

产冷适应复合酶菌株 *Pseudomonas* sp. NJ197的 选育、发酵条件及酶学性质*

张金伟¹ 连明珠² 曾润颖^{1*}

(¹国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, ²厦门大学生命科学院 福建厦门 361005)

摘要 从南极普利兹湾深海沉积物中筛选到一株同时产多种冷适应酶的菌株 NJ197, 细菌学形态鉴定及 16S rDNA 序列分析表明, 该菌株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。生长特性研究表明, 该菌株属于耐冷菌, 其最适生长温度为 5 ~ 15 ℃。NJ197 菌株能利用多种单一的碳、氮源产酶, 最适产酶温度为 20 ℃, 最高产酶温度为 30 ℃。粗酶液经硫酸铵盐析、DEAE cellulose-52 柱层析初步分离纯化后进行酶学性质的研究。该菌株所分泌复合酶中脂肪酶和淀粉酶的活力最高, 它们的最适作用温度分别为 30 ℃ 和 35 ℃, 最适 pH 值分别为 9.0 和 9.5, 对热敏感, 是典型的碱性冷适应复合酶。Ca²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Fe³⁺ 对该复合酶有较为明显的激活作用, 而 Zn²⁺、Hg²⁺、Rb²⁺、Cd²⁺、EDTA 则能抑制酶活。其中脂肪酶能在高浓度的 SDS、CHAPS 等变性剂中表现出较好的稳定性。图 5 表 2 参 21

关键词 冷适应复合酶; 碱性脂肪酶; 碱性淀粉酶; 耐冷菌; 南极

CLC TQ925 ◇ Q939.112.05

Screening, Fermentation Condition and Enzyme Characterization of Multicomponent Enzymes Producing *Pseudomonas* sp. NJ197*

ZHANG Jinwei¹, LIAN Mingzhu² & ZENG Runying^{1*}

(¹Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, State Oceanic Administration, ²School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract A strain NJ197, producing cold-adapted complex enzyme, was isolated from deep sea sediment of the Prydz Bay, Antarctic. The morphological identification and 16S rDNA sequence analysis showed that it belonged to genus *Pseudomonas*. The optimal growth temperature of the *Pseudomonas* sp. NJ197 was 5 ~ 15 ℃, indicating that it was a psychro-tolerant bacterium. The strain could use various single carbonaceous and nitrogenous substances to produce complex enzyme. Its optimal and highest temperatures for enzyme production were 20 ℃ and 30 ℃, respectively. The enzyme purification was performed by ammonium sulfate fractionation and anion exchange chromatography with DEAE cellulose-52. The activities of lipase and amylase were the strongest among the complex enzymes produced by *Pseudomonas* sp. NJ197, and the both were sensitive to high temperature. The optimal temperature and pH value for the lipase activity were 30 ℃ and 9.0, while those for the amylase activity were 35 ℃ and 9.5, respectively. The results indicated that they were typical alkaline cold-adapted enzymes, whose activities were stimulated by Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ and Fe³⁺, and inhibited by Zn²⁺, Hg²⁺, Rb²⁺, Cd²⁺ and EDTA. The cold-adapted lipase showed better resistance to inactivation of 1% detergents, such as SDS and CHAPS. Fig 5, Tab 2, Ref 21

Keywords cold-adapted complex enzyme; alkaline amylase; alkaline lipase; psychro-tolerant bacteria; Antarctic

CLC TQ925 ◇ Q939.112.05

极地低温环境中的微生物资源十分丰富, 而且由于环境条件的特殊性, 可以分离到能产生各种特殊活性物质的微生物, 在这些特殊活性物质中, 低温酶、冷适应酶由于在低温下具有较高的催化效率, 在工业上具有重要的应用价值, 因此受到最为广泛的关注^[1]。目前的工业酶制剂生产的出发菌株一般都是采用多菌株分别发酵单一酶, 再通过复配技术形成产品。与之相比, 产复合酶的菌株能节约成本, 而且产生的复合酶在同一体系中发挥作用时, 彼此之间具有更好的相容性和互补性,

因此具有更好的应用前景^[2]。目前尚未见到同时产低温淀粉酶和低温脂肪酶等多种低温酶、冷适应酶的细菌的研究报道。

本文通过对南极海域沉积物样品进行微生物的分离筛选, 得到一株产冷适应复合酶的耐冷菌株 NJ197, 该菌株所产生的冷适应复合酶中含有脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶、琼脂酶等, 其中以碱性脂肪酶和碱性淀粉酶的活性最高, 应用 16S rDNA 作为分子指标对其进行分类鉴定, 并进一步对其发酵条件及其酶学性质进行研究。

收稿日期: 2005-04-01 接受日期: 2005-06-03

*国家自然科学基金青年基金 (No. 40406029) 资助 Supported by the National Natural Science Youth Foundation of China (No. 40406029)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: runyingzeng@yahoo.com.cn)

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株 NJ197 筛选自南极普利兹湾深海沉积物 [(E) 74 °

25, (S) 66 55,水深 900 m],样品于 2001年 11月~2002年 4月中国第 18次南极考察航次期间采集,采用多管采样器采集,保存于 -20℃ 冰箱。

1.2 培养基

改良的 2216E培养基:蛋白胨 1%,酵母膏 0.2%,陈海水配制, pH 7.0~8.0。固体培养基另加 1.5%琼脂粉。

淀粉酶产生菌筛选培养基:可溶性淀粉 2%,琼脂粉 1.5%,陈海水配制, pH 8.5。

脂肪酶产生菌筛选培养基:葡萄糖 0.2%,可溶性淀粉 0.5%,蛋白胨 0.5%,酵母膏 0.5%,花生油 5%,维多利亚兰 0.04%,琼脂粉 1.5%,陈海水配制。

蛋白酶产生菌筛选培养基:酪蛋白 1%,酵母膏 0.2%,琼脂粉 1.5%,陈海水配制, pH 10。

基础发酵培养基:蛋白胨 1%,葡萄糖 0.5%,陈海水配制, pH 8.5。

种子发酵培养基:蛋白胨 1%,酵母膏 0.2%,陈海水配制, pH 8.5。

产酶发酵培养基:可溶性淀粉 2.5%,橄榄油乳化液 0.25%,蛋白胨 1.5%,陈海水配制, pH 8.5。

1.3 菌种分离

按常规稀释法进行分离^[3]。样品稀释后涂布于改良 2216E培养基上,于 15℃ 培养 3~7 d,采用滤纸影印法将菌落转接于各种筛选培养基上,挑取有复合酶活产生的单菌落再次划线培养,取单菌落镜检后接种于液体改良 2216 E培养基中,培养 3~7 d后加入 15% (终浓度)甘油,于 -80℃ 超低温冰箱中保存。经筛选,菌株 NJ197具有较高的复合酶活力。

1.4 酶提取及纯化

将 NJ197菌株接种于发酵培养基中,在 20℃, 200 r/min 下振荡培养 72 h后离心后取上清,即得粗酶液。向粗酶液中加入硫酸铵至 10%饱和度,4℃ 放置 1 h, 10 000 r/min离心 20 min后,往上清液继续加入硫酸铵至 80%饱和度,4℃ 放置 24 h,于 15 000 r/min离心 15 min,沉淀用 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0)溶解,并在相同缓冲液中透析过夜。把透析后的酶液在 4℃ 下 10 000 r/min离心 30 min,上清液经冷冻干燥浓缩后上样于已用 Tris-HCl缓冲液 (0.01 mol/L, pH 9.0)平衡过的 DEAE cellulose-52 离子交换柱,并用含 0~0.5 mol/L NaCl梯度的 Tris-HCl缓冲液洗脱,收集具有酶活性的洗脱组分,冷冻干燥后保存。

脂肪酶酶活测定采用 *p*-NPP法^[4]进行,以 30℃、pH 9.0 条件下作用 10 min,每分钟分解对硝基苯棕榈酸酯 (*p*-Nitrophenyl palmitate)释放出 1 μmol对硝基酚 (*p*-Nitrophenol)所需的酶量定义为 1个酶活力单位,以 u表示。

淀粉酶酶活测定采用 DNS法^[5]进行,以 35℃、pH 9.5 条件下作用 30 min,每分钟水解 1%淀粉液形成的 1 μmol还原糖 (麦芽糖或葡萄糖)所需的酶量定义为 1个酶活力单位,以 u表示。

1.5 NJ197的分子鉴定

按照文献[6]的方法扩增 NJ197菌株的 16S rDNA,将序列提交 EMBL (European Molecular Laboratory)数据库,与数据库已有的细菌 16S rDNA序列进行相似性比较分析。序列的比

较及系统发育分析采用 DNAMAN 5.1和 Mega 2.0软件进行。

1.6 温度对 NJ197菌株生长的影响

将 NJ197菌株接入改良的 2216E液体培养基,分别于不同温度下的摇床中 200 r/min振荡培养,隔一定时间取样,测 600 nm的光吸收值,绘制菌株温度生长曲线。

1.7 发酵条件研究

1.7.1 产酶周期 将基础发酵培养基 pH值调节至 8.5,接入 10%种子培养液,于 20℃, 200 r/min振荡培养,测定不同时间发酵液中脂肪酶和淀粉酶的活力,并绘制产酶曲线。

1.7.2 温度对产酶的影响 将基础发酵培养基 pH值调节至 8.5,接入 10%种子培养液,200 r/min,分别在 5、10、15、20、25、30、37℃ 下发酵 72 h,测定发酵液中脂肪酶和淀粉酶的活力,并绘制产酶曲线。

1.7.3 碳源试验 在基础发酵培养基中以不同的碳源代替葡萄糖,其终浓度为 1%, pH 8.5。20℃ 下 200 r/min振荡培养 72 h,取粗酶液测定酶活。所用碳源包括:葡萄糖、淀粉、糊精、蔗糖、乳糖、半乳糖、D-木糖、D-果糖、纤维二糖、甘露醇、阿拉伯糖、棉子糖、鼠李糖。

1.7.4 氮源试验 在基础发酵培养基中以不同的氮源代替蛋白胨,其终浓度为 0.5%, pH 9.0。20℃ 下 200 r/min振荡培养 72 h,取粗酶液测定酶活。所用的氮源包括:蛋白胨、(NH₄)₂H₂PO₄、NH₄Cl、NaNO₃、(NH₄)₂SO₄、尿素、豆饼粉、玉米粉。

1.8 酶学性质研究

1.8.1 温度对复合酶活性的影响 测定 NJ197复合酶在不同温度下 (10~50℃,间隔 5℃)水解底物的活力,以研究其最适作用温度。

1.8.2 复合酶的热稳定性 将酶液于不同温度下保温一定时间,测定复合酶的活力,在最适反应温度下反应。

1.8.3 pH对复合酶活性的影响 用 pH 4~12的缓冲液配制底物溶液,测定在不同 pH值下复合酶的酶活力。

1.8.4 表面活性剂对脂肪酶活力的影响 在酶活测定体系中加入一定浓度的各种表面活性剂,10℃ 混合均匀,放置 1 h后在最适条件下测定酶活,分别计算相对酶活和剩余酶活。

1.8.5 金属离子及螯合剂对复合酶活力的影响 向酶液中加入各种阳离子以及螯合剂 EDTA,使其终浓度为 0.1 mmol/L,在 10℃ 水浴中保温 30 min后测定酶活,在最适反应温度下反应。

2 结果

2.1 NJ197菌株的鉴定

2.1.1 NJ197菌株的细菌学鉴定 用油镜观察, NJ197细胞呈短杆状,单个排列 (图 1),菌体大小为 1~1.5 μm × 2~3 μm,革兰氏染色阴性。15℃ 培养时在淀粉酶筛选培养基上呈现出明显的透明圈,说明该菌具有强烈水解淀粉的能力;在脂肪酶筛选培养基上能使菌落周围的染料呈蓝绿色,说明该菌同时具有脂肪酶活力。在改良的 2216E板培养基上平划线,培养 3 d后菌落呈圆形,表面粗糙无光泽,边缘隆起,有明显的皱褶,颜色为乳白色,不透明。

2.1.2 NJ197菌株 16S rDNA 序列分析 将 NJ197菌株的 16S rDNA序列与 EMBL数据库中的序列进行同源性比较,发现与其同源性较高的菌株均为假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。一

般认为, 16S rDNA序列同源性小于 98%可以认为属于不同的种,同源性小于 95%,可以认为属于不同属^[7],因此 NJ197菌株属于假单胞菌属。此外, NJ197菌株与一株施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)的 16S rDNA序列同源性最高,为 98.19%。

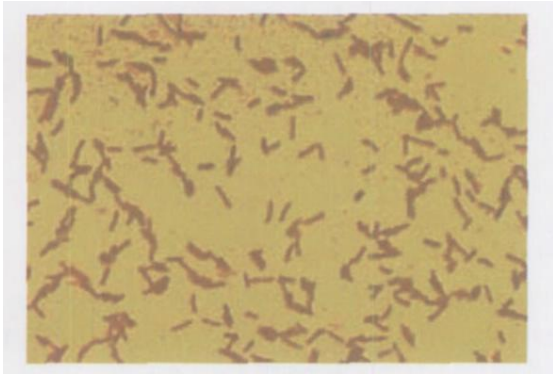


图 1 NJ197在油镜下的形态

Fig 1 Conformation of NJ197 under microscope

选取 13株细菌的 16S rDNA全序列进行遗传距离计算,并根据遗传距离计算结果绘制系统发育树(图 2)。所选取的菌株包括 NJ197菌株和数据库中与其同源性较高的细菌。结果表明, NJ197菌株和 *P. stutzeri*处于不同的分支,而与未知细菌(*Pseudomonas* sp. es8)的系统发育关系更近,但它们的同源性才 97.934%。

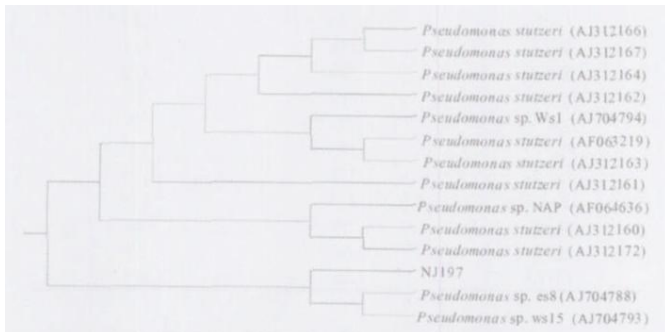


图 2 NJ197菌株的系统发育树(括号内为各菌株 16S rDNA序列在 EMBL 数据库中的注册号)

Fig 2 Phylogenetic tree of strain NJ197 (Numbers in the brackets were the accession number of each 16S rDNA sequence in EMBL database)

2.2 温度对 NJ197生长的影响

由图 3可以看出, NJ197菌株在 30℃时生长速度十分缓慢, 20℃时生长曲线的稳定期较短,而 5~15℃时的稳定期比较稳定。综合考虑细菌生长的菌体浓度及稳定期等因素, NJ197菌株的最适生长温度为 5~15℃。Ricardo Cavicchioli 等^[8]认为,耐冷菌(*Psychrotolerant organisms*)可以在接近冰点的温度下正常生长,而在 20℃以上更适合生长,生长温度上限为 40℃;而嗜冷菌(*psychrophilic organisms*)在 15℃或 15℃以下更适合其生长,生长温度上限为 20℃。因此, NJ197菌株属于耐冷菌。

2.3 NJ197菌株发酵条件试验

2.3.1 温度及培养时间对产酶的影响 菌株在基础发酵培养基中发酵 72 h后,测定发酵液中脂肪酶和淀粉酶的活力,结果表明, NJ197菌株产两种酶的最适温度均为 20℃,在 5℃下

仍可检测到酶活,但在 30℃下基本没有酶活产生。产酶周期实验表明, NJ197在发酵的早期阶段就开始产生脂肪酶,稍后才产淀粉酶,发酵 40~70 h是产脂肪酶的活跃时期,发酵 60~80 h是产淀粉酶的活跃时期,延长发酵时间,酶活即呈下降趋势。

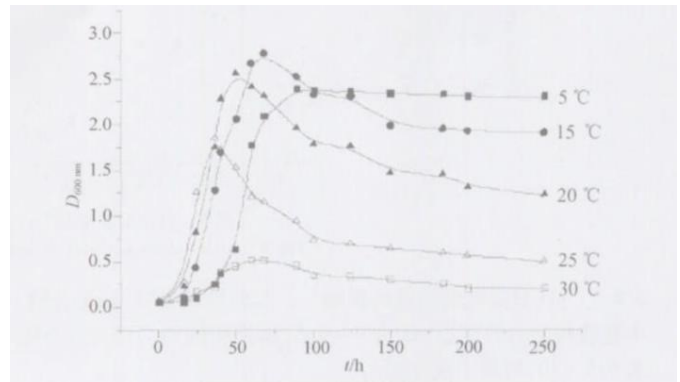


图 3 NJ197的温度生长曲线

Fig 3 Growth curve of strain NJ197 at different temperatures

2.3.2 碳源利用实验 菌株 NJ197能利用多种碳源生长并产酶,其中以葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、半乳糖和甘露糖等最有利于产脂肪酶;而以葡萄糖、蔗糖、糊精、阿拉伯糖等最有利于产淀粉酶。

2.3.3 氮源实验 菌株 NJ197能利用单一氮源生长并产酶,其中以 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、尿素最有利于产脂肪酶;以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、蛋白胨最有利于产淀粉酶;而复合氮源豆饼粉和玉米粉均有利于产复合酶。

2.4 NJ197菌株复合酶的性质

2.4.1 温度对复合酶活性的影响 该复合酶中脂肪酶的最适反应温度为 30℃,淀粉酶的最适反应温度为 35℃,复合酶在 15~40℃范围内酶活力较高,表现出明显的冷适应酶特性(图 4)。

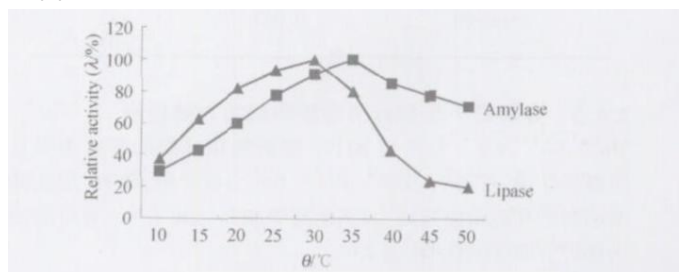


图 4 温度对酶活力的影响

Fig 4 Effect of temperature on enzyme activity

2.4.2 复合酶的热稳定性 实验表明,该脂肪酶在 10℃下活力保持稳定, 30℃下保温 10 h后酶活降为 10%, 50℃保温 10 h后酶活剩余 7%, 60℃以上 10 min基本丧失全部活力(图 5-A);淀粉酶在 10℃下活力较为稳定, 35℃下保温 10 h后酶活降为 17%, 65℃保温 10 h后酶活剩余 15%, 65℃以上 10 min基本丧失全部活力(图 5-B),表现出冷适应酶对热敏感的特性。根据 Russell^[9]的定义,认为低温酶(*cold-active enzyme*)是在 0~30℃具有高的比活或生理效能,而本复合酶最适作用温度在 30~35℃,且在中温条件下不是很稳定,但在低温条件下较为稳定,因而可认为是冷适应复合酶。

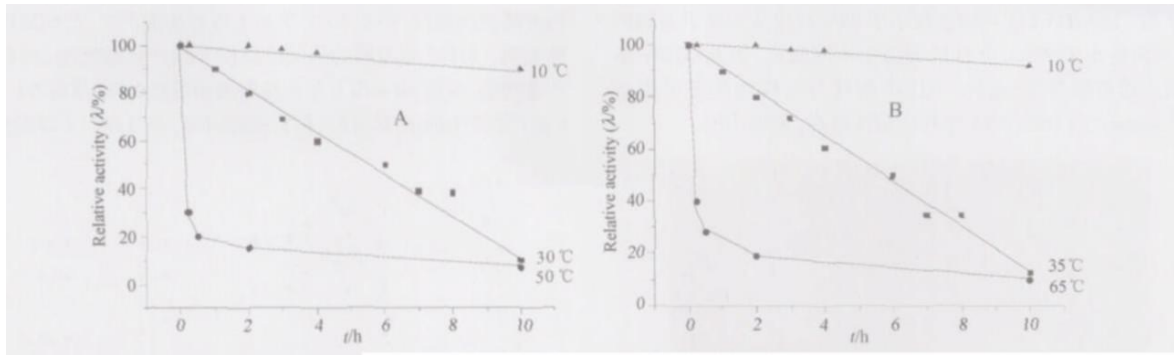


图 5 温度对脂肪酶(A)和淀粉酶(B)稳定性的影响

Fig 5 Effect of temperature on stability of lipase (A) and amylase (B)

2.4.3 pH对脂肪酶活性的影响 实验结果表明,该复合酶中脂肪酶活力的最适 pH为 9~9.5,而淀粉酶活力的最适 pH为 9.5~10,均属于碱性酶。

2.4.4 表面活性剂对脂肪酶活力的影响 在酶液中以 50 mg/L的量添加 CHAPS、SDS、Span 40、Span 60、Tween 80时能使脂肪酶活力提高 10%~35%。以 1%的量添加时对酶活有不同程度的影响(表 1)。

表 1 表面活性剂对脂肪酶活力的影响

Table 1 Effect of detergents on lipase activity

表面活性剂	Detergent	w / %	/ %
-	-	-	100
CHAPS	0.005	1	121
	1	1	79
SDS	0.005	1	135
	1	1	82
Tween 80	0.005	1	115
	1	1	79
Tween 40	0.005	1	106
	1	1	71
Span 40	0.005	1	119
	1	1	91
Span 60	0.005	1	112
	1	1	104

2.4.5 金属离子及螯合剂对脂肪酶活力的影响 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 对 NJ197 脂肪酶和淀粉酶有较为明显的激活作用;而 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Rb^{2+} 、 Cd^{2+} 、螯合剂 EDTA 则能抑制脂肪酶和淀粉酶的活力;其他离子如 Li^+ 、 K^+ 、 Na^+ 等对酶活力都没有明显的影响(表 2)。

3 讨论

脂肪酶是在碱性条件下水解脂肪的酶,它能高效地将甘油三酯分解为容易去除的脂肪酸、甘油二酯、甘油一酯和甘油等,因此大大提高了对脂肪污垢的去除。目前已有大量的细菌脂肪酶得到研究^[10],除了细菌以外,目前从各种环境中也分离产脂肪酶的酵母菌^[11]、链霉菌^[12]和根霉^[13]。淀粉酶是水解淀粉和糖原酶的统称,广泛存在于动植物和微生物中^[14-17]。它最早实现了工业生产并且迄今为止是用途最广、产量最大的一个酶制剂品种^[6]。采用复合酶菌株进行酶制剂的生产具有明显的优势:首先,直接利用原菌株生产复合酶能在工艺、设备等方面节约成本;其次,产生的复合酶在同一体系中发挥作用时,彼此之间具有更好的相容性和互补性,活力更高。本文中 *Pseudomonas*

sp. NJ197 所产复合酶中主要包括碱性脂肪酶和碱性淀粉酶,这两种酶都是目前洗涤业用酶中的主要酶种^[18, 19],而且由于其低温下具有较高活力,因此具有较好的应用开发前景。

表 2 金属离子和螯合剂对酶活的影响

Table 2 Effects of metal ions and chelator on enzyme activity

金属离子及螯合剂	脂肪酶相对酶活	淀粉酶相对酶活
Metal ions and chelator	Lipase relative activity (/ %)	Amylase relative activity (/ %)
-	100	100
Na^+	105	100
K^+	101	102
Li^+	103	103
Ca^{2+}	119	117
Mg^{2+}	117	111
Mn^{2+}	108	112
Cd^{2+}	53	37
Zn^{2+}	60	75
Cu^{2+}	106	123
Co^{2+}	126	125
Fe^{3+}	117	110
Hg^{2+}	59	46
Rb^{2+}	62	37
EDTA	56	62

南极是筛选低温酶的良好环境。经酶学性质试验分析, *Pseudomonas sp.* NJ197 所产生的复合酶属于典型的碱性冷适应复合酶,其最适反应温度为 30 (脂肪酶)~35 (淀粉酶),中温脂肪酶和淀粉酶的最适作用温度一般为 45~60,而低温的脂肪酶和淀粉酶一般在 30~45 活力最高^[14, 18, 19],因此本文所分离的复合酶具有较好的研究价值和应用前景。该复合酶中脂肪酶和淀粉酶最适 pH 值分别为 9.0 和 9.5,属于碱性酶,但它们对热都较为敏感,在最适作用温度下保温 5 h 后剩余 50%~60% 的酶活力,而保温 10 h 后仅剩余 10% 的酶活,属于典型的冷适应酶。复合酶中这两种冷适应酶的基因克隆及特性分析值得进一步研究。

该复合酶对 EDTA 敏感,可以推测该酶的活性中心构象的维持与金属离子有关; Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 等对脂肪酶和淀粉酶有明显的激活作用,而 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Rb^{2+} 、 Cd^{2+} 则能抑制二者的酶活。在以往的研究中, Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子对脂肪酶和淀粉酶均有不同程度的抑制作用,如 Cu^{2+} 几乎完全抑制了 *Pseudomonas sp.* B11-1 分泌的脂肪酶^[20]; Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子也几乎完全抑制了

Pseudomonas sp. strain KB700A 分泌的脂肪酶^[21], Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子对异淀粉酶的活力具有强烈的抑制作用^[14]. 但這些金属离子对 NJ197 菌株分泌的复合酶不但没有抑制反而有激活的作用, 这可能与该复合酶的特殊作用机制有关.

复合酶中脂肪酶分别与 1% 的 CHAPS、SDS、Tween 80、Tween 40、Span 40、Span 60 等非离子表面活性剂混合并于 10 作用 1 h 后仍表现出的相当稳定性, 说明该脂肪酶与这些非离子表面活性剂的相容性较好. 在洗涤工业应用中, 对酶制剂的要求主要包括: 在碱性范围内有活性, 而且对表面活性剂的失活作用具有较好的抗性, 热稳定性好等^[2], 因此, 该复合酶中的脂肪酶在洗涤剂工业中将具有较好的应用前景.

粗酶液经硫酸铵盐析、DEAE cellulose - 52 柱层析进行初步分离纯化后, 纯化倍数约为 30 ~ 35 倍, 以 *p*-Nitrophenyl palmitate 为底物, 可检测到脂肪酶比活力为 178 u/mg (发酵液平均比活力为 5.8 u/mg); 以可溶性淀粉为底物, 可检测到淀粉酶的酶活为 560 u/mg (发酵液平均比活力为 17.5 u/mg), 可见复合酶具有比较高的比活力和发酵效价^[2], 因此可直接利用野生型菌株进行工业发酵产复合酶, 但发酵条件有必要进一步优化.

References

- Feller G, Narinx E, Apigny JL, Aittaleb M, Baise E, Genicot S, Gerday C. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol Rev*, 1996, **18**: 189 ~ 202
- Wu SG (吴松刚). 吴松刚论文选集. 北京: 中国文联出版社, 2002
- 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1996
- Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, Atomi H, Inanaka T. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 4064 ~ 4069
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*, 1959, **31**: 426 ~ 428
- Lin NW (林念炜), Zhang R (张锐), Zhao J (赵晶), Zeng RY (曾润颖). Cold-active protease from Antarctic bacterium *Marinobacter* sp. strain R2: fermentation condition and enzyme properties. *J Xiamen Univ* (厦门大学学报), 2004, **43**: 865 ~ 869
- Fry NK, Warwick S, Saunders NA. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *J Gen Microbiol*, 1991, **137**: 1215 ~ 1222
- Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, Sowers KR. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**: 253 ~ 261
- Russell NJ. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*, 2000, **4**: 83 ~ 90
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, **15**: 29 ~ 63
- Song X (宋欣), Qu YB (曲音波), Ye HQ (叶寒青), Hu XY (胡晓燕). Screening of a yeast strain with lipase and esterase activity and characterization of the enzymes. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1999, **5**: 628 ~ 631
- Zhou XY (周晓云), Huang JN (黄建宁), Wang HZ (王慧中), Wang RW (王荣伟). Study on alkaline lipase by *Streptomyces*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1999, **5**: 529 ~ 532
- Qiu YJ (邱勇隽), Xu JH (许建和). Immobilized lipase of *Rhizopus* sp. bc0-09m01: characterization and application in kinetic resolution of chiral ester. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2001, **7**: 469 ~ 473
- 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984
- Shen W (沈微), Hua GQ (华国强), Wang ZX (王政祥), Tang XM (唐雪明), Zhuge J (诸葛健). Expression of a hyperthermophilic α -amylase of the archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* (微生物学通报), 2003, **30**: 22 ~ 25
- Rahardjo YS, Sie S, Weber FJ, Tramper J, Rinzema A. Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomol Eng*, 2005, **21**: 163 ~ 72
- Kim DY, Cha CH, Oh WS, Yoon YJ, Kim JW. Expression of the promoter for the maltogenic amylase gene in *Bacillus subtilis* 168. *J Microbiol*, 2004, **42**: 319 ~ 27
- Xu YL (徐亚林), Qian H (钱浩). Detergent development trend. *Detergent & Cosmetics* (日用化学品科学), 2001, **24** (2): 34 ~ 35
- Zheng Y (郑毅), Wu SG (吴松刚), Shi QQ (施巧琴). A review on the alkaline lipase of microorganism used for detergent. *China Surfactant Detergent & Cosmetics* (日用化学工业), 2001, **1** (2): 35 ~ 38
- Choo DW, Kurihara T, Suzuki T, Soda K, Esaki N. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 486 ~ 491
- Fujita M, Torigoe K, Nakada T. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*amyP*) for maltotetraose-forming amylase from *Pseudomonas stutzeri* MO-19. *J Bacteriol*, 1971, **171**: 1333 ~ 1339