

文章编号:1673-1689(2009)06-0816-06

耐有机溶剂脂肪酶产生菌的筛选及其酶学性质

肖素静, 曹艳, 孙磊, 何冰芳*

(南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要:以体积分数 10% 的甲苯等有机溶剂为筛选压力,从油污和污水等样品中筛选到一株产耐有机溶剂脂肪酶的有机溶剂耐受菌 LX1,经 16 S rDNA 序列分析,该菌株鉴定为 *Pseudomonas aeruginosa*。研究发现菌株 LX1 所产脂肪酶最适反应 pH 和温度分别为 7.0 和 40 °C,在较宽的 pH 范围内(6.5~10.5)具有较高的稳定性;金属离子螯合剂 EDTA 和 Ba²⁺、Ca²⁺ 对 LX1 脂肪酶活力均有明显的激活作用,推测该脂肪酶为金属激活酶。LX1 脂肪酶在体积分数 25% 的疏水性和亲水性有机溶剂中均具有较好的耐受性,在十六烷、十四烷、十二烷、正庚醇、正辛醇和正己醇体系中半衰期显著延长到 10 d 以上,在 DMF 和 DMSO 体系中的半衰期为 5 d 以上,均高于在无溶剂体系中的半衰期。展现了 LX1 脂肪酶在有机相生物催化中的良好应用前景。

关键词:耐有机溶剂;脂肪酶;筛选;鉴定;有机溶剂耐受菌

中图分类号:Q 556.1

文献标识码:A

Isolation of an Organic Solvent-Tolerant Lipase Producing Strain and Characterization of the Crude Lipase

XIAO Su-jing, CAO Yan, SUN Lei, HE Bing-fang*

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: This manuscript describes the isolation of LX1 strain producing solvent-tolerant lipase from areas contaminated by crude oil and chemicals under the screening pressure of 10% (V/V) toluene. The isolate LX1 was identified as *Pseudomonas aeruginosa* by the analysis of 16S rDNA sequence. The optimal pH and temperature for lipase activity was 7.0 and 40 °C, indicating the characteristic of neutral and medium temperature lipase. High stability of LX1 lipase was observed under a wide range of pH (6.5–10.5), and it was stable below 40 °C. The chelating agent EDTA and metal ions such as Ba²⁺, Ca²⁺ had significantly activated the activity of LX1 lipase. This suggested that it could be a metal activated enzyme. LX1 lipase showed good tolerance in many kinds of 25% (V/V) hydrophilic and hydrophobic solvents. In the presence of n-Hexadecane, n-Tetradecane, n-Dodecane, n-Octanol, n-Heptitol and n-Hexanol, the half-life of LX1 lipase was markedly prolonged to 10 d; Additionally, in the presence of propylene glycol, DMF and DMSO, the half-life of LX1 lipase was prolonged to 5 d, which were higher than the half-life without organic solvents. These results indicated that LX1 lipase has potential

收稿日期:2008-12-19

基金项目:国家 863 计划项目(2007AA02Z210),国家 973 计划项目(2004CB719600)。

* 通讯作者:何冰芳(1962-),女,浙江黄岩人,理学博士,教授,主要从事应用微生物、酶工程方面的研究。

Email: bingfanghe@njut.edu.cn

application in organic solvents.

Key words: organic solvent-tolerant, lipase, screening, identification, *Pseudomonas aeruginosa*

脂肪酶(lipase, EC 3. 1. 1. 3, 甘油三酰酯水解酶)是油-水界面上水解三酰甘油酯键的酶,其作用的底物通常是水不溶性的。若将脂肪酶应用于有机溶剂体系的生物催化中,有诸多优点^[1]:1)底物在有机溶剂中溶解度高;2)产物溶解在有机相中易于回收;3)减少底物或产物对水相或两相界面中脂肪酶的抑制;4)在有机相中能进行水解及相应的逆反应。但是在有机溶剂中,大多数微生物的代谢功能或酶活力受到抑制或失活,在有机介质中维持较高的脂肪酶活性及脂肪酶催化底物的广泛性,是实际生物催化过程中的难题。因此,开发天然耐有机溶剂脂肪酶,在理论和工业应用上具有重要的意义。

迄今为止,国内外已先后报道了耐有机溶剂脂肪酶产生菌的筛选,所产脂肪酶的酶学性质及有机溶剂耐受性能,如 *Pseudomonas aeruginosa* LST-03^[2], *Pseudomonas* sp. strain S5^[3], *Pseudomonas* sp. AG-8^[4], *Bacillus sphaericus* 205y^[1] 和 *Bacillus* sp. strain 42^[5], *Yarrowia* sp.^[6] 和 *Serratia marcescens* ECU1010^[7] 等。相关酶类的应用有了许多突破性的进展,但也难以满足日益增长的工业生物催化的需求。耐有机溶剂脂肪酶产生菌的多样性,同工酶性能的多样性,及耐有机溶剂程度等方面,仍具有进一步开发的潜力。

研究中以体积分数 10% 的甲苯等有机溶剂为筛选压力,从油污土样和污水等样品中筛选到一株产脂肪酶的有机溶剂耐受菌 LX1,对该菌株进行了菌种鉴定,并就该菌株所产脂肪酶粗酶液的酶学性质尤其是有机溶剂对脂肪酶稳定性的影响进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

对硝基苯酚棕榈酸酯(p-Nitrophenylpalmitate, pNPP),对硝基苯酚(p-Nitrophenyl, pNP), Sigma 公司提供;PowerWave XS 酶标仪(Universal Microplate Spectrophotometer),美国 BIO-TEK 仪器公司制;BIOLÓG 全自动细菌鉴定仪,BIOLÓG 公司制。

1.2 培养基及培养条件

富集培养基:蛋白胨 0.1 g/dL,玉米浆 0.18 g/

dL, (NH₄)₂SO₄ 0.35 g/dL, KH₂PO₄ 0.3 g/dL, NaCl 0.25 g/dL, MgSO₄ 0.1 g/dL, 葵花籽油 5 g/dL; pH 7.0~7.2, 30 °C, 150 r/min 培养。

三丁酸甘油酯培养基:牛肉膏 0.3 g/dL, 蛋白胨 1.0 g/dL, NaCl 0.25 g/dL, 三丁酸甘油酯 0.5 g/dL, 琼脂 1.8 g/dL; pH 7.0~7.2, 进豆浆机乳化后灭菌。

Rhodamin B 培养基:酵母膏 0.1 g/dL, 玉米浆 0.5 g/dL, K₂HPO₄ 0.1 g/dL, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g/dL, 橄榄油 6 g/dL, Rhodamin B 0.002 4 g/dL(过滤灭菌后另加), 琼脂 1.8 g/dL; pH 7.0, 进豆浆机乳化后灭菌。

产酶发酵培养基:玉米浆 2.0 g/dL, 牛肉膏 1.0 g/dL, 葡萄糖 0.5 g/dL, K₂HPO₄ 0.2 g/dL, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g/dL, 菜籽油 0.5 g/dL; pH 7.5。

培养条件:250 mL 的三角瓶装液量为 40 mL, 30 °C, 180 r/min 培养 48 h。

粗酶液制备:取 1 mL 发酵液于 10 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 取上清液作为粗酶液。

1.3 产脂肪酶的耐有机溶剂菌株的筛选

在富集培养基基础上分别加入体积分数 10% 的环己烷,体积分数 10% 的甲苯,体积分数 5% 的 DMSO(二甲基亚砜)为筛选压力,加入适量不同来源的土样,30 °C, 180 r/min 进行富集培养;每 2 d 转接一次,转接 3 次后稀释适当倍数涂布于三丁酸甘油酯平板上,30 °C 培养 24 h 后,挑取透明圈大的菌株在 LB 平板上分离纯化,并转接于 Rhodamin B 培养基上,在 350 nm 紫外光下观察,产脂肪酶的菌株周围有桔红色的荧光圈,根据菌落与荧光圈大小的比值,筛选能产生较高脂肪酶活力的菌株。然后将候选菌株接种到产酶发酵培养基,发酵 48 h 后取样测定上清液中脂肪酶活力。

1.4 菌种鉴定

利用通用引物(BSF8/20, BSR1541/20)PCR 扩增其 16 S rDNA 序列,由上海英骏生物技术有限公司测序,将该 16 S rDNA 序列提交 GenBank 数据库,并采用 BLAST 进行分析。采用 BIOLÓG 全自动细菌鉴定仪对菌株进行鉴定,具体操作见文献[8-9]。

1.5 脂肪酶活力的测定

1.5.1 以 pNPP 为底物的分光光度法 用脂肪酶

粗酶液催化对硝基苯酚棕榈酸酯(p-nitrophenyl-palmitate, pNPP)的水解,用酶标仪在410 nm检测反应10 min后生成的对硝基苯酚(pNP)的量。参照文献[10]。

酶活力定义为:一个单位的脂肪酶活力定义为每分钟催化对硝基苯酚棕榈酸酯(pNPP)分解释放出1 μmol 对硝基苯酚(pNP)所需要的脂肪酶量,文中以比活力(U/mL)表示。无特殊说明均采用此法测定酶活力。

1.5.2 以橄榄油为底物的NaOH滴定法 以橄榄油乳化液为底物,在一定pH及温度条件下反应15 min,用滴定法测定产生的脂肪酸^[11]。一个单位的脂肪酶活力定义为每分钟催化底物(橄榄油)分解释放出1 μmol 游离脂肪酸所需要的脂肪酶量。

1.6 LX1脂肪酶粗酶液的酶学性质

1.6.1 LX1脂肪酶的最适反应pH和pH稳定性

由于pNPP在强碱性条件下会自水解,采用以橄榄油为底物的NaOH滴定法来考察LX1脂肪酶的最适反应pH。而脂肪酶的pH稳定性研究中将粗酶液在不同pH的溶液中处理1 h后,用pH 7.0缓冲液稀释到较优浓度后用分光光度法测定残留脂肪酶活力。

1.6.2 LX1脂肪酶的最适反应温度及温度稳定性

将粗酶液与底物(pNPP)分别保温10 min,然后混合,分别在对温度下反应10 min,检测温度对脂肪酶活力的影响。

脂肪酶的温度稳定性实验:将粗酶液分别在不同温度处理1 h后,于40 $^{\circ}\text{C}$ 测定残留脂肪酶活力,以4 $^{\circ}\text{C}$ 的酶活力为对照。

1.6.3 金属离子对LX1脂肪酶活力的影响 用50 mmol/L的Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)配制20 mmol/L的不同金属离子及EDTA溶液,并分别与粗酶液按一定比例混合(金属离子终浓度分别为1 mmol/L和10 mmol/L),在30 $^{\circ}\text{C}$ 保温1 h后测定

残留脂肪酶活力,以不添加金属离子体系中的酶活力为对照。

1.6.4 LX1脂肪酶有机溶剂耐受性能检测 在粗酶液中添加终体积分数为25%(0.5 mL有机溶剂/1.5 mL酶液,总体积为4 mL的密封玻璃瓶)的各种有机溶剂,30 $^{\circ}\text{C}$,150 r/min条件下振荡,按一定时间间隔取样测定各体系中残留脂肪酶活力。添加疏水性有机溶剂样品的对照,为不加有机溶剂的原酶液体系;添加亲水性有机溶剂样品的对照,为等体积的pH 7.0磷酸缓冲液代替有机溶剂的酶液体系。

2 结果与讨论

2.1 耐有机溶剂脂肪酶产生菌的筛选

实验中以不同体积分数的甲苯、环己烷、DMSO为筛选压力,从油污土样和污水等样品中筛选到耐有机溶剂极端微生物123株,建立了耐有机溶剂极端微生物菌库,其中产脂肪酶活力较高的菌株有6株。经过初步的发酵产酶条件优化,采用产酶培养基发酵48 h后,菌株LX1所产脂肪酶活力可达到29.5 U/mL。现有报道的耐有机溶剂 *Pseudomonas* 属菌株产耐有机溶剂脂肪酶活力均很低,分别为0.78 U/mL^[2],0.32 U/mL^[3]。初步研究所获得的耐有机溶剂脂肪酶活力显著高于上述脂肪酶活力,且初步研究表明LX1脂肪酶对多种有机溶剂有较好的耐受性,因此选择菌株LX1进行后续研究。

2.2 菌种鉴定结果

该菌株扩增的1557 bp的16S rDNA序列经BLAST比对,与 *Pseudomonas aeruginosa* 种的多株菌相似度达99%;选取该种属的10个菌株的16S rDNA序列,经ClustalX多序列联配,利用MEGA3.1构建系统发育树。图1显示了相关假单胞菌的进化地位,鉴于16S rDNA的同源性比较结果,菌株LX1鉴定为 *Pseudomonas aeruginosa*,命名为 *Pseudomonas aeruginosa* LX1。

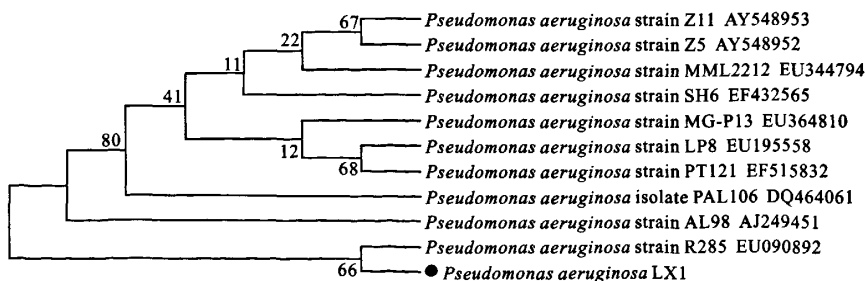


图1 菌株LX1的16S rDNA系统进化树

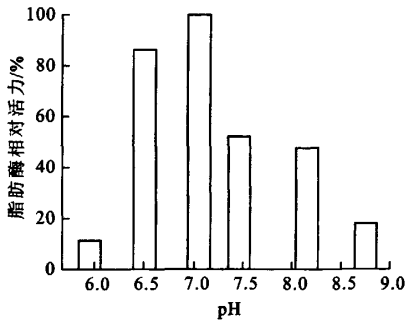
Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rDNA of strain LX1

采用 BIOLOG 全自动细菌鉴定仪对其生理生化性质进行了分析,结果表明菌株 LX1 与 *Pseudomonas aeruginosa* 的相似度最高仅为 0.23,可信度较低,表明该耐有机溶剂菌株与数据库中典型铜绿假单胞菌的生理生化性质有一定的差异,进化树分析也表明该菌株处于选定范围内相同属种进化分支的边缘。

2.3 LX1 脂肪酶粗酶液的酶学性质

2.3.1 LX1 脂肪酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性

由图 2 可见,LX1 脂肪酶在 pH 6.5~7.0 范围内有较高酶活力,其最适反应 pH 为 7.0,是中性脂肪酶。LX1 脂肪酶在较宽 pH 范围内(6.5~10.5)具有较高的稳定性,见图 3;在 pH 12.0 的缓冲体系中仍能保持 65% 以上的残留活力,表明该脂肪酶有很强的耐碱性。而 *Pseudomonas sp.* S5 脂肪酶^[13]仅在 pH 7.0~9.0 有较好的稳定性;*P. aeruginosa* LST-03 脂肪酶^[12]在 pH 5.0~8.0 范围内比较稳定,稳定性范围都比较窄。本研究过程中所产脂肪酶比较上述两种假单胞菌所产脂肪酶的 pH 稳定性范围更广泛,可能为该类菌产生的同工酶。



注:对照为 pH 7.0 时的酶活力。

图 2 脂肪酶的最适反应 pH
Fig. 2 Optimum pH of lipase

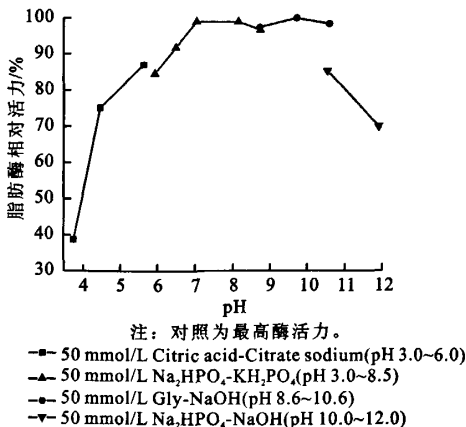
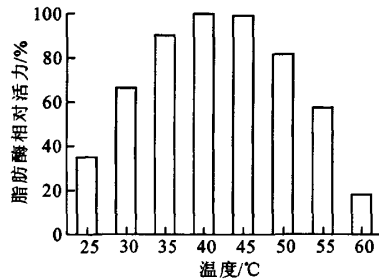


图 3 脂肪酶的 pH 稳定性
Fig. 3 pH stability of lipase

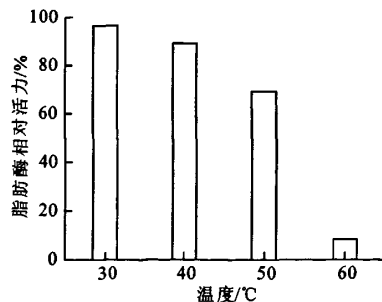
2.3.2 LX1 脂肪酶的最适反应温度及温度稳定性

由图 4 可见,LX1 脂肪酶在 35~45 °C 反应时,具有较高酶活力,其最适反应温度为 40 °C,在 25 °C 反应时,酶活力不足最适反应温度时的 40%,表明 LX1 脂肪酶为中温酶。由图 5 可见,LX1 脂肪酶在 30~40 °C 处理 1 h 后有 90% 以上的活力,表明 LX1 脂肪酶在 40 °C 以下具有较好的热稳定性。而报道的 *P. aeruginosa* LST-03 脂肪酶^[12]在 40 °C 处理 10 min 后即明显失活,*Pseudomonas sp.* S5 脂肪酶^[13]在 45 °C 和 50 °C 的半衰期分别为 2 h 和 1 h。进一步证明了研究中筛选到的 *Pseudomonas aeruginosa* LX1 所产脂肪酶与已报道的假单胞菌脂肪酶的差异。



注:对照为 40 °C 时的酶活力。

图 4 脂肪酶的最适反应温度
Fig. 4 Optimum temperature of lipase

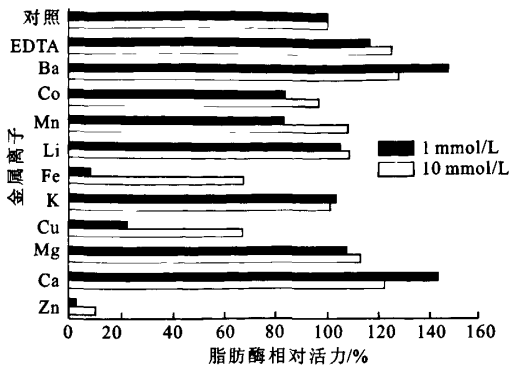


注:对照为 4 °C 储存时的酶活力。

图 5 脂肪酶的温度稳定性
Fig. 5 Thermal stability of lipase

2.3.3 金属离子对 LX1 脂肪酶活力的影响

由图 6 可见,1 mmol/L 和 10 mmol/L 的 Ca²⁺、Ba²⁺、Mg²⁺ 和 Li⁺ 体系对 LX1 脂肪酶活力都有一定的激活作用,尤其是 10 mmol/L 的 Ca²⁺ 和 Ba²⁺ 体系使 LX1 脂肪酶活力分别提高了 42.93% 和 46.98%;而 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的金属离子螯合剂 EDTA 对该酶活力也有一定的促进作用,由此推测 LX1 脂肪酶为金属激活酶。



注:30 ℃保温 1 h,以不添加金属离子体系中的酶活为对照。

图6 金属离子对脂肪酶活力的影响

Fig. 6 Effect of metal ions on the activity of lipase

2.3.4 疏水性有机溶剂对 LX1 脂肪酶稳定性的影响 由表 1 可见,12 种疏水性有机溶剂均使得 LX1 脂肪酶的稳定性显著增强。在不添加有机溶剂的对照样品中,LX1 脂肪酶的半衰期仅为 2 d,但在十六烷、十四烷、十二烷、正己烷、正庚醇、正辛醇和正己醇体系中该脂肪酶的半衰期均延长到 10 d 以上。在其他 5 种疏水性有机溶剂中的半衰期也高于无溶剂体系样品的半衰期。

表 1 疏水性有机溶剂对脂肪酶稳定性的影响

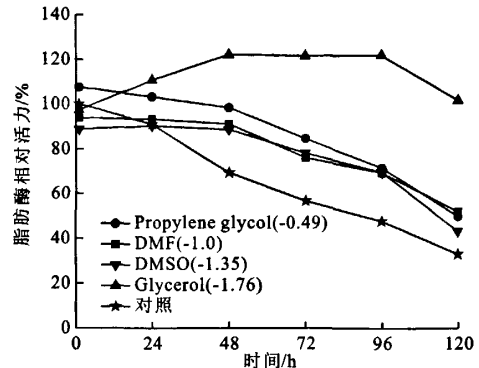
Tab. 1 Effect of hydrophobic organic solvents on the stability of lipase

疏水性有机溶剂	Lg $P_{O/W}$	半衰期/d
对照	—	2
n-Hexadecane	8.8	>10
n-Tetradecane	7.6	10
n-Dodecane	6.6	>10
n-Decane	5.6	4
n-Nonane	5.1	4
n-Octane	4.5	7
n-Heptane	4	6
n-Hexane	3.5	10
n-Octanol	2.9	>10
Heptitol	2.4	>10
Hexanol	1.8	>10
Pentanol	1.3	5

注:有机溶剂终体积分数为 25%,30 ℃,150 r/min 条件下振荡。

2.3.5 亲水性有机溶剂对 LX1 脂肪酶稳定性的影响 图 7 表明,在体积分数 25% 的 4 种亲水性有机溶剂体系中,LX1 脂肪酶的稳定性比在水相中有所

增强。水相对照样品中,该脂肪酶的半衰期为 4 d (酶液中加入 1/4 体积的缓冲液,蛋白质浓度降低,稳定性有所提高),在丙二醇、DMF(二甲基甲酰胺)和 DMSO 体系中半衰期约为 5 d,LX1 脂肪酶在丙三醇体系中显示了很好的稳定性,可能与丙三醇对生物大分子的保护功能有关。



注:有机溶剂终体积分数为 25%,30 ℃保温。

图7 亲水性有机溶剂对脂肪酶稳定性的影响

Fig. 7 Effect of hydrophilic organic solvents on the stability of lipase

亲水性有机溶剂易于夺取酶分子表面的“必需水”,所以多数自然酶类在亲水性有机溶剂中不稳定^[14]。*P. aeruginosa* LST-03^[12] 来源的脂肪酶在多种有机溶剂中的稳定性显著提高,但活力并没有提高。而来源于 *Pseudomonas* sp. S5^[13] 和 *B. sphaericus* 205y^[15] 的脂肪酶,在疏水性有机溶剂中的稳定性和活性都得到了提高,但是在亲水性有机溶剂中活力却显著降低。*Pseudomonas* sp. AG-8^[4] 脂肪酶在亲水性有机溶剂中的活力有所提高,但其在疏水性有机溶剂中的情况未见报道。研究中筛选的 *Pseudomonas aeruginosa* LX1 脂肪酶在部分亲水性和疏水性有机溶剂中的酶活力和稳定性都有所增强,表明 LX1 脂肪酶在疏水性有机溶剂-水的双相体系和亲水性有机溶剂-水的均相体系的生物催化中具有较好的应用前景。

3 结 语

1) 以体积分数 10% 甲苯等有机溶剂为筛选压力,从油污土样和污水等样品中筛选到一株耐有机溶剂产脂肪酶菌株 LX1,根据 16 S rDNA 序列分析,该菌株被鉴定为 *Pseudomonas aeruginosa*,命名为 *Pseudomonas aeruginosa* LX1,所产脂肪酶活力高达 29.5 U/mL,显著高于已报道的耐有机溶剂 *Pseudomonas* 属菌株所产耐有机溶剂脂肪酶的活力。

2) LX1 脂肪酶的酶学性质研究表明:该脂肪酶最适反应 pH 和温度分别为 pH 7.0 和 40°C, 在较宽的 pH 范围内(6.5~10.5)具有较高稳定性。金属离子整合剂 EDTA 和 Ba²⁺, Ca²⁺ 等离子对 LX1 脂肪酶活力有明显的激活作用, 推测该脂肪酶为金属激活酶。

3) LX1 脂肪酶在体积分数 25% 的各种有机溶

剂体系中均具有较好的耐受性。其原酶液的半衰期仅为 2 d 左右, 但在十六烷、十四烷、十二烷、正己烷、正庚醇、正辛醇和正己醇体系中半衰期均显著延长到 10 d 以上。在亲水性有机溶剂丙二醇、DMF 和 DMSO 体系中半衰期也能延长到 5 d 左右, 展现了 LX1 脂肪酶在各种有机相体系中高效生物催化的潜力。

参考文献(References):

- [1] Hun C J, Rahman R N Z A, Salleh A B, et al. A newly isolated organic solvent-tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase[J]. *Biochem Eng J*, 2003, 15: 147-151.
- [2] Ogino H, Miyamoto K, Ishikawa H. Organic solvent-tolerant bacterium which secretes an organic solvent-stable lipolytic enzyme[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 3884-3885.
- [3] Baharum S N, Salleh A B, Razak C N A, et al. Organic solvent-tolerant lipase by *Pseudomonas* sp. strain S5: stability of enzyme in organic solvent and physical factors affecting its production[J]. *Annals of Microbiology*, 2003, 53:75-83.
- [4] Sharma A K, Tiwari R P, Hoondal G S. Properties of a thermo-stable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8[J]. *J Basic Microbiol*, 2001, 41: 363-366.
- [5] Mohamed A E, Raja Noor Zaliha Raja A R, Abu Bakar S, et al. An organic solvent-stable lipase from *Bacillus* sp. strain 42[J]. *Annals of Microbiology*, 2005, 55 (3): 187-192.
- [6] 袁红玲, 汤鲁宏, 许正宏, 等. 产有机相催化酯合成活性的脂肪酶菌株的筛选[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(1): 19-23.
- YUAN Hong-ling, TANG Lu-hong, XU Zheng-hong, et al. Screening of lipase-producing strain for catalytic synthesis of ester in organic media[J]. *Microbiology*, 2007, 34(1): 19-23. (in Chinese)
- [7] ZHAO Li-li, XU Jian-he, ZHAO Jian, et al. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43: 626-633.
- [8] Robin S. Microlog System Release 4. 2 User guide[M]. [S. I.]: Hayward CA, 2004.
- [9] 谢家仪, 王永力. BIOLOG 细菌自动鉴定系统的应用与研究[J]. *微生物学通报*, 1996, 23 (5): 264-267.
- XIE Jia-yi, WANG Yong-li. Application and study of the biolog automated bacterial identification system[J]. *Microbiology*, 1996, 23 (5): 264-267. (in Chinese).
- [10] Tang L, Xia L. Purification and partial characterization of a lipase from *Bacillus coagulans* ZJU318[J]. *Appl Biochem Biotech*, 2005, 125: 139-146.
- [11] Yamada K, Ota Y, Machida H. A modified method for lipase activity assay with emulsified olive oil as substrate[J]. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1962, 36:860.
- [12] Ogino H, Nakagawa S, Shinya K, et al. Purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03[J]. *J Biosci Bioeng*, 2000, 89: 451-457.
- [13] Raja Noor Zaliha R A R, Syarul Nataqain B, Mahiran B, et al. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 341: 267-274.
- [14] Stamatis H, Xenakis A, Kolisis F N. Bioorganic reactions in microemulsions; the case of lipases [J]. *Biotechnol Adv*, 1999, 17: 293-318.
- [15] Moohamad Ropaning S, Raja Noor Zaliha Raja A R, Abu Bakar S, et al. A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene[J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, 49: 190-195.

(责任编辑:秦和平)