

低温葡聚糖内切酶产生菌的筛选、 鉴定及酶学性质

董硕 迟乃玉 张庆芳*

(大连大学 生物工程学院 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心 辽宁 大连 116622)

摘要: 自黄海长海县附近海泥中分离得到一株产低温葡聚糖内切酶的菌株 SWD-28, 经形态学及 ITS 序列鉴定为 *Penicillium cordubense*。对该菌株产的粗酶液进行硫酸铵盐析和 Sephadex G100 柱层析, 比活力达到 26.4 U/mg, 提高 20.6 倍, 回收率 13.1%。得到一个电泳纯的低温葡聚糖内切酶, 分子量为 33.1 kD。经圆二色对其结构进行检测, 发现其 α -螺旋占 49.9%, β -折叠占 0.0%, 转角占 24.3%, 随机卷曲占 25.8%, 呈典型 α 螺旋。对其酶学性质进行初步研究, 结果表明其最适 pH 为 5.0, 最适反应温度为 35 °C, 在 5 °C 酶活力仍能保持 60%。

关键词: 低温葡聚糖内切酶, *Penicillium cordubense*, 分离纯化, 酶学性质

Screening and identification of a cold-active endoglucanase-producing strain and its endoglucanase characterization

DONG Shuo CHI Nai-Yu ZHANG Qing-Fang*

(Bioengineer College, Dalian University, Liaoning Technology of Marine Microbiological Engineering Research Center, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: A strain SWD-28 producing cold-active endoglucanase was isolated from samples of Changhai county in Yellow Sea. It was identified as *Penicillium cordubense* based on the morphological and ITS sequence. An endoglucanase was isolated and purified from it. The specific activity of endoglucanase was 26.4 U/mg increased 20.6 fold and coefficient of recovery was 13.1%, the molecular mass was 33.1 kD. Analysis by circular dichroism (CD) spectrum of purified endoglucanase protein revealed that it displayed typical α -helix structure and α -helix 49.9%, β -sheet 0.0%, turn 24.3% and random coil 25.8%. Enzymatic properties showed that the optimum pH value is 5.0 and the optimum reaction temperature is 35 °C, at 5 °C the relative enzyme activity still reach to 60%.

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA091505, 2007AA021306)

* 通讯作者: Tel: 86-411-87402374; ✉: zqf7561@126.com

收稿日期: 2010-09-25; 接受日期: 2010-11-24

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

Keywords: Cold-active endoglucanase, *Penicillium cordubense*, Purification, Enzymatic properties

生物质能是绿色植物通过叶绿素将太阳能转化为化学能而贮存在生物质内部的能量。目前,随着世界能源短缺日趋严峻,生物质能技术的研究与开发已成为世界重大热门课题之一,受到世界各国政府与科学家的关注^[1]。开发利用生物质能对中国更具特殊意义。我国拥有丰富的生物质能资源,理论上 有 50 亿 t 左右,且政府已连续 4 个五年计划将其列为重点科技攻关项目,开展生物质能利用技术的研究与开发^[2]。

目前可供开发利用的资源主要为农作物秸秆等生物质废弃物,其主要成分为纤维素。纤维素酶是一种复合酶,能水解纤维素以获取葡萄糖。其包括葡聚糖内切酶、葡聚糖外切酶和 β -葡萄糖苷酶,3 种酶协同作用降解纤维素^[3]。葡聚糖内切酶能够在纤维素长链内部随机切割迅速降低纤维素结构的完整性,是纤维素酶系的重要组成部分。迄今为止,大多数研究集中在常温、高温纤维素酶的研究上,高产菌以木霉、青霉、曲霉的能力最突出,而对于产低温纤维素酶的研究主要集中在交替假单胞菌等细菌,真菌研究相对较少^[4-6]。

海洋占据地球面积的 70%,且具有低温、高压等特性,有着不同于地表微生物酶的独特应用前景^[7]。本实验从黄海长海县附近海泥中分离到一株产低温葡聚糖内切酶的菌株 SWD-28。从形态学和 ITS 生物学手段对其进行鉴定,并对酶分离纯化,通过圆二色研究酶二级结构和对酶学性质进行初步研究,为低温葡聚糖内切酶的研究提供了理论和实际价值。

1 材料与方法

1.1 样品

黄海长海县附近海泥样品 5 个、水样 5 个 (E122, N39)。

1.2 培养基及培养条件

平板分离培养基(g/L): 上层: CMC-Na 10, 琼脂 20; 下层: 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20。

种子培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20。固体培养基是在上述液体培养基中加入 2%琼脂。

发酵培养基(g/L): 秸秆粉(40 目筛) 20, 麸皮(40 目筛) 15, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.4, KH_2PO_4 2, NaCl 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3, 吐温-80 0.8。500 mL 的三角瓶, 装液量 100 mL, 20 °C、150 r/min 培养^[8]。

1.3 菌株筛选方法

取 1 g 泥样(或 1 mL 水样) 加入 20 mL 带有小玻璃珠的无菌水中, 使沉积物悬浮, 取悬浮液 1 mL 接种到 100 mL 的种子培养基中, 20 °C、150 r/min 培养 3 d。取 1 mL 培养液梯度稀释后涂布平板分离培养基, 20 °C 培养 3 d。以刚果红染色后菌落周围出现透明圈大小和液体发酵培养后的葡聚糖内切酶活力为指标筛选。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 形态学观察: 在菌落生长的平板上观察菌落形态。再经乳酸石炭酸棉兰染色后, 用光学显微镜观察菌体形态特征。

1.4.2 菌株分子生物学鉴定: 采用 UNIQ-10 柱式真菌基因组抽提试剂盒, 提取菌株 DNA。正向引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和反向引物 ITS2 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 PCR 扩增。50 μL PCR 反应体系: Template (基因组) 50 ng, 上游 Primer 100 $\mu\text{mol/L}$, 下游 Primer 100 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 100 $\mu\text{mol/L}$, 10 \times Taq reaction buffer 5.0 μL , Taq (5 U/ μL) 0.25 μL 。扩增程序为: 98 °C 5 min; 95 °C 35 s, 55 °C 35 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 8 min。PCR 产物送上海生物工程技术服务有限公司测序。测得序列后, 提交 GenBank 数据库进行 BLAST 比对。并通过 MEGA 4.1 软件计算序列的系统进化距离, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

1.5 酶活测定方法

葡聚糖内切酶活力的测定参照文献[9], 1 个酶活力单位(U)定义为: 每分钟水解 CMC-Na 产生 1 μmol 还原糖(葡萄糖)所需的酶量。

1.6 蛋白质含量测定方法

采用 BCA 试剂盒, 根据制作的标准曲线计算蛋白含量。

1.7 酶的分离纯化

粗酶液制备: 取发酵 6 d 后的发酵培养液, 以 6 000 r/min 在 4 °C 离心 15 min, 所得上清液为粗酶液。

硫酸铵盐析: 粗酶液缓慢加入硫酸铵至 30% 饱和度, 4 °C 盐析 12 h, 8 000 r/min 离心 20 min, 取上清液缓慢补加硫酸铵至 80% 饱和度, 4 °C 盐析 12 h, 收集沉淀, 溶于 pH 4.8 的柠檬酸缓冲液, 透析至无铵离子后, 计算收率。

Sephadex G100 柱层析: 取 5 mL 透析后酶液加入预先用同样缓冲液平衡过的 Sephadex G100 凝胶柱(Φ 2.2 cm \times 60 cm), 柱压力 34 cm H₂O, 洗脱速度约为 0.5 mL/min, 每管收集 3 mL。分别测定蛋白质含量和酶活力。

1.8 不连续垂直平板 SDS-PAGE 电泳

分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 5%, 浓缩电压和分离电压分别为 100 V 和 130 V。考马斯亮蓝 R250 染色。

1.9 圆二色谱法测定二级结构

采用 JASCO-810 型圆二色分光光度计在 25 °C 恒温下测定并记录数据。将 0.5 mL 蛋白溶液置于光径为 0.1 cm 的圆形石英比色池中, 狭缝宽度选取 1 nm, 在波长 190 nm–250 nm 范围内扫描, 速度 50 nm/min, 响应时间 2 s, 测量 3 次。

1.10 酶学性质

1.10.1 温度对酶活力的影响: 分别测定纯化后的酶液在 5 °C–55 °C 条件下的酶活力; 将纯化后的酶液分别在 0 °C–60 °C 条件下保温 1 h, 再在 35 °C 测定剩余酶活力。

1.10.2 pH 值对酶活力的影响: 分别测定纯化后的酶液在 pH 3.0–7.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液体系下的酶活力。

1.10.3 金属离子对酶活力的影响: 在酶反应体系中各加入 0.01 mol/L Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Ba²⁺ 金属离子, 然后测定酶活。以上实验均重复 3 次取平均值制图。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离鉴定

2.1.1 菌株的筛选: 从黄海长海县附近海泥及水样中分离得到透明圈较大的菌株 14 株。经摇瓶发酵复筛, 获得一株低温葡聚糖内切酶菌株 SWD-28, 发酵 3 次最高酶活平均为 2.43 U/mL。

2.1.2 菌株的形态学特征: SWD-28 菌株在培养基上菌落初为白色, 后变绿色, 最后变为褐绿色, 菌落表面呈粉粒状, 有皱褶, 反面为绿色, 靠近中心处有裂纹, 见图 1。经光学显微镜观察菌丝有隔, 顶囊膨大不明显, 顶囊分生小梗, 小梗顶端生分生孢子串, 见图 2。

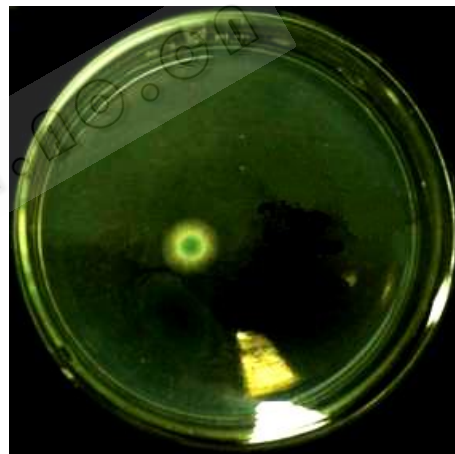


图 1 菌株 SWD-28 菌落形态

Fig. 1 The colony morphology of strain SWD-28

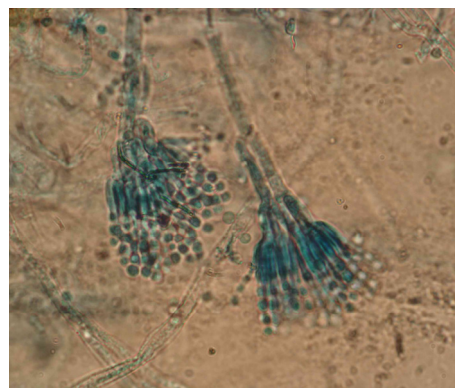


图 2 菌株 SWD-28 显微形态特征(×1 000)

Fig. 2 The micromorphology of strain SWD-28 (×1 000)

2.1.3 菌株的 ITS-rDNA 鉴定: 扩增菌株 SWD-28 ITS 序列并测序后结果表明, 其 ITS 序列(18S rDNA-5.8S rDNA-28S rDNA)全长 527 bp, 将序列输入 GenBank, 登录号 HM 777042。通过相似度比较, 其中 *Penicillium cordubense* (AF 527055.1)与 SWD-28 的亲缘性达到 99.43%。SWD-28 和相关菌株的亲缘关系见图 3。结合菌株的形态特征, 菌株鉴定为半知菌亚门, 丝孢纲, 丝孢目, 丛梗孢科, 青霉属的 *Penicillium cordubense*。

2.2 酶的分离纯化

发酵 6 d 后的发酵培养液, 4 °C 离心后取上清液。加入硫酸铵盐析, 取 30%–80%饱和度^[10]区间的沉淀, 用 pH 4.8 的柠檬酸缓冲液溶解。取 5 mL 此

酶液经 Sephadex G100 凝胶柱层析, 结果如图 4 所示。蛋白曲线呈现 3 个峰, 而葡聚糖内切酶组分主要集中在第 2 个蛋白峰内。说明 Sephadex G100 凝胶柱已经除去了一部分高分子量和低分子量的蛋白。

粗酶液经(NH₄)₂SO₄ 盐析、Sephadex G100 层析后, 葡聚糖内切酶的比活力提高了 20.6 倍, 回收率为 13.1%。各步分离纯化结果如表 1 所示。

2.3 SDS-PAGE 电泳

将纯化后的葡聚糖内切酶进行 SDS-PAGE 不连续电泳, 同时对粗酶液和盐析沉淀酶液取样进行电泳。结果见图 5, 根据分子量和相对迁移率的关系, 计算出葡聚糖内切酶的分子量为 33.1 kD。

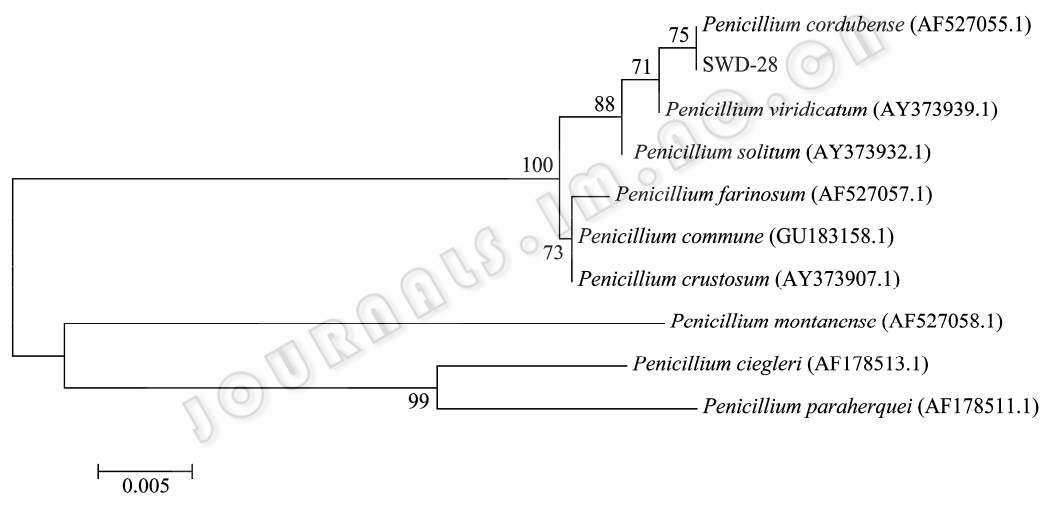


图 3 菌株 SWD-28 基因系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic trees for ITS sequence of SWD-28

注: 发育树节点的数字表示 Bootstrap 值; 括号内的数字是在 GenBank 上的序列登录号; 图例为遗传距离。
Note: Numbers at nodes present bootstrap percentages (based on 1000 samplings). The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Bar: 0.005 sequence divergence.

表 1 青霉 SWD-28 产葡聚糖内切酶纯化结果					
Table 1 The results of isolation and purification of the endoglucanase from <i>Penicillium</i> SWD-28					
步骤 Procedure	总蛋白 Protein (mg)	总活力 Activity (U)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Folds	回收率 Recovery (%)
粗酶液 Crude extract	380.4	486.1	1.28	1	100
硫酸铵盐析 (NH ₄) ₂ SO ₄	111.9	364.6	3.26	2.5	75
Sephadex G100	2.42	63.9	26.41	20.6	13.1

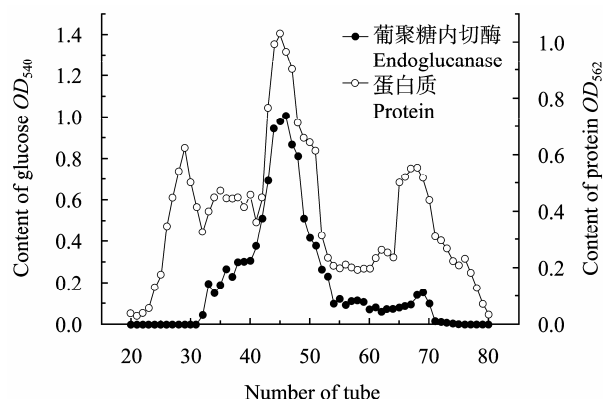


图4 Sephadex G100 凝胶过滤

Fig. 4 Gel filtration chromatogram of Sephadex G100

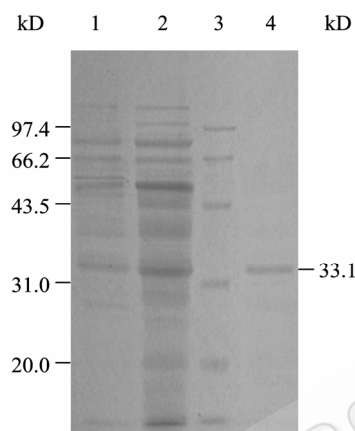


图5 SWD-28 酶液 SDS-PAGE 电泳

Fig. 5 SDS-PAGE of SWD-28 enzyme solution

注: 1: 粗酶液; 2: 盐析沉淀酶液; 3: Marker; 4: 纯化酶液。

Note: 1: Crude enzyme; 2: Salt-out enzyme; 3: Marker; 4: Purified enzyme.

2.4 圆二色谱法检测蛋白结构

测定分离纯化后的葡聚糖内切酶圆二色谱, 图6显示其在222 nm出现明显负峰。用Jascow32软件分析及Yang-chen公式计算其二级结构成分: α -螺旋49.9%, β -折叠0.0%, 转角24.3%, 随机卷曲25.8%。预测其为全 α 型蛋白。

2.5 低温葡聚糖内切酶酶学性质的初步研究

2.5.1 温度对酶活力的影响: 由图7可以看出, 酶的最适作用温度为35 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$ 以后酶活力迅速下降, 在5 $^{\circ}\text{C}$ -50 $^{\circ}\text{C}$ 酶活力能保持在60%以上, 在5 $^{\circ}\text{C}$ 仍保有60%的相对酶活力, 这符合低温酶的特性。在低温条件下, 相对嗜温型酶而言, 低温酶反应所需时间更短, 这是低温酶的应用优势^[11]。

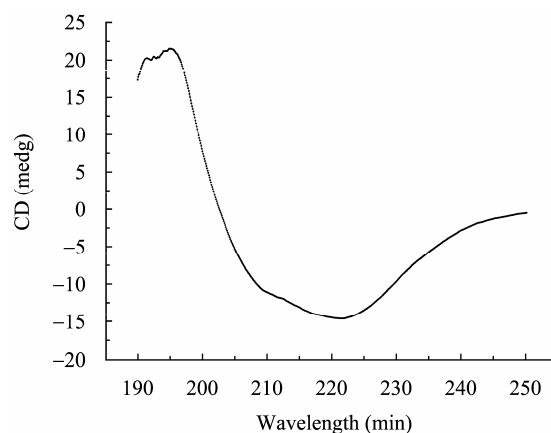


图6 葡聚糖内切酶圆二色性谱

Fig. 6 The CD spectrum of endoglucanase

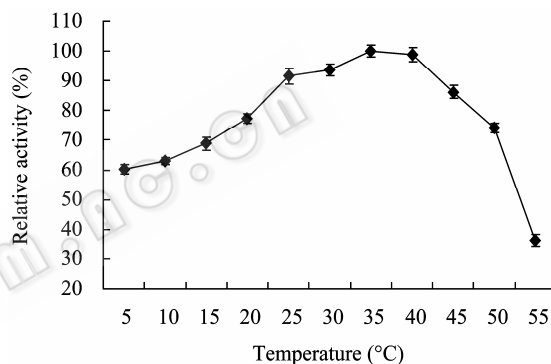


图7 反应温度对酶活的影响

Fig. 7 The effect of temperature on relative activity

从图8可以看出, 低温葡聚糖内切酶热稳定性, 在低温时较好, 40 $^{\circ}\text{C}$ 以上迅速下降, 当60 $^{\circ}\text{C}$ 处理1 h, 酶活力不足20%。低温酶类因其蛋白结构的原因往往对温度较敏感, 多具有热不稳定性^[12]。

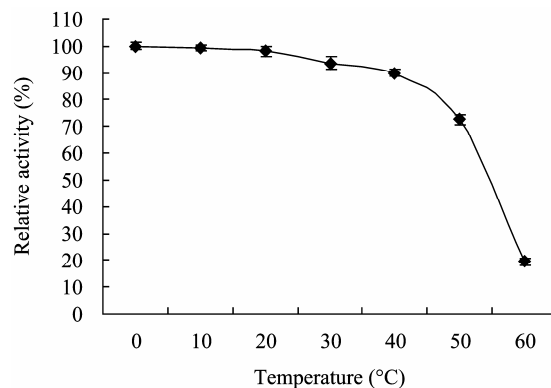


图8 低温纤维素酶的热稳定性

Fig. 8 Thermal stability of cold-active endoglucanase

2.5.2 pH对酶活力的影响: 由图9可知该低温葡聚糖内切酶最适反应 pH 为 5.0; 在 pH 4.0 至 pH 7.0 之间均有 50%以上的酶活, 说明此酶具有一定的耐酸性。

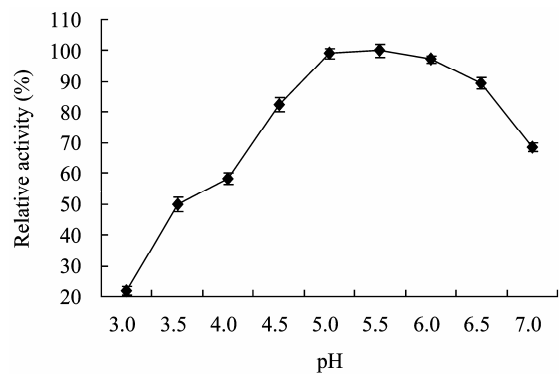


图9 pH对酶活的影响
Fig. 9 The effect of pH on relative activity

2.5.3 金属离子对酶活力的影响: 在最适 pH、最适反应温度的条件下, 分别加入 0.01 mol/L Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Ba²⁺金属离子, 然后测定酶活。结果如表2所示, Mg²⁺对酶活力有促进作用, Cu²⁺、Ba²⁺、Fe²⁺对酶活有较大抑制作用, Na⁺、Ca²⁺对酶活没有太大影响。

表2 金属离子对酶活力的影响	
Table 2 Effect of metallic ions on enzyme activity of SWD-28	
金属离子 Metallic ions	相对酶活 Relative enzyme activity (%)
对照 Control	100.0
Na ⁺	95.5
K ⁺	51.8
Ca ²⁺	86.2
Mg ²⁺	120.9
Fe ²⁺	13.2
Cu ²⁺	3.1
Mn ²⁺	58.9
Ba ²⁺	9.7

3 讨论

纤维素酶来源广泛, 但在应用条件下只有微生物来源的具有较大意义。目前陆地上的已被大量研究, 而来源于具有低温、高压等极端环境的海洋菌

种的研究较少; 同时低温酶具有高酶活力及高催化效率, 可大大缩短处理过程的时间并省却昂贵的加热系统, 因而成为目前纤维素酶研究的一个热点。

本实验在黄海长海县附近海泥中筛选出一株产低温葡聚糖内切酶的菌株 SWD-28。以其作为研究对象进行发酵试验, 以麸皮为诱导物, 20 °C 时酶活力达到 2.43 U/mL。实验发现菌株在用陈海水配制的培养基中生长和产酶都好于普通培养基, 但是人工添加微量物质的普通培养基没有明显改善。推测为陈海水中含有某些微量的促进菌体生长和增强酶表达的物质, 可以在后续试验中进一步研究。考虑到今后应用的简便性, 本实验研究中使用的是普通培养基。

通过形态观察和 ITS-rDNA 鉴定, 确定菌株 SWD-28 为 *Penicillium cordubense*。青霉是仅次于木霉的常温纤维素酶优良产酶菌种。对于其产低温纤维素酶的研究主要集中在菌种筛选及葡聚糖外切酶的基因克隆表达, 而青霉产低温葡聚糖内切酶及结构的研究未见报道^[6,13]。常温葡聚糖内切酶的作用最适温度一般在 50 °C–60 °C 之间。对比细菌所产的低温葡聚糖内切酶, SWD-28 产低温葡聚糖内切酶作用最适温度为 35 °C, 在 5 °C 低温条件下, 该菌株葡聚糖内切酶活性仍能保持约 60%, 高于同等温度下吕明生等人研究的交替假单孢菌所产酶(约 25%)^[14]。而且该酶的在 40 °C 以下热稳定性较好(90%以上), 对比黄玉兰等人对于低温纤维素酶产生菌短波单胞菌的研究, 其葡聚糖内切酶在 40 °C 条件下保温 1 h 酶活力不足 40%^[15]。SWD-28 表现出对低温的适应性, 此为海洋独特环境来源菌种的特性, 因此其在低温工业环境中具有更大的开发潜力。

通过对经硫酸铵和 Sephadex G100 柱层析纯化后酶液的圆二色检测, 计算得到 α-螺旋 49.9%, β-折叠 0.0%, 转角 24.3%, 随机卷曲 25.8%。预测其为全 α 型蛋白, 与文献中报道的常温葡聚糖内切酶一致^[16–18]。其中 β-折叠为 0%, 可以通过后续基因克隆、分析氨基酸序列来进一步验证。此外, 当圆二色检测时柠檬酸缓冲液浓度为 100 mmol/L 时, 显著

干扰圆二色检测, 当浓度将为 5 mmol/L 时, 效果已大为改善, 可以有效地作为背景除去, 避免了对于蛋白二级结构检测的影响。史苏佳等也发现在圆二色检测中缓冲体系和浓度对光谱光学信息表征蛋白质二级结构有影响^[19]。

低温酶能够广泛应用于生物工程的两大要素, 就是它们在低温环境中的高催化活力和在中高温条件下的热不稳定性^[11]。因其低温下高活力, 可以运用于食品工业, 保持食品口味及营养成分和环境保护等行业; 因其热不稳定性可以广泛应用于纺织工业中, 以提高产品的机械抗性等。因此, 可以从本菌出发, 利用基因克隆等手段获得其低温葡聚糖内切酶基因, 为其工业应用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Fu XY, Liu PF, Lin L, et al. A novel endoglucanase (Cel9P) from a marine bacterium *Paenibacillus* sp. BME-14[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(6): 1627–1636.
- [2] Berlemont R, Delsaute M, Pipers D, et al. Insights into bacterial cellulose biosynthesis by functional metagenomics on Antarctic soil samples[J]. *ISME Journal*, 2009, 3(9): 1070–1081.
- [3] 刘秀华. 纤维弧菌低温纤维素酶的分离纯化及性质探讨[D]. 山东大学硕士学位论文, 2007.
- [4] Margesin R, Schinner F. Low-temperature bioremediation of a waste water contaminated with anionic surfactants and fuel oil[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49(4): 482–486.
- [5] Zeng RY, Xiong PJ, Wen JJ. Characterization and gene cloning of a cold-active cellulase from a deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. DY3[J]. *Extremophiles*, 2006, 10(1): 79–82.
- [6] Hou YH, Wang TH, Long H, et al. Cloning, sequencing and expression analysis of the first cellulase gene encoding cellobiohydrolase 1 from a cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010[J]. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2007, 39(2): 101–107.
- [7] 徐庆强, 张志明, 王延明, 等. 产碱性纤维素酶海洋细菌的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. *海洋科学*, 2009, 33(7): 1–5.
- [8] 陈亮, 迟乃玉, 张庆芳. 低温纤维素酶菌株 CNY086 选育及发酵培养基优化 I [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(10): 1547–1552.
- [9] 刘海英, 王娟, 舒正玉, 等. 长梗木霉内切葡聚糖酶 I 基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(3): 355–359.
- [10] 刘长江, 连芙菲, 刘玲. 真菌融合子 R201 纤维素酶的纯化及性质研究[J]. *食品科技*, 2007(12): 43–46.
- [11] 孙子羽, 迟乃玉, 王宇, 等. 低温生淀粉糖化酶菌株 RS01 分离及其酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 798–802.
- [12] Garsoux G, Lamotte J, Gerday C, et al. Kinetic and structural optimization to catalysis at low temperatures in a psychrophilic cellulase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*[J]. *Biochemical Journal*, 2004, 384(2): 247–253.
- [13] Sonan GK, Receveur-Brechot V, Duez C, et al. The linker region plays a key role in the adaptation to cold of the cellulase from an Antarctic bacterium[J]. *Biochemical Journal*, 2007, 407(2): 293–302.
- [14] 吕明生, 吕凤霞, 房耀维, 等. 低温纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及酶学性质初步研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(12): 235–239.
- [15] 黄玉兰, 李征, 刘晓宁, 等. 一株耐低温纤维素酶高产菌株的筛选、鉴定和产酶的初步试验[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(5): 637–644.
- [16] 沈星灿, 梁宏, 何锡文, 等. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展[J]. *分析化学*, 2004, 32(3): 388–394.
- [17] Liu G, Wei X, Qin Y, et al. Characterization of the endoglucanase and glucomannanase activities of a glycoside hydrolase family 45 protein from *Penicillium decumbens* 114-2[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2010, 56(3): 223–229.
- [18] 苏贝. 海洋细菌 *Cellulophaga* sp. QY201 的内切葡聚糖酶研究[D]. 中国海洋大学硕士学位论文, 2009.
- [19] 史苏佳, 曹栋, 童军茂, 等. 傅里叶变换红外光谱与圆二色光谱表征磷脂酶 D 二级结构的比较[J]. *光谱实验室*, 2010, 27(2): 481–485.