

文章编号:1673-1689(2008)03-0114-06

## 一株碱性低温脂肪酶产生菌发酵条件的优化

王蕾<sup>1</sup>, 蔡宇杰<sup>1</sup>, 廖祥儒<sup>\*1</sup>, 张峰<sup>1</sup>, 张大兵<sup>2</sup>

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏汉邦科技有限公司, 江苏 淮安 223001)

**摘要:** 通过单因素实验, 对 SYBC Wu-3 菌摇床发酵产脂肪酶的培养基组成和培养条件进行优化, 得出最佳的产酶培养基组成配方为: 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 6 g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3 g/L; 油脂 250 mL/L, 乳化剂 OP 25 mL/L。最优发酵条件为 250 mL 的摇瓶装液量 50 mL, 培养温度 30 ℃, 发酵时间 72 h。经过优化后发酵液脂肪酶活力最高可达到 10.68 U/mL, 较优化前提高了 2.8 倍。

**关键词:** 脂肪酶; 培养基; 发酵; 优化

中图分类号: Q 556.1

文献标识码: A

## Optimization of Fermentation Conditions for a Low-Temperature Lipase-Producing Strain

WANG Lei<sup>1</sup>, CAI Yu-jie<sup>1</sup>, LIAO Xiang-ru<sup>\*1</sup>, ZHANG Feng<sup>1</sup>, ZHANG Da-bing<sup>2</sup>

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiang Su Hanbon Science & Technology Co. Ltd, Huai'an 223001, China)

**Abstract:** The effect of single factor on the flask incubation of SYBC Wu-3 was investigated. The optimum medium for the yield of lipase was that containing peptone 5 g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3g/L, oil 250 mL/L, emulsification 25 mL/L. The strain was cultured under the condition of 30 ℃ for 72 h. The enzyme activity under the optimal condition was 2.8 times of that under the condition before optimized, and reached to 10.68 U/mL.

**Key words:** lipase; medium; fermentation; optimization

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)又称三酰基甘油酯基水解酶, 广泛存在于动植物组织、植物种子及微生物中。脂肪酶具有多种催化能力, 能够催化脂化合物分解、合成和酯交换反应, 因此被广泛应用于食品、轻纺、皮革、香料、化妆品、洗涤剂、有机合成、医药等领域。微生物脂肪酶种类多, 作用温度及 pH 值范围比动植物脂肪酶广, 底物专一性高, 且

便于工业生产以获得较高纯度的酶制剂, 已成为工业生产脂肪酶的主要来源。

根据 Margsin<sup>[1]</sup>等人的定义, 把最适酶活温度在 30 ℃左右, 在 0 ℃左右仍具有一定催化活性的脂肪酶称为低温脂肪酶。目前, 产低温脂肪酶的微生物大多来源于南、北两极以及大洋底部等长期处于低温的环境中, 如静止嗜冷杆菌(*Psychrobacter*

收稿日期: 2007-10-08.

基金项目: 江南大学人才引进项目(006626).

作者简介: 王蕾(1981-), 女, 内蒙古包头人, 生物化学与分子生物学硕士研究生.

\* 通讯作者: 廖祥儒(1964-), 男, 江西南康人, 理学博士, 教授, 博士生导师. 主要从事生化与分子生物学研究.

Email: liaoxiangru@163.com

*immobilis*) B10<sup>[2]</sup>, 深海适冷假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) KB 700A<sup>[3]</sup> 以及 *Pseudomonas sp.* B11-1<sup>[4]</sup> 等。我国对低温脂肪酶的研究起步较晚, 研究的产低温脂肪酶微生物主要来源于几次南极科学考察采集的样品中。2003 年中国极地研究中心的俞勇<sup>[5]</sup> 等从南极乔治王岛冻土来源的 76 株低温细菌中筛选到 13 株低温脂肪酶产生菌, 并对其中的 BTs10022 菌株进行了鉴定和酶学性质的初步研究; 2004 年邵铁娟<sup>[6]</sup> 等对渤海海泥中筛选到的一株产低温脂肪酶微生物进行了菌种鉴定及产脂肪酶发酵条件的研究; 2006 年, 张金伟<sup>[7]</sup> 等从南极普里兹湾深海沉积物中筛选到一株产低温脂肪酶菌株 7195, 并对其进行了鉴定和初步分离纯化; 尽管目前已经对低温脂肪酶展开了一些研究, 但有关碱性低温脂肪酶的报道还不多, 作者从自然界中筛选得到一株地霉属微生物, 显示其可以分泌一种碱性低温脂肪酶, 故对其产酶发酵条件进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

实验室保藏菌种 (*Geotrichum. sp.*), 命名为 SYBC Wu-3。

### 1.2 培养基

**1.2.1 酵母膏蛋白胨培养基** 酵母膏 3 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 麦芽汁 3 g/L, 蛋白胨 5 g/L; pH 值自然。

**1.2.2 产酶培养基** 酵母膏 3 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 3 g/L; 橄榄油 100 mL/L, 表面活性剂 (乳化剂 OP) 50 mL/L。

### 1.3 培养方法

**1.3.1 种子培养** 250 mL 的三角瓶装 50 mL 酵母膏蛋白胨培养基, 接入斜面菌种一环, 30 ℃、180 r/min 旋转式摇床振荡培养 24 h。

**1.3.2 产酶培养** 250 mL 的三角瓶装 50 mL 产酶培养基, 接种体积分数为 2%, 30 ℃、180 r/min 旋转式摇床振荡培养 72 h。

### 1.4 分析方法

**1.4.1 酶活测定方法** 脂肪酶活性的测定以对硝基苯丁酸酯 (PNPB) 为底物, 参考 Margesin<sup>[8]</sup> 等人的测定方法并略作修改。每 5 mL 测定体系含: 72 mmol/L Tri-HCl (pH 9.5) 缓冲液, 8 mmol/L 对硝基苯丁酸酯。30 ℃ 保温 15 min 后加入 100  $\mu$ L 酶液, 在 405 nm 下测定吸光值。利用对硝基酚的消光系数 18 600 L/(mol · cm) 计算对硝基酚的产生量, 以 1 min 内催化产生 1  $\mu$ mol 的对硝基酚所需的

酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

**1.4.2 菌体量测定方法** 干重法: 取发酵液 30 mL, 8 000 r/min 离心 15 min, 蒸馏水水洗 3 次, 沥干后于 105 ℃ 烘箱中干燥至恒重。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产酶培养基中碳源的选择

以产酶培养基进行摇瓶培养, 显示在 72 h 时发酵液脂肪酶活性达到最高, 粗酶的最适温度在 20 ~ 30 ℃ 之间, 并在 0 ℃ 有较高的酶活性。在产酶培养基的基础上分别将酵母膏替换为葡萄糖、淀粉、高粱粉和玉米粉; 接种体积分数均为 2%, 在 30 ℃、180 r/min 条件下摇瓶培养 72 h 以确定碳源对发酵产酶的影响。由图 1 可以看出, 葡萄糖、淀粉、高粱粉、玉米粉对脂肪酶的产生并没有促进作用 (以酵母膏为碳源时的发酵液酶活为基准, 计算相对酶活), 其中以葡萄糖的作用最小, 其脂肪酶活力仅有 0.139 U/mL, 是以酵母膏为碳源的 4.3 %, 由此可见, 该菌对糖的利用能力不高。而酵母膏对脂肪酶的产生有十分明显的促进作用, 其脂肪酶活力可达 3.2 U/mL, 是葡萄糖的 23 倍, 故后期实验选择酵母膏作为培养基碳源。

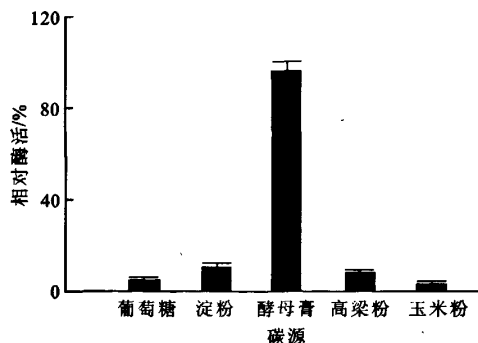


图1 碳源对 SYBC Wu-3 菌产脂肪酶的影响

Fig. 1 Effect of carbon source on lipase production of SYBC Wu-3

### 2.2 产酶培养基中氮源的选择

在产酶培养基的基础上分别将蛋白胨替换为豆饼粉、绿豆粉、硫酸铵、尿素和硝酸铵, 在接种体积分数为 2%, 30 ℃、180 r/min 条件下摇瓶培养 72 h, 以考察氮源对发酵产酶的影响, 见图 2。

以蛋白胨为氮源时的发酵液酶活为基准, 计算相对酶活。结果显示, 硫酸铵、硝酸铵、绿豆粉、尿素等为氮源时摇瓶发酵产脂肪酶均明显降低 ( $P < 0.001$ ), 其中尿素的作用最小, 其脂肪酶活力仅为 1.43 U/mL; 相对于无机氮源, 以蛋白胨、豆饼粉等有机氮为氮源的培养基对脂肪酶的产生均有提高, 其

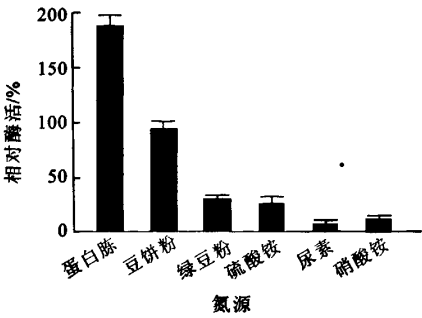


图 2 氮源对 SYBC Wu-3 菌产脂肪酶的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen source on lipase production of SYBC Wu-3

中以蛋白胨为氮源时最理想,其脂肪酶活力可达 3.16 U/mL。故采用蛋白胨作为产酶培养基的氮源。

2.3 不同无机盐对菌体产生脂肪酶活力的影响

按照产酶培养基配方分别将 NaCl 替换为 BaCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、LiCl、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NaNO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 或 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 在接种体积分数为 2%, 30℃、180 r/min 条件下摇瓶培养 72 h, 测定发酵液脂肪酶活性, 以考察无机盐在发酵产脂肪酶中的作用, 见表 1。

表 1 无机盐对 SYBC Wu-3 菌产脂肪酶的影响

Tab. 1 Effect of inorganic salt on lipase production of SYBC Wu-3

| 无机盐               | 相对酶活/% | 无机盐                              | 相对酶活/% |
|-------------------|--------|----------------------------------|--------|
| NaCl              | 100    | LiCl                             | 22     |
| BaCl <sub>2</sub> | 56     | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>  | 80     |
| CoCl <sub>2</sub> | 65     | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | 40     |
| MnCl <sub>2</sub> | 73     | NaNO <sub>3</sub>                | 53     |
| KCl               | 120    | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 103    |
| CaCl <sub>2</sub> | 32     | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 122    |
| MgCl <sub>2</sub> | 40     |                                  |        |

从表 1 可以看出,不同的无机盐对菌体产脂肪酶的作用不尽相同,以 NaCl 为无机盐时的发酵液酶活为基准计算相对酶活,其中 BaCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、LiCl、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 及 NaNO<sub>3</sub> 均明显不利于发酵产酶( $P<0.01$ ),其中作用最小的是 CoCl<sub>2</sub>,其脂肪酶活力仅为 1.6 U/mL; KCl 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 对发酵产酶具有较为明显的促进作用( $P<0.05$ ),其中 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 对酶活的促进作用最为明显,其脂肪酶活力最高可达 9.7 U/mL,是 CoCl<sub>2</sub> 的 6.6 倍; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 对摇瓶发酵产脂肪酶无明显影响。

2.4 初始 pH 值对菌体产生脂肪酶活力的影响

按照优化后的培养基配方配制培养基并分别调节初始 pH 值到 4、5、6、7、8、9,实验接种体积分数为 2%, 在 30℃、180 r/min 条件下摇瓶培养 72 h, 测定发酵液脂肪酶活性,以明确初始 pH 值对发酵产脂肪酶的影响。以初始 pH 9 时的发酵液酶活为基准,计算相对酶活。结果显示,尽管初始 pH 值为 7~8 时,酶活有所升高,但发酵液初始 pH 值对酶活并无明显影响,见图 3。

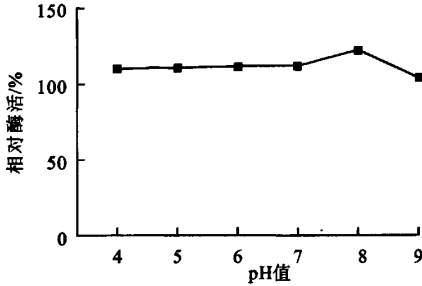


图 3 初始 pH 值对 SYBC Wu-3 菌产脂肪酶的影响

Fig. 3 Effect of initial pH value on lipase production of SYBC Wu-3

2.5 摇瓶装液量对菌体产生脂肪酶活力的影响

按照优化后的培养基配方配制培养基并分别按 10、20、30、40、50、60、70 mL 体积将培养基加入 250 mL 的三角瓶,接种体积分数为 2%, 在 30℃、180 r/min 条件下摇瓶培养 72 h, 测定发酵液酶活,以确定装液量对发酵产酶的影响。以装液量为 50 mL 时的发酵液酶活为基准,计算相对酶活。由图 4 可以看出,装液量对酶活有较大影响,当装液量 $\leq 30$  mL/250 mL 时,酶活随装液量的增大而升高;当装液量达到(30~40) mL/250 mL 时,发酵液酶活最高;之后随着装液量的增加,酶活逐渐降低,当装液量为 70 mL/250 mL 时,发酵液酶活最低。装液量 30 mL 时的脂肪酶活力较酶活最低时提高了 1.6 倍。

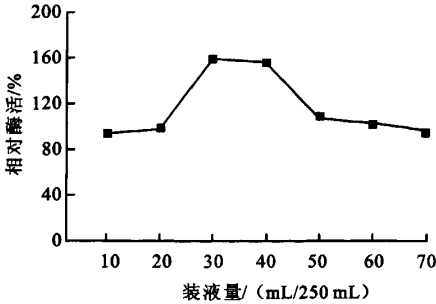


图 4 装液量对 SYBC Wu-3 菌产脂肪酶的影响

Fig. 4 Effect of media volume on lipase production of SYBC Wu-3

Wu-3 菌为好氧菌,装液量对发酵产酶的影响实际上是溶解氧对产酶的影响。由于三角瓶的容积一定,装液量越大,能够溶解到发酵液中的氧气就越少。由此可知,适宜的通气量可以促进脂肪酶活力的提高;装液量过大和过小均不利于菌体脂肪酶的产生,因此在发酵时 250 mL 的三角瓶的装液量应控制在 40 mL 左右。

2.6 培养温度对菌体产生脂肪酶活力的影响

按照优化后的培养基配制培养基并分别在 20、25、30、35、40 ℃,180 r/min 条件下摇瓶培养 72 h,测定发酵液酶活,以考察培养温度对发酵产脂肪酶的影响。

以发酵温度为 30 ℃时发酵液的酶活为基准,计算相对酶活。由图 5 可以看出,当发酵温度范围在 20~30 ℃时,发酵液酶活几乎不变,但当发酵温度为 30~35 ℃时,发酵液酶活迅速升高,并在 35 ℃时达到酶活最大值,之后随着培养温度的升高,发酵液酶活又开始下降。因此,摇瓶发酵时培养温度应控制在 35 ℃。

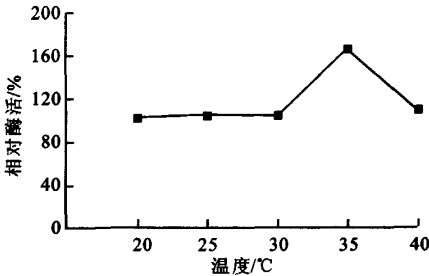


图 5 温度对 SYBC Wu-3 菌产脂肪酶的影响

Fig. 5 Effect of temperature on lipase production of SYBC Wu-3

2.7 正交实验

2.7.1 因素和水平确定 通过对摇瓶培养基组成和培养条件的单因素实验得知,对 SYBC Wu-3 菌发酵产生脂肪酶活力影响较大的因素有蛋白胨、酵母膏、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的质量浓度和装液量、温度,此外油脂和乳化剂对 SYBC Wu-3 发酵产生脂肪酶活力有一定的影响。添加油脂可以促进 SYBC Wu-3 产生脂肪酶,与添加油脂和酵母膏的培养基相比,只加入酵母膏的培养基脂肪酶活力可以提高数倍;乳化剂 OP 可以增加油脂和水相接触的表面剂,有利于 SYBC Wu-3 发酵时对油脂的利用,但是如果加入量过大反而会抑制菌体生长、导致菌体死亡,因此也对产生的酶活力有较大的影响。故选择这些因素为实验因素,因素和水平的选择见表 2。

2.7.2 正交试验结果 试验按照表 2 选取的因素和水平,选用  $L_{18}(3^7)$  正交表,并按照正交表安排实验,正交实验结果见表 3。

由表 3 可以看出, $A_1 B_2 C_1 D_2 E_2 F_2 G_3$  为最优水平组合,即蛋白胨添加量为 5 g/L,酵母膏添加量为 6 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  添加量为 3 g/L,橄榄油体积分数为 250 mL/L,乳化剂 OP 体积分数为 25 mL/L,装液量为 50 mL/250 mL,发酵温度为 30 ℃。

由极差分析比较  $R_E > R_A > R_B > R_C > R_G > R_D > R_F$  可以看出:因素对 SYBC Wu-3 菌发酵产脂肪酶活力的主次顺序是 EABCGDF。即乳化剂添加量对 SYBC Wu-3 发酵产酶活力影响最大,其次为蛋白胨添加量、酵母膏添加量等,而温度对 SYBC Wu-3 菌发酵产酶活力影响最小。

表 2 因素水平表

Tab. 2 Factors and levels

| 水平 | 因素                    |                       |                                             |                       |                        |          |                     |
|----|-----------------------|-----------------------|---------------------------------------------|-----------------------|------------------------|----------|---------------------|
|    | 蛋白胨<br>质量浓度/<br>(g/L) | 酵母膏<br>质量浓度/<br>(g/L) | $\text{NaH}_2\text{PO}_4$<br>质量浓度/<br>(g/L) | 油脂<br>体积分数/<br>(mL/L) | 乳化剂<br>体积分数/<br>(mL/L) | 温度/<br>℃ | 装液量/<br>(mL/250 mL) |
| 1  | 5                     | 3                     | 3                                           | 200                   | 0                      | 25       | 30                  |
| 2  | 10                    | 6                     | 6                                           | 250                   | 25                     | 30       | 40                  |
| 3  | 15                    | 9                     | 9                                           | 300                   | 50                     | 35       | 50                  |

表 3 正交实验结果

Tab. 3 Result of orthogonal design

| 实验号 | 各因素水平       |             |                                   |            |             |    |     | 酶活/<br>(U/mL) |
|-----|-------------|-------------|-----------------------------------|------------|-------------|----|-----|---------------|
|     | 蛋白胨<br>质量浓度 | 酵母膏<br>质量浓度 | $\text{NaH}_2\text{PO}_4$<br>质量浓度 | 油脂<br>体积分数 | 乳化剂<br>体积分数 | 温度 | 装液量 |               |
| 1   | 1           | 1           | 1                                 | 1          | 1           | 1  | 1   | 6.62          |
| 2   | 1           | 2           | 2                                 | 2          | 2           | 2  | 2   | 9.29          |
| 3   | 1           | 3           | 3                                 | 3          | 3           | 3  | 3   | 8.25          |

续表 3

| 实验号            | 各因素水平          |                |                                          |                |                |                |                | 酶活/<br>(U/mL) |
|----------------|----------------|----------------|------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
|                | 蛋白胨<br>质量浓度    | 酵母膏<br>质量浓度    | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>质量浓度 | 油脂<br>体积分数     | 乳化剂<br>体积分数    | 温度             | 装液量            |               |
| 4              | 2              | 1              | 1                                        | 2              | 2              | 3              | 3              | 9.22          |
| 5              | 2              | 2              | 2                                        | 3              | 3              | 1              | 1              | 7.90          |
| 6              | 2              | 3              | 3                                        | 1              | 1              | 2              | 2              | 6.22          |
| 7              | 3              | 1              | 2                                        | 1              | 3              | 2              | 3              | 8.01          |
| 8              | 3              | 2              | 3                                        | 2              | 1              | 3              | 1              | 6.54          |
| 9              | 3              | 3              | 1                                        | 3              | 2              | 1              | 2              | 7.72          |
| 10             | 1              | 1              | 3                                        | 3              | 2              | 2              | 1              | 9.45          |
| 11             | 1              | 2              | 1                                        | 1              | 3              | 3              | 2              | 10.08         |
| 12             | 1              | 3              | 2                                        | 2              | 1              | 1              | 3              | 7.19          |
| 13             | 2              | 1              | 2                                        | 3              | 1              | 3              | 2              | 7.03          |
| 14             | 2              | 2              | 3                                        | 1              | 2              | 1              | 3              | 9.62          |
| 15             | 2              | 3              | 1                                        | 2              | 3              | 2              | 1              | 8.52          |
| 16             | 3              | 1              | 3                                        | 2              | 3              | 1              | 2              | 7.89          |
| 17             | 3              | 2              | 1                                        | 3              | 1              | 2              | 3              | 6.64          |
| 18             | 3              | 3              | 2                                        | 1              | 2              | 3              | 1              | 6.21          |
| K <sub>1</sub> | 8.480          | 8.037          | 8.133                                    | 7.793          | 6.707          | 7.823          | 7.540          |               |
| K <sub>2</sub> | 8.085          | 8.345          | 7.605                                    | 8.108          | 8.585          | 8.022          | 8.038          |               |
| K <sub>3</sub> | 7.168          | 7.352          | 7.995                                    | 7.832          | 8.442          | 7.888          | 8.155          |               |
| 优水平            | A <sub>1</sub> | B <sub>2</sub> | C <sub>1</sub>                           | D <sub>2</sub> | E <sub>2</sub> | F <sub>2</sub> | G <sub>3</sub> |               |
| R              | 1.312          | 0.903          | 0.528                                    | 0.315          | 1.878          | 0.199          | 0.615          |               |

3 结 语

作者从自然界筛选得到一株低温脂肪酶产生菌 SYBC Wu-3,通过单因素影响、正交实验对发酵培养基和发酵条件进行了优化,确定其发酵培养基为:蛋白胨 5 g/L,酵母膏 6 g/L,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L,橄榄油 250 mL/L,乳化剂 OP 25 mL/L;发酵条件为 250 mL 的摇瓶装液量 50 mL,培养温度 30 ℃,发酵时间 72 h。在最优发酵培养基组成和发酵条件下,发酵液脂肪酶酶活力最高可达到 10.68 U/mL,较优化前(3.68 U/mL)提高了 2.8 倍。

在培养基方面,SYBC Wu-3 分别以蛋白胨和酵母膏为最佳氮、碳源,可能该菌不能较好地利用

淀粉等碳水化合物,而偏好于蛋白质、脂类等;不同于 *Galactomyces geotrichum* Y25<sup>[8]</sup>、*Aspergillus* sp. F044<sup>[10]</sup>、*Pseudomonas* sp. YT34-8<sup>[11]</sup>、*Pseudomonas* sp. 26-2<sup>[12]</sup>、*P. fluorescence* 5963<sup>[13]</sup>,与已报道的<sup>[14]</sup>相比,具有优化后的培养基组成成分简单,发酵周期短等优点;作为一株低温脂肪酶产生菌,其脂肪酶活力高于低温脂肪酶产生菌 *Pseudomonas* sp. YT34-8,略低于 *Pseudomonas* sp. 26-2 和 *P. fluorescence* 5963。

由此可见,SYBC Wu-3 作为原始菌株具有一定的脂肪酶生产能力,可作为一株具有潜力的脂肪酶产生菌进行进一步研究。

参考文献(References):

[1] 林学政, 边际, 何培青. 极地微生物低温适应性的分子机制[J]. 极地研究, 2003, 15(1): 75—82.  
LIN Xue-zheng, BIAN Ji, HE Pei-qing. Molecular mechanism of cold-adaptation of polar microorganisms[J]. Chinese Journal of Polar Research, 2003, 15(1): 75—82. (in Chinese)

- [2] Jean L A, Jean L, Charles G, et al. Molecular adaption to cold of Antarctic bacterial lipase[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 1997(3): 29—35.
- [3] Rashid N, Shimada Y, Ezaki S. Low- temperature lipase from *Psychrotrophic pseudomonas sp.* strain KB700A [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2001(9): 4064—4069.
- [4] Choo D W, Kuriharat, Suzukit. A cold adapted lipase of alaskan psychrotrophic *Pseudomonas sp.* strain B1121: gene cloning and enzyme purification and characterization[J]. **Appl Environ Microbio**, 1998, 64(2): 486—491.
- [5] 俞勇, 李会荣, 陈波, 等. 低温脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其部分酶学性质[J]. 高技术通讯, 2003(10): 89—93.  
YU Yong, LI Hui-rong, CHENG Bo, et al. Screening and classification for low-temperature lipase-producing bacterium and characterization of lipase[J]. **Chinese High Technology Letters**, 2003(10): 89—93. (in Chinese)
- [6] 邵铁娟, 孙溢, 郑家声, 等. Bohaisea-9145 海洋低温碱性脂肪酶研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 789—793.  
SHAO Tie-Juan, SUN Mi, ZHENG Jia-sheng, et al. Study on low-temperature alkaline lipase form bohaisea-9145[J]. **Acta Microbiological Sinica**, 2004, 44(6): 789—793. (in Chinese)
- [7] 张金伟, 曾润颖. 南极产低温脂肪酶菌株 *Psychrobacter sp.* 7195 的选育、发酵条件及酶学性质研究[J]. 生物磁学, 2006, 6(1): 6—10.  
ZHANG jin-wei, ZENG Run-ying. Multicomponent enzymes produced by *Psychrobacter sp.* 7195: screening fermentation condition and enzyme charaterization[J]. **Biomagnetism**, 2006, 6(1): 6—10. (in Chinese)
- [8] Margesin R, Feller G, Hammerle M, et al. A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil[J]. **Bio-technology Letters**, 2002, 24: 27—33.
- [9] 阎金勇, 杨江科, 闫云君. *Galactomyces geotrichum* Y25 产脂肪酶条件的优化[J]. 生物加工过程, 2007, 5(2): 46—51.  
YAN Jin-yong, YANG Jiang-ke, YAN Yun-jun. Optimzation of lipase production conditions by *Galactomyces geotrichum* Y25[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2007, 5(2): 46-51. (in Chinese)
- [10] 陈 晖, 杨江科, 刘曼西, 等. 响应面法快速优化曲霉 *Aspergillus sp.* F044 产脂肪酶培养条件[J]. 工业微生物, 2007, 37(1): 47—52.  
CHEN Hui, YANG Jiang-ke, LIU Man-xi, et al. Optimization of lipase production conditions for *Aspergillus sp.* F044 by reponse surface methodology[J]. **Industrial Microbiology**, 2007, 37(1): 47-52. (in Chinese)
- [11] 余琼, 梁运祥. 产低温脂肪酶假单胞菌的选育及产酶条件的优化[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(7): 662—665.  
YU Qiong, LIANG Yun-xiang. Isolation of *Pseudomonas* strain producing low-temperature lipase and optimization of the lipase producing conditions[J]. **Hubei Agricultural Sciences**, 2006, 45(7): 662—665. (in Chinese)
- [12] 张搏, 杨江科, 苏华武, 等. 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.  
ZHANG Bo, YANG Jiang-ke, SHU Hua-wu, et al. Screening, identification of lipase production bacteria and optimization of the lipase production[J]. **Biotechnology**, 2007, 17(1): 23—26. (in Chinese)
- [13] 逢淑召, 王群, 郭慧云. 荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescense* 5963 产脂肪酶条件的优化[J]. 生物加工过程, 2004, 2(1): 62—65.  
PANG Shu-zhao, WANG Qun, GUN Hui-yun. Optimization of the lipase producing conditions from *Pseudomonas fluorescense* 5963 strain[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2004, 2(1): 62—65. (in Chinese)
- [14] 肖群海, 段学辉, 牛春玲. 粗状假丝酵母(*Candida valida* T2)生产脂肪酶的发酵条件[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 62—66.  
XIAO Qun-hai, DUAN Xue-hui, NIU Chun-ling. Studies on the fermentation process for lipase production by *Candida valida* T2[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(4): 62—66. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)