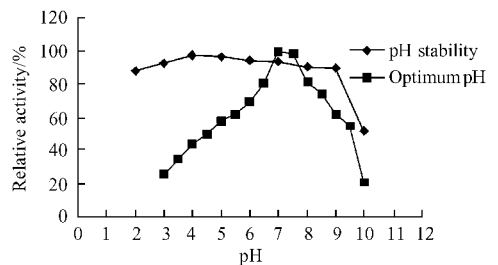


图4 pH 对黑曲霉 F044 脂肪酶活力和稳定性的影响

Fig.4 Effects of pH on lipase activity and stability

2.5 不同有机溶剂对黑曲霉 F044 脂肪酶活性的影响

将有机溶剂与脂肪酶酶液分别按照 40% 和 50% (V/V) 的比例混匀, 25℃ 下处理 24h 后测定脂肪酶残留的酶活力, 结果如图 5 所示。对醇类有机溶剂而言, 脂肪酶的失活作用随着碳链的增长而增加^[9]。

因此在进行酯化反应或转酯反应时宜选用短链醇或短链酯(如乙酸甲酯)作为反应底物。

2.6 黑曲霉 F044 脂肪酶对不同油脂的水解特异性

除蓖麻油外,脂肪酶水解不同油脂(橄榄油、豆油、桐油、菜籽油、茶油、棉油、三油酸甘油酯)的能力并未表现出明显的特异性,结果如图 6 所示,可见本脂肪酶是一种广谱脂肪酶。而脂肪酶水解蓖麻油能力低的原因在于该蓖麻油酸值过高(大于 33.45),抑制了脂肪酶的水解活力,而不是因为油脂中脂肪酸碳链长度的差异造成的(上述油脂中主要脂肪酸碳链均为 C18)。

2.7 黑曲霉 F044 脂肪酶水解 pNPP 米氏常数的测定

0.5mL 纯化后的脂肪酶在 0.05mmol/L pH7.5 Tris-HCl 45℃ 条件下水解不同浓度的 pNPP(从 1.33mmol/L 到 20mmol/L),用比色法测定(OD_{410nm})水解产物 pNP 的含量。利用双倒数作图法测得黑曲霉 F044 脂肪酶水解 pNPP 的 K_m 和 V_{max} 分别为 7.37mmol/L 和 25.91 μ mol/(min·mg)(图 7)。

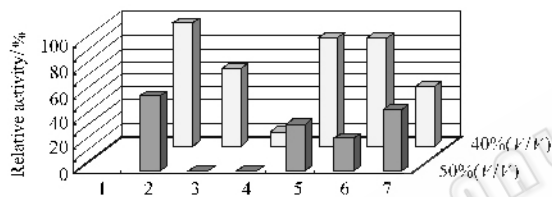


图 5 黑曲霉脂肪酶在不同有机溶剂中的稳定性

Fig.5 Effect of various organic solvents on *A. niger* F044 lipase stability

1: control 2: methanol 3: alcohol 4: propanol;
5: 2-propanol 6: methyl acetate 7: ethyl acetate.

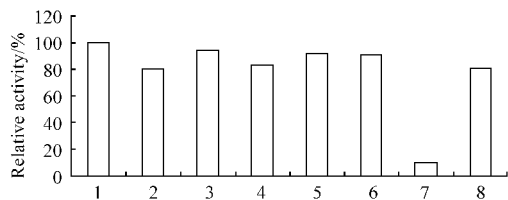


图 6 黑曲霉脂肪酶水解不同油脂的底物特异性

Fig.6 Substrate specificity of the *A. niger* F044 lipase to various oils

1: olive oil 2: soybean oil 3: tung oil 4: rapeseed oil;
5: tea oil 6: cotton seed oil 7: castor oil 8: glyceroltrioleate.

2.8 黑曲霉 F044 脂肪酶纯酶的 HPLC 分析

将电泳纯的脂肪酶继续用 Sephadex G-75 凝胶过滤,连续分离 2 次后,收集峰尖部分的脂肪酶酶液,浓缩后用反相高效液相色谱法(SCX-C18 色谱柱)检测脂肪酶酶液的纯度。检测结果显示为单一

对称峰,出峰时间为 25.99min(实验室数据),说明制备的纯酶可用于蛋白质 N-末端测序。

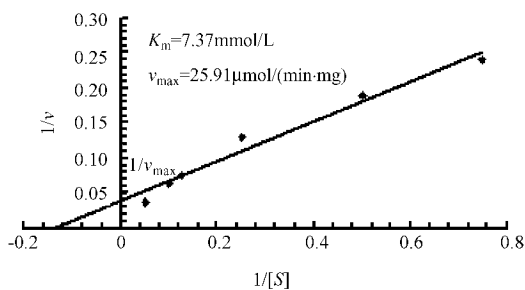


图 7 黑曲霉脂肪酶水解 pNPP 的 Lineweaver-Burk 图

Fig.7 Lineweaver-Burk plot of purified lipase

2.9 黑曲霉 F044 脂肪酶 N-末端氨基酸序列测定

经过 HPLC 检测为单峰的脂肪酶,用 Edman 降解法测定其 N-末端的氨基酸序列。该 N-末端氨基酸序列与 Torossian 报道的黑曲霉脂肪酶 N-末端氨基酸序列大部分同源^[8],与其他曲霉脂肪酶 N-末端氨基酸序列没有任何同源性(表 2)。

表 2 不同曲霉脂肪酶 N-末端氨基酸序列比较

Table 2 N-terminal amino acid sequence of *Aspergillus* sp. lipase

| Lipase | N-terminal amino acid sequence | References |
|------------------------------|--------------------------------|------------|
| <i>A. niger</i> F044 lipase | S(E,H)VSTSTLDELQLFAQ | this study |
| <i>A. niger</i> lipase | SVT | [9] |
| <i>A. niger</i> lipase | XVSTSTLDELQFALQ | [8] |
| <i>A. niger</i> lipase | AVLDFWLDNLQLFAQWAILA | [2] |
| <i>A. carneus</i> lipase | SPTFA | [16] |
| <i>A. oryzae</i> lipase | NAPLNEFLSALLSHL | [22] |
| <i>A. parasiticus</i> lipase | DIPTTQLEDFKFWVQ | [23] |
| <i>A. flavus</i> lipase | DIPTTQLEDFKFWVQ | [23] |

3 讨论

黑曲霉 F044 菌株的产脂肪酶能力远高于本实验室分离到的其他真菌菌株(*Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. 和其他 *Aspergillus* sp.)的产脂肪酶能力。采用响应面法优化发酵条件后,按照脂肪酶国际酶活力单位定义^[16,17],黑曲霉 F044 摇床发酵实验结果为 32.15u/mL^[12],高于已报道的其它野生型黑曲霉菌株的产脂肪酶能力(16.4u/mL 和 29.6u/mL)^[24,25],是一株脂肪酶高产菌株。

本实验中,未发现黑曲霉 F044 产生脂肪酶同工酶。追踪已报道黑曲霉产生同工酶的文献发现,在这些实验中,原始材料多是直接从公司购买或者他人馈赠的粗酶^[10,11]。生产这些粗酶的原始出发菌株的详细情况尚不明确,是否是由于工程菌株携带有外源基因^[26]或者是由于黑曲霉寄生菌^[27]产生,有待进一步验证。且上述黑曲霉脂肪酶同工酶的分

量分别为 31/19kD 和 43/65kD, 明显区别于已报道的其他黑曲霉脂肪酶分子的大小^[28, 9]。

到目前为止, 细菌脂肪酶 Ca^{2+} 的结合位点和 Ca^{2+} 对脂肪酶的激活机理已基本清楚^[28], 但真菌脂肪酶 Ca^{2+} 的结合位点和 Ca^{2+} 对脂肪酶的激活机理尚未见文献报道。脂肪酶活性对 Ca^{2+} 的依赖性表现出来的差异是否说明了脂肪酶在结构上存在差异^[29, 28], 有待进一步证实。

本实验中纯化的黑曲霉 F044 脂肪酶虽然与 Torossian 分离纯化的黑曲霉脂肪酶 N-末端氨基酸有一定的同源性^[8], 但该脂肪酶缺乏详细的理化性质报道, 仅报道的最适 pH(4.4 ~ 5.5) 与黑曲霉 F044 脂肪酶存在较大的差异, 因此在确定两者同源性大小时, 有必要对两者进行更长的氨基酸序列比较分析。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 1998, **16**(9): 396 - 403.
- [2] Nambodiri VM, Chattopadhyaya R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids*, 2000, **35**(5): 495 - 502.
- [3] Xu XB. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2000, **102**(4): 287 - 303.
- [4] Sonnet PE. Lipase selectivities. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1988, **65**: 900 - 904.
- [5] Fu X, Zhu X, Gao K, et al. Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus* sp. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1995, **72**(5): 527 - 530.
- [6] Yang K, Wang YJ, Kuo MI. Effects of substrate pretreatment and water activity on lipase-catalyzed cellulose acetylation in organic media. *Biotechnology Progress*, 2004, **20**(4): 1053 - 1061.
- [7] Stander MA, Bornscheuer UT, Henke E, et al. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2000, **48**(11): 5736 - 5739.
- [8] Torossian K, Bell AW. Purification and characterization of an acid-resistant triacylglycerol lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1991, **13**: 205 - 211.
- [9] Sugihara A, Shimada Y, Tominaga Y. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1988, **52**(6): 1591 - 1592.
- [10] Höfelmann M, Hartmann J, Zink A, et al. Isolation, purification, and characterization of lipase isoenzymes from a technical *Aspergillus niger* enzyme. *Journal of Food Science*, 1985, **50**: 1721 - 1725.
- [11] Fernández-Lorente G, Ortiz C, Segura RL, et al. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, **92**(6): 773 - 779.
- [12] Chen H(陈晖), Yang JK(杨江科), Liu MX(刘曼西), et al. Optimization of lipase production conditions for *Aspergillus* sp. F044 by response surface methodology. *Industrial Microbiology (工业微生物)*, in press.
- [13] Qi ZK(齐祖同). *Flora Fungorum Sinicorum*(Vol.5): *Aspergillus* et Teleomorphi Cognati. Beijing: Science Press, 1997.
- [14] Accensi F, Cano J, Figuera L, et al. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **180**(2): 191 - 196.
- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248 - 254.
- [16] Saxena RK, Davidson WS, Sheoran A, et al. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 2003, **39**: 239 - 247.
- [17] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, et al. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-Ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(15): 4836 - 4841.
- [18] Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **26**(5-6): 421 - 430.
- [19] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**(5259): 680 - 685.
- [20] Van Heerden E, Lithauer D, Verger R. Biochemical characterisation and kinetic properties of a purified lipase from *Aspergillus niger* in bulk phase and monomolecular films. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **30**(7): 902 - 909.
- [21] Hatzinikolaou DG, Macris JB, Christakopoulos P, et al. Production and partial characterisation of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 1996, **5**: 547 - 552.
- [22] Toida J, Fukuzawa M, Kobayashi G, et al. Cloning and sequencing of the triacylglycerol lipase gene of *Aspergillus oryzae* and its expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **189**(2): 159 - 164.
- [23] Yu J, Mohawed SM, Bhatnagar D, et al. Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **95**(6): 1334 - 1342.
- [24] Ren LH(任利虹), Zhou YK(周应揆). Selection of lipase-producing strains and optimal lipase producing conditions for *Aspergillus niger*. *Industrial Microbiology (工业微生物)*, 1996, **26**(1): 23 - 26.
- [25] Macris JB, Kourentzi E, Hatzinikolaou DG. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 1996, **31**(8): 807 - 812.
- [26] Prathumpai W, Flitter SJ, McIntyre M, et al. Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, **65**(6): 714 - 719.
- [27] Leopold J, Seichertova O. The parasitism of the mould *Penicillium purpurogenum* on *Aspergillus niger*. 3. The determination of the part of some enzymes of *Penicillium purpurogenum* in the mycelium lysis of the mould *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica (Praha)*, 1967, **12**(5): 458 - 465.
- [28] Amada K, Kwon HJ, Haruki M, et al. Ca^{2+} induced folding of a family I . 3 lipase with repetitive Ca^{2+} binding motifs at the C-terminus. *FEBS Letters*, 2001, **509**(1): 17 - 21.