

Mutation Breeding of Thermostable Acid Lipase-Producing Strain A-16 and Optimizing of Its Lipase-Producing Condition

Kaiping Zhang, Yanli Liu, Bo Ma, Jiaoli Huang, Yuelou Pan, Qiufei Ouyang*

College of Agriculture and Food Engineering, Baise University, Baise Guangxi

Email: kaiping6@163.com, 244034502@qq.com

Received: Jun. 10th, 2015; accepted: Jun. 25th, 2015; published: Jun. 30th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

A strain A-16 producing thermostable acid lipase was isolated from the soil of the refinery. By using the lipase-producing strain A-16 as starting strain, a mutant strain UE-03 with high activity of lipase were obtained and selected by the compound mutation breeding of ultraviolet (UV) and ethyl methyl sulfonate (EMS), the activity of lipase produced by that strain reached 17695.6 U/mL, and it was about 73.6% higher than that of the starting strain; the genetic stability experiment showed that the mutant UE-03 had a better genetic stability after 5 times of subculture. The fermentation conditions of mutant strain UE-03 producing lipase were investigated, the optimum results of initial pH 4.0, temperature 45°C, tween-80 0.15% (w/v) were obtained by single-factor test. On this basis, by using response surface methodology to optimize the fermentation conditions, the suitable fermentation parameters were initial pH 4.28, culture temperature of 46.8°C, tween-80 0.15% (w/v), and the acid lipase activity was up to 19339.5 U/mL after optimizing. The study provided excellent strains and technology reference for the further development and utilization of the strain.

Keywords

Acid Lipase, Mutation Breeding, Genetic Stability, Fermentation Conditions, Response Surface Analysis

产耐高温酸性脂肪酶菌株A-16的诱变选育及其发酵条件优化

*通讯作者。

张开平, 刘燕丽, 马 博, 黄娇丽, 潘月楼, 欧阳秋飞*

百色学院, 农业与食品工程学院, 广西 百色

Email: kaiping6@163.com, 244034502@qq.com

收稿日期: 2015年6月10日; 录用日期: 2015年6月25日; 发布日期: 2015年6月30日

摘 要

从炼油厂附近土壤中筛选得到一株产耐高温酸性脂肪酶菌株A-16, 通过紫外线(UV)和甲基磺酸乙酯(EMS)的复合诱变选育, 获得1株产脂肪酶活力较高的突变株UE-03, 产脂肪酶活力为17695.6 U/mL, 比原始菌株提高了73.6%, 将UE-03连续传代培养5次, 产酶能力稳定。对突变株UE-03产酶条件进行了探讨, 通过单因素试验筛选出最适初始pH4.0, 温度为45℃, 吐温-80添加量为0.15% w/v; 在此基础上采用响应面分析法优化产酶条件, 得到适宜产酶条件为: pH 4.28, 温度46.8℃, 吐温-80添加量0.15% w/v, 经优化后菌株产酶活力达到19339.5 U/mL, 为该菌株进一步开发利用提供优良菌种和技术参考。

关键词

酸性脂肪酶, 诱变选育, 遗传稳定性, 发酵条件, 响应面分析

1. 引言

脂肪酶又称三酰基甘油水解酶(EC 3.1.1.3), 是一类能在油水界面或非水相系统中催化酯类物质发生水解、酯化、酯交换以及合成等化学反应的生物催化剂, 广泛存在于动植物和微生物中, 其中微生物脂肪酶是工业用脂肪酶的主要来源。脂肪酶被广泛应用于食品、医药、化妆品、饲料、生物柴油制备等领域, 但很多工业用脂肪酶在实际生产中由于耐热或耐酸性差而失活, 或酶作用的最适温度和 pH 值不在生产要求范围内而受限制。目前, 酸性脂肪酶在国内还没有工业化, 对酸性脂肪酶的需求依然依赖于进口[1]-[4]。因此, 获得一株性状优良、适合工业生产需求的高产脂肪酶菌株已成为脂肪酶应用研究开发的关键, 在加紧寻找野生型高产脂肪酶菌株之外, 诱变育种也是获得高产脂肪酶菌株的一种有效手段[5] [6]。

诱变育种是利用物理或化学诱变剂诱发微生物基因突变, 改变遗传结构与功能, 然后采用简单、快速和高效的筛选方法, 从中筛选出产量高、性状优良的突变株[7] [8]。本研究以产脂肪酶菌株 A-16 为出发菌株, 通过紫外线(UV)和甲基磺酸乙酯(EMS)的复合诱变选育, 获得产脂肪酶活力显著提高且传代稳定性良好的突变株, 并对其进行产酶条件优化, 为该菌株的工业化生产提供实验指导。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌种

以橄榄油为单一碳源, 通过溴甲酚紫平板初筛和三丁酸甘油酯琼脂平板鉴定法从含油土壤中分离并保存的野生型产耐高温酸性脂肪酶菌株 A-16, 作为出发菌株。

2.1.2. 试剂

橄榄油, 西班牙原装进口; 吐温-80, 英国进口; 甲基磺酸乙酯(EMS), SIGMA 公司; 聚乙烯醇(PVA-1750), 国药集团化学试剂有限公司; 溴甲酚紫, 硫代硫酸钠均为国产分析纯。

2.1.3. 主要仪器

Eppendorf 5417R 台式高速冷冻离心机, 德国产品; SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; DK-8D 型电热恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司; HZQ-F160 全温振荡器, 哈尔滨东联电子有限公司; 99-1 型大功率磁力搅拌器, 常州国华电器有限公司。

2.1.4. 培养基

斜面培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, K_2HPO_4 1.0, NaCl 1.0, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, 琼脂 15.0, 橄榄油 10.0 mL/L, pH 5.0。

溴甲酚紫平板筛选培养基[9]。

种子培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, K_2HPO_4 1.0, NaCl 1.0, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, 葡萄糖 15.0, 橄榄油 10.0 mL/L, pH 5.0。

发酵培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母膏 10.0, 蔗糖 10.0, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, K_2HPO_4 1.0, NaCl 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, 橄榄油 10.0 mL/L, pH 5.0。

2.2. 实验方法

2.2.1. 菌株活化

按照无菌操作的要求, 将低温冰箱(-80℃)保存的产耐高温酸性脂肪酶菌株 A-16 进行划线传代培养, 然后选取 Hc 值[10] (菌落水解圈直径与菌落直径之比)较大的菌落接种到种子培养基中, 于 45℃、180 r/min 摇床培养 24 h。

2.2.2. 菌悬液的制备

移取 1 mL 新鲜培养物于盛有 9 mL 无菌生理盐水(0.6%)的培养皿中, 加入无菌玻璃珠振荡 20 min。然后配制菌悬液, 并用血球计数板计数, 调整菌体浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL。

2.2.3. 紫外诱变

超净工作台内, 照射前开启紫外灯预热 20 min。取 10 mL 菌悬液于直径为 9 cm 的无菌培养皿中, 放入 2 cm 长无菌转子, 将培养皿置于磁力搅拌器上, 紫外灯功率为 30 W, 照射垂直距离为 20 cm, 分别照射 60、90、120、150、180、210、240s。照射结束后在红光照射下操作, 将紫外照射过的菌悬液和未经紫外照射的菌悬液分别进行梯度稀释($10^{-4} \sim 10^{-6}$), 移取各梯度稀释液 0.1 mL 涂布于平板筛选培养基, 每种稀释液涂 3 个平板, 用黑布包裹, 置于 45℃暗箱中培养 48 h, 观察菌落生长情况并计算不同 UV 照射条件下的致死率和正变率。

致死率(%) = (诱变前菌落数 - 诱变后菌落数) / 诱变前菌落数 × 100%

正变率(%) = Hc 值增大的菌落数 / 诱变后菌落总数[11]-[14]。

2.2.4. 甲基磺酸乙酯(EMS)诱变

选取经紫外线照射后酶活最高的突变株为出发菌株, 按 2.2.2 节方法制备菌悬液。取 5 mL 菌悬液, 加入 15 mL 磷酸缓冲液和不同体积的 EMS 溶液, 使 EMS 终浓度分别为: 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%。在 45℃、180 r/min 下分别振荡处理 10、15、20、25、30 min 后, 立即取 5 mL 处理液于无菌试管中, 加入 1 mL 25% 硫代硫酸钠溶液终止反应。对菌体进行稀释后, 涂布于平板筛选培养基上, 45℃培养 48 h, 并以没有经过 EMS 处理的菌液作对照。根据对照平板上的菌落数, 计算致死率和正变率[15] [16], 计算方法同上。

2.2.5. 突变菌株的筛选

初筛: 将诱变后长出的菌落以点种方式转接到平板初筛培养基上, 以出发菌株为对照, 计算各突变

株 Hc 值, 挑选高于同批对照菌株 Hc 值的突变株供复筛备用。

复筛: 挑取初筛得到的突变株接种于种子培养基中, 45℃、180 r/min 培养 24 h 后, 按 2% (V/V) 接种量接种到发酵培养基中, 45℃、180 r/min 条件下培养 48 h, 测酶活, 筛选出高产脂肪酶突变株。

2.2.6. 酶活力测定

按 GB/T 23535-2009 [17] 测定。酶活力单位定义为: 1 mL 液体酶, 在 40℃ 和 pH 7.5 条件下, 每分钟水解橄榄油产生 1 μmol 可滴定的脂肪酸, 即为 1 个酶活力单位(U), 以 U/mL 表示。

2.2.7. 突变株的遗传稳定性测定

将产脂肪酶最高的突变株连续 5 代传代培养, 将各子代突变株转接到发酵培养基中, 测其产脂肪酶能力的稳定性。

2.3. 产酶条件优化

以相对酶活为指标, 研究发酵条件初始 pH 值、温度以及吐温-80 添加量对菌株产酶的影响, 每个试验点做 3 个平行, 试验结果用平均值±标准偏差表示。在单因素试验的基础上, 以 pH 值(A)、温度(B)以及吐温-80 添加量(C)为变量, 相对酶活为响应值, 设计了 3 因素 3 水平共 17 个试验点的响应面分析试验 [9]。实验因素与水平见表 1。

3. 结果与分析

对产脂肪酶菌株 A-16 进行酶学性质研究, 结果发现: 该酶的最适温度为 50℃、pH 4.5, 并且在 70℃ 范围内热处理 1 h 后酶活力还保持在 78% 以上; 同时该酶在酸性环境中保温 1 h 后可保持 70% 以上的酶活力。因此, 说明该酶具有良好的热稳定性以及在酸性条件下稳定性较好。

3.1. 紫外诱变结果

菌株 A-16 经紫外诱变处理后, 致死率、正突变率与照射时间的关系见图 1。

由图 1 可知: 致死率随着紫外照射时间的延长而逐渐增大, 但正变率并不是随着照射时间的延长而增大的, 在照射时间 180 s 内, 正变率随着照射时间的延长而增大, 当超过 180 s 后, 正变率逐渐降低。因此, 选择照射时间为 180 s。将诱变处理后的菌悬液经平板初筛, 摇瓶复筛, 得到 12 株产酶活力高于原始出发菌株的突变菌株。通过对这 12 株正突变株的遗传稳定性测定, 结果见表 2, 由表 2 可知, 突变株 U-08 相对酶活

Table 1. Factors and the level of response surface experiment

表 1. 响应面试验因素与水平

因素	水平		
	-1	0	1
温度(°C)	35	45	55
pH 值	3.5	4.5	5.5
吐温-80 (w/v)	0.05%	0.1%	0.15%

Table 2. The results of UV mutagenesis strains

表 2. 紫外诱变菌株的筛选结果

突变株	U-01	U-02	U-03	U-04	U-05	U-06	U-07	U-08	U-09	U-10	U-11	U-12
相对酶活(%)	118.4	118.6	115.2	117.6	119.3	119.8	113.5	121.8	116.8	120.1	118.6	121.5

最高,较原始菌株提高了 21.8%,且酶活力为 12415.5 U/mL。以 U-08 突变株为出发菌株进行 EMS 诱变。

3.2. 甲基磺酸乙酯诱变结果

以菌株 U-08 为出发菌株,采用不同浓度的 EMS 处理不同时间,菌株致死率、正突变率随处理时间的变化见图 2。

由图 2 可以看出,菌株对甲基磺酸乙酯诱变极为敏感,致死率随着 EMS 浓度的增大及处理时间的延长而逐渐增加,当 EMS 终浓度在 2.5%、3% 时,处理 10 min 致死率达到 80%,处理 20 min 菌体几乎无存活。但正变率与 EMS 浓度以及处理时间并不满足线性关系,当 EMS 终浓度为 1%、1.5% 时,菌株的正变率都随着 EMS 处理时间的延长而增加;当 EMS 终浓度为 2% 时,菌株的正变率随着 EMS 作用时间的延长先上升后下降;当 EMS 终浓度为 2.5%、3% 时,菌株的正变率都随着 EMS 作用时间的延长而降低。综合 EMS 在不同诱变条件下对出发菌株的诱变效果,选择 EMS 终浓度为 2%,作用时间为 20 min,此时正突变率达到最大值。将诱变处理后的菌悬液经平板初筛,摇瓶复筛,得到 8 株 Hc 值高于出发菌株的突变菌株,对其遗传稳定性测定,结果见表 3,由表 3 可知,突变株 UE-03 相对酶活最高,较原始菌株提高了 73.6%,且酶活力为 17695.6 U/mL。

3.3. 突变株 UE-03 的遗传稳定性

将选育到的突变株 UE-03 在斜面培养基上连续 5 次传代培养,并转接到发酵培养基培养 48 h,观察各子代产脂肪酶能力的稳定性,结果见图 3。

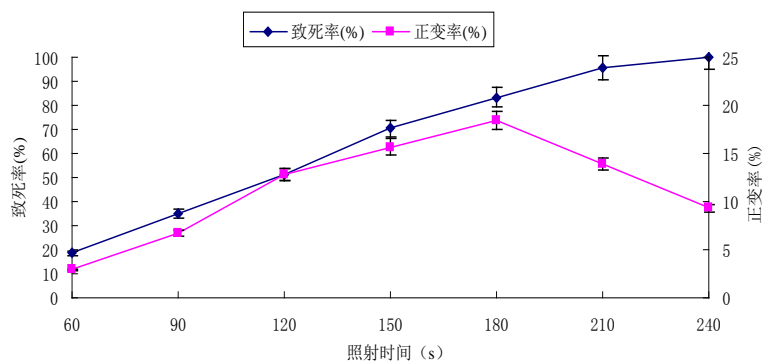


Figure 1. The effect of different mutation time on mutagenic rate and death ratio
图 1. 不同照射时间对正变率和致死率的影响

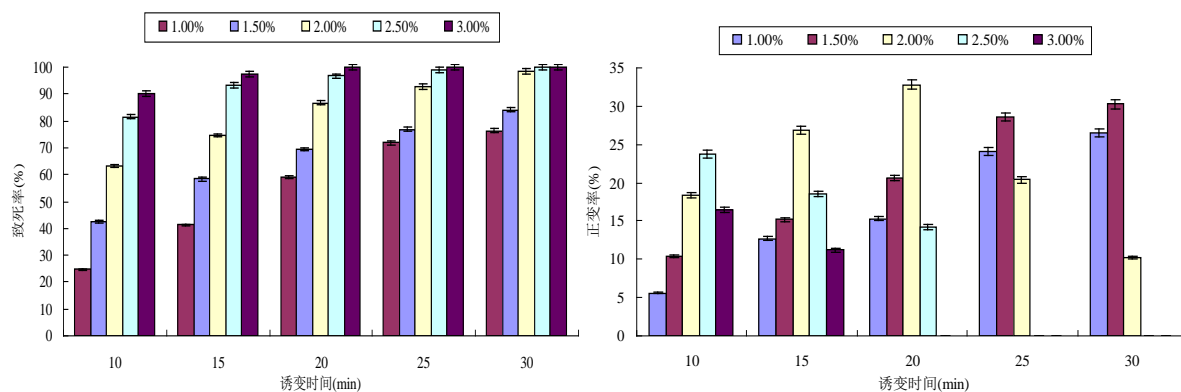


Figure 2. Mutagenic effects of different EMS concentrations
图 2. 不同 EMS 浓度的诱变效果

由图 3 可以看出 UE-03 突变株经过 5 次连续传代后, 产脂肪酶活力无显著差异, 说明其具有良好的遗传稳定性。

3.4. 不同初始 pH 值对菌株产酶的影响

不同的 pH 值对菌体的生长和发酵产酶影响较大, 将 UE-03 菌株在不同 pH 值(3.0~7.0, 间隔一个 pH 单位)、45℃、180 r/min 条件下培养 48 h 后, 离心, 取上清液测脂肪酶活力, 以初始 pH 4.0 时的发酵液酶活为基准, 计算相对酶活, 结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出, pH 值 4.0 时, 菌体产酶量达到最大。

3.5. 不同温度对产酶的影响

温度也是影响菌体生长和产脂肪酶的重要因素之一。将菌体分别置于不同温度下(30℃~60℃, 间隔 5℃)培养, 以发酵温度为 45℃时的发酵液酶活为基准, 计算相对酶活, 结果见图 5。由图 5 可知, 菌株在 45℃时, 相对酶活最高。

Table 3. The results of EMS mutagenesis strains

表 3. EMS 诱变菌株结果

突变株	UE-01	UE-02	UE-03	UE-04	UE-05	UE-06	UE-07	UE-08
相对酶活(%)	155.1	168.6	173.6	157.9	169.5	171.8	173.3	161.8

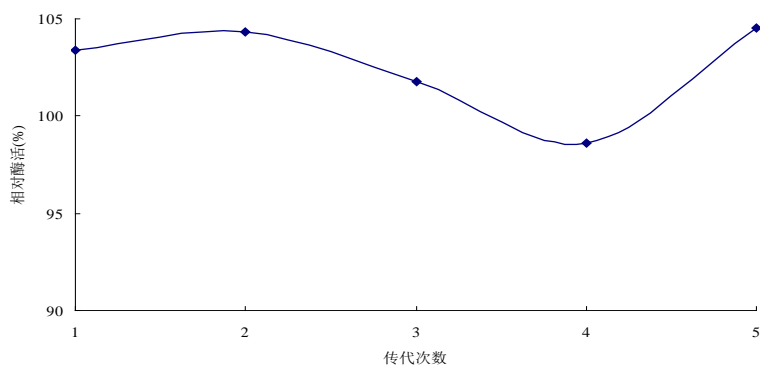


Figure 3. The stability of mutant No.UE-03

图 3. UE-03 的遗传稳定性

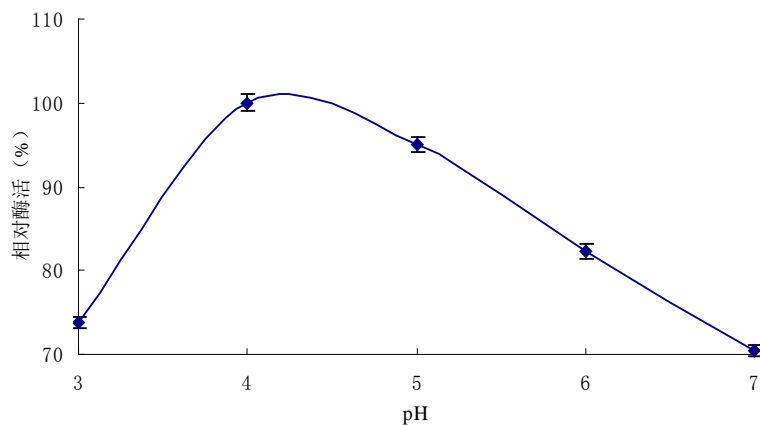


Figure 4. The effect of pH on the production of lipase from UE-03

图 4. pH 对 UE-03 产脂肪酶的影响

3.6. 表面活性剂吐温-80 添加量对菌株产酶的影响

由于表面活性剂具有增加细胞膜的通透性作用,因此在培养基中加入表面活性剂可以促进菌体产脂肪酶。在最佳温度、pH 条件下,研究不同吐温-80 添加量对菌体产酶的影响。以培养基未添加吐温-80 时的发酵液酶活为基准,计算相对酶活,结果如图 6。从图 6 可以看出,吐温-80 添加量在 0%~0.15% w/v 时,尽管相对酶活有所升高,但对菌体产酶影响不大。

3.7. 响应面法优化实验

根据单因素试验条件, pH 值(A)、温度(B)以及吐温-80 添加量(C)为变量对菌株产酶影响比较显著。因此,以 pH 值(A)、温度(B)以及吐温-80 添加量(C)为变量为变量,菌株相对酶活为响应值,用 Design Expert8.0 Trial 软件通过中心组合法寻求最优发酵工艺参数[18],实验设计及结果见表 4,方差分析见表 5,根据回归方程作出不同因子的响应面分析图见图 7。

试验数据使用 Design-Expert8.0 Trial 软件进行二次回归拟合后,得到以下回归方程: $Y = 105.88 + 2.28A - 2.75B + 2.18C - 2.35AB + 0.47AC - 0.13BC - 8.00A^2 - 7.34B^2 + 0.70C^2$, 式中: Y 为相对酶活; A 为温度; B 为初始 pH; C 为吐温-80 添加量。

运用 Design Expert8.0 Trial 软件进行回归分析,回归方程的方差分析见表 5,由表 5 可知,模型的 P 值<0.0001,说明模型显著。同时模型中自变量一次项 A, B, C, 二次项 AB, A^2 , B^2 显著($\alpha = 0.01$)。模

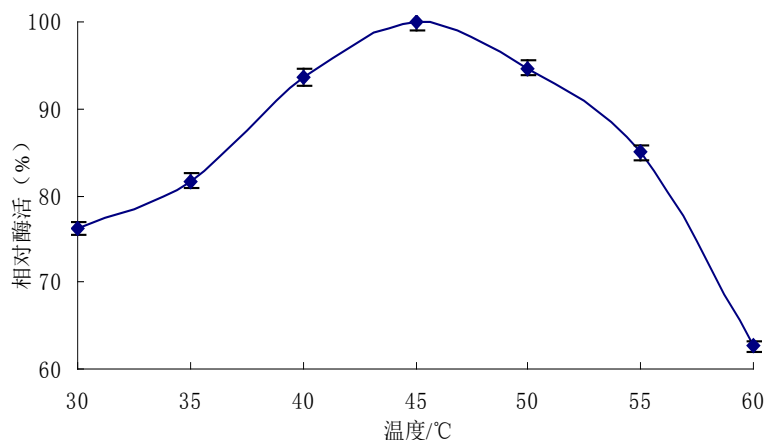


Figure 5. The effect of temperature on the production of lipase from UE-03
图 5. 温度对 UE-03 产脂肪酶的影响

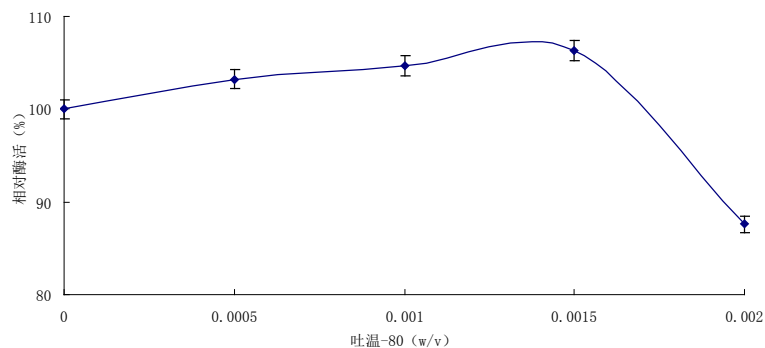


Figure 6. The effect of tween-80 concentration on the production of lipase from UE-03
图 6. 吐温-80 添加量对 UE-03 产脂肪酶的影响

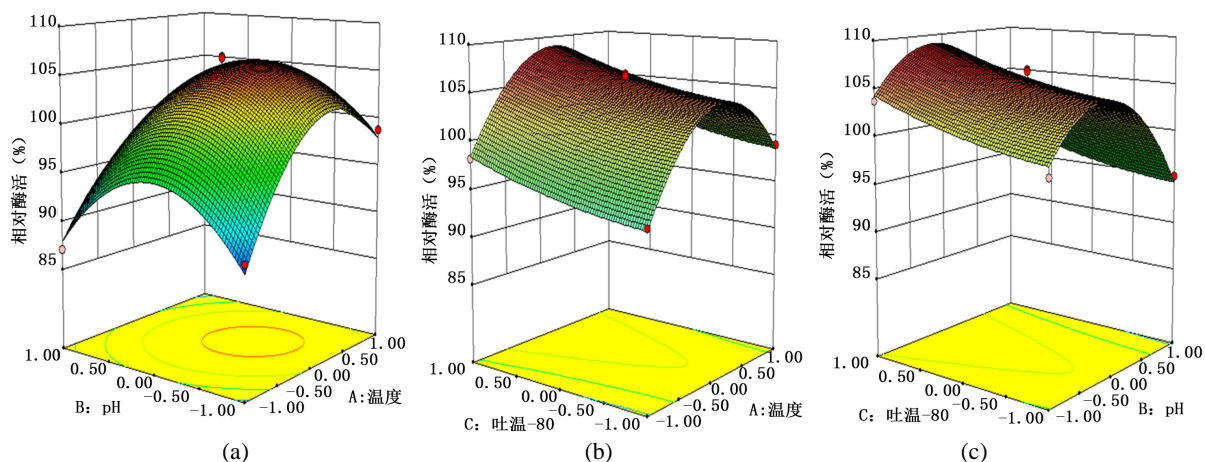


Figure 7. The three-dimensional chart of response surface analysis; interact of (a) temperature and pH; (b) temperature and tween-80; (c) pH and tween-80

图 7. 响应面立体分析图; (a) 温度和 pH 交互作用; (b) 温度和吐温-80 添加量交互作用; (c) pH 和吐温-80 添加量交互作用

Table 4. The design and results of response surface experiments

表 4. 响应面试验设计及结果

试验号	温度(°C)	pH 值	吐温-80 (w/v)	相对酶活(%)
1	55	4.5	0.05%	98.92 ± 0.02
2	55	5.5	0.1%	86.83 ± 0.16
3	45	3.5	0.05%	98.61 ± 0.13
4	45	4.5	0.1%	105.4 ± 0.06
5	45	4.5	0.1%	106.7 ± 0.12
6	45	5.5	0.15%	99.62 ± 0.14
7	35	5.5	0.1%	87.05 ± 0.22
8	35	3.5	0.1%	89.57 ± 0.21
9	55	3.5	0.1%	98.73 ± 0.16
10	45	3.5	0.15%	103.67 ± 0.08
11	45	4.5	0.1%	105.39 ± 0.11
12	45	5.5	0.05%	95.07 ± 0.11
13	45	4.5	0.1%	106.52 ± 0.05
14	35	4.5	0.15%	98.16 ± 0.13
15	35	4.5	0.05%	94.35 ± 0.17
16	55	4.5	0.15%	102.92 ± 0.10
17	45	4.5	0.1%	105.39 ± 0.10

型失拟项的 P 值 > 0.05 , 说明模型选择合适。因此可用该回归方程代替试验真实点对实验结果进行分析[9]。同时, 由软件分析得到模型的校正决定系数 $R^2 = 0.9884$, 说明该模型最多只有约 1.16% 的变化不能用此模型来解释。本实验偏差系数(CV)为 1.08%, 其值较低, 能由该模型解释, 进一步说明模型拟合优度较好[19]。

对回归方程进行分析, 得出最佳产酶条件(见表 6)为: pH 4.28, 温度 46.8℃, 吐温-80 添加量 0.15% w/v, 相对酶活为 109.29%。采用最优发酵条件进行产酶实验, 重复三次, 相对酶活为 $(109.27 \pm 0.16)\%$, 与模型预测值接近, 说明该模型较可靠。

4. 结论

随着现代蛋白质工程技术的快速发展, 基因改造已经用于菌种选育, 但传统的理化因素诱变育种方法具有简便、快速、高效等优点, 因而在实际生产中仍被广泛使用。本研究以实验室保藏的产耐高温酸性脂肪酶菌株 A-16 作为出发菌株, 通过紫外线和 EMS 的复合诱变选育, 得到 1 株产脂肪酶活力较高的突变株 UE-03, 其产脂肪酶活力为 17695.6 U/mL, 比原始菌株提高了 73.6%。对于生产菌株来说, 只有具备良好的遗传稳定性才能在工业生产上广泛应用, 本文所筛选到的突变株 UE-03 连续 5 代传代培养后发现产酶较稳定。试验结果表明紫外线和 EMS 的复合诱变可以显著提高菌株产脂肪酶能力, 同时也表明了传统的理化因素诱变在微生物诱变育种中效果较显著。

Table 5. Analysis of variance

表 5. 方差分析表

变量	平方和	自由度	均方	F 值	Pr>F
A-温度	41.72	1	41.72	36.29	0.0005
B- pH	60.56	1	60.56	52.67	0.0002
C-吐温-80	37.93	1	37.93	32.99	0.0007
AB	22.00	1	22.00	19.13	0.0033
AC	9.025E-003	1	9.025E-003	7.850E-003	0.9319
BC	0.065	1	0.065	0.057	0.8188
A ²	269.14	1	269.14	234.10	<0.0001
B ²	226.84	1	226.84	197.31	<0.0001
C ²	2.08	1	2.08	1.81	0.2208
回归	685.82	9	76.20	66.28	<0.0001
剩余	8.05	7	1.15		
失拟	6.26	3	2.09	4.65	0.0858
误差	1.79	4	0.45		
总和	693.86	16			

注: Prob > F 值小于 0.05 表明模型或考察因素影响显著; Prob > F 值小于 0.01 说明影响极显著。

Table 6. Optimum conditions of response surface optimization

表 6. 响应面优化最佳条件

试验	pH	温度℃	吐温-80(w/v)	相对酶活(%)
1	4.28	46.8	0.15%	109.29

通过单因素试验和 Box-Behnken 响应面分析法对 UE-03 菌株发酵条件进行了优化, 得到优化发酵条件为: pH 4.28, 温度 46.8℃, 吐温-80 添加量 0.15% w/v, 相对酶活为 109.29%, 在最优发酵条件下, 产酶活力达到 19339.5 U/mL, 为该菌株工业化生产提供优良菌种和技术参考。

基金项目

广西高校科学技术研究项目(KY2015YB281); 百色学院校级科研项目(2013KB01)。

参考文献 (References)

- [1] 张开平, 惠明, 田青, 等 (2013) 克雷伯氏菌 B-36 的分离鉴定及产酸性脂肪酶特性的研究. *中国粮油学报*, **10**, 80-85.
- [2] Tripathi, R., Singh, J., Randhir, K.B. and Thakur, I.S. (2014) Isolation, purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. *Energy Procedia*, **54**, 518-529. <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.293>
- [3] Shu, Z.Y., Wu, J.G., Xue, L.Y., Lin, R.F., Jiang, Y.M., Tang, L.H., et al. (2011) Construction of *Aspergillus niger* lipase mutants with oil-water interface independence. *Enzyme Microbial Technology*, **48**, 129-133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.10.011>
- [4] Hwang, H.T., Qi, F., Yuan, C.L., Zhao, X.B., Ramkrishna, D., Liuand, D. and Varma, A. (2014) Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Protein engineering and lipase production. *Biotechnology and Bioengineering*, **111**, 639-653. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.25162>
- [5] Stergiou, P.Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L.G., et al. (2013) Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology Advances*, **31**, 1846-1859. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.006>
- [6] 杨帆, 李福英, 何雄飞, 等 (2013) 深海产低温脂肪酶菌株 Dspro004 的诱变育种. *生物学杂志*, **3**, 20-23.
- [7] 苗长林, 罗文, 吕鹏梅, 等 (2013) 脂肪酶产生菌微波-亚硝基胍复合诱变及培养条件优化. *林产化学与工业*, **5**, 30-34.
- [8] 王美珠 (2013) 产油皮状丝孢酵母耐高温菌株的诱变筛选及发酵调控. 华东理工大学, 上海, 4.
- [9] 张开平 (2013) 耐高温酸性脂肪酶产生菌的选育及其酶学特性研究. 河南工业大学, 郑州, 4.
- [10] 朱葛健, 王正祥 (1994) 工业微生物实验技术手册. 中国轻工业出版社, 北京.
- [11] Toscano, L., Gochev, A., Montero, G. and Stoytcheva, M. (2011) Enhanced production of extracellular lipase by novel mutant strain of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, **25**, 2243-2247. <http://dx.doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0019>
- [12] Fu, F., Sui, Z.-H., Zhou, W., Wang, J.-G., Chang, L.-P. and Ci, S.-F. (2014) UV-irradiation mutation of tetraspores of *Gracilariopsis lemaneiformis* and screening of thermotolerant strains. *Journal of Applied Phycology*, **26**, 647-656. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-0087-3>
- [13] Liu, J.H., Wang, F.M., Zhao, Q. and Cheng, H. (2013) Study of mutagenesis on the strain producing cellulase. *Energy Science and Technology*, **5**, 54-57.
- [14] 宋炜, 蒋丽娟, 申爱荣, 等 (2009) 高产脂肪酶酵母菌株的分离筛选及紫外诱变. *中南林业科技大学学报*, **3**, 55-59.
- [15] 朱琪, 王维, 兰时乐 (2013) 脂肪酶产生菌黑曲霉 ZM-1 复合诱变育种研究. *安徽农业科学*, **18**, 7796-7799.
- [16] Agrawal, R., Sandlewal, A. and Ashok K V. (2012) Development of a β -glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis. *Biotechnology*, **12**.
- [17] (2009) GB/T23535-2009, Lipase preparations[S].
- [18] Ramani, K., Saranya, P., Jain, S.C. and Sekaran, G. (2013) Lipase from marine strain using cooked sunflower oil waste: production optimization and application for hydrolysis and thermodynamic studies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36**, 301-315. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-012-0785-2>
- [19] Wang, Q.F., Zhang, C.Y., Hou, Y.H., Lin, X.Z., Shen, J.H. and Guan, X.Y. (2013) Optimization of cold-Active lipase production from psychrophilic bacterium *Moritella* sp. 2-5-10-1 by statistical experimental methods. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **77**, 17-21. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.120104>