

李明, 余华顺, 喻晨, 等. 桔青霉产核酸酶 P1 酶分离纯化及其酶学性质 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 89-94. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050212

LI Ming, YU Huashun, YU Chen, et al. Isolation, Purification and Enzymatic Properties of Nuclease P1 Fermented by *Penicillium citrinum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 89-94. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050212

· 生物工程 ·

桔青霉产核酸酶 P1 酶分离纯化及其酶学性质

李明^{1,2,3}, 余华顺^{2,3}, 喻晨^{2,3}, 吴尧^{2,3}, 龚大春^{1,2,3,*}

(1.三峡大学生物与制药学院,湖北宜昌 443002;

2.中国轻工业功能酵母重点实验室(三峡大学),湖北宜昌 443002;

3.安琪酵母股份有限公司特种酶制剂事业部,湖北宜昌 443003)

摘要:桔青霉(*Penicillium citrinum*)产核酸酶 P1 浓缩液采用活性炭脱色、硫酸铵分级沉淀、脱盐和凝胶层析等分离技术,得到核酸酶 P1 纯组分,并研究了该酶的酶学性质。该酶纯化后比酶活达到 33967 U/mg,纯化倍数为 8.48 倍;该酶的米氏常数 K_m 、最大反应速度 V_m 和催化常数 K_{cat} 分别为 2.50 mmol/L、0.0864 mmol/(mL·min) 和 252.43 s⁻¹。该酶最适温度为 75 °C,热稳定范围 60~75 °C;最适 pH 为 5.5, pH 稳定范围为 4.0~6.0; Zn²⁺ 在 1 mmol/L 条件下对核酸酶 P1 有很好的激活作用, Cu²⁺ 和 Co²⁺ 对该酶的抑制作用明显,而 Ni²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺ 等离子具有不同程度的抑制作用。本研究对于该酶的广泛应用奠定了科学基础。

关键词:核酸酶 P1, 纯化, 动力学参数, 酶学性质

中图分类号:O629

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2021)07-0089-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050212

Isolation, Purification and Enzymatic Properties of Nuclease P1 Fermented by *Penicillium citrinum*

LI Ming^{1,2,3}, YU Huashun^{2,3}, YU Chen^{2,3}, WU Yao^{2,3}, GONG Dachun^{1,2,3,*}

(1.Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2.China Key Laboratory of Light Industry Functional Yeast, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

3.Angel Yeast Co.,Ltd, Special Enzyme Division, Yichang 443003, China)

Abstract: The nuclease P1 was purified to obtain pure component by activated carbon decolorization, (NH₄)₂SO₄ precipitation, desalination and gel chromatography and its enzymatic properties was investigated. This purified enzyme had a specific activity of 33967 U/mg protein after 8.48-fold purification. The Michaelis constant (K_m), the maximum reaction rates (V_m) and the catalytic constant (K_{cat}) of the purified enzyme were 2.50 mmol/L, 0.0864 mmol/(mL·min) and 252.43 s⁻¹, respectively. The optimization pH and temperature for the nuclease P1 were at pH5.5 and 75 °C. The enzyme was stable in the temperature range from 60 to 75 °C and in the pH range from 4.0 to 6.0. Zn²⁺ had a positive effect on the enzyme activity, while Cu²⁺ was a strong inhibitor of nuclease P1, Ni²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺ had the different inhibition. This research laid a scientific foundation for the extensive application of the enzyme.

Key words: nuclease P1; purification; kinetic parameter; enzymatic property

核酸酶 P1, 又名 5'-磷酸二酯酶, 它是一种含锌金属酶。桔青霉(*Penicillium citrinum*)来源的核酸酶 P1, 分子量约为 44 kDa, 由 331 个氨基酸多肽单链构成, 含有 2 个二硫键, 其活性中心存在一个三锌

结构。核酸酶 P1 的作用为水解 RNA 和催化水解热变性 DNA 中的磷酸二酯键得到 5'-核苷酸。5'-核苷酸具有很好的营养保健作用, 其中 5'-GMP 和 5'-AMP 是天然的风味增强剂, 能够显著提高产品的风

收稿日期: 2020-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(21776162); 三峡大学学位论文培优基金项目资助(2019SSPY151)。

作者简介: 李明(1989-), 女, 硕士研究生, 研发工程师, 研究方向: 酶工程, E-mail: 1239825954@qq.com。

* 通信作者: 龚大春(1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物催化和手性化合物的研究与开发, E-mail: 185195061@qq.com。

味特征,还可以作营养补充剂、药物前体物质。随着人们对健康生活需求的提升,酶法水解核酸得到的天然核苷酸的需求不断增长,其广泛应用于食品、药品、保健品及饲料中^[1-3]。核酸酶 P1 在核苷酸工业化生产中的应用至关重要。核酸酶 P1 还可以应用于分子生物学方面的研究,如测定病毒 RNA 的 5'-末端核苷酸序列^[4]。Bai 等^[5]利用核酸酶 P1 具有使适配体与磺胺二甲氧基形成偶联物的原理建立了一种检测磺胺二甲氧基的电化学检测方法。随着核酸酶 P1 在更多领域的应用,对该酶的分离纯化及其酶学性质开展研究,将对高纯度核酸酶 P1 工业化生产及其应用具有重要意义。

目前,有文献报道了对核酸酶 P1 菌株选育^[6-10]和发酵工艺^[11-14]的相关研究,李兆飞等^[6]将桔青霉菌株经氯化锂-离子束复合诱变筛选得到核酸酶 P1 高产菌株;郑美娟等^[7]以桔青霉 AG-R1 为出发菌株,研究了甲苯胺蓝-RNA 平板筛选方法,为工业化快速选育产核酸酶 P1 菌种提供高效方法;田吕明等^[12-13]以 Logistic 方程和 Luedeking-Piret 方程为基础,研究了桔青霉发酵生产核酸酶 P1 的发酵动力学特性,还运用响应面法和爬坡路径法等多种方法优化得到桔青霉产核酸酶 P1 的最佳发酵培养基;喻晨等^[14]采用部分析因试验设计、中心组合实验设计和响应面分析法对桔青霉产核酸酶 P1 培养基进行优化研究。但对该酶的分离纯化及其酶学性质研究报道较少^[15-16]。本研究拟通过脱色、盐析、凝胶层析等分离步骤将桔青霉产核酸酶 P1 浓缩液纯化后,测定核酸酶 P1 的酶学动力学常数 K_m 、 V_m 、 K_{cat} ,并开展其酶学性质研究,为核酸酶 P1 的开发奠定了科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

核酸酶 P1 浓缩液 桔青霉发酵生产,由安琪酵母特种酶生产部提供;硫酸铵、活性炭、酵母 RNA 均为分析纯。

HiTrip™ Desalting 和 Superdex™ 75 10/300 GL 美国 GE AKTA; Pure 25 M1 蛋白纯化仪 美国 GE AKTA; UV-2802H 紫外可见分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司; Pilot 2-4hH 真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; DYY-5 电泳仪 北京市六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 分离纯化工艺 核酸酶 P1 浓缩液→活性炭吸附脱色→硫酸铵分级沉淀→HiTrip™ Desalting 脱盐→Superdex™ 75 10/300 GL 凝胶层析→纯化酶→冻干

活性炭吸附脱色:于 8 个三角瓶中称取一定量的核酸酶 P1 浓缩液,然后分别添加 0.3%、0.5%、0.7%、0.9%、1.1%、1.3%、1.5%、1.7% 的粉末活性炭,于 60 ℃ 机械搅拌 1 h。去除活性炭残渣后,将脱

色酶液在 420 nm 下测定 OD,计算脱色率^[17]。选择脱色最理想的活性炭用量,将核酸酶 P1 浓缩液脱色处理,得到脱色酶液。

硫酸铵分级沉淀^[18]:量取上述脱色酶液,逐级添加硫酸铵,使其饱和度依次达到 40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%,收集各级沉淀。

HiTrip™ Desalting 脱盐:将上述比酶活最高的沉淀用醋酸缓冲液(10 mmol/L, pH5.5)溶解,上 HiTrip™ Desalting 柱,上样量为 0.5 mL,用醋酸缓冲液(10 mmol/L, pH5.5)洗脱,选择合适的流速(流速初设为 0.5 mL/min),收集主要蛋白峰,根据在线监测电导率,验证脱盐效果^[19],将收集的目的峰样品冻干保存。

Superdex™ 75 10/300 GL 凝胶层析:将脱盐后的冻干样品用醋酸缓冲液(10 mmol/L, pH5.5)溶解,用 Superdex™ 75 10/300 GL 凝胶柱层析,上样量为 0.5 mL,流速为 0.8 mL/min,用醋酸缓冲液(10 mmol/L, pH5.5)洗脱,分段收集第一个蛋白峰,每分钟收集 1 管,依次收集 5 管,将收集的样品冻干,得到纯化酶。

冻干:将需要冻干保存的样品放在真空冷冻干燥机样品盘内,经过预冻、升华干燥、解析干燥得到冻干纯化酶。

1.2.2 分析检测方法

1.2.2.1 蛋白浓度测定 用考马斯亮蓝法(Bradford 法)^[18],以考马斯亮蓝 R-250 溶液为显色剂,通过可见光分光光度法,参照牛血清蛋白制作的标准曲线测定每个样品的蛋白浓度。

1.2.2.2 SDS-PAGE 电泳分析 使用 SDS-PAGE 连续电泳,按要求配制分离胶、浓缩胶、染色液及脱色液。以考马斯亮蓝 R-250 为染色液,标准蛋白 Marker 的分子量分别为 5、15、30、35、50、65、95、130 kDa。上样样品的蛋白浓度均稀释至 1~2 mg/mL 范围内再处理上样。

1.2.2.3 核酸酶 P1 酶活检测 采用紫外分光光度法^[7],以酵母 RNA 为底物,在 68 ℃ 水浴中与稀释酶液反应,用核酸沉淀剂终止反应后,在 260 nm 波长下测 OD₂₆₀,以先加沉淀剂者为对照,计算光密度差(ΔOD)。在上述条件下,每分钟生成的核苷酸使 260 nm 处的光密度差值为 1.0 时的酶量为一个酶活单位。

1.2.3 酶学特性研究

1.2.3.1 最适 pH 和 pH 稳定性 在 pH4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 环境下分别检测纯酶酶活,研究该酶最适 pH;将纯酶分别在 pH3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 醋酸缓冲液体系中静置 1 h 后检测残余酶活,研究该酶的酸碱耐受度。

1.2.3.2 最适温度和温度稳定性 在 40、50、60、65、70、75、80、85、90、95 ℃ 温度条件下测定纯酶酶活,研究该酶最适温度;将纯酶分别在 40、50、60、

65、70、75、80、85 °C 几个温度条件下保温 1 h 后检测残余酶活, 研究该酶耐热特性。

1.2.3.3 金属离子的影响 将纯酶分别用终浓度为 1、5、10、50 mmol/L 的金属离子(Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Pb^{2+})溶液溶解, 于 25 °C 静置 60 min 后测定残余酶活, 将不外加金属离子时的酶活设置为 100%。

1.2.3.4 动力学参数米氏常数 K_m 、最大反应速度 V_m 和催化常数 K_{cat} 的测定 以酵母 RNA 为底物, 分别在底物浓度为 1.52、2.28、3.04、3.81、4.57 mmol/L 测定反应时间分别为 5、7、9、11、13、15 min 的酶活, 绘制每个底物浓度下酶活-反应时间图, 拟合趋势线, 求出斜率即为该底物浓度下的酶促反应速率^[20], 再依据 Lineweaver-Burk 作图法^[21-24]作图, 由米氏方程的变形式 $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$ 得出米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_m 。 K_m 表示酶与底物的亲和能力, K_m 值越小, 亲和能力越强。催化常数 K_{cat} (s^{-1}) 是酶的催化常数, 表示单位时间内每一活性中心或每分子酶所能转换的底物分子数, 反映了酶催化特定底物的能力大小。根据每秒钟核酸酶 P1 蛋白分子数所能转化的核酸 RNA 分子数的比值^[25-27], 计算出 K_{cat} 。

1.3 数据处理

本研究用 OriginPro 9.0 和 Excel 2007 进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 核酸酶 P1 的纯化

2.1.1 活性炭用量对核酸酶 P1 脱色效果的影响 由图 1 可知, 当活性炭用量小于 0.9% 时, 脱色率随着活性炭用量的增加而急剧增加, 当活性炭用量大于 0.9% 时, 脱色率缓慢增加, 当活性炭用量达到 1.5%, 再继续增大用量, 脱色效果增加不明显。因此活性炭用量 1.5% 为最佳用量, 此时脱色率达到 91%。

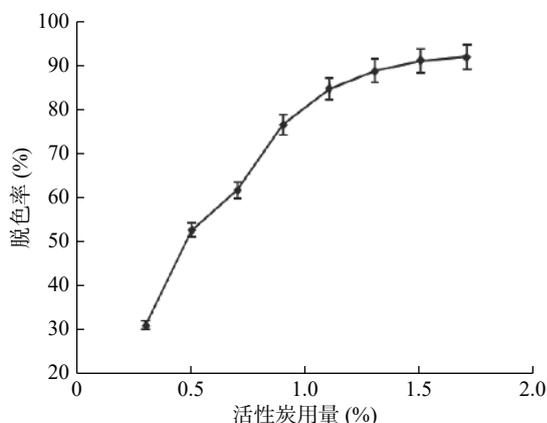


图 1 不同活性炭用量对脱色效果的影响

Fig.1 Effect of different amount of activated carbon on decolorization

2.1.2 硫酸铵浓度对核酸酶 P1 的分级沉淀效果的影响 为了考察硫酸铵的浓度对核酸酶 P1 的沉淀效果,

按照 1.2.1 进行分级沉淀, 实验结果见表 1。由表 1 可知, 在脱色酶液中逐级添加硫酸铵, 上清液比酶活逐渐减小, 沉淀比酶活先增后减, 当硫酸铵饱和度达到 65% 时, 收集的沉淀酶的比酶活最高, 可以达到 15157 U/mg, 后期再增加硫酸铵浓度会导致部分酶失活, 比酶活反而下降。

表 1 不同浓度硫酸铵分级沉淀的比酶活

Table 1 The specific enzyme of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation

硫酸铵饱和度 (%)	上清液蛋白 (mg/mL)	沉淀溶解后蛋白 (mg/mL)	上清液比酶活 (U/mg)	沉淀比酶活 (U/mg)
40	2.63	1.43	11984	1252
50	2.27	1.65	14194	7860
60	1.90	3.66	6733	11330
65	1.31	6.58	2532	15157
70	0.86	14.86	1732	9306
75	0.52	7.33	1418	7617
80	0.39	3.01	970	5782
85	0.22	0.97	457	988

2.1.3 HiTrip™ Desalting 脱盐效果 利用美国 GE 公司蛋白质纯化仪, 采用脱盐柱 HiTrip™ Desalting, 上样量为 0.5 mL, 用醋酸缓冲液(10 mmol/L, pH5.5)洗脱, 当流速为 0.5 mL/min 时, 盐分与目的蛋白峰很难分开, 当流速为 0.3 mL/min 时, 样品中的盐分与目的峰(第一个蛋白峰)有效分开, 收集第一个蛋白峰洗脱液, 见图 2。第一个含盐较少的蛋白峰收集样电导率为 0.85 mS/cm, 第二个蛋白峰电导率为 7.45 mS/cm。由此可见, 该脱盐柱可将盐析沉淀样中的大部分盐分除去。

2.1.4 Superdex™ 75 10/300 GL 凝胶层析 由图 3 可知, 将脱盐后的冻干样经过 Superdex™ 75 10/300 GL 凝胶层析(该层析柱对球状蛋白最佳分离范围是 3~70 kDa), 共收集到两个蛋白峰, 其中, 第一个蛋白峰酶活最高, 将该蛋白峰依次收集的 5 管样品冻干后分析, 其中第 3 管如图 4 泳道 4 所示, 主带清晰, 且比酶活最高, 达到 33967 U/mg。

2.1.5 SDS-PAGE 电泳实验 在上样前将各个样品的蛋白浓度稀释至 1~2 mg/mL 范围内, 然后再进行处理, 上样。纯化效果如图 4 所示, 泳道 1 为核酸酶 P1 发酵浓缩液。发酵浓缩液经过活性炭脱色、硫酸铵沉淀、脱盐柱层析及 Superdex™ 75 10/300 GL 凝胶层析后, 获得纯化酶(图 4 泳道 4 所示), 该纯化酶电泳条带清晰且杂带较少, 分子量约为 44 kDa。

按照 1.2.1 的方法, 将核酸酶 P1 浓缩液经过脱色、盐析、脱盐、凝胶层析等分离纯化过程, 其中, 分别将盐析沉淀稀释至 120 mL, 脱盐收集酶液冻干后稀释至 60 mL, 凝胶层析收集酶液冻干后稀释至 40 mL, 再进行蛋白浓度及酶活力测定, 结果见表 2。从表 2 中可以看出, 经过 5 步分离纯化后, 比酶活达到 33967 U/mg, 纯化倍数为 8.48 倍。

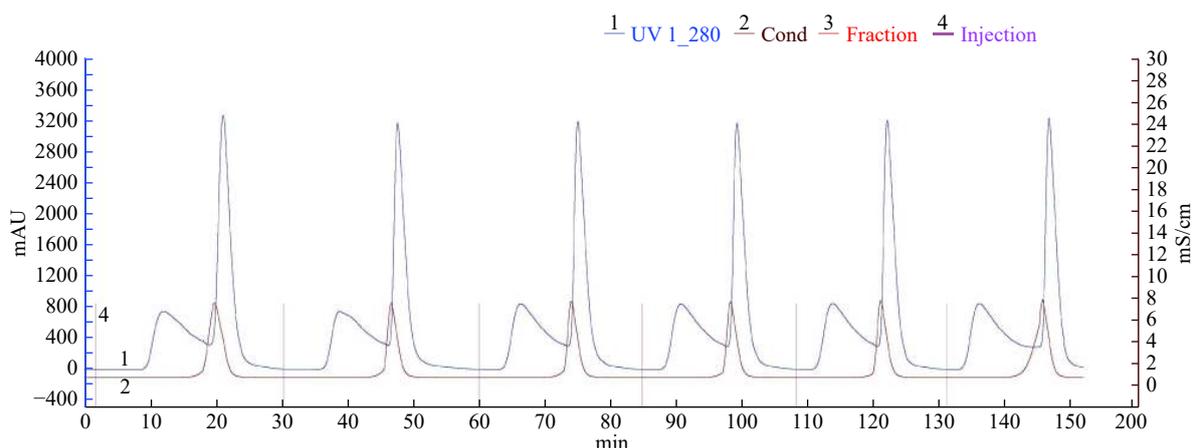


图2 HiTrip™ Desalting 脱盐图谱
Fig.2 The desalination spectrum of HiTrip™ Desalting

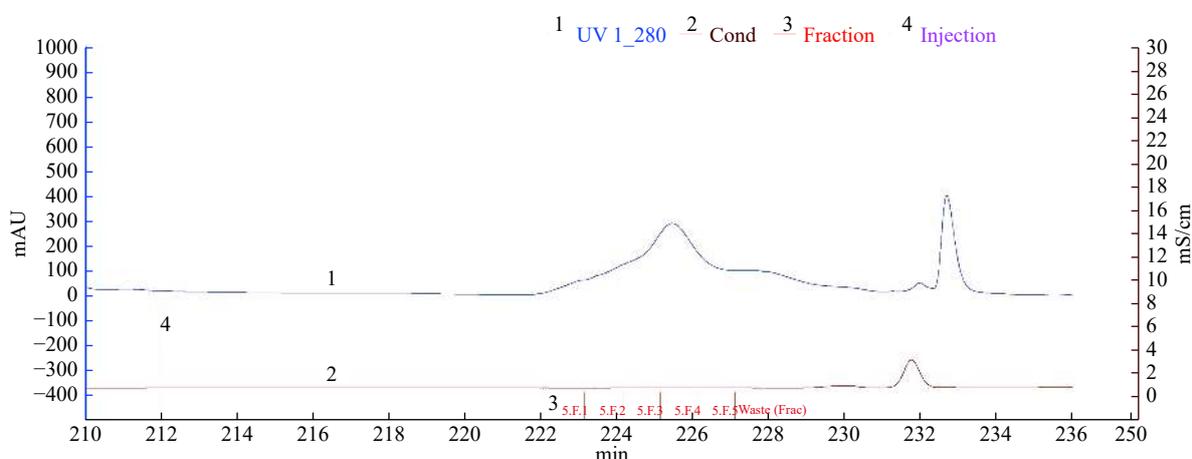


图3 Superdex™ 75 10/300 GL 凝胶层析图谱
Fig.3 The chromatogram of Superdex™ 75 10/300 GL

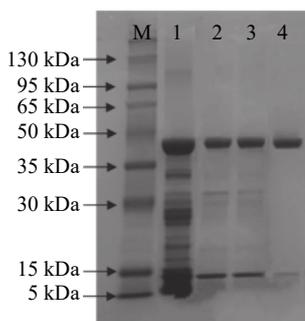


图4 核酸酶 P1 纯化 SDS-PAGE 电泳图
Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis of purification of the nuclease P1

注: M: Marker; 泳道 1: 核酸酶 P1 浓缩液; 泳道 2: 盐析后酶液; 泳道 3: 脱盐后冻干酶; 泳道 4: 核酸酶 P1 纯化冻干酶。

2.2 核酸酶 P1 酶学特性分析

2.2.1 pH 对核酸酶 P1 酶促反应的影响 按照 1.2.3 方法, 开展核酸酶 P1 对不同酸度的耐受度。pH 对核酸酶 P1 酶促反应影响如图 5 所示, 核酸酶 P1 最适反应 pH 为 5.5, 该酶作用 pH 偏酸性且范围较广, 在 pH4.0~6.0 环境中仍然具有 80% 以上的相对酶活。

2.2.2 温度对核酸酶 P1 酶促反应的影响 温度对核

表 2 各分离步骤的纯化结果

纯化过程样品	蛋白浓度 (mg/mL)	蛋白总量 (g)	比酶活 (U/mg)	纯化倍数
浓缩酶液	3.64	3.458	4005	—
脱色酶液	2.85	2.28	10730	2.68
盐析	6.58	0.79	15157	3.78
脱盐	5.65	0.339	24262	6.06
凝胶层析	5.31	0.212	33967	8.48

酸酶 P1 酶促反应的影响如图 6A 所示, 短时间内核酸酶 P1 的最适反应温度为 75 °C。核酸酶 P1 的一级结构中有 54% 为疏水性氨基酸, 从而形成较为紧密的结构, 这种结构可能使其具有良好的热稳定性^[14]。通过将纯酶置于 40~85 °C 条件下, 且 pH5.5, 处理 1 h 后检测残余酶活, 研究其稳定性, 结果见图 6B。从图中可以看出, 该酶在 65 °C 以下储存稳定性很好, 高于 65 °C 其酶的稳定性开始下降, 70 °C 时候酶活下降到相对酶活的 80%。本研究表明综合考虑酶活损失与催化效率, 该核酸酶 P1 在核苷酸生产工艺中适宜温度范围为 60~75 °C 之间。

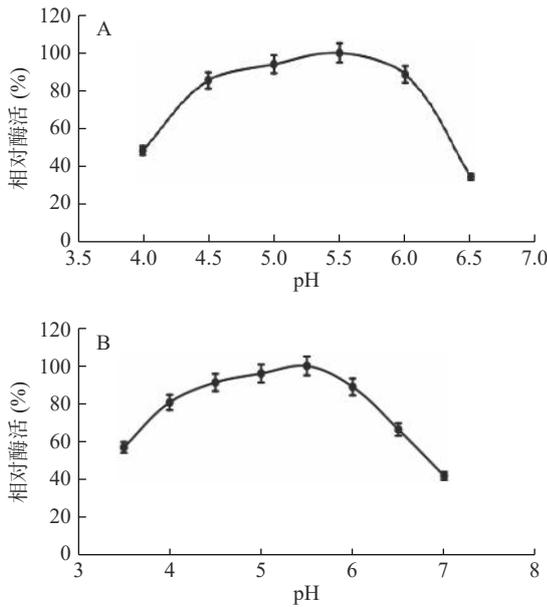


图 5 核酸酶的最适 pH 和 pH 稳定性

Fig.5 Optimum pH and pH stability of nuclease P1

注: A 为最适反应 pH, B 为一定温度条件下 pH 稳定性。

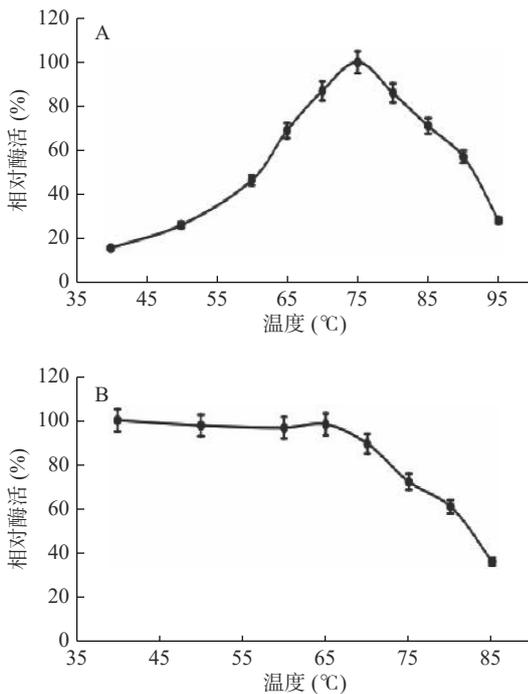


图 6 核酸酶 P1 最适反应温度和温度稳定性

Fig.6 Optimum reaction temperature and temperature stability of nuclease P1

注: A 为最适反应温度, B 为一定 pH 条件下温度稳定性

2.2.3 金属离子对酶活性的影响 金属离子对核酸酶 P1 催化水解 RNA 反应的影响如图 7 所示。从图 7 中可以看出,在 1 mmol/L 条件下 Zn^{2+} 对核酸酶 P1 有明显激活作用, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 在 1 mmol/L 条件下有轻微激活作用,而 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 在 50 mmol/L 条件下有明显的抑制作用,酶活分别下降到 64%、55%、3%、67% 和 55%,特别是 Cu^{2+} 在 1~50 mmol/L 之间有酶活明显下降趋势,说明 Cu^{2+}

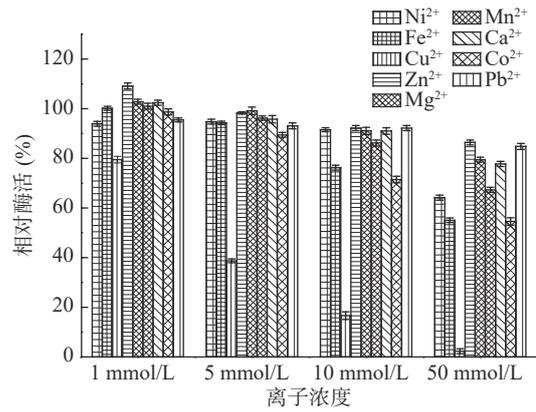


图 7 金属离子对核酸酶 P1 活性的影响

Fig.7 The effect of metal ion on nuclease P1 activity

对核酸酶 P1 具有强烈抑制作用。因此在核苷酸生产过程中可以添加适当浓度的 Zn^{2+} ,但应当避免接触含铜、钴离子的化合物,其他离子应控制在 10 mmol/L 以下。

2.2.4 核酸酶 P1 动力学参数 K_m 、 V_m 和 K_{cat} 的测定 由图 8 可得该酶的最大反应速度 V_m 为 0.0864 mmol/(mL·min),米氏常数 K_m 为 2.50 mmol/L,根据核酸酶 P1 的分子量和底物浓度得出催化常数 K_{cat} 为 252.43 s^{-1} ,即理论上该核酸酶 P1 每秒钟可以将 252 个 RNA 底物分子周转化成产物。

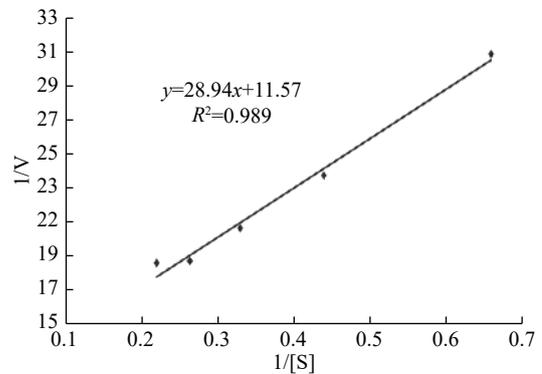


图 8 核酸酶 P1 的动力学参数测定双倒数图

Fig.8 Double-reciprocal plot for determination of nuclease P1 dynamics parameters

3 结论

本研究设计的纯化方法简单、快速,利用脱色、盐析、色谱分离等手段纯化得到核酸酶 P1 纯组分,酶蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析,呈现单一主带,该核酸酶 P1 组分比酶活为 33967 U/mg,纯化倍数为 8.48 倍;测定了该酶的米氏常数 K_m 、最大反应速度 V_m 和催化常数 K_{cat} ,分别为 2.50 mmol/L、0.0864 mmol/(mL·min) 和 252.43 s^{-1} ;该酶在 60~70 $^{\circ}C$ 、pH4.0~6.0 条件下仍具有较高相对酶活。与其他核酸酶 P1 相比,该核酸酶 P1 具有较好的热稳定性及更广的应用 pH 范围,且与底物 RNA 有更强的亲和能力。 Zn^{2+} 对该酶有很好的激活作用, Cu^{2+} 对其有抑制作用,该酶可广泛应用于酵母深加工和核苷酸生产

领域。

近几年,核酸酶 P1 除了应用于核苷酸生产中,还被应用于分子生物学及检测方法等方面的研究,如测定病毒 RNA 的 5'-末端核苷酸序列,检测磺胺二甲氧基的电化学检测方法。随着对核酸酶 P1 越来越深入的研究,它将具有更广阔的应用前景,同时,也对核酸酶 P1 提出了更高的要求,需要进一步探究并开发高品质产品。

参考文献

- [1] 王定昌. 核苷酸的生产技术及应用前景[J]. *粮油食品科技*, 2008, 16(3): 65-66.
- [2] 喻晨, 赵劫, 张亚雄, 等. 桔青霉发酵制备核酸酶 P1 研究进展[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(11): 416-420.
- [3] 张蕉南. 酵母核苷酸在水产动物上的研究进展与应用前景[J]. *饲料工业*, 2016, 37(14): 28-31.
- [4] Xiaoyi Chen, Bin Wang, Li Pan. Heterologous expression and characterization of *Penicillium citrinum* nuclease P1 in *Aspergillus niger* and its application in the preparation of nucleotides[J]. *Protein Expression and Purification*, 2019(156): 36-43.
- [5] Bai Zuhai, Chen Yan, Li Fei, et al. Electrochemical aptasensor for sulfadimethoxine detection based on the triggered cleavage activity of nuclease P1 by aptamer-target complex[J]. *Talanta*, 2019(204): 409-414.
- [6] 李兆飞, 姚娟, 余华顺, 等. 氯化锂-离子束复合诱变核酸酶 P1 高产菌株研究[J]. *食品科技*, 2013, 38(12): 2-4, 8.
- [7] 郑美娟, 郭金玲, 田毅红, 等. 桔青霉产核酸酶 P1 菌种高效选育方法研究[J]. *化学与生物工程*, 2018, 35(2): 33-37.
- [8] 梁剑光, 顾秋忆, 秦修东, 等. 利用常压室温等离子体 (ARTP) 诱变选育高产核酸酶 P1 菌株[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(21): 183-186.
- [9] 梁新乐, 孙隽, 张虹, 等. TB-DNA 平板高效筛选桔青霉核酸酶 P1 产量突变株[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(9): 103-108.
- [10] 廖明义. 产核酸酶 P1 菌株的诱变选育及发酵动力学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 34-35.
- [11] 廖明义, 陈雯莉. 桔青霉发酵制备核酸酶 P1 的发酵动力学研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(3): 180-182, 316.
- [12] 田吕明, 叶炜, 赵劫, 等. 桔青霉摇瓶发酵生产核酸酶 P1 的动力学研究[J]. *工业微生物*, 2012, 42(2): 38-42.
- [13] 田吕明, 叶炜, 赵劫, 等. 响应面法优化桔青霉产核酸酶 P1 培养基[J]. *食品科技*, 2011, 36(10): 23-27.
- [14] 喻晨, 张亚雄, 赵劫, 等. 响应面法优化桔青霉产核酸酶 P1 培养基[J]. *食品科学*, 2011, 32(17): 283-286.
- [15] 廖红东, 莫晓燕, 宋威, 等. 核酸酶 P1 的分离纯化及部分酶学性质研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2005, 36(9): 536-538.
- [16] 吕浩, 应汉杰. 核酸酶 P1 的纯化和酶学性质研究[J]. *南京工业大学学报*, 2002, 6(24): 66-69.
- [17] 桂丽, 孙溢, 刘均忠, 等. 中性蛋白酶发酵液脱色工艺优化[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(8): 92-96.
- [18] Y Guoqing, Lu E Shi, Yi Yu, et al. Production, purification and characterization of nuclease P1 from *Penicillium citrinum*[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 1276-1281.
- [19] 刘峰, 雷玲玲, 刘慧芹, 等. 2265FS 土壤原位电导仪测定结果与土壤含盐量的关系[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(13): 3167-3169.
- [20] 夏宁, 王晓琪, 严文冰, 等. 豆浆脂肪氧合酶测定方法的优化及酶动力学的研究[J]. *大豆科学*, 2018, 37(5): 769-775.
- [21] 胡晓倩, 陈雅蕊, 邓爱平, 等. 谷胱甘肽转硫酶酶促动力学实验设计[J]. *实验技术与管理*, 2002, 19(1): 27-31.
- [22] Lineweaver H, Burke D. Determination of enzyme dissociation constants[J]. *America Chemistry Society*, 1934, 56(3): 658-666.
- [23] 武林贺, 白新鹏, 吴谦, 等. 脂肪酶水解椰子油动力学研究[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(16): 65-69.
- [24] 景一娴, 饶菁菁, 廖飞, 等. 低于米氏常数底物浓度下酶动力学参数的测定[J]. *重庆医科大学学报*, 2018, 43(11): 1464-1468.
- [25] Robert R Rando. Chemistry and enzymology of keat Inhibitors[J]. *Science*, 1974, 185: 320-324.
- [26] Robert Eisenthal, Michael J Danson, David W Hough. Catalytic efficiency and K_{cat}/K_m : a useful comparator[J]. *Trends in Biotechnology*, 2007, 425(6): 247-249.
- [27] 安扬东方. 阴沟肠杆菌海藻糖酶酶学性质鉴定及体外分子改良[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.