

高产脂肪酶菌株的筛选及产酶条件研究

Study on screening of high lipase-producing strain and conditions for enzyme production

赵兴秀 赵长青 何义国 邹伟 张静

ZHAO Xing-xiu ZHAO Chang-qing HE Yi-guo ZOU Wei ZHANG Jing

(四川理工学院, 四川 自贡 643000)

(Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China)

摘要:从油坊土壤、饭店、食堂油烟机排气孔等 8 个取样点获得 16 份样品,通过溴甲酚紫平板初筛和摇瓶发酵复筛选出 9 株产脂肪酶量高的菌株,其中一菌株 A7 的产量最高,其酶活为 12.9 U/mL,以菌株 A7 为出发菌株再进行发酵培养基的研究。经过单因素和正交试验,确定脂肪酶高产的最佳培养基为:大豆油 5 g/L、蛋白胨 20 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L、初始 pH 6.0,培养温度 30 °C,摇床转速 200 r/min,优化后产酶量达到 19.8 U/mL。

关键词:脂肪酶;筛选;培养基;生物柴油

Abstract: 16 samples were obtained from 8 sample points such as the soil of oil mill, restaurant, lampblack absorber. 9 strains were gotten by primary screening with bromocresol purple plate and secondary screening with shaking flask fermentation, and a strain, which producing lipase with 12.9 U/mL was determined original strain. By single factor and orthogonal experiment the optimum condition for high lipase-producing of the strain A7 was obtained, which was soybean oil 5 g/L, peptone 20 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, pH 6.0, culture temperature 30 °C, rotation speed 200 r/min. The enzyme activity of strain A7 was 19.8 U/mL under the optimum condition.

Keywords: lipase; screening; medium; biodiesel

脂肪酶是一类具有多种催化能力的酶,广泛应用于食品、化妆品、皮革、洗涤剂、医药、印染、能源等领域^[1]。作为诊断和预测工具,血清中的脂肪酶可用于检测急性胰腺炎和胰腺损伤^[2],也有研究^[3]将脂肪酶固定在 pH 或氧化电极上,联合葡萄糖氧化酶制成脂质生物传感器,测定人体甘油

三酯和血胆固醇含量。利用酶促转酯反应合成生物柴油是制备新能源的一条新途径^[4-5],由于生物柴油可再生,对环境友好,且利用脂肪酶制备生物柴油的反应条件温和,产物易于分离,因此具有深远的经济效益^[6]。目前利用脂肪酶催化植物油合成生物柴油代替石化柴油已成为寻找新能源的研究热点,美国、巴西、日本及欧洲的发达国家,已经开始利用脂肪酶大规模催化合成生物柴油^[7-9]。

由于脂肪酶在医药、食品、工业生产等方面具有广阔的应用前景,因此,分离筛选高产脂肪酶菌株是获取脂肪酶的第一步,目前筛选产脂肪酶菌株的方法很多,张搏等^[10]从富油土壤中分离到 1 株脂肪酶产生菌,经过正交试验,其发酵脂肪酶活力可达 15.5 U/mL。董明奇等^[11]也从富油土壤中分离筛选到 1 株产酶活性为 14.065 U/mL 的短波单胞菌,同时发现 Mg^{2+} 能激活菌体产酶。邓欣等^[12]以面包干酵母为出发菌株,对其进行紫外和微波复合诱变,得高产突变菌株 DX213,其酶活为 635 U/mL。工业用脂肪酶多来源于微生物,分布于细菌、放线菌、酵母菌等多个属中^[13]。主要存在于工业废水、盐碱地、植物油加工厂、油脂、被油污染的土壤、油料种子、腐败食物、堆肥及温泉等^[14]。张婵等^[15]从富油样品中得到 320 株产脂肪酶的细菌、酵母菌和霉菌,进一步分离获得了一株高产脂肪酶菌株,通过培养基优化,其最终产酶活力达到 9.28 U/mL,较优化前提高 2.65 倍。虞慧慧等^[16]通过单因素及正交试验,对毕赤酵母工程菌 GS-IM-18 的发酵培养基进行优化,使所产高温碱性脂肪酶的酶活达 2 749 U/mL,是摇瓶发酵水平的 3.9 倍,蛋白含量为 1.8 mg/mL。为了寻找来源更为广泛、代表性更强的原始菌株,本研究从油坊土壤、饭店、食堂油烟机排气孔等地取样,通过富集培养、初筛和复筛得到了一株产酶较高的细菌,再对其进行正交试验优化产酶条件,得到一株产酶活性较高的菌株。将该菌株作为进一步育种的出发菌株,将为脂肪酶大量生产和制备提供条件,同时也为深入研究该菌所产脂肪酶的性质提供理论依据。

基金项目:酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(编号: NJ2012-16);四川理工学院科研项目(编号: 2012PY08, 2012RC10);四川省教育厅项目(编号: 14ZA0206);泸州老窖科研奖学金项目(编号: 13ljzk05);绿色催化四川省重点实验室(编号: LYJ1304)

作者简介:赵兴秀(1977—),女,四川理工学院副教授,硕士。

E-mail: 623545277@qq.com

收稿日期:2015-09-27

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

超净工作台:BHC-1300IIB2型,苏州苏洁净化设备有限公司;
分光光度计:EU-2200R型,上海昂拉仪器有限公司;
高压灭菌锅:BKQP-50型,山东博科生物产业有限公司;
培养箱:DHP-9052型,上海合恒仪器设备有限公司。

1.2 菌种采集

从油坊土壤、饭店、食堂油烟机排气孔等富油土壤中采集8个样品共16份。取样时先将表层土刮去2~3 cm,在同一地点取2份,每份取土样10 g左右。

1.3 培养基

富集培养基:硫酸铵1.0 g/L,硝酸铵1.0 g/L,氯化钠1.0 g/L,硫酸镁0.5 g/L,磷酸氢二钾1.0 g/L,大豆油1.0 g/L,pH 7.0,121℃灭菌20 min;
初筛培养基:硫酸铵1.0 g/L,硝酸铵1.0 g/L,氯化钠1.0 g/L,硫酸镁0.5 g/L,磷酸氢二钾1.0 g/L,琼脂15.0 g/L,脂肪乳化剂12.0 g/L,1.6%溴甲酚紫1.0 g/L,pH 7.0,121℃灭菌20 min;

种子斜面培养基:硝酸铵2.0 g/L,硫酸镁0.5 g/L,磷酸氢二钾1.0 g/L,氯化钾0.5 g/L,硫酸亚铁0.01 g/L,蔗糖30.0 g/L,琼脂25.0 g/L,pH 7.0,121℃灭菌20 min;

发酵培养基:硫酸铵1.0 g/L,硫酸镁1.0 g/L,磷酸氢二钾1.0 g/L,蔗糖5.0 g/L,脂肪乳化剂12.0 g/L,蛋白胨30.0 g/L,pH 7.0,121℃灭菌20 min。

1.4 主要试剂

4%的聚乙烯醇(PVA)溶液:称取40 g聚乙烯醇于烧杯中,加入800 mL蒸馏水,边搅拌边加热,使其完全溶解,自然冷却后加蒸馏水定容至1 000 mL,然后用双层纱布过滤,保存滤液备用;

脂肪乳化剂:取大豆油与聚乙烯醇(4%)按1:3(V:V)比例混合,用高速组织搅拌机搅拌乳化5~8 min,于4℃保存备用(保质期1周)。

1.5 方法

1.5.1 脂肪酶活力测定 采用NaOH滴定法^[17]。在40℃,以每分钟产生1 μmol 游离脂肪酸所需的酶量定义为1个酶活力单位(U)。

1.5.2 三丁酸甘油酯平板透明圈法 在180 mL Tris—HCl缓冲液(pH 8.0)中加入三丁酸甘油酯乳化液20 mL,然后加入1.5%琼脂,灭菌,倒平板。凝固后,每个平板内打直径为0.8 cm的小孔。取1 mL发酵培养液4 000 r/min离心10 min,转移上清液,移取50 μL上清液于小孔内,于30℃反应24 h,测透明圈大小,取圈大清晰者进行酶活力测定。

1.5.3 产脂肪酶菌株的初筛和复筛 称取5 g不同地点采集的富含脂肪的样品溶于45 mL无菌生理盐水中,混匀,将2.5 mL溶液接种于富集培养基,于30℃、180 r/min恒温摇床培养72 h。然后将长出菌落用蒸馏水梯度稀释成 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 6个不同浓度,分别涂布于初筛

培养基平板上,于30℃恒温培养72 h,挑取初筛培养基周围有黄色透明圈的菌落,接种于平板培养基上,30℃恒温培养72 h。待长出菌落并产生黄色变色圈后,挑取变色圈大的菌落进行复筛。因为脂肪酶将脂肪分解成脂肪酸,使产脂肪酶菌株周围环境的pH由中性变为酸性,并出现黄色透明圈(溴甲酚紫在酸性条件下显示黄色),据此可将产脂肪酶菌株与其他菌株分离开来。

采用三丁酸甘油酯平板透明圈法^[18]测量变色圈的直径和菌落直径,如透明圈直径越大,说明产生的脂肪酶越多,菌落直径较小,说明该菌株产脂肪酶的能力越强。计算两者之比,选出比值较大的菌株纯化,然后进行摇瓶培养。

1.5.4 单因素发酵试验

利用紫外分光光度计测定不同单因素在多水平条件下脂肪酶的浓度,以确定产生最大酶活的最佳单因素条件。

(1)碳源对发酵产酶的影响:在发酵培养基中分别添加橄榄油、花生油、菜籽油、大豆油4种碳源,于30℃、200 r/min发酵48 h后,测定菌株A7的脂肪酶活力,以确定最佳碳源。

(2)氮源对发酵产酶的影响:在摇瓶筛选培养基中分别加入蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、氯化铵、硫酸铵5种氮源,于30℃、200 r/min发酵48 h后测定菌株A7的脂肪酶活力,以确定最佳氮源。

(3)初始pH及培养温度对发酵产酶的影响:将培养基的初始pH分别调节为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,培养温度分别控制在24、26、28、30、32、34℃,于200 r/min下发酵48 h后测定菌株A7的脂肪酶活力,以确定最适pH。

(4)摇床转速对发酵产酶的影响:将摇床转速调节为100、120、140、160、180、200、220 r/min,于30℃下发酵48 h后测定菌株A7的脂肪酶活力,以确定最佳摇床转速。

(5)金属离子对发酵产酶的影响:在发酵培养基中分别添加了0.4 g/L的 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Cu^{2+} ,同时设空白对照。于30℃、转速200 r/min培养产酶菌株48 h后测定菌株A7的脂肪酶活力,以确定对发酵产生最佳效果的金属离子。

1.5.5 正交试验 在最佳温度和摇床转速、橄榄油和蛋白胨分别作碳源和氮源时,菌株A7的产酶活力最强,在培养基中加入 Mg^{2+} 后,菌株A7产酶能力明显提高,所以考察了橄榄油、蛋白胨、 Mg^{2+} ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)和初始pH四因素对产酶的影响,以确定各试验因素的最佳条件。

2 结果与分析

2.1 菌株分离纯化

从8个采样点获取的16份样品经溴甲酚紫平板初筛(图1)和三丁酸甘油酯平板透明圈法复筛(图2)得到产脂肪酶菌株9株,命名为A1~A9。由于菌株所分泌脂肪酶分解了底物脂肪,而使培养基pH由中性变为酸性,导致溴甲酚紫显示黄色,从而分离出产脂肪酶菌株。菌株A7产生的黄色变色圈,比较各菌株的透明圈与菌落直径比值(图3),发现菌株A2、A3、A6、A7和A8的比值均大于3.5,相对酶活最高,因此对其进行酶活力测定,结果见图4。

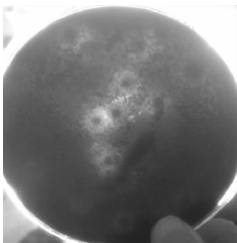


图 1 经溴甲酚紫平板初筛结果

Figure 1 The result of plate by bromocresol purple

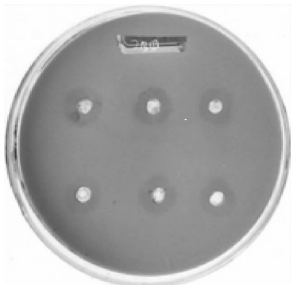


图 2 三丁酸甘油酯平板透明圈法复筛结果

Figure 2 The result of secondary screening by tributyrin plate

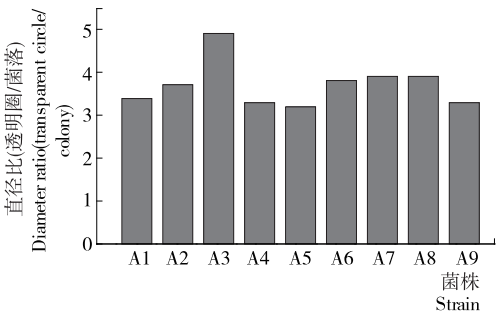


图 3 不同产酶菌株的透明圈与菌落直径比值

Figure 3 The ratio of transparent circle diameter and the colony diameter

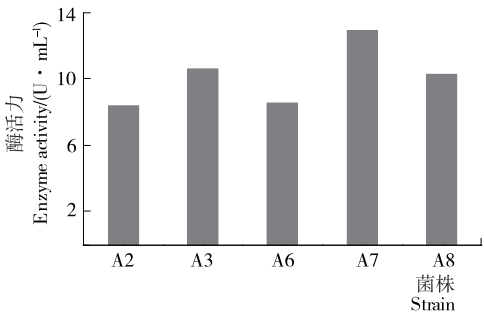


图 4 不同菌株产酶能力比较

Figure 4 The enzyme activity of strains

由图 4 可知,菌株 A7 酶活力最高,为 12.9 U/mL,将其作为出发菌株,进行发酵条件优化研究。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 碳源对发酵产酶的影响 在发酵培养基中分别添加了不同碳源,酶活测定结果见图 5。

由图 5 可知,不同碳源对菌株发酵产酶影响不同,其中

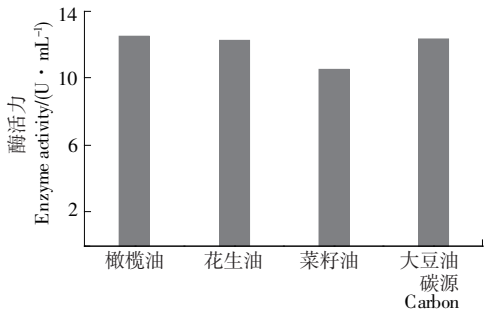


图 5 碳源对产酶的影响

Figure 5 Effects of carbon on the enzyme activity

大豆油能明显促进脂肪酶的合成,而且大豆油价格便宜,容易获得,因此可将大豆油作为产脂肪酶菌的最佳碳源。

2.2.2 氮源对发酵产酶的影响 在发酵培养基中分别添加了不同的氮源,其酶活测定结果见图 6。

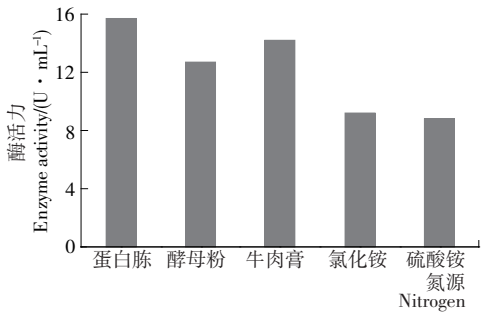


图 6 氮源对产酶的影响

Figure 6 Effects of nitrogen on the enzyme activity

由图 6 可知,以蛋白胨为氮源时的生长和代谢状况相对最好,最高酶活达到 15.7 U/mL,而其他氮源作用相对较低,可能是由菌种特性及培养方式所决定的。

2.2.3 初始 pH 及培养温度对发酵产酶的影响 分别设置不同的初始 pH 和培养温度,其酶活测定结果见图 7、8。

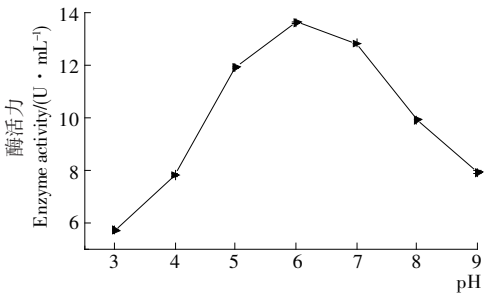


图 7 初始 pH 对产酶的影响

Figure 7 Effect of medium pH on the enzyme activity

由图 7 可知,随着发酵液初始 pH 值的增大脂肪酶活力逐渐上升,当初始 pH 达到 6 时,脂肪酶活力最大,为 13.60 U/mL;当初始 pH 大于 6 时,酶活力又逐渐下降;当初始 pH 为 9 时,脂肪酶活力仅为 7.9 U/mL。

由图 8 可知,培养温度对菌株产酶影响较大,当温度为 30 ℃时,酶活最高,为 13.7 U/mL,温度为 28、32 ℃,其酶活分别为 12.1、12.4 U/mL,均比 30 ℃时的酶活至少相差 1.3 个

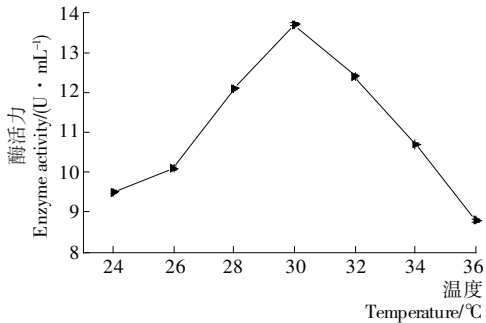


图8 培养温度对产酶的影响

Figure 8 Effect of temperature on the enzyme activity

酶活单位,因此,30℃为发酵培养的最佳温度。

2.2.4 摇床转速对发酵产酶的影响 分别设置不同的摇床转速,其酶活测定结果见图9。

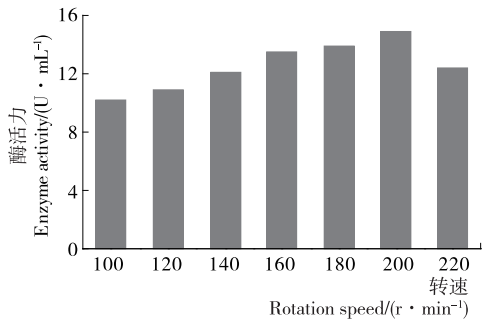


图9 摇床转速对产酶的影响

Figure 9 Effect of rotation speed on the enzyme activity

由图9可知,随着摇床转速的增加,菌株A7产脂肪酶能力增强,可能是转速越快,三角瓶内氧的溶解量增大,从而使产酶能力增强,但转速过高易使培养液溅出瓶外,导致培养基量发生变化,因此最佳转速确定为200 r/min。

2.2.5 金属离子对发酵产酶的影响 在发酵培养基中添加了不同的金属离子后,其酶活测定结果见图10。

由图10可知,在培养基中加入Mg²⁺后,菌株A7产酶能力明显提高,其酶活力达15.2 U/mL,比未添加Mg²⁺提高了17.8%。而加入Cu²⁺后,其产酶活力仅为8.9 U/mL,比未添加Cu²⁺降低了31%,表明Cu²⁺对菌株A7的产酶能力具有抑制作用。

2.3 正交试验

根据单因素试验各因素的显著程度,设计了正交试验,

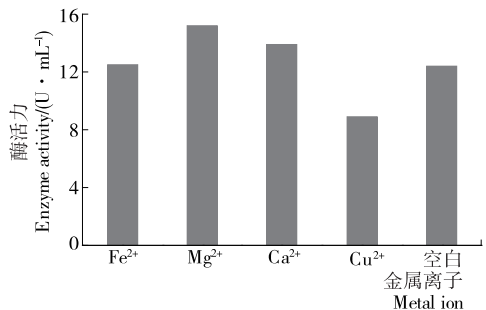


图10 金属离子对产酶的影响

Figure 10 Effect of metal ions on the enzyme activity

正交试验各因素水平见表1,根据表1设计培养基正交试验,结果见表2。

表1 正交试验各因素水平表

Table 1 All factor levels of the orthogonal test

水平	A 大豆油/ (g · L ⁻¹)	B 蛋白胨/ (g · L ⁻¹)	C MgSO ₄ · 7H ₂ O/ (g · L ⁻¹)	D pH
1	5	10	0.2	5.0
2	10	20	0.4	6.0
3	15	30	0.6	7.0

表2 培养基优化正交试验结果

Table 2 The Results of orthogonal experiment

序号	A	B	C	D	酶活力/ (U · mL ⁻¹)
1	1	1	1	1	12.6
2	1	2	2	2	19.8
3	1	3	3	3	13.2
4	2	1	2	3	14.3
5	2	2	3	1	13.9
6	2	3	1	2	15.7
7	3	1	3	2	13.4
8	3	2	1	3	12.9
9	3	3	2	1	10.8
k ₁	15.20	13.43	13.73	12.43	
k ₂	14.63	15.53	14.97	16.30	
k ₃	12.37	13.23	13.50	13.47	
R	2.83	2.30	1.47	3.87	

由表2可知,对菌株A7脂肪酶活力影响的主要因素是培养基的pH,其次是橄榄油的含量和蛋白胨的含量,影响最小的是金属离子的含量。试验2为最优水平,即最优培养基成分为:橄榄油5 g/L,蛋白胨20 g/L,MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g/L,初始pH 6.0,在此培养基中培养其酶活达到19.8 U/mL。

3 结论

本研究从油坊土壤、饭店、食堂油烟机排气孔等处采样,然后进行分离筛选,具有原始菌株来源广、代表性强等特点,通过试验也表明其酶活较多数产酶菌株高。其原因可能有以下3个方面:①分离筛选所得菌种不同;②菌株所产脂肪酶水解目标物不同;③对脂肪酶酶活的定义不同。在本试验的后续工作中,还需通过形态学和分子生物学手段确定菌株A7的种属,同时利用多种诱变方法,对菌株进行改良,以提高其产酶能力,为利用脂肪酶催化植物油合成生物柴油提供原始材料和参考数据。

参考文献

[1] 戴清源,朱秀灵. 非水相中脂肪酶催化合成糖酯类食品添加剂的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 385-389.

中,5种A牌系列中国产卷烟中价位相对较高的卷烟4和卷烟5中所检出的糖和丙二醇的含量显著较高,一方面与卷烟本身所使用烟叶品质较高有关,优质烟叶中总糖和还原糖含量都较高;另一方面与卷烟加工中所加料液和保润剂配方有关,势必会造成产品间的保润性能会存在一定差异。对于其他中国品牌的卷烟,低价位的中国产卷烟1(5.5元/包)、中国产卷烟2(7.5元/包)中麦芽糖和蔗糖,葡萄糖,果糖及丙二醇的含量都相对较低,这也与其本身所使用叶组配方组成及品质有关。但是中国产卷烟1中同时检测出甘油含量为5.47mg/g;中国产卷烟2检测出山梨醇,其含量为1.88 mg/g,同时在中国产卷烟3中也检出山梨醇的存在,说明这两种卷烟在保润剂配方中添加了山梨醇。

另外对于国外品牌卷烟,2个不同价位的C牌进口卷烟中都检测出麦芽糖和蔗糖,葡萄糖,果糖,甘油及丙二醇的存在,相比于中国卷烟,C牌进口卷烟1和C牌进口卷烟2中的丙三醇量相对较大,是中国卷烟1的1.5~2.0倍,其他样品中均未检出丙三醇,表明大部分卷烟基本上不用丙三醇作保润剂。分析发现,2种C牌号系列进口卷烟尽管二者价位不同,但是几种糖的含量无明显差异,而在甘油和丙二醇二者的使用量和比例上有所不同,低价位的进口卷烟1中甘油使用比例大,相反高价位的进口卷烟2中丙二醇使用比例大,其配方保润剂的设计思路可能充分考虑了烟叶类型的差异,值得深入探讨。

3 结论

建立了用高效液相色谱法同时测定烟草中果糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和甘油、丙二醇以及山梨醇含量的方法,该方法方便快捷、结果可靠。采用本研究建立的HPLC方法,

可对不同国内外品牌卷烟的糖类和多元醇进行检测,为深入了解不同卷烟的物理保润机制进而改善烟草物理保润性能提供理论指导。

参考文献

[1] 陈章玉,徐若飞. 高效液相色谱法测定烟草料液中几种保润成分[J]. 理化检验:化学分册,2006(12):1 049-1 051.

[2] 王岚,李忠,蒋次清,等. HPLC法同时测定烟草和料液中的糖和保润剂[J]. 烟草科技,2006(8):25-28.

[3] 黄菲,黄翼飞. 高效液相色谱测定烟用香精及料液中保润剂方法的改进[J]. 现代食品科技,2011,27(8):1 043-1 046.

[4] 李忠,杨光宇,黄海涛,等. 高效液相色谱法测定烟草料液中的糖、甘油和丙二醇[J]. 分析化学,2002,30(6):687-689.

[5] 张杰,李鹏,孙世豪,等. GC/MS法同时检测无烟气烟草制品中的1,2-丙二醇、丙三醇和甘油[J]. 烟草科技,2011(3):36-42.

[6] 王军,高尊华,纪朋,等. 烟用料液及加料烟片中丙二醇的测定[J]. 安徽农学通报,2012,18(22):117-118.

[7] 胡磊,郭葆,陆海,等. 植物组织中糖与糖醇乙酰化及毛细管气相色谱分析[J]. 植物学通报,2004,21(6):689-699.

[8] Leffmgwell J C. Leaf chemistry: basic chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types//Dais D, Nielsen M T. Tobacco: Production Chemistry and Technology [M]. Oxford: Blackwell Science, 1999: 265-284.

[9] Talhout R, Opperhuizen A, van Amsterdam J G C. Sugars as tobacco ingredient Effects on mainstream smoke composition[J]. Food and chemical Toxicology, 2006, 44(11): 1 789-1 798.

[10] 舒俊生,田振峰,陈开波,等. 烟叶中多糖的分离及单糖组成[J]. 食品与机械,2013,29(3):34-36.

[11] 孙雨安,王国庆,张应军,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定烟草中水溶性糖[J]. 分析科学学报,2004,20(5):531-533.

(上接第19页)

[2] 何义国,赵兴秀. 脂蛋白酯酶的分离纯化及其部分性质研究[J]. 四川理工学院学报:自然科学版,2012,25(6):1-5.

[3] 宋英攀,冯苗,詹红兵. 石墨烯纳米复合材料在电化学生物传感器中的应用[J]. 化学进展,2012,24(9):1 665-1 673.

[4] 黄凌云,赵希岳,蔡志强,等. 预处理固定化脂肪酶催化合成生物柴油[J]. 中国油脂,2007,32(7):47-50.

[5] 李映霞,赵凤娟,牛秋红. 响应面法优化固定化脂肪酶催化棉籽油转化生物柴油的研究[J]. 中国油脂,2013,38(10):60-63.

[6] 王巍杰,杨永强,吴尚卓. 脂肪酶催化合成生物柴油的研究进展[J]. 生物技术通报,2010(3):54-57.

[7] 贾虎森. 生物柴油利用概况及其在中国的发展思路[J]. 植物生态学报,2006,30(2):221-230.

[8] Ognjanovic N, Bezbradica D, Knezevic-Jugovic Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel inasolvent-free system: process optimization and the immobilized system stability[J]. Bioresour Technol, 2009, 100(21): 5 146-5 154.

[9] Matassoli A L, Corrúa I N, Portillo M F, et al. Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 155(1): 44-52.

[10] 张搏,杨江科. 脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件优化[J]. 生物技术,2007,17(1):23-26.

[11] 董明奇,史岩,姜春雷,等. 脂肪酶高产菌株的筛选及酶学特性研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2008,45(4):985-990.

[12] 邓欣,方真,张帆,等. 诱变选育脂肪酶高产菌株及其酶学性质[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(3):512-516.

[13] 刘虹蕾,缪铭. 微生物脂肪酶的研究与应用[J]. 食品工业科技,2012,33(12):376-38.

[14] 蔺昕,李培军,孙铁珩. 石油污染土壤的生物修复与土壤酶活性关系[J]. 生态学杂志,2005,24(10):1 226-1 229.

[15] 张婵,杨强. 高产脂肪酶菌株的分离筛选与培养基优化[J]. 中国酿造,2013(10):17-21.

[16] 虞慧慧,徐泽平,周传兵,等. 毕赤酵母工程菌产高温碱性脂肪酶发酵培养基的优化[J]. 食品与机械,2014,30(4):196-199.

[17] 李丕武,刘瑜,李瑞瑞,等. 两种葡萄糖氧化酶活力测定方法的比较[J]. 食品工业科技,2013,34(12):71-75.

[18] 代敏,纪昌涛,汪小锋,等. 疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶在毕赤酵母中的表面展示及酶学性质[J]. 微生物学报,2012,52(7):857-865.