

藏灵菇源干酪乳杆菌 KL1 高产胆盐水解酶 发酵条件的优化研究

刘 慧,熊利霞,李金锭,程 雪,张红星

(北京农学院食品科学系,北京 102206)

摘 要: 利用从藏灵菇中筛选的产胆盐水解酶的干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* KL1 研究影响胆盐水解酶酶活力的环境因素和超声波细胞破碎条件,探讨产酶能力的检测方法;采用四因素三水平 [$L_9(3^4)$] 正交试验研究胆盐水解酶的优化发酵条件,利用完全交叉组合试验研究超声波细胞破碎的最适条件,并应用牛津杯试验定性检测 KL1 菌株产胆盐水解酶的能力;优化发酵条件:葡萄糖添加量为 2%、大豆蛋白胨添加量为 2%、发酵温度为 37 °C、接种量为 2%;细胞破碎最适条件:超声波功率为 700 W,3 s 间歇,5 s 工作,持续工作 15 min,控制温度范围 0~6 °C。在优化发酵条件下,胆盐水解酶的活力是优化前的 7.4 倍;在超声波细胞破碎最适条件下,细胞破碎率能达到 80% 的要求,并可检出胆盐水解酶活性;牛津杯试验结果表明 *Lactobacillus casei* KL1 菌株产生的胆盐水解酶具有降低胆固醇的功效。

关键词: 干酪乳杆菌;胆盐水解酶;优化发酵条件;细胞破碎条件

中图分类号:TS201.2 文献标识码:A

Study on the Optimization of the Fermentation Conditions of Bile Salt Hydrolase

by *Lactobacillus casei* KL1 from Tibetan Kefir

Liu Hui, Xiong Lixia, Li Jinding, Cheng Xue, Zhang Hongxing

(Department of Food Science, Beijing Agricultural College, Beijing 102206)

Abstract: *Lactobacillus casei* KL1, isolated from Tibetan Kefir, was studied the environment factors, ultrasound cytolysis conditions and detection method which influenced the enzyme activity of bile salt hydrolase; Four factors and three levels orthogonal test were chosen to study fermentation conditions. The completely cross combination testing was utilized to research ultrasound cytolysis condition, and Oxford cup experiment was used to detect the producing enzyme ability of KL1; Optimize fermentation conditions were glucose 2%, soy peptone 2%, fermentation temperature 37 °C and inoculums size 2%; Optimize cytolysis conditions were ultrasonic power 700W, 3 s intermission, 5 s task, non-stop working 15 min, and the temperature range from 0 °C to 6 °C Under the optimize fermentation conditions, the enzyme activity of bile salt hydrolase was 7.4 times bigger than before. The cytolysis rate achieved 80% under the ultrasound cytolysis optimum condition, and bile salt hydrolase's activity could be check out. The results of Oxford cup experiment indicated that the bile salt hydrolase of *Lactobacillus casei* KL1 had the function of reducing cholesterol.

Key words: *Lactobacillus casei*, bile salt hydrolase, optimize fermentation conditions, cytolysis conditions

基金项目:北京市自然科学基金资助项目“藏灵菇益生菌产生物活性物质及生理功能的研究”(5062006)。

第一作者简介:刘慧,女,1963 年出生,副教授,从事食品微生物学与功能性发酵食品研究,发表学术论文 30 余篇。通信地址:102206 北京市昌平区回龙观镇北农路 7 号,北京农学院食品科学系, Tel: 010-80799174 (O), E-mail: foodlh@263.net。

通讯作者:张红星,男,1970 年出生,副教授,从事食品生物技术与功能乳品研究。 Tel: 010-80794124 (O), E-mail: hxzhang511@163.com。

收稿日期:2008-08-27,修回日期:2008-10-07。

胆盐水解酶(bile salt hydrolase, BSH)是肠道中的双歧杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属中的多种乳酸细菌在生长过程中产生的代谢产物^[1]。大量实验证明,胆盐水解酶能在肝肠循环中将结合胆盐分解,产生氨基酸与溶解度较低的游离胆盐。后者能与胆固醇结合形成沉淀复合物而排出体外,从而降低血清总胆固醇的含量^[2-4]。目前国内有关胆盐水解酶的研究报道较少,且其产量很低。影响胆盐水解酶合成的因素,除了产生菌的遗传特性外,还有环境因素,如培养基成分(碳源、氮源及其碳氮比、刺激生长因子、无机盐、产酶促进剂)、培养基初始 pH、发酵温度和时间、接种量等亦有重要影响^[5]。不同菌种产生的胆盐水解酶的发酵条件有所不同。笔者利用从藏灵菇中筛选的产胆盐水解酶的干酪乳杆菌 KL1(*Lactobacillus casei* KL1)菌株研究环境因素对乳酸菌胆盐水解酶活力的影响规律,优化其产酶的最佳发酵条件,以提高酶的产量与活力,探究超声波细胞破碎条件对胆盐水解酶活力的影响及定性检测产酶能力的方法,旨在利用高产胆盐水解酶的菌株开发和研制作为人类膳食补充的功能性发酵乳制品和微生物生态制剂,通过饮食调节,以降低人血清总胆固醇水平,预防心、脑血管疾病的发生,具有十分重要意义与长远的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 干酪乳杆菌 KL1 (*Lactobacillus casei* KL1),由该课题组从藏灵菇中筛选与鉴定,并确定为产胆盐水解酶菌株^[5]。试验于 2007 年 8 月—2008 年 5 月北京农学院食品系食品微生物实验室进行。

1.1.2 主要试剂 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH6.5)、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.0)、6 mmol/L 牛磺胆酸钠溶液、80%三氯乙酸、茚三酮显色剂、碘酸钾稀释液^[5]、0.85%无菌生理盐水、95%乙醇、牛磺胆盐、胆固醇、氯化钙等。

1.1.3 培养基 MRS 培养基,改良 MRS 培养基^[6](将 MRS 培养基中的鱼蛋白胨以 0.5%的胰蛋白胨和 0.5%乳酪蛋白水解物替代,其他成分不变),含 0.1%胆固醇、0.3%牛磺胆盐的 MRS 培养基,含 0.1%胆固醇、0.3%牛磺胆盐和 0.2%氯化钙的 MRS 培养基,灭菌脱脂乳(市售蒙牛鲜牛乳)等。

1.1.4 主要仪器设备 Biofuge stratos 型大容量台式冷冻离心机(美国热电公司);UV-1800 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);BS224S 型电子天平(220 g/0.1mg)(德国赛多利斯);SA-300VL 型全自动高压灭菌锅(台湾);Bugbox 型厌氧培养箱(英国 Ruskin 公司);

GHP-9160 型隔水式恒温培养箱(上海一恒);BCD-301 型冰箱(青岛海尔);CTXNW-2B 型超声循环提取机(北京弘祥隆公司);HZS-HA 水浴振荡器(哈尔滨东联公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌种的活化 将脱脂乳试管保种的菌株以新鲜灭菌脱脂乳活化 1 代,37 °C 培养过夜至牛乳凝固。再以 1%~2%接种量转接于 10 ml MRS 培养基试管中,37 °C 增菌培养至培养液混浊,如此活化 2~3 代,待培养液在 12 h 之内产生大量菌泥,冷藏备用。

1.2.2 发酵剂的制备 吸取试管增菌液以 2%~3%的接种量转接于盛 100 ml 改良 MRS 培养基的三角瓶中,37 °C 培养至培养液混浊,冷藏备用。

1.2.3 KL1 菌株产胆盐水解酶牛津杯试验 在试验组含胆固醇、牛磺胆盐的 MRS 培养基及含胆固醇、牛磺胆盐和氯化钙的 MRS 培养基平板上(以改良 MRS 培养基作为对照组),对称放置牛津杯,吸取 100 μ l 干酪乳杆菌 KL1 菌株 MRS 发酵液分别接入牛津杯中,于厌氧培养箱中 37 °C 培养 3~4 天后,观察牛津杯周围是否有银色沉淀现象,据此定性判断试验菌株产胆盐水解酶的能力。

1.2.4 超声波细胞破碎条件对胆盐水解酶活力的影响 在超声波换能器功率分别为 600 W、700 W、800 W,3 s 间歇,5 s 工作,控制反应杯内温度 0~6 °C 条件下,持续工作时间分别为 10 min 和 15 min,以显微镜直接涂片计数法^[6]检测细胞破碎率,茚三酮显色法检测胆盐水解酶活力,采用完全交叉组合试验研究不同超声波细胞破碎条件对酶活力的影响。

1.2.5 产胆盐水解酶发酵条件的优化 根据初步单因素多水平试验结果,选择影响菌体生长和产酶较为显著的葡萄糖添加量、大豆蛋白胨添加量、发酵温度和接种量为正交试验因素,设计四因素三水平 $[L_9(3^4)]$ 正交试验(见表 1)。以普通 MRS 为基础培养基,其中葡萄糖和蛋白胨的用量按表 1 操作,以不同量接种后,分别于 32 °C、37 °C、42 °C 培养一定时间。每组合设 3 次重复。以胆盐水解酶反应液中氨基酸的吸光度值(A_{570nm})为试验测定指标,通过对结果的极差分析和方差分析确定其优化发酵条件。

1.2.6 胆盐水解酶活力测定方法。(1)发酵液中胆盐水解酶的提取。将 KL1 菌株按表 1 操作于不同发酵条件下培养 12 h 后,取发酵液置于 50 ml 离心管中,以 1000 0 r/min,4 °C 离心 15 min,弃上清液,菌体用 0.1 mol/L、pH6.5 的磷酸盐缓冲液离心洗涤 2 次(条件同上),弃上清液;加入 0.1 mol/L、pH6.5 的磷酸盐缓冲液摇匀,4

表 1 优化发酵条件正交试验设计因素水平表

水平	因素			
	A 葡萄糖添加量/%	B 大豆蛋白胨添加量/%	C 发酵温度/℃	D 接种量/%
1	2	1	32	1
2	3	2	37	2
3	4	3	42	3

℃冷藏 30 min, 将细胞悬浮液于冰浴中按 1.2.4 设计条件进行超声波破碎, 再以 10000 r/min, 4℃离心 15 min, 其上清液即为胆盐水解酶液。(2)胆盐水解酶与底物反应。取 0.1 ml 胆盐水解酶液, 加入 0.1 mol/L、pH6.0 的磷酸盐缓冲液 1.8 ml 和 0.1 ml 的 6 mmol/L 牛磺胆酸钠, 于漩涡混合器上振荡混匀 1min, 将混合液于 37℃振荡培养 40 min。(3)中止酶反应。酶反应完毕, 立即加入 80%三氯乙酸 0.1 ml, 充分混匀中止酶反应

1 min 后, 以 10000 r/min, 4℃离心 10 min, 上清液即为酶反应液^[7]。(4)酶活力的测定。胆盐水解酶活力的测定是通过结合胆盐降解后释放的氨基酸量的多少来衡量。即该酶活力与氨基酸的生成量成正比。可采用茚三酮显色法测定氨基酸的含量, 具体方法参见文献^[1]。

1.2.7 验证试验 将正交试验中优化发酵条件组合设为验证组, 普通发酵条件组合设为对照组, 验证比较产 EPS 最佳发酵条件的优越性。

表 2 牛津杯试验结果

培养基类型	银色沉淀现象
含胆固醇+牛磺胆盐 MRS 培养基(试验组 I)	+++
含胆固醇+牛磺胆盐+氯化钙 MRS 培养基(试验组 II)	+++
改良 MRS 培养基(对照组)	-

注: 表 2 中“++++、+++”表示牛津杯周围有不同程度的银色沉淀现象,“-”表示无沉淀现象。

2 结果与讨论

2.1 KL1 菌株产胆盐水解酶牛津杯试验

由表 2 可见, 在试验组 I 和试验组 II 中, 含有胆固醇与牛磺胆盐的 MRS 培养基表面牛津杯周围产生较多的银色沉淀, 而对照组的改良 MRS 培养基表面无沉淀产生, 由此表明 KL1 菌株能产生较高活力的胆盐

水解酶, 且有降低胆固醇的功效。这是因为该菌株产生的胆盐水解酶使结合态胆盐分解为游离态胆盐(胆酸), 并以游离态胆盐和氨基酸(牛磺酸或甘氨酸)的形式释放出来, 游离态胆盐与培养基中的胆固醇结合形成沉淀^[2], 故使牛津杯周围产生银色沉淀现象, 从而导致培养基中胆固醇含量的降低。

表 3 不同细胞破碎条件研究结果

超声波功率/W	总时间/min	细胞破碎率/%	检测 BSH 活性
600	10	50	-
	15	55	-
700	10	70	-
	15	80	+
800	10	80	-
	15	85	-

注: 表 3 中“+”表示检测破碎液有 BSH 活性,“-”表示无 BSH 活性。

2.2 超声波破碎条件对胆盐水解酶活力的影响

影响超声波细胞破碎的主要因素是功率、温度和工作时间^[8]。由表 3 可知, 在相同的工作时间条件下细胞破碎率随超声波功率的增加而增大。但是, 从发酵液中提取菌体细胞内的胆盐水解酶, 不仅要达到一定的细胞破壁率(≥80%), 还要保证破壁后的酶活性损失较小。由表 3 可见, 以 800 W 的功率破碎细胞时, 虽然细胞破壁率均达到要求, 但由于超声波功率较高使反应

杯内温度上升较快, 以致很难控制 0~6℃ 的温度范围, 从而导致对温度极敏感的 BSH 失去活性。以 700 W 的功率破碎细胞时, 3 s 间歇, 5 s 工作, 持续工作 10 min, 因细胞破碎率达不到要求而未检出 BSH 活性; 而以相同的破碎功率持续工作 15 min, 细胞破碎率达到 80% 的要求, 并可检出 BSH 活性。由此可见, 细胞破碎最适条件: 超声波功率为 700 W, 3 s 间歇, 5 s 工作, 持续工作 15 min, 控制温度范围 0~6℃。

表 4 优化发酵条件 L₉(3⁴)正交试验结果

试验号	因素				氨基酸 (A _{570nm})			
	A. 葡萄糖添加量/%	B. 大豆蛋白胨添加量/%	C. 培养温度/℃	D. 接种量/%	I	II	III	Tt
1	1	1	1	1	0.029	0.027	0.026	0.082
2	1	2	2	2	0.037	0.036	0.038	0.111
3	1	3	3	3	0.020	0.019	0.023	0.062
4	2	1	2	3	0.026	0.023	0.022	0.071
5	2	2	3	1	0.027	0.028	0.032	0.087
6	2	3	1	2	0.023	0.027	0.030	0.080
7	3	1	3	2	0.025	0.028	0.031	0.084
8	3	2	1	3	0.028	0.032	0.029	0.089
9	3	3	2	1	0.024	0.027	0.028	0.079
K ₁	0.255	0.237	0.251	0.248	Tr=0.239	Tr=0.247	Tr=0.259	T=0.745
K ₂	0.238	0.287	0.261	0.275				
K ₃	0.252	0.221	0.233	0.222				
K ₁ /9	0.0283	0.0263	0.0279	0.0276				
K ₂ /9	0.0264	0.0319	0.0290	0.0306		R _B >R _D >R _C >R _A		
K ₃ /9	0.0280	0.0246	0.0259	0.0247				
R	0.0019	0.0073	0.0031	0.0059				

注:表 4 中数据均为 n=3 之测定平均值。

表 5 方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	F _{α(0.05)}	F _{α(0.01)}
区组间	7.9 × 10 ⁻⁵	2	3.95 × 10 ⁻⁵	2.53		
A	7.48 × 10 ⁻⁵	2	3.74 × 10 ⁻⁵	2.36		
B	3.2 × 10 ⁻⁴	2	1.60 × 10 ⁻⁴	11.12**		
C	1.01 × 10 ⁻⁴	2	5.05 × 10 ⁻⁵	3.20	F _{α(0.05(2,16))} = 3.63	F _{α(0.01(2,16))} = 6.23
D	2.13 × 10 ⁻⁴	2	1.07 × 10 ⁻⁴	9.23**		
误差	2.528 × 10 ⁻⁴	16	1.58 × 10 ⁻⁵	—		
总变异	6.37 × 10 ⁻⁴	26	—	—		

2.3 产胆盐水解酶发酵条件的优化

由表 4 可知,以胆盐水解酶活力即酶反应液中氨基酸的吸光度值为试验指标,则 RB>RD>RC>RA,即大豆蛋白胨添加量是影响胆盐水解酶合成的最主要因素,接种量次之,发酵温度相对影响较小,葡萄糖添加量影响最小。又由表 5 方差分析可知,大豆蛋白胨添加量之间 F=11.12>F_{0.01(2,16)}=6.23,其差异对胆盐水解酶合成的影响高度显著;接种量之间 F=9.23>F_{0.01(2,16)}=6.23,其差异对胆盐水解酶合成的影响亦极显著;而葡萄糖添加量和发酵温度的差异对胆盐水解酶合成的影响不显著。

综上所述,大豆蛋白胨添加量是影响胆盐水解酶合成的最主要因素,接种量稍次之,发酵温度相对影响较小,葡萄糖添加量影响最小。

2.3.1 葡萄糖添加量对胆盐水解酶合成的影响 碳源的浓度对发酵产胆盐水解酶有明显影响。若碳源过于丰富,则易引起菌体异常繁殖,对菌体代谢、产物合成及氧的传递会产生不良影响。若产生阻遏作用的碳源,如

葡萄糖用量过大,则胆盐水解酶的合成受到明显抑制;反之,仅仅供给维持量的碳源,菌体生长和产物合成均停止,亦会影响胆盐水解酶的合成^[9]。由表 4 中 K_{A1}>K_{A3}>K_{A2}可知,最佳水平为 A₁,即培养基中葡萄糖的添加量为 2%时,有利于 KL1 菌株的生长和胆盐水解酶活力的提高。

2.3.2 大豆蛋白胨添加量对胆盐水解酶合成的影响 氮源的浓度对发酵产胆盐水解酶有极显著影响。如果一次性投入氮源过多,易引起菌体生长过盛而使培养基的营养成分过早耗尽,导致菌体过早衰老而自溶,缩短产物的分泌期^[10]。反之,若氮源浓度过低,菌体生长和产物合成均停止。由表 4 K_{B2}>K_{B1}>K_{B3}中可知,最佳水平为 B₂,即培养基中大豆蛋白胨的添加量为 2%时,有利于 KL1 菌株的生长和胆盐水解酶活力的提高。

2.3.3 发酵温度对胆盐水解酶合成的影响 温度是影响细胞生长繁殖和发酵产胆盐水解酶的重要因素之一。发酵温度不同,菌株的生长及其合成胆盐水解酶的产量亦明显不同。一般菌体浓度与合成胆盐水解酶的产

量成正相关。若发酵温度过低,菌体生长缓慢,菌体浓度不高,从而影响胆盐水解酶的产量。若发酵温度过高,菌体培养后期容易衰老而自溶,菌体浓度亦不高,也会影响胆盐水解酶的合成。而在 25~37 °C 范围内,培养乳酸杆菌的温度越高,菌体生长愈好。由表 4 中 $K_{C_2} > K_{C_1} > K_{C_3}$ 可知,最佳水平为 C_2 ,即 KL1 菌株的最适生长与合成胆盐水解酶的发酵温度为 37 °C。

2.3.4 接种量对胆盐水解酶合成的影响 接种量对合成胆盐水解酶的产量与活力有极显著影响。因为接种量的大小直接影响在定量培养基中菌体的生长速度或菌体浓度,进而影响菌体的生理状态和酶的产量。一般不同接种量对菌体生长与酶的合成的影响趋势基本一致。若接种量过低,则会引起菌体生长速度缓慢,亦不

利于菌体代谢,从而影响酶的产量。若接种量过高,会使菌体生长过快、菌浓过高,造成营养缺乏,不利于菌体生长和代谢。一般在 0.5%~3% 接种量范围内,酶的产量与活力随着菌体浓度的增加而提高。由表 4 中 $K_{D_2} > K_{D_1} > K_{D_3}$ 可知,最佳水平为 D_2 ,即 KL1 菌株的最佳接种量为 2%。

综上所述,该试验研究 KL1 菌株合成胆盐水解酶的最佳发酵条件,主要从酶的活力即降解结合胆盐产生氨基酸的量(吸光度值 A_{570nm})来考虑。经极差分析和方差分析,确定高产胆盐水解酶发酵条件的最佳组合是 $A_1B_2C_2D_2$,即葡萄糖添加量为 2%、大豆蛋白胨添加量为 2%、发酵温度为 37 °C、接种量为 2%。

表 6 发酵条件优化结果与初始发酵条件结果对照

发酵条件	葡萄糖添加量/%	蛋白胨添加量/%	发酵温度/°C	接种量/%	氨基酸(A_{570nm})
对照组	1	1 (鱼蛋白胨)	37	1	0.005
优化条件	2	2 (大豆蛋白胨)	37	2	0.037

注:表 6 中数据均为 $n=3$ 之测定平均值。

2.4 验证试验

由表 6 可见,在优化发酵条件下培养 *Lactobacillus casei* KL1 菌株时,产胆盐水解酶的活力显著提高,其酶反应液中氨基酸的平均吸光度值 A_{570nm} 为 0.037,而对照组酶反应液中氨基酸的平均吸光度值 A_{570nm} 为 0.005。因此,在优化发酵条件下,*Lactobacillus casei* KL1 菌株产胆盐水解酶活力是优化前的 7.4 倍。

3 结论

3.1 采用牛津杯试验检测 *Lactobacillus casei* KL1 菌株能产生较高活力的胆盐水解酶,且有降低胆固醇的功效。该菌株在含有胆固醇与牛磺胆盐的 MRS 培养基表面牛津杯周围产生银色沉淀现象。这是因为胆盐水解酶使结合态胆盐分解为游离态胆盐,并与培养基中的胆固醇结合形成沉淀,从而导致培养基中胆固醇含量的降低。

3.2 采用完全交叉组合试验确定超声波细胞破碎最适条件:超声波功率为 700 W,3 s 间歇,5 s 工作,持续工作 15 min,控制温度范围 0~6 °C,*Lactobacillus casei* KL1 菌株细胞破碎率能达到 80% 的要求,并可检出胆盐水解酶活性。

3.3 大豆蛋白胨添加量是影响胆盐水解酶合成的最主要因素,接种量稍次之,发酵温度相对影响较小,葡萄糖添加量影响最小。即影响胆盐水解酶合成的主次因素顺序为:大豆蛋白胨添加量 > 接种量 > 发酵温度 > 葡萄糖添加量。

3.4 采用四因素三水平 [$L_9(3^4)$] 正交设计,经极差分析

和方差分析,确定 *Lactobacillus casei* KL1 菌株高产胆盐水解酶发酵条件的最佳组合是 $A_1B_2C_2D_2$,即葡萄糖添加量为 2%、大豆蛋白胨添加量为 2%、发酵温度为 37 °C、接种量为 2%。

3.5 在优化发酵条件下,*Lactobacillus casei* KL1 菌株产胆盐水解酶活力是优化前的 7.4 倍。

参考文献

- [1] 刘慧,杜薇,张红星. 乳酸乳球菌乳酸亚种高产胆盐水解酶发酵条件的优化研究[J]. 食品科学,2006,27(11):322-326.
- [2] Liang, M. T. Bile salt deconjugation ability of lactobacilli strains[J]. *International Dairy Journal*,2005, 10: 91-98.
- [3] 王玉文,刘慧,李平兰. 产胆盐水解酶乳酸菌的分离、鉴定及降胆固醇机理的初步研究[J]. 食品科学,2006,27(10):215-218.
- [4] 赵佳锐,杨虹. 益生菌降解胆固醇的作用和机理研究进展[J]. 微生物学报,2005,45(2):315-319.
- [5] 天津轻工业学院,大连轻工业学院,无锡轻工业学院,等合编. 工业发酵分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000:84-86,370.
- [6] 刘慧. 现代食品微生物学实验技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2006:62-64,263-265.
- [7] Jean-Pierre Grill, Franc, OIS Schneider, Joel Crociani, Jean Bal-longue. Purification and Characterization of Conjugated Bile Salt Hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 15: 2577-2582.
- [8] 曹军卫,马辉文. 微生物工程[M]. 北京:科学出版社,2004:201-204.
- [9] 贺小贤,刘慧,杨辉. 现代生物工程技术导论[M]. 北京:科学出版社,2005:237-241.
- [10] 贺小贤. 生物工艺原理[M]. 北京:化学工业出版社,2003:180-181.