

耐盐高降解蛋白菌株的分离鉴定 及其降解条件的研究

孟宪刚,李玉梅,史美玲,吴 东

(兰州交通大学化学与生物工程学院,甘肃兰州 730070)

摘 要:通过耐盐实验和发酵实验,从餐饮废水中分离得到一株耐盐且高效降解蛋白的细菌(A-3),为了确定该菌株的最佳降解条件,选择培养基初始 pH、溶氧量、接种量和碳源 4 个影响因素进行降解实验。通过形态学、生理生化特征以及 16S rDNA 鉴定,将 A-3 初步鉴定为沙雷氏菌(*Serratia sp.A3*)。蛋白质降解实验结果表明:耐盐降解蛋白菌 *Serratia sp.A3* 最佳降解条件为:初始 pH7.0,溶氧量 180r/min,接种量 5%,蔗糖作为碳源可以促进菌株对蛋白质的降解。

关键词:蛋白质,降解条件,*Serratia sp.A3*

Identification and study on degradating condition of halophilous protein degradation strain *Serratia sp.A3*

MENG Xian-gang, LI Yu-mei, SHI Mei-ling, WU Dong

(College of Chemistry and Bioengineering Sciences, Lanzhou jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: A halophilous protein degradation bacteria A-3 was isolated from the restaurant wastewater by salt tolerance test and fermentation test. In order to determine the optimum conditions for the degradation of the strain, Four influencing factors such as initial pH, dissolved oxygen, inoculum size and carbon source were selected do degradation inoculation experiments. Based on morphologic observation, biochemical characteristic and identification of 16S rDNA, A-3 belonged to the genus of *Serratia sp.A3*. The results showed that: The strain *Serratia sp.A3* optimum degradation environmental conditions was pH7.0, dissolved oxygen 180r/min, 5% inoculum size, the Sucrose could promote the protein degradation of *Serratia sp.A3*.

Key words: protein; degradating condition; *Serratia sp.A3*

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)15-0180-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.15.030

近年来,随着我国服务性行业的快速发展和工业化进程的加快,餐饮业、乳品业等行业的规模也随着扩大,产生了大量的废液。其中,餐饮废水、乳品废水、马铃薯加工产生的废液中均含有大量的蛋白质等有机物。这类废水具有以下特点: a. 和其他有机物、无机物混杂在一起,处理难度大,处理成本高; b. 排放量大且无毒性,但如果这些废液不经过有效处理而排放到自然环境中,一方面浪费资源,另一方面会使水体富营养化,在温度过高时还会使水体发黑发臭,污染水源,污染空气,破坏生态平衡,影响人类身体健康。

含蛋白废水大多盐浓度较高,处理含盐废水经济有效的新技术是目前环保和科研的热点,其中生物法备受关注^[1]。目前,嗜盐及耐盐菌对高盐环境的

特殊耐受能力影起了人们极大的兴趣,它们不但在高盐环境中对物质的自然转化发挥着重要的作用,而且在高盐碱性污水的处理过程中表现出巨大的应用前景,嗜盐及耐盐菌分泌的相关酶类在工业中也有很广泛的应用^[2-3]。

本研究室从含盐量较高的餐饮废水中分离得到一株耐盐高降解蛋白菌,经鉴定为粘质沙雷氏菌。本实验主要研究了不同环境条件对该耐盐高降解蛋白菌降解率的影响,并对其发酵培养基进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品来源 兰州交通大学百苑餐厅废水、朝阳餐厅废水和玉兰餐厅废水。

1.1.2 实验仪器 手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器 上海精胜科学仪器有限公司; Z36HK 高速冷冻离心机 德国 Hermle 公司; 722S 可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; FA2004N 电子天平 上海精密科学仪器有限公司; PHS-25 型数显酸度计 上海精密科学仪器有限公司; SHB-A 多功能

收稿日期: 2013-12-12

作者简介: 孟宪刚(1974-),男,博士,教授,研究方向:工业微生物。

基金项目: 甘肃省 2011 年高校基本科研业务费; 甘肃省 2012 年财政厅生物技术专项基金。

恒温水浴振荡器 常州国华电器有限公司;SPX 型智能生化培养箱 宁波东南仪器有限公司;SW-CT-2G 型双人净化工作台 苏州净化设备有限公司。

1.1.3 培养基配方 富集培养基:酪蛋白 12g/L,蔗糖 30g/L, Na_2HPO_4 1g/L, NaCl 20g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, NaNO_3 2g/L, FeSO_4 0.01g/L。初筛培养基:酪蛋白 16g/L,蔗糖 30g/L, Na_2HPO_4 1g/L, KCl 0.5g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, NaNO_3 2g/L, FeSO_4 0.01g/L, pH7.0,琼脂 15~20g/L。基础发酵培养基:酪蛋白 10g/L,葡萄糖 7.5g/L,酵母膏 2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, NaCl 20g/L, pH7.0。种子培养基:葡萄糖 10g/L,蛋白胨 5g/L,酵母膏 5g/L, KH_2PO_4 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L, NaCl 20g/L, pH7.0。

1.2 实验方法

1.2.1 耐盐高降解菌株的筛选 富集:将采集的餐厅废水样品混合,摇匀后,取 10mL 样品混合液加到 50mL 无菌水中,充分振荡,取上清液 5mL 接种于富集培养基中,20℃、180r/min 摇床振荡培养 24h。

分离:取 5mL 的上述富集液,加入到 45mL 的无菌水中稀释 10 倍,并按此稀释倍数稀释至 10^{-9} ,选择 10^{-6} ~ 10^{-9} 稀释度分别涂布在牛肉膏蛋白胨培养基平板上(每一梯度 5 皿),置于 20℃ 恒温培养箱中培养 48h,观察菌落形态,并对菌落形态特征各不相同的菌株进行分离纯化三次(每次三皿)。

初筛:分别挑取上述分离得到的形态特征各不相同的典型单菌落采用三点法点接于初筛平板培养基中,观察菌落直径和透明圈的大小,以 HC 值,即透明圈直径与菌落直径的比值作为标准。将比值较大的菌落进行分离纯化后,结合明胶液化实验,筛选出 HC 比值较大且明胶液化程度较高的菌作为初筛菌株。

复筛:

a.耐盐菌株的筛选:将初筛菌株活化后,按浓度梯度稀释至 10^{-7} ,选择 10^{-5} ~ 10^{-7} 稀释度分别涂布在不同盐浓度(NaCl 浓度:0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%)的平板上(每一梯度 3 皿),于 20℃ 培养 72h,比较初筛菌株耐盐性的大小;

b.高降解蛋白菌株的筛选:将初筛菌株活化后,接于种子液培养基中,置于 20℃、180r/min 摇床振荡培养 24h,再将种子液以 2% 的接种量转接于基础发酵培养基,于 20℃、180r/min 摇床振荡培养 48h,通过考马斯亮蓝法测定吸光值,根据蛋白质降解率公式,计算出蛋白降解率,作为判断待测菌株对蛋白分解能力强弱的标准^[4]。

蛋白降解率(%) = (降解前酪蛋白含量 - 降解后酪蛋白含量) / 降解前酪蛋白含量 × 100

计算公式如下:

结合耐盐实验,筛选出耐盐性好且蛋白降解率高的菌株作为目标菌株,接入斜面保藏培养基,做好标记,于 20℃ 培养 48h 后,置于 4℃ 冰箱保存。

1.2.2 蛋白质标准曲线 在 595nm 波长下测定吸光度,以吸光度值为纵坐标,蛋白质含量为横坐标,绘制蛋白质标准曲线^[5]。

1.2.3 菌株鉴定 形态特征鉴定:在牛肉膏蛋白胨平板培养基上培养菌株,观察菌落形态;经涂片、固定后,在光学显微镜(10×40)下观察菌体形态。

生理生化鉴定:参照文献^[6],设计生理生化鉴定实验,主要包括 V-P 实验、吲哚实验、甲基红实验、 H_2S 的生成实验、 H_2O_2 酶的产生、氧化酶实验、硝酸盐还原实验、酪蛋白水解实验等。

16S rDNA 分子鉴定:

a.细菌基因组 DNA 的提取 根据细菌总 DNA 提取试剂盒(Tiagen)的操作手册进行提取。

b.细菌 16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增 16S rDNA 基因 PCR 扩增的两个引物分别选用的是细菌鉴定用的通用引物 27F: 5' - AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG - 3' 和 1492R: 5' - GGTTACCTTGTT ACGACT - 3'。PCR 反应体系为:双蒸水 33.5μL,模板 DNA 2.5μL,引物(1mmol/L)各 2μL, Taq DNA 聚合酶 1μL, dNTPs (25mmol/L) 4μL, 10 × Taq buffer (含 Mg^{2+}), PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 45s, 55℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 75s, 30 个循环后 72℃ 温育 10min。PCR 的产物由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。将菌株的 16S rDNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析。

1.2.4 培养条件对菌株降解蛋白能力的影响 分别测定不同培养时间、不同 NaCl 浓度、不同碳源、不同初始 pH、不同溶氧量和不同接种量对菌株 *Serratia sp.*A3 降解率的影响。培养时间为 0、6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72h; NaCl 浓度分别为 1%、3%、5%、7%、9%,加入发酵培养基中的碳源分别为淀粉、蔗糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖;初始 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0;转速为 120、150、180、210、240r/min;接种量为 1%、2%、3%、4%、5%、6%。

2 结果与分析

2.1 蛋白质标准曲线的测定

采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。以蛋白质含量为横坐标, OD_{595} 为纵坐标,绘制蛋白质标准曲线见图 1。

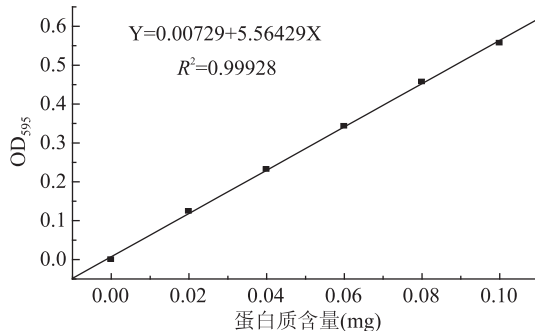


图1 蛋白质标准曲线

Fig.1 Standard curve of protein concentration

得到蛋白质浓度与 OD 值之间的关系方程如下: $y = 0.00729 + 5.56429x$ ($R^2 = 0.99928$)。式中 y 为吸光度 OD 值, x 为蛋白质含量,通过测定待测样品的吸光度,就可计算出蛋白质含量。

2.2 菌株分离、鉴定

2.2.1 初筛 将采样的餐饮废水经多次富集、稀释后,涂布在分离平板培养基上,20℃恒温培养后得到典型的23株菌株,再将上述菌株涂布于初筛培养基上,培养48h后测量透明圈直径(H)与菌落直径(C),筛选出HC比值较大且明胶液化程度较高的10株菌,作为初筛菌株。

2.2.2 复筛 将初筛的10株菌分别进行耐盐实验及蛋白质降解实验(图2)。耐盐实验结果表明,初筛后的10株菌,只有G-1、B-3、E-3、I-1、A-3五株菌能够在NaCl浓度为10%的培养基上生长。

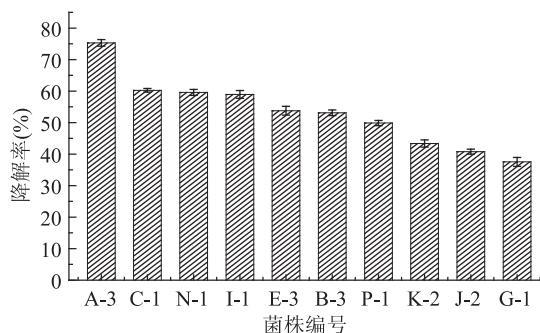


图2 菌株蛋白降解率的比较

Fig.2 Protein-degrading rate of strain

图2表明,在耐盐程度较高的5株蛋白质降解菌中,菌株A-3降解率最高,达到75.31%。因此将A-3作为进一步研究的目的菌株。

2.2.3 菌种鉴定

2.2.3.1 形态特征 经富集、分离筛选后最终获得一株编号为A-3的优势菌株。将其涂布在分离培养基上,20℃下培养2~3d后,观察到菌落形态呈灰白色,圆形,表面湿润黏稠、不透明,稍隆起,易挑取,边缘整齐,菌落直径较小(图3)。经涂片后,在显微镜下观察该菌形态,菌体呈球状或球杆状,极似球菌。

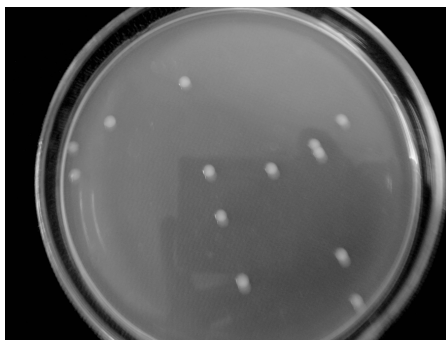


图3 A-3的形态特征

Fig.3 morphology of A-3

2.2.3.2 生理生化特征 菌株A-3的生理生化鉴定结果见表1,参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰细菌鉴定手册》,可将菌株A-3初步鉴定为沙雷氏菌属。

2.2.3.3 16S rDNA 鉴定 将筛选得到的菌株A-3的16S rDNA进行测序,获得长度约为1438bp。将该测序结果提交于genbank,获得登录号为KF864660。与NCBI上已有的序列进行比对,共得到五株相似性最

高的菌株(表2)。通常认为,当16S rDNA序列的同源性小于97%时属于不同的种,当同源性小于93%时属于不同的属^[7]。比对结果显示,菌株A-3与*Serratia marcescens strain C1*、*Serratia marcescens strain N4-5*、*Serratia marcescens strain DOAB*、*Serratia marcescens sp.RN29*、*Serratia sp.PRGB11*相似性分别为99.72%、99.58%、99.65%、99.37%、99.57%。结合生理生化鉴定,菌株A-3为沙雷氏菌(*Serratia*)。

表1 菌株K-1生理生化特性

Table 1 Physical and biochemical characteristics of strain K-1

实验项目	结果	实验项目	结果
革兰氏染色	-	碳源生长利用:	
接触酶	+	D-葡萄糖	+
明胶液化实验	+	L-阿拉伯糖	-
淀粉水解	-	D-木糖	+
甲基红实验	-	D-甘露醇	+
V-P实验	+	蔗糖	+
硝酸盐(还原)实验	-	乳糖	-
硫酸盐(还原)实验	-	D-山梨醇	-
硫化氢产生实验	-	纤维二糖	+
吲哚实验	-	麦芽糖	+
利用柠檬酸盐	+	鼠李糖	-
利用丙酸盐	-	葡萄糖产气	-
苯丙氨酸脱氨酶	-	2% NaCl 生长实验	+
赖氨酸脱羧酶	-	5% NaCl 生长实验	+
精氨酸双水解酶	-	7% NaCl 生长实验	+
鸟氨酸脱羧酶	-	10% NaCl 生长实验	+

注:能生长或阴性:-,不能生长或阳性:+。

表2 A-3与其他相关菌株的

16SrDNA的序列相似性

Table 2 16SrDNA sequence similarity between A-3 and other related strains

登录号	菌株	相似度
GU220796	<i>Serratia marcescens strain C1</i>	99.72
EF035134	<i>Serratia marcescens strain N4-5</i>	99.58
JX103452	<i>Serratia marcescens strain DOAB</i>	99.65
KC790287	<i>Serratia marcescens sp.RN29</i>	99.37
EF195344	<i>Serratia sp.PRGB11</i>	99.57

2.3 菌株降解蛋白过程中pH的变化

图4可知,*Serratia sp.A3*在降解蛋白的过程中,培养基pH先降低然后再升高。0h时,pH为7.0,18h时pH降到最小值5.23,随着时间的增长,pH逐渐升高,培养达到72h时,pH为8.74。这可能是在培养前期,菌体利用营养物质快速生长,同时产生各种有机酸等酸性物质,使培养基pH下降,随后,菌体生长进入稳定期,主要利用营养成分来产生各种代谢物分解相应的底物,产生碱性物质,导致pH变大。

2.4 培养条件对菌株降解蛋白能力的影响

2.4.1 时间对菌株降解率的影响 将活化菌液按2%的接种量接入装有150mL基础发酵培养基

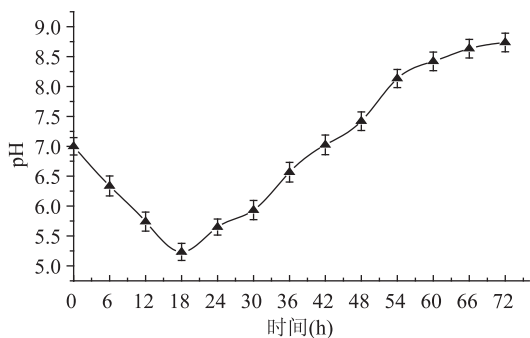


图4 *Serratia* sp.A3 降解过程中 pH 的变化

Fig.4 *Serratia* sp.A3 degradation process of pH changes

(pH7.0)的三角瓶中,20℃,180r/min 摇床培养。0、6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72h 取样,测定 OD₅₉₅,计算蛋白降解率。

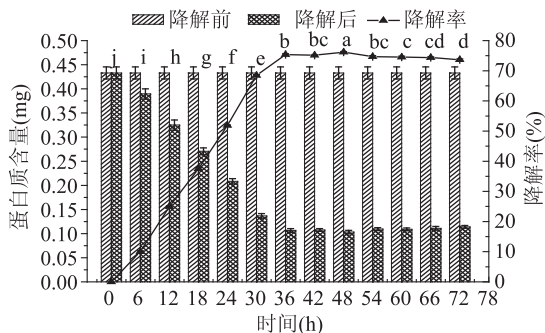


图5 时间对 *Serratia* sp.A3 降解率的影响

Fig.5 Effect of time on degradation rate of *Serratia* sp.A3

注:图中不同小写字母表示差异显著($\alpha = 0.05$),图6~图10同。

图5可知,随着时间的延长,*Serratia* sp.A3 的降解率逐渐增大,在48h时降解率达到最大值76.17%,这是由于培养前期,菌体利用营养成分快速生长,产生的蛋白酶量较小,待后期菌体生长稳定后,菌株主要进行产酶代谢,产生大量蛋白酶用于降解蛋白质,因此降解率迅速增大。经数据统计,在36~72h降解过程中,时间对降解率的影响不显著。

2.4.2 NaCl 对菌株降解率的影响 盐浓度会改变菌体生长环境的渗透压,结果表明(图6),NaCl 浓度过高,外界渗透压也增大,致使微生物原生质膜上的离子种类和数量发生了变化^[8],从而抑制了菌株的生长和蛋白酶的产生,蛋白降解率随着 NaCl 浓度的升高而降低。

2.4.3 碳源对菌株降解率的影响 由图7可知,*Serratia* sp.A3 对蔗糖的利用率最高,在以蔗糖为碳源时,降解率达到77.51%,经数据统计表明,在以蔗糖和葡萄糖为碳源时,对菌株 *Serratia* sp.A3 蛋白降解率的影响不显著。

2.4.4 pH 对菌株降解率的影响 pH 会改变底物分子和酶的带点状态,从而影响酶和底物的结合。图8结果表明,菌株 *Serratia* sp.A3 在 pH 为7.0时降解率为74.55%,在6.5~7.0的范围内,pH 对降解率的影响

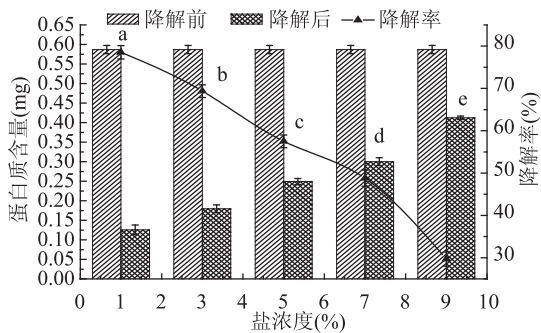


图6 NaCl 浓度对 *Serratia* sp.A3 降解率的影响

Fig.6 Effect of NaCl concentration on degradation rate of *Serratia* sp.A3

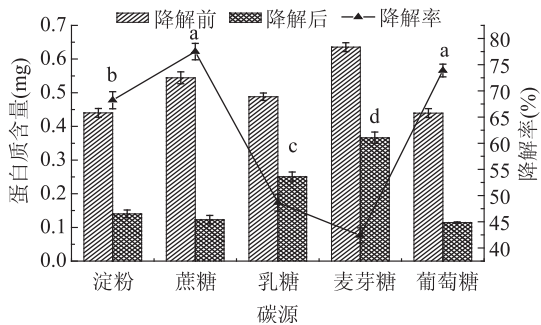


图7 碳源对 *Serratia* sp.A3 降解率的影响

Fig.7 Effect of carbon sources on degradation rate of *Serratia* sp.A3

不显著。而过高或过低的 pH 会破坏蛋白酶的空间结构,从而引起酶活性的降低甚至完全丧失^[9],进而使蛋白降解率降低。

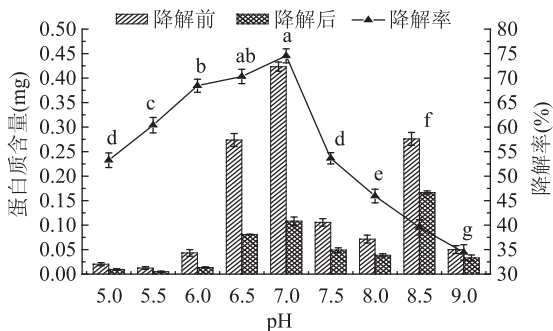


图8 pH 对 *Serratia* sp.A3 降解率的影响

Fig.8 Effect of pH on degradation rate of *Serratia* sp.A3

2.4.5 溶氧量对菌株降解率的影响 摇床转速直接影响发酵培养基中的溶氧水平,而培养基中氧浓度的高低直接影响微生物的生长及目标产物的代谢积累^[10]。因此,溶氧量可以通过摇床的转速来控制,转速越快,溶氧量越大。将种子液按2%的接种量接入培养基中,分别置于120、150、180、210、240r/min 摇床震荡培养48h。

如图9所示,*Serratia* sp.A3 在180r/min 时,蛋白降解率为75.53%,当转速增大,溶氧量浓度也随着升高,细胞间产生竞争抑制,菌体生长受抑,蛋白降解率降低。

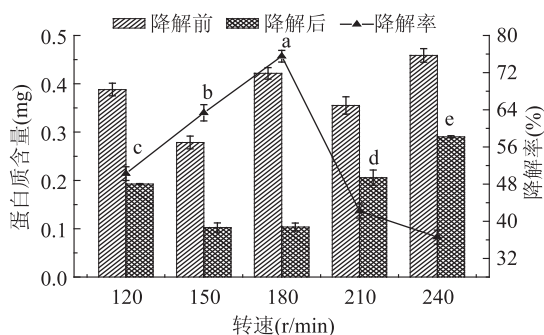


图9 溶氧量对 *Serratia* sp.A3 降解率的影响

Fig.9 Effect of dissolved oxygen on degradation rate of *Serratia* sp.A3

2.4.6 接种量对菌株降解率的影响 图10表明,接种量为1%时,培养基内菌种数量较低,导致菌株适应期延长,蛋白降解率较低。随着接种量的增大,蛋白降解率逐渐升高,当接种量为5%时,*Serratia* sp.A3蛋白降解率达到80.56%,但接种量太多又会导致每个菌体得不到充足的碳源和能源,从而导致反应速率降低^[11],蛋白降解率下降。

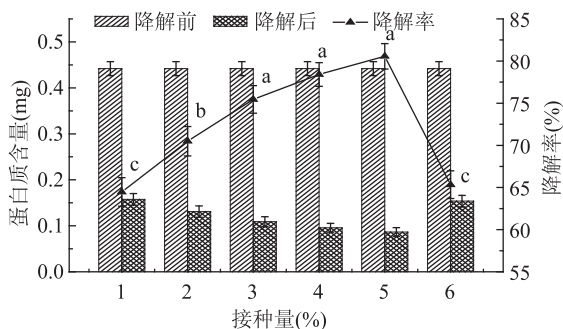


图10 接种量对 *Serratia* sp.A3 降解率的影响

Fig.10 Effect of inoculum on degradation rate of *Serratia* sp.A3

3 讨论与结论

沙雷氏菌属于肠杆菌科,是一类兼性厌氧杆状细菌,广泛分布于自然界,一般存在于土壤、水、植物叶片、动物以及人类的肠道和呼吸道中。沙雷氏菌可分泌多种胞外酶,如核酸酶、蛋白酶、脂肪酶及几丁质酶等^[6,12]。研究表明,粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* HR.3 可以分泌金属蛋白酶^[13]。另外还有相当一部分具有致病性的沙雷氏菌菌株能分泌胞外蛋白酶^[14]。

现已报道的耐盐蛋白降解菌包括真菌毛霉^[15]以及细菌微球菌^[16]、枯草芽孢杆菌^[9]、乳酸菌^[17]等,目前还没有关于耐盐沙雷氏菌的研究。作者对从餐饮废水中筛选出能够耐盐高效降解蛋白的粘质沙雷氏菌 *Serratia* sp.A3 的基础发酵培养基进行优化,并对环境条件对蛋白降解率的影响进行了研究,得出菌株 *Serratia* sp.A3 最适降解环境条件为 pH6.0~7.0,溶氧量 180r/min,接种量 5%,降解时间 48h;碳源是微生物生长代谢所必需的营养物质,不同类型的细菌对不同的碳源利用不同,同一种细菌在不同碳源上

也会表现出不同的代谢能力。为了提高蛋白降解率,应选择对蛋白酶有诱导作用,而无阻遏作用或者阻遏作用小的物质作为碳源^[18]。研究结果表明,以蔗糖为碳源时会促进菌株 *Serratia* sp.A3 对蛋白的降解。在优化的发酵条件下(培养时间、碳源、初始 pH、溶氧量、接种量),菌株 *Serratia* sp.A3 蛋白降解率达到 80.56%。

参考文献

- [1] 李俊叶,王筱兰,邹峥嵘.耐盐菌的筛选及初步鉴定[J].安徽农业科学,2011,39(11):6658-6660.
- [2] 任培根,周培瑾.中度嗜盐菌的研究进展[J].微生物学报,2003,43(3):427-431.
- [3] 赵百锁,杨礼富,宋蕾,等.中度嗜盐菌在生物技术中的应用[J].微生物通报,2007,34(2):359-362.
- [4] 徐速,刘晓辉,张列兵,等.降解乳蛋白菌株的分离筛选与鉴定[J].中国乳品工业,2008,36(4):18-20.
- [5] 李宗根.生物化学与生物技术[M].北京:人民卫生出版社,2003:251.
- [6] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [7] 王全富,缪锦来,李光友,等.南极微生物产低温蛋白酶菌株的筛选、分子鉴定及部分酶活特性[J].中国水产科学,2005,12(4):437-444.
- [8] 陈梅梅,钱文,田生,等.耐盐石油降解菌性能及降解条件优化[J].油气田环境保护,2012,22(3):7-9.
- [9] 苗兰兰,曹龙奎,吴泽柱.永川豆豉中高产蛋白酶菌株的筛选鉴定及液体培养条件的研究[J].农产品加工:学刊,2009(5):66-69,90.
- [10] 滕超,李秀婷,朱运平.传统豆豉中高产蛋白酶葡萄球菌的筛选及其产酶条件优化[J].江苏农业科学,2012,40(10):305-308.
- [11] 吕志萍,程龙飞.石油污染土壤中石油含量对玉米的影响[J].油气田环境保护,2001,11(1):36-7.
- [12] Garrity GM, Bell JA, Liburn TG. Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition[M]. 北京:科学出版社,2004:453-454.
- [13] Tao K, Long ZF, Liu K, et al. Purification and properties of a novel insecticidal protein from the locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3[J]. Curr Microbiol, 2006, 52(1):45-49.
- [14] Kim N, Kim SI. Characterization and primary specificity of an extracellular metalloproteinase from *Serratia marcescens*[J]. Can J Microbiol, 1994, 40(2):120-126.
- [15] 李华,沈立荣,冯凤琴,等.传统细菌型豆豉中优势菌株的蛋白酶酶活研究[J].粮油加工,2009(12):180-183.
- [16] 江洁,吴耘红,蒋继丰,等.豆豉中微球菌的分离及其产蛋白酶特性研究[J].中国调味品,2004(5):22-24,34.
- [17] 宋国亮,张忠华,熊骏,等.元阳豆豉中高产蛋白酶乳酸菌的筛选及其产酶条件的研究[J].中国微生物学杂志,2011,23(1):8-12.
- [18] 陈鸿图.高产中性蛋白酶菌株选育及产酶特性研究[D].广州:华南理工大学,2012.