

有机溶剂对米曲霉及荧光假单胞菌细胞毒性的研究

吴晖, 杨美艳, 赖富饶, 李晓凤

(华南理工大学食品与轻工学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文以米曲霉以及荧光假单胞菌为代表性霉菌及细菌型微生物, 通过对菌体生长量、菌丝球大小以及显微观察, 研究了常见有机溶剂对具有催化活性的微生物细胞的生长毒性。研究发现有机溶剂对真菌和细菌的毒性与其 $\lg P$ 值有密切关联关系, 且与具体的溶剂种类有关。在针对米曲霉的研究中, 正丙醇、叔丁醇和甲苯($\lg P$ 值分别为 0.55、0.80、2.5)对菌丝球的形成有一定的抑制作用; 当正丁醇与氯仿($\lg P$ 值分别为 0.82、2.00)存在时菌丝质量为 0, 即能完全抑制菌丝生长; 丙酮, 短链醇, 长链烷烃等的存在对菌丝体总质量(0.81 ± 0.07)和菌丝形态没有明显改变, 但对生殖期以及孢子形态有显著影响。对荧光假单胞菌而言, 正丁醇、氯仿、甲苯和辛烷($4.6 > \lg P > 0.8$)可以完全抑制菌体生长($OD_{560} < 1.17 \pm 0.05$), 其他溶剂存在时菌体生长与对照($OD_{560} = 2.27 \pm 0.05$)无显著差异; 此外, 有机溶剂会影响培养过程中细胞的形状和细胞间的排列方式。

关键词: 有机溶剂; 米曲霉; 荧光假单胞菌; 细胞形态; 细胞毒性

文章编号: 1673-9078(2014)4-15-20

Toxicity of Organic Solvents to Microbial Cells with Catalytic Activity

WU Hui, YANG Mei-yan, LAI Fu-rao, LI Xiao-feng

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Using *Aspergillus oryzae* and *Pseudomonas fluorescens* as representative types of mold and bacteria microbes respectively, the toxicity of commonly-used organic solvents to the cell growth of microbial cell with catalytic activities was investigated through measurement of microbe growth, hypha ball size and microscopic observation. It was found that the toxicity of organic solvent to fungi and bacteria has close relationship to its $\lg P$ value and also related to the type of solvent. For *A. oryzae*, n-propanol ($\lg P$ value 0.55), t-butanol ($\lg P$ value 0.80) and toluene ($\lg P$ value 2.5) inhibited the formation of the hypha ball. No mycelium formed when n-butanol ($\lg P$ value 0.82) and chloroform ($\lg P$ value 2.00) existed in the culture, indicating that they could completely inhibit the growth of hypha. Though the existence of acetone, short chain alcohols and long chain alkanes hardly changed the total mycelium quality (0.81 ± 0.07) and hypha morphology, they have significant effects on reproductive period and spore morphology. For *P. fluorescens*, the solvents with $\lg P$ values ranged in 0.8-4.6, including n-butanol, chloroform, toluene and octane, completely inhibited the growth of cells ($OD_{560} < 1.17 \pm 0.05$). Other solvents made no significant differences from the control ($OD_{560} = 2.27 \pm 0.05$) in the bacteria growth. In addition, organic solvent will affect the cell shapes and the arrangement of the cells in the process of culturing.

Key words: organic solvent; *Aspergillus oryzae*; *Pseudomonas fluorescens*; cell morphology; cytotoxicity

生物催化因具有选择性高、反应条件温和、环境友好的特性而成为生物技术领域中一个快速发展的领域。在过去的几十年中, 生物催化技术已经发展成为工业合成大宗化学品、医药中间体、活性药物等物质的重要工具, 并有望在医药、精细化工等领域取代传统的化学合成路径成为主要合成手段。全细胞生物催

收稿日期: 2013-10-23

基金项目: 广东省自然科学基金(S2013010012486); 广东省教育厅创新项目(2012KJGX0006); 新世纪优秀人才项目(NCET-12-0192); 中央高校基本科研业务费项目(2013ZM0044, 2013Z20068, 2013ZM0065); 广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室开放课题(201304)

作者简介: 吴晖(1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 李晓凤(1977-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 生物催化

化是指利用完整的生物有机体(即全细胞、组织甚至个体)作为催化剂进行化学转化的过程, 这种反应过程又称为生物转化。全细胞是生物催化剂的一种, (相对于酶法合成而产生)作为酶的天然载体, 可以省去酶分离纯化及固定化等步骤, 从而大大地降低生产成本。但对于一些工业上重要的化合物, 其底物或产物大多数是水溶解度差或几乎不溶于水的因此生物催化过程常受到底物溶解度低、底物/产物抑制生物催化剂活性、产物进一步降解等限制, 从而阻碍了生物催化技术在一些重要工业过程中的应用。为解决这些问题, 广大研究者将注意力转移到有机溶剂、水-有机溶剂两相体系、超临界流体、离子液体等非水相生物催化的研究中, 取得了很好的效果。

生物催化剂在非水介质中不仅能起催化作用,而且具有许多在水介质中不具备的新特点,比如非水介质中脂肪酶结构“刚性”增强,使其区域选择性和立体专一性等大大提高,增强了酶的热稳定性等;长期以来,人们认为非水介质对细胞有毒害作用,细胞在有机溶剂中不能存活。上世纪80年代末,有研究人员将细菌细胞置于有机溶剂体系中进行反应,发现细菌细胞可以在有机溶剂中存活。之后研究人员致力于对细胞的耐有机溶剂性质以及有机溶剂对细胞的毒害机理之研究^[1,2],同时有机溶剂的选择也成为全细胞非水相催化的研究热点。由于全细胞催化技术利用的是微生物在生长期分泌的一种或多种酶类,因此研究有机溶剂对微生物生长期间的细胞毒性对促进全细胞非水相催化的发展具有重要的意义。

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 是一种好气性真菌,属于半知菌亚门、曲霉属,菌丝一般呈黄绿色,后为黄褐色,培养适温为37℃。米曲霉的菌丝由多细胞组成,是一类产复合酶的菌株,除产蛋白酶外,还可产淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、植酸酶等,广泛应用于食品、饲料、生产曲酸、酿酒等发酵工业。荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 分类学上属于细菌域、变形菌门、 γ -变形菌纲假单胞菌目、假单胞菌科的假单胞菌属。细胞为直的杆菌,大小为0.7~0.8 \times 2.3~2.8 μm ,不产芽孢,革兰氏染色阴性。生长温度范围4~37℃,最适生长温度是25~30℃。广泛分布于自然界,如土壤、水、植物及动物活动环境中。该菌生化能力活跃,可降解许多人工合成化合物,常被用于环境保护。我们的前期研究表明,米曲霉及荧光假单胞菌均具有催化活性^[3,4]。本文分别以这两种微生物为代表,通过对菌体生长量、菌丝球大小以及细胞的显微镜观察,研究了非水相生物催化领域常见有机溶剂对其细胞生长的毒性影响。

1 材料与方法

1.1 材料

米曲霉 (*Aspergillus oryzae* 3.5232) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens* GIM1.209) 分别购自中国微生物菌种保藏中心 (CCGCC) 和广东省微生物研究所 (GDIM), 有机溶剂及其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌体的诱导培养及毒性试验

米曲霉: 从4℃保存的菌种斜面上用接种环勾取一环米曲霉菌丝于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 上,

28℃下培养60h, 得到成熟孢子。往平皿中加入10mL 无菌水, 用涂布棒从PDA上刮取米曲霉孢子, 6层无菌纱布过滤, 获得米曲霉孢子悬液。向500mL锥形瓶中加入100mL发酵液和2mL孢子悬液, 180 r/min, 28℃下培养48h后, 倒入培养皿中拍照, 观察菌丝球形态, 并随机取样进行显微镜观察。发酵液配方为: 0.1% (此处均为质量百分比) 酵母浸膏、0.5% (NH₄)₂SO₄、0.1% K₂HPO₄、0.02% MgSO₄·7H₂O、0.5% 吐温80。

荧光假单胞菌: 种子液 (m/V): 1%葡萄糖、1%牛肉膏、1%蛋白胨、0.5% K₂HPO₄、0.02% MgSO₄·7H₂O、0.5% NaCl、pH 7.0 \pm 0.1。发酵液 (m/V): 0.1% 酵母浸膏、0.5% (NH₄)₂SO₄、0.1% K₂HPO₄、0.02% MgSO₄·7H₂O、0.5% 大豆油、pH 7.0 \pm 0.1。从斜面勾取一环菌种至种子液中, 培养24h后接种到发酵液中, 接种量为2% (V/V), 参考文献^[25]的方法, 同时加入1% (V/V) 有机溶剂, 180 r/min, 30℃, 摇瓶培养48h后立即测定其OD₅₆₀值, 以空白发酵液为对照^[5]。

1.2.2 米曲霉干菌丝的制作以及菌体质量测定

将得到的菌丝培养液经布氏漏斗抽滤, 两倍培养液体积的蒸馏水冲洗菌丝, 且用布氏漏斗去除洗液。再用4℃丙酮浸没湿菌体约1min后, 抽滤去除丙酮, 反复操作两次, 以去除菌体表面的水分, 从而得到干菌丝, 称重得到菌体质量。

1.2.3 显微镜观察

从加有不同有机溶剂的培养基中取少量菌体于载玻片上, 加盖盖玻片后置于显微镜下观察。显微镜购自广州明美电子有限公司, 型号MD130, 米曲霉放大倍数为10 \times 40倍, 荧光假单胞菌为10 \times 100倍油镜。

1.3 数据统计分析

采用SPSS 10.0 和 Sigma Plot 10.0 进行数据处理, 平行组误差用误差棒表示。

2 结果与讨论

2.1 有机溶剂对米曲霉菌落的分布及细胞生长量的影响

有机溶剂往往在低浓度时即对微生物的生长都具有不同程度的毒性, 但其不同种类有机溶剂对细胞的毒性影响因素的研究甚少。在生物催化研究中, lgP 用来表示有机溶剂的极性参数。一般地, lgP 越低, 溶剂疏水性越弱, 对酶分子失活能力越强。因此, 常常用来推测有机溶剂对酶的毒性^[6]。因此本实验中尝

试用 $\lg P$ 参数来表征有机溶剂的疏水性对细胞生长的影响。

León R^[2]等揭示了细胞的生物活性与溶剂的 $\lg P$ 之间的关系,认为当有机溶剂的 $\lg P$ 低于临界点时,细胞无催化活性或者活性非常弱;大于此临界点时则显示出生物活性;临界点随着不同的微生物而不同。总的来说,有机溶剂的 $\lg P$ 低于 2 则不适合于生物催化系统,当 $\lg P$ 介于 2~4 时,微生物细胞的生物催化能力有较大的差异;相比之下在高 $\lg P$ 值有机溶剂中,微生物细胞显示出相对较高的催化活性。

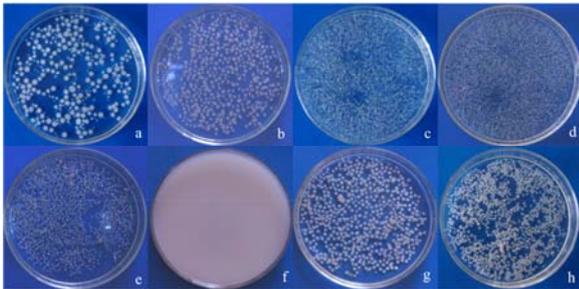


图 1 不同有机溶剂对米曲霉菌丝成球的影响

Fig.1 The influence of different organic solvents on the mycelium ball of *A. oryzae*

注: a~h: 对照、丙酮、正丙醇、叔丁醇、甲苯、辛醇、异辛烷、正庚烷。

从图 1a 中可以清楚地看到,有氯仿和正丁醇存在的情况下培养基清亮,无菌丝生长。对照中的米曲霉菌丝在外力持续震荡的作用下团聚成相对较大的光滑的球形,其间夹杂少许小的球体。图 1b、g、h 中菌丝球体体积小于对照,但球体分布密度稍大;图 1c、d、e 中菌丝球体体积很小且分布密度高。除了丙酮与正辛醇,当有机溶剂的 $\lg P$ 值小于 0.82 时,米曲霉菌丝在强极性溶剂的作用下难以团聚成大的菌丝球,当 $\lg P$ 值大于 2 时,有机溶剂极性较弱,菌丝体受其影响较小,仍能形成较大的菌丝球,但比对照小,说明弱极性的有机溶剂对米曲霉菌丝球的形成有一定影响,但影响不及强极性溶剂的大。图 1f 中出现了乳白色浑浊的现象,分析原因可能是正辛醇完全阻止了菌丝球的形成,使其均匀分布于培养基。

菌丝成球的内在生理因素研究近年来才刚刚起步。Braun和Vecht-Lifshitz认为,菌丝成球不仅仅是机械外力导致的,还可能是特定代谢活动引起的^[7]。丝状菌成球条件有种属差异,但人们普遍认可两种成球类型:孢子聚集型和非孢子聚集型(菌丝体聚集),米曲霉属于孢子聚集型。Li Z J^[8]等认为,菌球长到一定大小后在特定的搅拌速率下继续生长要耐受更大的流变压力,经过一段时间后菌球会改变形态以适应环境,比如变得更光滑。薛维纳等的实验也得到这一结论,黑

曲霉发酵时当小菌球持续在较高的搅拌压力下菌球变的光滑、致密,酶活较低^[9]。本实验在有机溶剂存在的情况下,米曲霉菌丝成球受阻,球体粗糙,其可能的原因有二:一是有机溶剂可能改变了米曲霉孢子的表面电势,从而阻碍其正常成球;二是有机溶剂的存在可能改变了米曲霉的某些代谢活动,影响其菌丝正常成球。

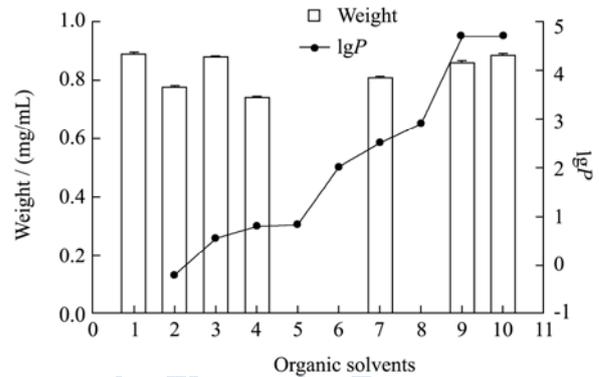


图 2 不同有机溶剂对米曲霉菌丝体质量的影响

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

注: 1~10: 对照、丙酮、正丙醇、叔丁醇、正丁醇、氯仿、甲苯、辛醇、异辛烷、正庚烷。

结合图 1 的结果,从图 1 中可以看出,米曲霉菌丝生长量与有机溶剂的 $\lg P$ 值没有呈现规律性的相关性。不过,除甲苯之外,有机溶剂的 $\lg P$ 值在 0.82~2.9 范围内对米曲霉的生长完全抑制,毒性最大。在这一范围,有机溶剂对荧光假单胞菌的毒性也是最明显的(图 5),说明有机溶剂对真菌与细菌的生长毒性无明显差异。在其它出现了菌丝生长的处理中,菌丝体质量相对对照无显著差异,说明丙酮、正丙醇、叔丁醇、甲苯、异辛烷和正庚烷对米曲霉的生长只有轻微的抑制作用。

2.2 有机溶剂对米曲霉菌丝形态的影响

正常的米曲霉菌丝体无色透明或呈明亮的颜色,但不呈暗污色;可育的分枝分生孢梗茎以大体垂直的方向从特化的厚壁的足细胞生出,光滑或粗糙,通常无隔膜;顶端膨大形成顶囊,具不同形状,从其表面形成瓶梗,或先产生梗基,再从梗基上形成瓶梗,最后由瓶梗产生分生孢子。从图 3d 可以看出,除叔丁醇的加入导致菌丝直径变小,且无明显分枝外,其他有机溶剂的加入对米曲霉菌丝形态无明显影响。

Martin^[10]在米曲霉工程菌发酵产重组脂肪酶时发现,在分批发酵中,菌丝直径由 2.8~2.9 m 增加到 4.0~4.4 m,直径增加了 1.5 m,尤其是菌丝尖端(被认为脂肪酶产生区),菌丝及尖端膨大的同时伴随脂肪

酶生成速率增加米曲霉野生菌株脂肪酶分批发酵中直径始终维持在 2.9 μm 为验证菌丝直径随生活史变化是否为该工程菌固有的生理特性, Martin 又做了分批补料麦芽糖实验,发现该菌株在产酶时期菌丝仍是变粗,由 1.0 μm 增加到 2.5 μm , 但给予氧胁迫后菌丝直径由 2.5 μm 变为 1.0 μm , 酶产量急剧下降。因此该菌株尖端膨大是跟产酶相关的, 当产酶受环境胁迫时, 菌丝直径即变小。Swapnil^[11]发现米曲霉分批补料发酵中, 通过控制碳源流加速率, 造成碳源限制可有效控制生物量及菌体形态。鉴于通过营养控制可以有效控制菌体形态及产酶量, 结合上面的实验结果, 可以考虑通过筛选不同的有机溶剂作为不同全细胞生物催化酰化反应的非水相溶剂, 来有目的的调控霉菌的产酶, 从而得到目的酰化产物。

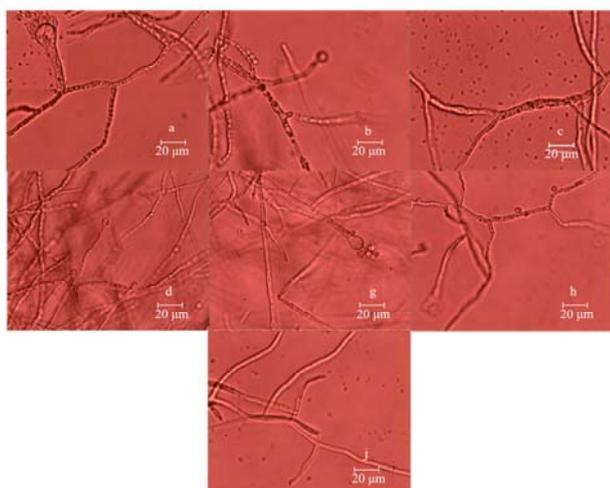


图3 有机溶剂对米曲霉菌丝形态的影响

Fig.3 The influence of organic solvents on the mycelial morphology of *A. oryzae*

注: a: 水, b: 丙酮, c: 正丙醇, d: 叔丁醇, g: 异辛烷, h: 正庚烷, j: 甲苯。

2.3 有机溶剂对繁殖期米曲霉细胞形态的影响

米曲霉正常的分生孢子头呈放射状, 直径 150~300 μm , 也有少数为疏松柱状。分生孢子梗 2 mm 左右。近顶囊处直径可达 12~25 μm , 壁薄, 粗糙。顶囊近球形或烧瓶形, 通常 40~50 μm 。小梗一般为单层, 12~15 μm , 偶尔有双层, 也有单、双层小梗同时存在于一个顶囊上。分生孢子幼时洋梨形或卵圆形, 老后大多变为球形或近球形, 粗糙或近于光滑。通过显微镜观察可以发现, 加入了正丁醇, 正辛醇和氯仿的发酵液清亮, 无任何菌丝生长; 在有菌体生长的发酵液中, 加入清水, 正庚烷和异辛烷的发酵液中有产孢结

构, 且正庚烷和异辛烷中产孢结构的梗基只生于顶囊的上部, 为畸形产孢结构^[12,13]; 而加入了丙酮和叔丁醇的发酵液中可见菌丝顶端膨大成球形, 但尚未形成产孢结构, 说明丙酮和叔丁醇并未完全抑制, 而只是延缓了米曲霉的生殖生长; 加入正丙醇和甲苯的发酵液中未见产孢结构。这就说明有机溶剂对米曲霉生殖生长是有影响的, 并且在有菌体生长的几个处理中, 随着所加入有机溶剂lgP值的增大, 有机溶剂对米曲霉生殖生长的抑制作用逐渐减小, 当溶剂lgP值达到 4.7 时, 米曲霉可正常进入生殖生长阶段。

有机溶剂对米曲霉菌丝形态影响不明显, 但对生殖生长却影响较大, 是因为菌丝生长的最适环境条件对其无性繁殖可能是最适的, 但对其有性繁殖一般不合适^[14]。

2.4 有机溶剂对荧光假单胞菌生长量的影响

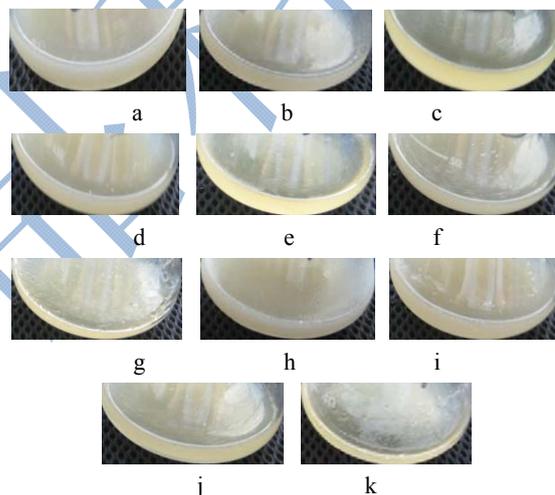


图4 有机溶剂对荧光假单胞菌生长量的影响

Fig.4 The influence of organic solvents to the growth of *P. fluorescens* cells

注: a: CK, b: n-propanol, c: n-butanol, d: t-butanol, e: isopentanol, f: n-heptane, g: octane, h: isooctane, i: acetone, j: chloroform, k: toluene。

图4表明了有机溶剂对细菌生长量的影响。对照中的发酵液呈均匀的乳白色, 为荧光假单胞菌发酵液在 30℃、180 r/min 下培养 48 h 后因细菌菌体生长而造成的乳白色浑浊。图中可以清楚看到, 分别加入了 1% (V/V) 正丁醇、氯仿、甲苯和正辛烷的四份培养基清亮, 没有出现类似空白对照中的浑浊; 加入了异辛烷与正庚烷的发酵液有浑浊现象, 但是浑浊程度不如对照。其他几种有机溶剂对发酵液浑浊度的影响不大, 即细菌的生长量影响不大。

图5通过对不同发酵液 OD₅₆₀ 值的测定, 直接证实了有机溶剂对荧光假单胞菌生长量的影响。从图中

可以看出,当有机溶剂的 lgP 小于等于 0.8 时,发酵液的 OD_{560} 值与对照差 ($OD_{560}=2.27\pm 0.05$) 异不显著,丙酮对真菌和细菌的毒性都较小,王振斌等在研究有机溶剂对肿瘤细胞的细胞毒作用时也发现丙酮对所研究的 3 株肿瘤细胞毒性较小;当 lgP 大于 0.8 时,发酵液的 OD_{560} 值随着 lgP 值增大而增大,即细菌的生长量随着所加入的有机溶剂极性的减小而增大,受溶剂的影响越小。当 $4.6 > lgP > 0.8$ 时,发酵液的 OD_{560} 值不到对照的一半,与对照差异显著,这与图 6 中的直观表现是一致的。但是荧光假单胞菌生长量受溶剂极性的影响也不是完全根据其 lgP 值的变化而变化的,例如所研究的异辛烷与正庚烷,虽然两者的 lgP 值相同(都为 4.7),但是发酵液发酵后的 OD_{560} 值却相差了约 1.0,两者对细胞生长量的影响差异显著;正丁醇与异丁醇,两者的 lgP 值均为 0.8,但是发酵液的 OD_{560} 值却相差了约 1.0,两者对细胞生长量的影响差异显著。因此在一定范围内,荧光假单胞菌的生长量随着 lgP 值的变化而有规律变化,但同时也与具体的有机溶剂种类相关。

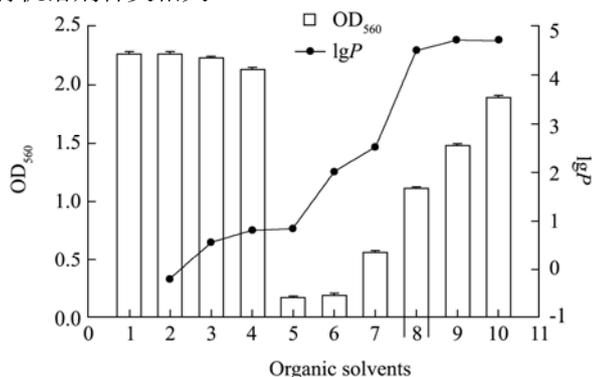


图 5 纯有机溶剂对荧光假单胞菌的毒性

Fig.5 Toxicity of pure organic solvents to *P. fluorescens*

注: 1~10: 对照, 丙酮, 正丙醇, 叔丁醇, 正丁醇, 氯仿, 甲苯, 辛烷, 异辛烷, 正庚烷。

2.5 有机溶剂对荧光假单胞菌细胞形态的影响

在前面的研究基础上,选取对细胞生长量影响最小(所培养微生物 OD_{560} 值最高 2.266)的丙酮 (lgP -0.23) 以及对细胞生长量影响最大(所培养微生物 OD_{560} 值较低 0.558)的甲苯 (lgP 2.5) 进行显微镜观察,以等量的无菌水为阴性对照,进一步研究有机溶剂对荧光假单胞杆菌细胞形态的影响,同时选取最利于发挥细胞催化活性的疏水性溶剂正己烷 (lgP 3.5) 为阳性对照。从图 6 可以看到,加入无菌水的细胞呈大小均一的杆状无规则分布,而加入 1%丙酮培养的

细胞长度呈数倍增长,宽度无明显变化;1%甲苯的存在对单个细胞本身的形态无显著影响,但多个细胞会头尾相连成一条条长链;正己烷对细胞生长无显著影响,即细胞毒性小,这从一方面证明了全细胞催化在正己烷为疏水溶剂时催化效率最高的原因^[15,16]。显微镜观察的结果表明,溶剂的极性越大越能促进细胞的伸长生长,极性越小,溶剂对细胞形态的影响越小。

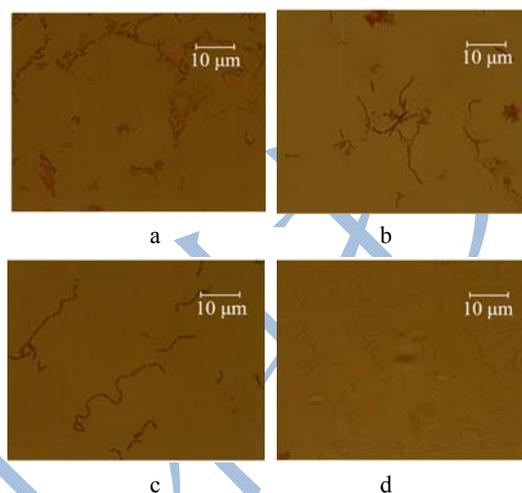


图 6 有机溶剂对荧光假单胞菌细胞形态的影响

Fig.6 Influence of organic solvents on cell shapes of *P. fluorescens*

注: a~d: 水、丙酮、甲苯、正己烷。

3 结论

本文研究了常见有机溶剂对两株具有酰化合成活性的微生物细胞的生长毒性。研究发现当有机溶剂的 lgP 值在 0.8~2.9 范围内时,其对真菌和细菌的毒性作用都是最强的;同时发现,但 lgP 值不是唯一的判断标准,该细胞毒性还与具体的溶剂种类有关。有机溶剂对米曲霉菌丝成球影响各异,但不影响菌丝体总质量,虽然其对米曲霉的菌丝形态没有明显改变,但对生殖期以及孢子形态有显著影响。对荧光假单胞菌来说,正丁醇、氯仿、甲苯和正辛烷可以完全抑制菌体生长,部分溶剂对细菌形态也有一定的影响。本文从直观的角度研究了有机溶剂对微生物的生长毒性,为全细胞的非水相催化更好的发展提供了细胞角度的论证。为了更好的解释这些表面现象形成的机理,胞壁的组成成分、疏水性以及表面电荷等因素的变化都值得深入研究。

参考文献

[1] Fernandes P, Ferreira B S, Cabral J M S. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics [J]. International Journal of Antimicrobial Agents,

- 2003, 22(3): 211-216
- [2] León R, Fernandes P, Pinheiro H M, et al. Whole-cell biocatalysis in organic media [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 23(7-8): 483-500
- [3] Li X F, Lu Z H, Liu H W, et al. Dependence of catalytic performance of a freeze-dried whole-cell biocatalyst of *Pseudomonas fluorescens* in regioselective acetylation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine on growth conditions [J]. Process Biochemistry, 2012a, 47(12):1826-1831
- [4] Li XF, Zhu Z, Zhao GL, et al. A novel biocatalytic approach to acetylation of 1-beta-D-arabino- furanosylcytosine by *Aspergillus oryzae* whole cell in organic solvents [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012c, 93(1):143-50
- [5] Matsumoto M, Mochiduki K, Kondo K. Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, 98(5): 344-347
- [6] Klivanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents [J]. Nature, 2001, 409(6817): 241-246
- [7] Braun S, Vecht-Lifshitz SE. Mycelial morphology and metabolite production [J]. TIBTECH, 1991, 9: 63-68
- [8] Li Z J, Shukla V, Fordyce A P, et al. Fungal morphology and fragmentation behavior in a fed-batch *Aspergillus oryzae* fermentation at the production scale [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 70(3): 300-312
- [9] 薛维纳, 储炬, 张超, 等. 液体深层发酵中丝状菌形态控制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 19(33):404-408
XUE Wei-Na, CHU Ju, ZHANG Chao, et al. Progress in research of morphology control of filamentous microorganisms in submerged fermentation [J]. Science and Food Industry, 2012, 19(33): 404-408
- [10] Martin B Haack, Lisbeth Olsson, Kim Hansen. Anna eliassonlantz. change in hyphal morphology of *Aspergillus oryzae* during fed-batch cultivation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70: 482-487
- [11] Swapnil Bhargava, Kevin S, Wenger MarkR. Pulsed feeding during fed-batch *Aspergillus oryzae* fermentation leads to improved oxygen mass transfer [J]. Biotechnology Progress, 2003, 19:1091-1094
- [12] 齐祖同. 中国真菌志 (第五卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1997
QI Zu-Tong. Chinese Fungi (Vol.5) [M]. Beijing: Science Press, 1997
- [13] 邢来君, 李明春. 普通真菌学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999
XING Lai-Jun, LI Ming-Chun [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999
- [14] 王振斌, 马海乐, 许文荣, 等. 有机溶剂对肿瘤细胞的细胞毒作用 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2005, 15(3):201-204
WANG Zhen-Bin, MA Hai-Le, XU Wen-Rong, et al. Organic Solvents Cytotoxic Effect on Cancer Cell [J]. Journal of Jiangsu University (medicine), 2005, 15(3): 201-204
- [15] 梁晓夏, 庞宗文, 梁静娟, 等. 生物催化合成熊果苷的微生物的筛选研究 [J]. 现代食品科技, 2007, 23(7):22-31
LIANG Xiao-xia, PANG Zong-wen, LIANG Jing-juan, et al. Screening of Microorganisms Catalyzing the Biosynthesis of Arbutin [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(7): 22-31
- [16] 冯广莉, 李晓凤, 张奔, 等. 混合溶剂中酶法催化合成木糖酯及其结构鉴定研究 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(6):1222-1226
FENG Guang-li, LI Xiao-feng, ZHANG Ben, et al. A New Method for Enzymatic Synthesis of Xylose Diester in Two-solvent Medium and its Structural Identification [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1222-1226