有机溶剂对黑曲霉 *Aspergillus niger* GIM 3.25 的毒性影响

王亚芬[1]，赵光磊[2]，袁琨[1]，李晓凤[1]
（1.华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）
（2.华南理工大学轻工科学与技术学院，广东广州 510640）

摘要：有机溶剂对微生物细胞的毒性作用会影响全细胞催化剂在有机介质中催化反应的效率和稳定性。本文研究了 11 种 logP 值不同的有机溶剂对黑曲霉 *Aspergillus niger* GIM 3.25 的孢子、菌丝球和催化效率的毒性作用，结果表明：所研究的有机溶剂中，甲醇、乙腈、甲苯、叔戊醇对微生物的孢子形态产生明显的改变；其中甲醇、乙腈、甲苯会导致孢子变形甚至破裂，叔戊醇致使孢子的形态完全变化，孢子的直径变小，表面变光滑。与对照组相比，有机溶剂还对 *Aspergillus niger* GIM 3.25 菌丝成球状况、菌丝质量和所成菌丝的催化效应产生损害作用，其中丙酮、异丙醇、异辛烷的毒性作用最低，甲醇、乙腈、氯仿毒性作用较高；氯仿甚至抑制了菌丝球的形成。有机溶剂对孢子和菌丝体的毒性作用未与有机溶剂的 logP 值呈现出相关关系。本研究将为推动真菌全细胞催化剂在非水介质中的广泛应用及具有溶剂抗性真菌菌株的筛选提供良好的依据和参考。

关键词：有机溶剂；毒性作用；生物催化；全细胞
文章篇号：1673-9078(2016)07-47-52 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.008

Toxic Effects of Organic Solvents on *Aspergillus niger* GIM 3.25

WANG Ya-fen[1], ZHAO Guang-lei[2], YUAN Kun [1], LI Xiao-feng[1]
(1.School of Food Sciences and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.College of Light Science and Industry, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The toxic effects of 11 kinds of organic solvents on microbial cell were investigated. It was found that methanol, acetonitrile and methylbenzene had evident toxic effects on the surface morphologies of *A. niger* spores, forcing the spores deformation and even rupture. After incubated with *t*-Amyl alcohol, the morphology of the *A. niger* spores showed significant changes in both surface and size. Organic solvents also affected the mycelium morphology, the growth of *A. niger* and their catalytic abilities. Methanol, acetonitrile and chloroform had the higher toxicities than other solvents, while acetone, isopropanol and isooctane had lower cell toxicities. No evident relationship between solvent toxicity and the log*P* values of the solvents was found in this research.

Key words: organic solvent; toxic effect; *A. niger*; catalytic ability

微生物全细胞催化剂是一种新型的绿色催化剂，采用完整细胞的整体酶系替代需分离纯化的酶。与纯酶法相比较，该方法不需要复杂的酶纯化和固定的过程，且回收和再利用都非常方便。相对于商业酶来说，全细胞催化剂既能有效节省资金成本，又能高效地保护生态环境；此外，全细胞催化剂能完整地保存内部辅助因子以及酶的分子结构，实现酶与酶之间的耦合作用，表现出对外部的环境更高的耐受能力[1~2]以及更高效的催化活力[3]。目前，已有多种多样的微生物菌种用于全细胞催化反应的报道。其中，曲霉类是研究比较多的一类全细胞催化剂俩元菌种。例如，研究表明黑曲霉可以产生 19 种脂肪酶，是一种理想的全细胞催化剂来源。

霉菌的生长状况与培养条件紧密相关，当置于固体培养基中静置培养时，真菌的菌丝会分枝生长，长成絮状；当置于液体培养基中振荡培养时，菌丝间碰撞接触的机率会大大增加，菌丝会彼此紧密地缠绕并凝聚成球，即真菌菌丝球体[4]。随着菌丝球的不断扩大、密实，致密的菌丝球结构会阻止菌丝球内外的物质交换过程，导致菌丝球中心发生自溶，形成典型的中空菌丝球结构。菌丝球的密度较大，菌体的比表面积大大增加，因此，菌丝球的沉降速度非常快，固液

收稿日期：
基金项目：国家自然科学基金（31270636）；中央高校基本业务费重点项目（2015zz111）
作者简介：王亚芬（1992-），女，研究生，研究方向：食品微生物
通讯作者：李晓凤(1977-)，女，博士，副教授，研究方向：食品质量与安全，生物催化与转化

分离操作步骤相对简单，且能有效地避免菌体流失[5~7]。随着培养时间增加，培养基内营养物质逐步降低，代谢分泌物不断增加，菌丝球最终会全部破碎[8]。

有机溶剂是一种常用的非水相介质，用于脂溶性化合物的转化反应。在由菌丝体制备成全细胞催化剂用于有机介质的反应过程中，有机介质可能会通过多种途径影响全细胞催化剂的活性。例如，有研究表明，有机溶剂可以通过改变霉菌孢子表面的电势以及霉菌的某些正常代谢活动，让菌丝无法正常成球[9]。它们还会影响细胞内各种连接酶的构象，破坏细胞膜并影响细胞的基础代谢，从而对细胞产生一定的毒害作用，毒性的大小由溶剂本身的性质和微生物遗传的生物结构共同决定的[10]。一方面，有机溶剂作用于细胞膜中的磷脂双分子层，改变膜的流动性和渗透性，导致质子和离子的渗透性突然增大，质子的动力不足，能量无法进行传导[11]，胞内的 pH 调控失去控制[12]，致使大分子渗透；此外，有机溶剂会直接作用于镶嵌在磷脂双分子层中间的蛋白质，使膜的流动性大大增加[13]，导致微生物的正常新陈代谢受到干扰，微生物失稳，甚至死亡。另一方面，一些耐受微生物体内存在一定的特异性耐受机制，包括细胞膜耐受机制[14]、细胞膜上的溶剂泵出机制[15]、细胞内的有机溶剂转化和降解机制[16]等，能使细胞内有机溶剂的含量低于致死阈值，从而具有一定的耐受性。有趣的是，细胞对不同有机溶剂的临界毒性浓度点非常相似，约为 200 mmol/L 左右[17]；膜上的溶剂浓度取决于水相中的溶剂浓度和有机溶剂的疏水性，而有机溶剂对微生物毒性差异性，主要取决于溶剂进入细胞膜的难易程度不同。目前，常用 log*P* 值作为有机溶剂的疏水常数，来表征有机溶剂的极性。研究人员已经针对酶和有机溶剂 log*P* 关系进行了大量的研究，发现强极性溶剂易破坏酶的结构，毒性作用较大，而弱极性的溶剂相对比较温和，表现的毒性作用也较小。然而，有关全细胞催化活性与有机溶剂毒性作用之间的关系的研究甚少，且由于微生物的耐受机制造成的溶剂毒性特异性，目前毒性相关机理尚不明确。为了使全细胞催化剂能更好地被应用于非水介质中的各种化学反应，研究有机溶剂毒性作用对微生物细胞活性的影响非常必要。

基于此，本文以黑曲霉细胞为研究对象，以非酯型儿茶素酰化反应为模型，探讨了有机溶剂对黑曲霉孢子、菌丝球和催化效率的毒性影响。本文所做研究有望为非水介质中的全细胞转化研究提供良好的参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

黑曲霉 *Aspergillus niger* GIM 3.25，购自广东省微生物菌种保藏中心。

1.2 主要试剂

甲醇、乙腈、丙酮、异丙醇、四氢呋喃、叔戊醇、氯仿、甲苯、石油醚、正己烷、异辛烷，均为市售分析纯。丙酸乙烯酯（Vinyl propionate，VP），纯度大于 98%，购自日本 TCI 公司；非酯型儿茶素（表没食子儿茶素 EGC、表儿茶素 EC），纯度高于 98%，购自南京景竹生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 全细胞催化剂制备方法

将黑曲霉接种于马铃薯葡萄糖琼脂斜面培养基（PDA）中，于 28 ℃的恒温培养箱中培养 60 h，连续活化两次后，用无菌水溶解孢子，制成孢子悬浮液（1×10^8/L），即得霉菌种子液。将种子液以 2%的体积当量接种发酵培养基中（5 g/L $(NH_4)_2SO_2$；1 g/L K_2HPO_4；0.2 g/L $MgSO_4\cdot7H_2O$；5 g/L酵母浸膏；5 g/L 大豆油），于 37 ℃、180 rpm的恒温摇床中培养 48 h，即得到霉菌的发酵液。将发酵液用双层 100 目的滤布过滤或用布氏漏斗进行抽滤，用蒸馏水反复冲洗多次，于-45 ℃真空冷冻干燥 24 h，得到的冻干菌体即为全细胞催化剂。

1.3.2 有机溶剂对黑曲霉孢子的影响

在全细胞催化剂的种子液制备阶段向 PDA 培养基中分别加入 1%体积当量的 11 中 log*P* 值不同的有机溶剂（甲醇，乙腈，丙酮，异丙醇，四氢呋喃，叔戊醇，氯仿，甲苯，石油醚，正己烷，异辛烷），待培养基凝固后，划线接种黑曲霉，用保鲜膜包好以免有机溶剂挥发，于 28 ℃恒温培养 60 h；当黑色的曲霉孢子形成后，用无菌水将培养基上生长出来的黑曲霉配制成霉菌的孢子悬浮液，置于-45 ℃中进行真空冷冻干燥；在干燥后的菌体粉末上涂上一层薄薄的金，用 Zeiss EVO18 扫描电子显微镜在 10000 伏的加速电压下进行二次电子模式分析。扫描电镜观察的放大倍数统一设为 4500 倍。

1.3.3 有机溶剂对霉菌菌丝球形成的影响

向发酵培养基中分别加入 1%体积当量的 11 种 log*P* 值不同的有机溶剂，接种正常培养的黑曲霉种子液，用保鲜膜封住锥形瓶瓶口放置有机溶剂挥发，置于 37 ℃恒温振荡培养 48 h，观察黑曲霉菌丝球的形成状况，拍照并记录。将菌丝球经布氏漏斗进行抽滤，

分开菌体和培养液，用蒸馏水对黑曲霉反复进行清洗后置于-45 ℃环境下进行真空冷冻干燥以去除多余的水分，得到冻干菌丝，称重得到菌体的质量；用所得的菌丝球全细胞催化非酯型儿茶素与 VP 的酰化反应，分析催化剂活性及反应效率。

1.3.4 有机溶剂体系对黑曲霉全细胞催化剂催化活性的影响

在 11 种不同 log*P* 值的有机溶剂中选择对非酯型儿茶素溶解性较高的有机溶剂作为黑曲霉全细胞催化非酯型儿茶素与丙酸乙烯酯反应的反应介质，用 24 h 后的底物转化率衡量有机溶剂对正常全细胞催化剂转化活性的影响。

2 结果与分析

2.1 有机溶剂培育对菌丝球形态的影响

黑曲霉的培养条件和方式对其菌落形成状况影响很大，固态静止培养会形成顶部带有黑色球形孢子的发达菌丝，液体振荡动态培养因会增加菌丝碰触的机会，促使菌丝相互缠绕形成了小球体，菌丝球的外表光滑、致密，阻碍了球体内外正常的物质交换，导致内部菌丝因缺乏足够的营养物质而发生自溶，因此，菌丝球呈典型的内部空心状态。

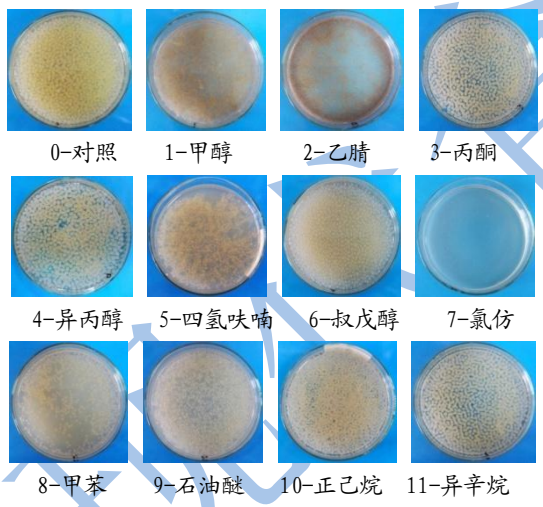


图 1 不同有机溶剂对黑曲霉菌丝成球的影响

Fig.1 The influence of different organic solvents on the mycelium balls of *A. niger*

注：培养皿的直径为6 cm。

有机溶剂对菌丝球的影响既表现在抑制菌丝的生长，使黑曲霉无法在发酵液中正常代谢致使菌丝产量少，又表现在会抑制曲霉菌丝成球、使培养液浑浊甚至出现絮状沉淀等非正常现象。有机溶剂的毒害作用由溶剂本身的性质和微生物遗传的耐受能力共同决定[18]。图 1 中 0 号是没有加入任何有机试剂的对照试验组，该组的培养基清亮，黑曲霉在外部振荡作用下可以缠绕、聚合成光滑的小菌丝球，球体数量很多，且颜色偏黄。3、4、11 号中的培养基清亮，菌丝球体表面光滑，直径略小于对照组，球体数量也少于对照组少。4、9、10 号中的菌丝球体直径约只有对照组的一半，但菌丝球体的数量很多，10 号培养液清亮，而 6、9 号的培养液浑浊。5、8 号的培养液略带浑浊，菌丝球数量明显少于对照组，其中 5 号菌丝球体的个体小、表面粗糙、大小不一，8 号菌丝球体的直径约为对照组的一半，但表面光滑。1、2、7 号明显受到了有机溶剂的抑制作用；1 号出现絮状沉淀，并伴有极少数的直径微小的褐色菌丝球体；2 号无絮状沉淀，形成了少量直径较小的褐色菌丝球体；7 号培养基清亮，无菌丝的生长。可见，所研究的有机溶剂中丙酮、异丙醇、异辛烷对黑曲霉球化的抑制作用最低，甲醇、乙腈、氯仿严重影响了黑曲霉菌丝成球化，其他溶剂都在一定程度上对黑曲霉菌丝球的形成起到毒性作用；然而，所研究有机溶剂的毒性作用与有机溶剂的 log*P* 值并未呈现出相关关系。

2.2 有机溶剂培育对黑曲霉菌丝球质量的影响

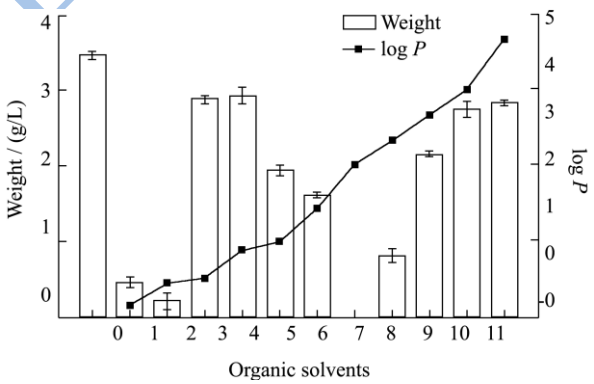


图 2 不同有机溶剂对黑曲霉菌丝体质量的影响

Fig.2 The influence of different organic solvents on the mycelium weight of *A. niger* cells

注：0-对照，1-甲醇，2-乙腈，3-丙酮，4-异丙醇，5-四氢呋喃，6-叔戊醇，7-氯仿，8-甲苯，9-石油醚，10-正己烷，11-异辛烷。

黑曲霉菌丝球的质量由球体的大小和密度共同决定。有机溶剂会对菌丝生长和球化过程产生抑制作用，从而无法形成正常的菌丝球。从图 2 可以看出黑曲霉的菌丝球的生长量与有机溶剂的 log*P* 并未出现线性关系；极性较大的甲醇（log*P*=-0.76）和乙腈（log*P*=-0.33）明显抑制黑曲霉的生长，但是极性同样大的丙酮（log*P*=-0.24）仅有轻微的抑制作用，极

性适中的氯仿和甲苯对黑曲霉的抑制作用显著，甲苯甚至完全抑制了黑曲霉的正常生长，其他有机溶剂对黑曲霉的生长过程都有一定程度的抑制作用，其中丙酮、异丙醇、正己烷、异辛烷的毒性最小；推测有机溶剂对黑曲霉生物量的影响与不同种类有机溶剂本身的性质相关。

2.3 有机溶剂培育对黑曲霉孢子形态的影响

为了进一步确定有机溶剂对黑曲霉全细胞的毒性作用机理，本实验接着通过 SEM 手段探测了有机溶剂对黑曲霉繁殖体孢子形态的影响。分别向 PDA 培养基中加入了 11 种 log*P* 不同的有机溶剂，接种正常的黑曲霉后，在适宜的条件下培养，直至黑曲霉长出大量的孢子，用无菌水洗下孢子后进行真空冷冻干燥，用扫描电镜进行分析。图中，扫描电镜的放大倍数均为 4500 倍。

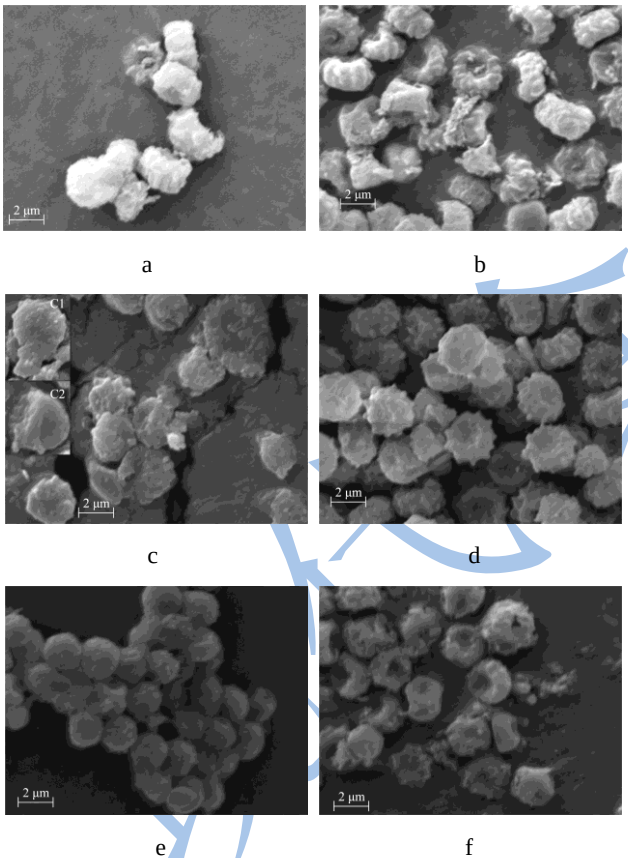


图 3 有机溶剂培育后的黑曲霉全细胞孢子图

Fig.3 SEM photographs of freeze-dried *A. niger* spores after incubated in organic solvents

注：a-对照组，b-甲醇，c-乙腈，d-丙酮，e-叔戊醇，f-甲苯。

图 3 中 a 是正常黑曲霉孢子的扫描电镜照片，因事先通过真空冷冻干燥脱水，图片中黑曲霉孢子表面呈现出轻微的、均匀的褶皱，两端向内凹，形成了扁平的“车轮”状，孢子的直径约为 3.2 um。图 b~f 分别展示了黑曲霉在五种带有机溶剂的 PDA 培养基中培育后的孢子的表面形态。c_1、c_2 分别是图 c 的局部采集图。可以看出黑曲霉孢子被极性较强的甲醇和乙腈培育后细胞形态破坏得最严重，经甲醇培育后，黑曲霉孢子的褶皱现象严重且大量的孢子的细胞胞膜发生了破裂，细胞结构被破坏；经乙腈培育后，黑曲霉的孢子褶皱程度适中，但孢子个体大小不一，大孢子的直径是正常孢子的一倍多，小孢子的直径不足正常孢子的一半，且如 c1、c2 所示，孢子明显出现了变形；在经相似 log*P* 的较强极性溶剂丙酮培育后，孢子生长得较好，褶皱程度适中，孢子的整体细胞形态与对照组的无异；在叔戊醇孵化体系中，黑曲霉的孢子的细胞形态发生显著的改变，直径明显变小，约 1.8 um 左右，孢子不再呈图 a 中的中心内凹的扁圆状“车轮”形，而呈现出中心略凹的近球形形态，且表面相对光滑，无明显的褶皱出现；经甲苯培育后的黑曲霉孢子直径相对变小，不再呈现从直径两端向内收缩的形状，而是从四面八方向内收缩，略成四方体的形状。在其他有机溶剂孵化的黑曲霉孢子形态状况与对照组相似，未出现典型的形态特征。可以看出，甲醇、乙腈、四氢呋喃、甲苯对孢子的形态的毒性较大，且在受到不同有机溶剂培育后黑曲霉孢子的表面形态与有机溶剂的 log*P* 值之间也未发现存在明显的关联关系。

2.4 有机溶剂培育对黑曲霉全细胞催化效率的影响

研究接着探讨了经不同种类有机溶剂培育后，所制备的黑曲霉全细胞在儿茶素酰化反应中的催化活性的变化情况。表 1 表明，经甲醇、乙腈培育后，黑曲霉振荡培养后即使生成了少量褐色的菌丝球，但所形成的全细胞的催化效果极低；经四氢呋喃、甲苯、叔戊醇培育后，菌丝球形态有明显的异常改变，全细胞的催化效果也随之大大降低；经 log*P* 值相对较高的石油醚、正己烷、异辛烷培育后，菌丝球形态变化程度不大，全细胞的催化能力也会被一定程度地抑制；经丙酮、异丙醇培育后，菌丝球形态仅发生了略微的变化，全细胞的催化能力受有机溶剂的抑制作用较轻。结合 2.1.1 和 2.1.2 的结果，可以看出黑曲霉在液态振荡培养过程中，全细胞的催化效果与菌丝球的形成状况密切相关，菌丝球形成状况好的组次对应的催化效率也相对高，菌丝球形成状况异常的组次对应的催化效率相对低；此外，除石油醚培育的黑曲霉全细胞之外，全细胞的催化效率与菌丝体的质量呈较明显的正相关的关系；以上发现均说明微生物全细胞的催化效

果在微生物培养过程中会受有机溶剂毒性作用的影响，不同有机溶剂的毒性作用与其种类有关，与溶剂的 log*P* 值并未呈直接的相关关系。

表 1 不同有机溶剂培育对黑曲霉菌丝全细胞催化活力的影响

Table 1 Acylation of non-gallated catechins by *A. niger* whole cells cultured in solvent-containing media

Solvents	log*P*	EGC		EC	
		V0/(mmol/h)	Conversion/%	V0/(mmol/h)	Conversion/%
Ck		35.63	95.73	33.29	94.15
Methyl alcohol	-0.76	NA	NA	NA	NA
Acetonitrile	-0.33	NA	3.2	NA	NA
Acetone	-0.24	29.83	91.24	30.76	90.71
Isopropanol	0.33	30.82	93.14	29.17	93.62
Tetrahydrofuran	0.49	13.75	32.15	14.28	30.82
Tert-amyl alcohol	1.15	18.75	50.73	17.84	48.23
Chloroform	2.0	NA	NA	NA	NA
Methylbenzene	2.5	19.83	40.27	17.36	38.71
Petroleum ether	3.0	26.83	74.28	22.84	69.62
n-hexane	3.5	28.74	83.21	28.70	82.38
Isooctane	4.5	27.93	88.74	27.66	86.42

注：NA表示未获得全细胞。

2.5 有机溶剂反应介质对黑曲霉全细胞催化剂活性的影响

表 2 不同有机溶剂体系中黑曲霉全细胞催化剂的活力

Table 2 Effect of solvents on *Aspergillus niger* whole cell catalyzed acylations of EGC and EC

Solvents	log*P*	EGC		EC	
		Solubility/(mmol/mL)	Conversion/%	Solubility/(mmol/mL)	Conversion/%
Methyl alcohol	-0.76	1605.30	95.98	824.49	96.20
Acetonitrile	-0.33	219.92	68.79	19.13	57.34
Acetone	-0.24	1802.42	55.68	1135.09	56.52
Isopropanol	0.33	282.04	95.08	70.85	95.04
Tetrahydrofuran	0.49	1694.14	74.18	1211.53	84.05
Tert-amyl alcohol	1.15	121.87	97.10	23.84	NA
Chloroform	2.0	25.04	NA	23.78	NA
Methylbenzene	2.5	6.15	NA	1.29	NA
Petroleum ether	3.0	6.16	NA	1.13	NA
n-hexane	3.5	9.32	NA	0.86	NA
Isooctane	4.5	6.42	NA	0.05	NA

注：反应体系为异丙醇，EGC、EC浓度为30 mmol/L，丙酸乙烯酯浓度为600 mmol/L，脂肪酶Lipozyme^{IM} RM用量为40 mg/mL，反应温度为50 ℃，振荡速度为200 rpm，反应时间为24 h，NA表示因溶解度较低，未测量。

底物在有机溶剂中的溶解性以及有机溶剂对全细胞催化剂的毒性作用是制约底物转化的两个关键因素。溶剂 log*P* 值、底物溶解性以及有机溶剂对全细胞的毒性作用均对催化效率产生较大的影响。表 2 中显示，在有机溶剂的 log*P* 值低于 2.0 时，EGC 能很好地溶解，在 log*P* 值低于 1.0 的有机溶剂中，EC 能有效溶解于甲醇、丙酮、异丙醇、四氢呋喃中，但溶解性并未随着 log*P* 呈现出线性关系，且在乙腈中的溶解度并不好。在甲醇中，EGC 和 EC 溶解度都很高，且底物转化率也很高，分别达到了 95.98%和 96.20%，说明甲醇是种很好的媒介溶剂；在异丙醇中，EGC 的溶解度明显高于 EC 的溶解度，且二者也均能实现较高的转化率，分别达 95.08%和 95.04%，说明异丙醇更易溶解羟基较多的底物，且异丙醇对催化剂的毒性作

用不大；叔戊醇对 EGC 的溶解度和转化率都很高，但对 EC 的溶解度较低；乙腈和丙酮对 EGC 的溶解度均较大，但已经对 EC 的溶解度较低，二者对全细胞催化剂的毒性均较强，会降低催化剂的的稳定性，影响催化活力，导致底物的转化率受到了抑制[19]。在 log*P* 值较高疏水性溶剂中，EGC、EC 基本不溶，热力学平衡难以向底物转化的方向进行。

3 结论

在非水介质中利用微生物全细胞作为催化剂时，有机溶剂对微生物细胞的毒性作用将显著影响微生物细胞催化反应的效率。通过研究不同有机介质对黑曲霉的毒性影响结果表明，甲醇、乙腈、甲苯、叔戊醇对微生物的孢子形态产生明显的改变，甲醇、乙腈、甲苯会导致孢子变形甚至破裂，叔戊醇致使孢子的形态完全变化，孢子的直径变小，表面变光滑。此外，有机溶剂还对黑曲霉菌丝成球状况、菌丝质量和所成菌丝的催化效应产生损害作用，其中丙酮、异丙醇、异辛烷的毒性作用最低，甲醇、乙腈、氯仿毒性作用很高，氯仿甚至抑制了菌丝球的形成。有机溶剂对孢子和菌丝体的毒性作用未与有机溶剂的 log*P* 值呈现出相关关系。在黑曲霉全细胞催化非酯型儿茶素酰化反应中，有机溶剂培育及作为介质时均就会对催化剂活性和反应效率产生显著影响。本研究将为全细胞催化的应用推广及理论研究均提供良好的参考和借鉴。

参考文献

[1] Oda M, Kaieda, M, Hama, et al. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production [J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 23(1): 45-51

[2] Arai S, Nakashima K, Tanino T, et al. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(1): 51-55

[3] Gog A, Roman M, Toşa M, et al. Biodiesel production using enzymatic transesterification -Current state and perspectives [J]. Renewable Energy, 2012, 39(1): 10-16

[4] Kelly S, Grimm L H, Hengstler J, et al. Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger* [J]. Bioprocess Biosystems, Engineering, 2004, 26(5): 315-323

[5] 董新姣,李娜.无花果曲霉菌丝球对刚果红的脱色研究[J].水处理技术,2007,33(8):41-43

[6] 王国惠.霉菌菌丝球对重金属Cr(Ⅵ)的吸附特性[J].中山大学学报(自然科学版),2007,46(3):112-116

[7] Cui Y Q, Lans R G J M, Luyben K C A M. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 55(5): 715-725

[8] 马放,张斯,山丹.黑曲霉Y3菌丝球培养基成分优化[J].中国环境科学,2008,28(11):989-993

[9] 吴晖,杨美艳,赖富饶,李晓凤.有机溶剂对米曲霉及荧光假单胞菌细胞毒性的研究[J].现代食品科技,2014,30(4):15-17

[10] Ramos J L, Duque E, Gallegos M T, et al. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria [J]. Annual Review of Microbiol, 2002, 56: 743-768

[11] Isken S, de Bont J. Bacteria tolerant to organic solvents [J]. Extremophiles, 1998, 2(3): 229-238

[12] Sikkema J, de Bont J, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons [J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(2): 201-222

[13] Weber F J, de Bont J. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 286(3): 225-245

[14] Heipieper H J, Neumann G, Cornelissen S, et al. Solvent-tolerant bacteria for bio-transformations in two-phase fermentation systems [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2007, 74(5): 961-973

[15] Ramos J L, Duque E, Gallegos M T, et al. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria [J]. Annual Review of Microbiology, 2002, 56: 743-768

[16] Fahy A, Ball A S, Lethbridge G, et al. High benzene concentrations can favour gram-positive bacteria in groundwaters from a contaminated aquifer [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65: 526-533

[17] Isken S, Heipieper H J. Encyclopedia of environmental microbiology: Toxicity of organic solvents to microorganisms [J]. New York: Wiley, 2002: 3147-3155

[18] Ramos J L, Duque E, Gallegos M T, et al. Mechanisms of solvent tolerance in gram- negative bacteria [J]. Annual Review Microbiology, 2002, 56: 743-768

[19] Ducret A, Trani M, Lortie R. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22(4): 212-216