

一株产耐有机溶剂脂肪酶伯克霍尔德氏菌的分子鉴定及酶学性质分析

柏晓辉^{1,2}, 樊燕^{1,2}, 周娟³, 徐庆辉³, 邵杨¹, 张鑫¹, 洪光明⁴, 郑志⁵

(1. 黄山学院生命与环境科学学院, 安徽黄山 245041; 2. 河南科技学院生命科技学院, 河南新乡 453003; 3. 黄山市产品质量检验研究院, 安徽黄山 245000; 4. 黄山佳龙绿色食品有限公司, 安徽黄山 245421; 5. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥 230601)

摘要:为筛选具有潜在应用价值的产脂肪酶菌株, 采用三丁酸甘油酯固体培养基从黄山松树林土壤中筛选产脂肪酶菌株, 利用 16S rDNA 测序对筛选的菌株进行鉴定, 并对其产脂肪酶酶活力参数以及酶学性质进行分析。结果表明: 筛选的产脂肪酶菌株 HSU-7 为伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia* sp. HSU-7); 菌株 HSU-7 所产脂肪酶的最适反应温度为 45℃, 最适 pH 为 5, 为一种耐酸性的中温脂肪酶; 菌株 HSU-7 发酵 5 d, 所产脂肪酶酶活力最大, 为 72.22 U/mL。同时, K⁺、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 对菌株 HSU-7 所产脂肪酶酶活力具有显著的促进作用, 而 Ni²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺ 和 Zn²⁺ 具有一定的抑制作用, 该脂肪酶可耐受有机溶剂甲醇、乙醇、异丙醇和二甲基亚砜, 但 Triton X-100 可显著抑制其酶活力; 此外, 该脂肪酶能耐受 65℃ 的高温。综上, 菌株 HSU-7 可高产脂肪酶, 且该脂肪酶有较强的热稳定性, 可耐受多种有机溶剂, 具有很好的工业应用价值。

关键词: 菌株; 脂肪酶; 分子鉴定; 酶活力; 耐热性; 耐有机溶剂; 耐酸性

中图分类号: TQ925+.6; Q939.11+2 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)08-0090-06

Molecular identification and enzymatic properties of an organic solvent tolerant lipase – producing *Burkholderia* sp. strain

BAI Xiaohui^{1,2}, FAN Yan^{1,2}, ZHOU Juan³, XU Qinghui³, SHAO Yang¹, ZHANG Xin¹, HONG Guangming⁴, ZHENG Zhi⁵

(1. College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan 245041, Anhui, China; 2. School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China; 3. Huangshan Institute of Product Quality Inspection, Huangshan 245000, Anhui, China; 4. Huangshan Jialong Green Food Co., Ltd., Huangshan 245421, Anhui, China; 5. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: In order to screen the lipase – producing strain with potential applications, the solid medium containing tributyrin was used to screen the lipase – producing strain from the soil of pine forest in Huangshan. Then the lipase – producing strain were identified by 16S rDNA sequencing and the

enzymatic activity parameters and properties of the lipase produced were determined. The results showed that the lipase – producing strain HSU-7 selected was identified as *Burkholderia* sp.. The optimum reaction temperature and pH for the lipase produced by the strain HSU-7 were 45℃ and 5, respectively, revealing that it was an acid – resistant and medium – temperature lipase. The enzymatic activity of lipase produced by strain

收稿日期: 2023-01-11; 修回日期: 2023-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31900122); 家蚕基因组生物学国家重点实验室开放课题(SKLSGB-ORP202106); 安徽省自然科学基金项目(1908085QC124); 安徽省优秀拔尖人才项目(gxgwf2020060); 大学生创新创业训练项目(201910375013, S202110375034, 202210375095)

作者简介: 柏晓辉(1985), 男, 副教授, 主要从事病原微生物耐药机制、特境微生物的筛选鉴定与代谢产物的生物活性研究(E-mail) bxh@hsu.edu.cn.

HSU-7 was the highest at 72.22 U/mL after 5 d of fermentation. Meanwhile, K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} significantly promoted the enzymatic activity of the lipase produced by strain HSU-7, while Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , and Zn^{2+} had some inhibition effects on the enzymatic activity. The lipase could tolerate the organic solvents methanol, ethanol, isopropanol and dimethyl sulfoxide, but Triton X-100 significantly inhibited the activity of the lipase. In addition, the lipase could tolerate 65 °C. In summary, the strain HSU-7 can produce lipase with high yield, and the lipase has strong thermal stability and can tolerate a variety of organic solvents, so the strain has good industrial application value.

Key words: strain; lipase; molecular identification; enzymatic activity; heat-resistance; resistance to organic solvents; acid-resistance

随着社会的不断发展与进步,能源危机已成为当今社会发展不容忽视的重要问题。目前可供人类使用的能源有煤炭、天然气、石油、太阳能和风能等,但仍以化石能源为主^[1]。化石能源为不可再生能源^[2],其大量使用造成大气中CO₂浓度不断增高,并导致全球变暖,而CO₂温室效应是当前人类面临的重要环境问题^[3]。因此,开发高效、可再生的新型清洁能源迫在眉睫。

生物柴油是由动植物油脂或废弃油脂与醇(如甲醇或乙醇)反应制得的脂肪酸单烷基酯,其中典型的为脂肪酸甲酯。生物柴油具有燃料性能好、可再生和环保等优势,是当前大力发展的一种新型清洁能源^[4-6]。目前,生产生物柴油的方法主要有物理法、化学法和生物法^[7-8]。物理法主要是按一定比例将柴油、原料油脂和添加剂等混合制成生物柴油,该方法制备的生物柴油流动性差,会导致发动机活塞环粘连而不宜长时间使用^[8]。化学法是工业生产中应用较多的方法,但该方法存在工艺复杂、产品不易回收且能耗较高等问题^[8]。生物法主要采用生物酶催化合成生物柴油,该方法具有醇消耗量少、无污染排放且产品易回收等优点^[8]。因此,生物法制备生物柴油已成为能源领域研究的热点之一,具有广阔的市场前景。

脂肪酶,即三酰基甘油酯基水解酶,隶属于羧基酯水解酶,可催化甘油三酯分解为甘油二酯、甘油单酯、甘油和脂肪酸等^[9],也是生物法制备生物柴油工业中使用较多的酶类^[10],具有重要的应用价值。此外,脂肪酶还可应用于食品、洗涤剂、制革、医药品和污水处理等行业,是用途最广泛的酶制剂之一^[11],脂肪酶已成为酶工程研究领域的热点和重点。目前脂肪酶的工业化生产主要依赖微生物发酵^[12],如目前已发现有65个种属的微生物可产生脂肪酶^[13]。我国于20世纪60年代开展脂肪酶研究与开发,但到目前为止,只有解脂假丝酵母

(*Candida lipolytica*)和扩展青霉(*Penicillium expansum*)2种菌所产生的脂肪酶实现工业化生产,与国外尚有一定的差距^[14-15]。因此,急需筛选和开发脂肪酶活力高、产量高、应用成本低的新型脂肪酶菌种资源。为此,本文以黄山松树林中的土壤为材料,采用三丁酸甘油酯平板筛选、纯化出一株产耐有机溶剂脂肪酶菌株HSU-7,经16S rDNA序列鉴定后,对其脂肪酶的酶学性质进行研究,以期生物柴油工业提供产脂肪酶菌种资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验样品

本实验所用土壤采自黄山学院黄山松树林中,刮去表层1~2 cm处土壤后,采集土样装入无菌铝盒中带回实验室备用。

1.1.2 实验试剂

对硝基苯酚棕榈酸酯、对硝基苯酚和三丁酸甘油酯,上海阿拉丁试剂有限公司; $(NH_4)_2SO_4$ 、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KCl 、 $Fe_2(SO_4)_3$ 、 $ZnCl_2$ 、 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 $CuCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、蔗糖、甲醇、乙醇、异丙醇、聚乙烯醇、二甲基亚砜(DMSO),上海国药集团化学试剂有限公司; 橄榄油、盐酸、蛋白胨、琼脂、Triton X-100,上海生工生物工程有限公司; 氨基丁三醇, Solarbio公司。

1.1.3 培养基

富集培养基: 酵母浸膏 2 g、 $(NH_4)_2SO_4$ 2 g、 $NaCl$ 1.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、 K_2HPO_4 5 g、橄榄油乳化液(橄榄油与质量分数2 g/100 mL的聚乙烯醇溶液按体积比1:3混匀、乳化20~25 min制得) 12 mL、水 1 000 mL。

三丁酸甘油酯培养基^[16]: $NaCl$ 10 g、酵母粉 5 g、蛋白胨 10 g、三丁酸甘油酯 2 mL、琼脂 15 g,定容至 1 000 mL。

发酵培养基: $(NH_4)_2SO_4$ 1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g、

K_2HPO_4 1 g、蔗糖 5 g、橄榄油 5 mL、蛋白胨 30 g、水 1 000 mL、自然 pH。

1.1.4 实验仪器

超净工作台、恒温培养箱,上海智城分析仪器公司;高压蒸汽灭菌锅,重庆雅马拓科技有限公司;高速冷冻离心机,美国贝克曼库尔特公司;振荡培养箱,上海旻泉仪器有限公司;三孔恒温电热水槽,匡贝实业(上海)有限公司;紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;电子天平,上海恒平科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理

称取 5 g 采集的土样溶于 45 mL 无菌水中,用无菌玻璃棒充分搅拌均匀,静置 1 h 后,吸取 10 mL 溶液保存于 15 mL 无菌试管中作原始菌种。

1.2.2 产脂肪酶菌株分离、纯化与鉴定

参考赵兴秀等^[17]的方法,取 5 mL 原始菌种于 100 mL 富集培养基中,在 37 °C 恒温振荡培养 72 h。取富集培养液梯度稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 6 个浓度后,分别取 100 μ L 涂布于三丁酸甘油酯培养基平板上,在 37 °C 恒温静置培养 2 ~ 3 d,观察三丁酸甘油酯平板菌落周围是否出现透明水解圈;若出现透明水解圈,则该菌株可产脂肪酶。分别测量菌落直径(d)和水解圈直径(D),比较菌株所产脂肪酶的酶活力大小;同时,对可产脂肪酶的菌株进行多次纯化(划线于三丁酸甘油酯培养基平板进行纯化),直至纯化出的菌落均为纯种(多次纯化菌落特征一致,即认为纯种)。选取 D/d 大的菌株观察其菌落特征,并参考柏晓辉^[18]、王蕾^[19]等报道的方法鉴定菌株的种类,同时将筛选的菌株保存在 -80 °C 冰箱中。

1.2.3 脂肪酶粗酶液的制备

从 -80 °C 冰箱中取出保存的筛选菌株,划线于三丁酸甘油酯培养基平板上复苏。取活化的单克隆菌落于发酵培养基中,在 28 °C 恒温振荡发酵一定时间,取发酵液于 4 °C、12 000 r/min 下离心 10 min,得上清液即为脂肪酶粗酶液。

1.2.4 脂肪酶酶活力的测定

采用对硝基苯酚法^[20]测定酶活力。酶活力定义为在一定条件下每毫升粗酶液每分钟分解对硝基苯酚棕榈酸酯产生 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量。

1.2.4.1 标准曲线绘制

准确配制 1 mmol/L 的对硝基苯酚标准溶液,分别取 0、100、150、200、250、300、350、400、500 μ L 于不同的试管中,分别加入 0.25 mL 异丙醇、2.49 mL

蒸馏水,并用 pH 8.0 Tris - HCl 缓冲液补足至 5 mL,混匀,室温下反应 20 min 后沸水浴处理 10 min,室温冷却后用容量瓶定容至 5 mL,测定其在 410 nm 波长下的吸光值,重复测定 3 次,以对硝基苯酚浓度(X)为横坐标,吸光值(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程: $Y=0.0155X+0.0123$ ($R^2=0.9999$)。

1.2.4.2 酶活力测定

称取 3 mg 对硝基苯酚棕榈酸酯于烧杯中,加入 10 mL 异丙醇搅拌至完全溶解即得底物溶液,于棕色瓶中 4 °C 保存备用。取干净试管,加入 2.25 mL 一定 pH 的 Tris - HCl 缓冲液和 0.25 mL 上述底物溶液,混匀,在一定温度下反应 20 min,再加入 0.01 mL 脂肪酶粗酶液,混匀,置于一定温度的水浴锅中恒温反应 15 min 后,沸水浴处理 10 min 终止反应,冷却至室温后定容至 5 mL,并于 410 nm 波长下测定溶液的吸光值(实验组的吸光值),重复 3 次。同时,以煮沸失活的脂肪酶粗酶液作为对照,按上述方法测定对照组溶液的吸光值,再根据标准曲线回归方程、实验组与对照组的吸光值的差值和酶活力定义计算酶活力。

1.2.5 脂肪酶的稳定性研究

1.2.5.1 金属离子的影响

配制浓度为 1 mmol/L 的 KCl、MnCl₂、ZnCl₂、CaCl₂ 和 CuCl₂ 等金属离子溶液,参考余新松等^[21]的方法向反应液(1.2.4.2 中加入脂肪酶粗酶液前的体系)中加入上述金属离子处理,再按照 1.2.4 的方法测定酶活力,以添加与不添加外源金属离子的脂肪酶酶活力的比值计算添加外源金属离子的相对酶活力。

1.2.5.2 有机溶剂的影响

配制体积分数为 1%、15% 和 30% 的甲醇、乙醇、Triton X-100、二甲基亚砜(DMSO)和异丙醇溶液,参考余新松等^[21]的方法向反应液中加入上述有机溶剂处理,再按照 1.2.4 方法测定酶活力。以添加与不添加有机溶剂时脂肪酶酶活力的比值计算添加有机溶剂时的相对酶活力。

1.2.5.3 温度的影响

将脂肪酶粗酶液置于 35、45、55、65、75 °C 下分别处理 1 h 和 2 h,再按照 1.2.4 方法测定酶活力,以 0 °C 时的酶活力为 100%,计算其他温度下的相对酶活力。

2 结果与分析

2.1 产脂肪酶菌株的筛选与鉴定

按 1.2.1 和 1.2.2 方法从黄山松树林土壤中筛选到一株产脂肪酶菌株 HSU-7。经观察,菌株

HSU-7 在三丁酸甘油酯平板上形成白色菌落,菌落呈不规则的圆形、较为干燥,菌落周围有明显的透明水解圈,其菌落直径(d)为 10.0 mm,水解圈直径(D)为 36.0 mm。测序获得菌株 HSU-7 16S rDNA 序列,构建系统进化树,见图 1。

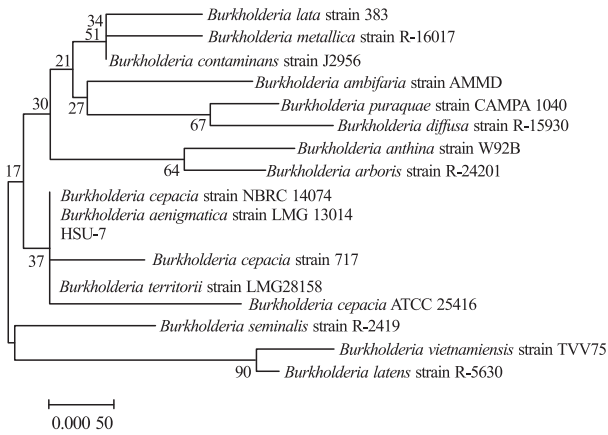


图 1 基于 16S rDNA 序列对比构建 HSU-7 系统进化树

由图 1 可知,筛选的菌株 HSU-7 与 *Burkholderia cepacia* strain NBRC 14074 等伯克霍尔德氏菌属位于同一分支。因此,由形态学及分子生物学方法鉴定菌株 HSU-7 为伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia* sp. HSU-7)。

2.2 菌株 HSU-7 所产脂肪酶的最适反应条件

按 1.2.3 方法发酵 2 d 制得脂肪酶粗酶液,再按 1.2.4 方法测定其酶活力,以确定该脂肪酶的最适反应条件。

2.2.1 最适反应温度的确定

按 1.2.4 方法,在 pH 8.0 时,考察反应温度对脂肪酶酶活力的影响,结果见图 2。

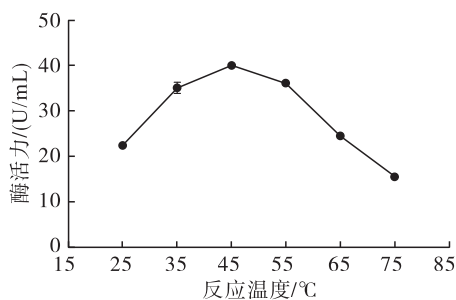


图 2 反应温度对脂肪酶酶活力的影响

由图 2 可知,当反应温度在 25~45℃ 时,脂肪酶的酶活力随反应温度的升高而增加,在反应温度为 45℃ 时,酶活力达最大值,为 42.55 U/mL,继续升高反应温度,酶活力降低。因此,45℃ 为该脂肪酶的最适反应温度。微生物来源脂肪酶依据最适反应温度可分为低温、中温和高温三类^[22],本研究筛选到的菌株 HSU-7 所产脂肪酶属于中温脂肪酶。

2.2.2 最适反应 pH 的确定

按 1.2.4 方法,在反应温度 45℃ 时,考察 pH 对脂肪酶酶活力的影响,结果见图 3。

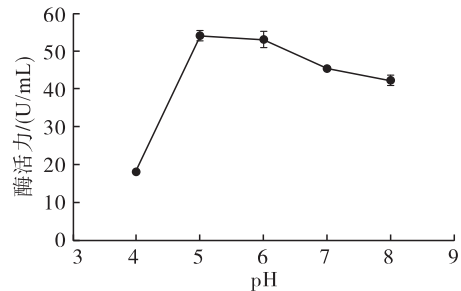


图 3 pH 对脂肪酶酶活力的影响

由图 3 可知,随 pH 的升高,脂肪酶的酶活力呈先增后降趋势,在 pH 5 时酶活力最大,为 54.48 U/mL。因此,该脂肪酶的最适反应 pH 为 5。细菌来源的脂肪酶最适反应 pH 一般为 8~10,属于碱性脂肪酶^[22];而本研究筛选的菌株 HSU-7 所产脂肪酶最适反应 pH 为 5,为酸性脂肪酶,且在 pH 5~7 范围内活性较为稳定。

综上,该脂肪酶的最适反应 pH 为 5,最适反应温度为 45℃,后续研究均在此条件下测定酶活力。

2.3 发酵时间对脂肪酶酶活力影响

按 1.2.3 方法发酵不同时间制得脂肪酶粗酶液,测定其酶活力,结果见图 4。

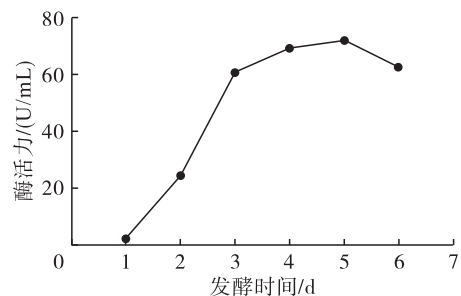


图 4 发酵时间对脂肪酶酶活力的影响

由图 4 可知,随发酵时间的延长,脂肪酶的酶活力呈先增后降的趋势,并在发酵 5 d 时酶活力达到最大值,为 72.22 U/mL。因此,发酵 5 d 为该脂肪酶的最佳发酵时间。

本研究筛选并纯化的菌株 HSU-7 的初始酶活力 (72.22 U/mL) 已远高于已报道的大部分野生型菌株,如 Dandavate 等^[23]筛选的菌株 *Burkholderia multivorans* V2 酶活力仅为 6.48 U/mL, Uttatree 等^[24]筛选的菌株 *Acinetobacter baylyi* 酶活力为 4.41 U/mL,夏宇等^[25]筛选的白地霉初始酶活力也仅为 10.79 U/mL,但与马抒哈等^[22]报道的菌株 WZ10-3 初始酶活力 78.68 U/mL 相似,属于高产脂肪酶。以上结果说明,菌株 HSU-7 具有较大的开发价值,值得深入研究。

2.4 菌株 HSU-7 所产脂肪酶的稳定性

按 1.2.3 在发酵 5 d 时制备脂肪酶粗酶液,按 1.2.5 方法考察其对金属离子、有机溶剂和高温的耐受性。

2.4.1 金属离子对脂肪酶活力的影响

按 1.2.5.1 方法,考察金属离子对脂肪酶活力的影响,结果见图 5。

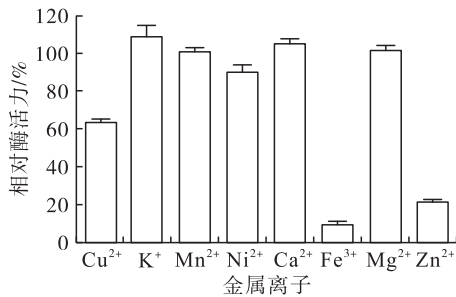
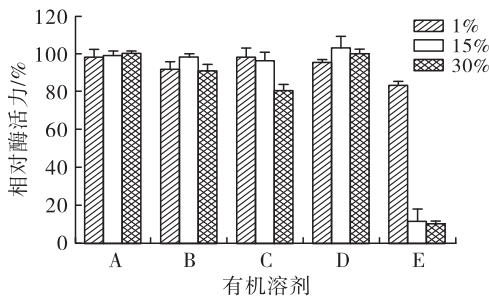


图 5 金属离子对脂肪酶活力的影响

由图 5 可知, K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 对脂肪酶活力有明显的促进作用,而 Cu²⁺、Ni²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺ 对脂肪酶活力有不同程度的抑制作用,其中 Fe³⁺ 和 Zn²⁺ 的抑制作用最显著。

2.4.2 有机溶剂对脂肪酶活力的影响

按 1.2.5.2 方法,考察有机溶剂对脂肪酶活力的影响,结果见图 6。



注: A. 甲醇; B. 乙醇; C. 异丙醇; D. DMSO; E. Triton X-100

图 6 不同体积分数的有机溶剂对脂肪酶活力的影响

由图 6 可知:不同体积分数的甲醇和 DMSO 对脂肪酶活力影响不大,而乙醇和异丙醇会使脂肪酶的酶活力略微降低,但相对酶活力仍维持在 80% 以上,说明该脂肪酶对甲醇、乙醇、异丙醇和 DMSO 有一定的耐受能力;当 Triton X-100 体积分数为 1% 时,脂肪酶的相对酶活力大于 80%,而 Triton X-100 体积分数为 15% 和 30% 时,该脂肪酶的相对酶活力明显降低,说明该脂肪酶对 Triton X-100 耐受能力较差。

2.4.3 温度对脂肪酶活力的影响

按 1.2.5.3 方法考察温度对脂肪酶活力的影响,结果如图 7 所示。

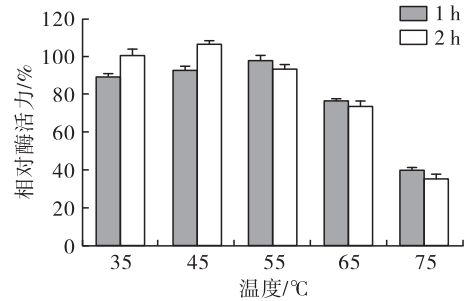


图 7 温度对脂肪酶活力的影响

由图 7 可知:在 35、45、55 °C 处理 1 h 和 2 h 时,脂肪酶的相对酶活力波动较小,说明该脂肪酶对以上温度具有耐受性;当温度为 65 °C 时,脂肪酶的相对酶活力仍可保持在 75% 左右,说明该脂肪酶对 65 °C 也具有耐受性;当温度为 75 °C 时,脂肪酶的酶活力大幅降低,相对酶活力只有 30% 左右,说明该脂肪酶对 75 °C 耐受性较差。本研究发现菌株 HSU-7 所产脂肪酶在 65 °C 处理 2 h 后仍能维持 75% 以上酶活力,而张传丽^[26]、桑鹏^[27]等筛选出的约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)所产脂肪酶在 60 °C 下处理 2 h 后,酶活力降至 60% 左右,以上数据表明菌株 HSU-7 所产脂肪酶具有较好的耐热性。

综上所述,菌株 HSU-7 所产脂肪酶是一种酸性脂肪酶,有较强的热稳定性,能耐受多种有机溶剂,且多种金属离子对 HSU-7 所产脂肪酶活力具有促进作用,表明菌株 HSU-7 所产脂肪酶具有很好的工业应用价值,值得进一步开发与利用。

3 结论

本研究采用三丁酸甘油酯平板从黄山松树林土壤中筛选出一株产耐有机溶剂脂肪酶菌株 HSU-7,经分子鉴定为伯克霍尔德氏菌;该菌株所产脂肪酶最适反应温度为 45 °C,最适 pH 为 5,最佳发酵时间为 5 d;在最佳条件下,该发酵液脂肪酶初始酶活力可达 72.22 U/mL。同时,该脂肪酶对温度、pH、金属离子和有机溶剂都具有不同程度的耐受性,在工业生产中具有较好的研究和开发价值。

参考文献:

- [1] 邹才能, 赵群, 张国生, 等. 能源革命: 从化石能源到新能源[J]. 天然气工业, 2016, 36(1): 1-10.
- [2] 周凌云. 世界能源危机与我国的能源安全[J]. 中国能源, 2001(1): 12-13.
- [3] 何建坤, 张希良, 李政, 等. CO₂ 减排情景下中国能源发展若干问题[J]. 科技导报, 2008(2): 90-92.
- [4] 尚业雄. 浅谈生物柴油的发展现状[J]. 中国石油和化工标准与质量, 2018, 38(23): 121-122, 124.
- [5] 朱长辉, 朱文超, 罗嘉, 等. 微波强化酯交换反应制备生物柴油研究进展[J]. 化工进展, 2022, 41(10):

- 5145 - 5154.
- [6] KNOTHE G, RAZON L F. Biodiesel fuels[J]. Prog Energy Combust, 2017, 58: 36 - 59.
- [7] MARCHETTI J M, MIGUEL V U, ERRAZU A F. Possible methods for biodiesel production [J]. Renew Sust Energ Rev, 2007, 11(6): 1300 - 1311.
- [8] 陈冠益, 夏晒歌, 李婉晴, 等. 面向碳中和的生物柴油制备及应用研究进展[J]. 太阳能学报, 2022, 43(9): 343 - 353.
- [9] 胡兴翠, 刘建华. 微生物脂肪酶特性及工业应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(8): 3572 - 3579.
- [10] TAN T W, LU J K, NIE K L, et al. Biodiesel production with immobilized lipase: a review [J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(5): 628 - 634.
- [11] 居乃琥. 酶工程研究和酶工程产业的新进展(II): 国内外酶制剂工业的现状、发展趋势和对策建议[J]. 食品与发酵工业, 2000(4): 38 - 43.
- [12] 赵书范, 李琪, 聂红梅, 等. 黑曲霉脂肪酶基因的克隆及其在黑曲霉中的同源表达[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(9): 14 - 19.
- [13] 汪小锋, 王俊, 杨江科, 等. 微生物发酵生产脂肪酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(4): 47 - 53.
- [14] 孙宏丹, 孟秀香, 贾莉, 等. 微生物脂肪酶及其相关研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2001(4): 292 - 295.
- [15] 韩生义, 赵淑琴, 刘晓丽, 等. 一株碱性脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2017, 52(1): 119 - 125.
- [16] 郭晓军, 郭威, 袁洪水, 等. 一株饲用产脂肪酶芽孢杆菌的筛选及其紫外诱变育种[J]. 中国饲料, 2015(12): 27 - 29.
- [17] 赵兴秀, 赵长青, 何义国, 等. 高产脂肪酶菌株的筛选及产酶条件研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 16 - 19, 76.
- [18] 柏晓辉, 刘孝莲, 刘娣, 等. 一株黄精内生菌的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 777 - 782.
- [19] 王蕾, 张培玉, 李江. 热泉菌 *Bacillus* sp. BI-3 产高温脂肪酶的发酵条件优化[J]. 中国油脂, 2017, 42(1): 104 - 108.
- [20] 王慧芳, 王雅琴, 刘春国. 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J]. 化学与生物工程, 2007(8): 72 - 75.
- [21] 余新松, 邵建扬, 孙春巧, 等. 一株产耐高温蛋白酶蜡样芽孢杆菌的分子鉴定和酶学性质研究[J]. 核农学报, 2020, 34(8): 1698 - 1704.
- [22] 马抒晗, 张玮佳, 吴茜, 等. 高产脂肪酶菌株的筛选鉴定及酶学、转酯特性[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(4): 602 - 608.
- [23] DANAVATE V, JINJALA J, KEHARIA H, et al. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis[J]. Bioresour Technol, 2009, 100(13): 3374 - 3381.
- [24] UTTATREE S, WINAYANUWATTIKUN P, CHAROE - NPANICH J. Isolation and characterization of a novel thermophilic - organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 162(5): 1362 - 1376.
- [25] 夏宇, 周文, 邓学良, 等. 脂肪酶高产菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(9): 116 - 120.
- [26] 张传丽, 孙会刚, 崔珏, 等. 高产脂肪酶菌株的筛选及其酶学性质分析[J]. 食品科技, 2019, 44(11): 30 - 35.
- [27] 桑鹏, 刘林波, 陈贵元, 等. 大理弥渡热泉耐热脂肪酶产生菌的筛选及其酶活性研究[J]. 中国饲料, 2020(3): 27 - 31.
- [47] TAN K H, CHAM H Y, AWALA H, et al. Effect of extra - framework cations of LTL nanozeolites to inhibit oil oxidation [J]. Nanoscale Res Lett, 2015, 10(1): 1 - 12.
- [48] MORENO K J, HERNÁNDEZ - SIERRA M T, BÁEZ J E, et al. On the tribological and oxidation study of xanthophylls as natural additives in castor oil for green lubrication [J/OL]. Materials, 2021, 14(18): 5431 [2022 - 04 - 01]. <https://doi.org/10.3390/ma14185431>.
- [49] KUMAR G, GARG H C, GIJAWARA A. Experimental investigation of tribological effect on vegetable oil with CuO nanoparticles and ZDDP additives [J]. Ind Lubr Tribol, 2019, 71(3): 499 - 508.

(上接第 60 页)