

固定化脂肪酶生物反应器 催化合成乙酸正己酯

闫倩云¹, 李玲玲¹, 丛方地^{1,*}, 刘海臣², 周学永¹, 邢克智¹, 孔新月¹, 赵 瑞¹

(1. 天津农学院基础科学学院, 天津 300384;

2. 内蒙古民族大学生命科学院, 内蒙古通辽 028042)

摘要:为提高非水相酶促合成食品添加剂乙酸正己酯的效率,以羧甲基纤维素为稳定剂,通过物理吸附,将假单胞菌脂肪酶 *Pseudomonas cepacia* lipase 固定在锥形瓶内壁上,制备成简易的生物反应器,并研究了其用于催化合成乙酸正己酯的动力学。结果表明,在反应器中,加入己醇与乙酸乙烯酯的混合液,并在 37℃、150r/min 下摇动,反应即开始;反应液倒出,则反应停止,无需过滤。反应 7h,相对于酶粉,反应器中的固定化酶,可使反应转化率提高 7 倍,48h 后,转化率达 99%。经 10 次循环催化、共 10d 与有机相的接触,仍保留有 52% 的转酯活性;同样条件下,不添加羧甲基纤维素的固定化酶,仅有 12.8% 的活性。可见,这种反应器操作方便,能有效提高酶的非水活性和稳定性,适于催化非水相反应。

关键词:乙酸正己酯,假单胞菌脂肪酶,固定酶生物反应器,非水相

Catalyzed synthesis of hexyl acetate in immobilized lipase bioreactor

YAN Qian-yun¹, LI Ling-ling¹, CONG Fang-di^{1,*}, LIU Hai-chen²,

ZHOU Xue-yong¹, XING Ke-zhi¹, KONG Xin-yue¹, ZHAO Rui¹

(1. College of Basic Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. College of Life Sciences, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028042, China)

Abstract: To efficiently improve lipase-catalyzed synthesis of food additive hexyl acetate in nonaqueous phase, a simple bioreactor was prepared by immobilizing *Pseudomonas cepacia* lipase on inner wall of conical flask via physical adsorption and with carboxymethyl cellulose as stabilizer, and used in catalyzed synthesis of hexyl acetate. Results showed that the reaction began after hexanol and vinyl acetate added in this reactor at 37℃ and 150r/min, and the reaction stopped once reaction mixture powered off it. Comparing with lipase power, the immobilized lipase in bioreactor could cause 7-fold increase in transesterification conversion rate of hexanol reacting with vinyl acetate after 7h. After 48h, the conversion achieved more than 99%. Moreover, stability of lipase also was obviously strengthened for CMC-stabilized immobilization. After ten times of catalyzed recycles, total ten days of contacting with organic phase, CMC-stabilized immobilized lipase still kept 52% of transesterification activity. And under the same of conditions, water-modified immobilized lipase only left 12.8% of transesterification activity. It was obvious that the reactor was not only easy in operation but also available in enhancement of enzymatic activity and stability, fitting in nonaqueous catalysis.

Key words: Hexyl acetate; *Pseudomonas cepacia* lipase; immobilized enzyme bioreactor; nonaqueous phase; nonaqueous phase

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)09-0171-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.09.029

低分子量的脂类具有浓郁的水果香味,是食品行业常用的食用香精,如,乙酸正己酯具有香蕉香味,可用于饮料、甜点和烘烤食品中^[1]。乙酸正己酯的传统工业生产采用化学催化剂,如浓硫酸、金属盐、超强酸等,在较高温度下催化合成,但是通常会

有副产物,并不可避免地造成环境污染^[2-4]。因而,环境友好的生物催化方法,特别是非水相酶催化合成,更受到人们青睐。如,超临界条件下的脂肪酶酶催化、固定化脂肪酶酶催化转酯、吸水剂辅助固定化脂肪酶酶催化等^[5-7]。在近乎无水的非水相中的酶催

收稿日期: 2014-07-24

作者简介: 闫倩云(1991-),女,学士,从事生物制药方向的研究。

* 通讯作者: 丛方地(1968-),男,博士,副教授,从事生物催化方向的研究。

基金项目: 天津市国家级大学生创新创业训练计划项目(201310061017);国家自然科学基金项目(31070478)。

化反应,不但反应条件温和,而且副反应减少,非常有利于催化在水相中不稳定的底物分子^[8-9]。脂肪酶的催化特性是界面催化作用,即在水/油(有机相)上,表现出优异的催化作用,但在有机相中催化活性明显降低,且活性的稳定性差^[10-11]。因为脂肪酶的活性部位通常被一段 α -螺旋覆盖,被称为盖子结构^[12]。在界面上,脂肪酶一方面可以被水相优化,保持优势蛋白构象;另一方面盖子被有机相打开,使之具有较好的催化活性,即所谓的界面活化机制^[13]。在纯有机相中,酶蛋白通常会被有机溶剂变性而失活,因而活性偏低、且不稳定^[11]。所以,提高非水相酶促合成乙酸正己酯的效率,应模拟脂肪酶的界面活化机制,提高酶的催化活性。为此,我们在已有研究的基础上^[5-6,14],以羧甲基纤维素(Carboxymethyl cellulose,CMC)为稳定剂,通过物理吸附,将脂肪酶 *Pseudomonas cepacia* lipase (PCL) 固定在锥形瓶内壁上,形成一种简易的生物反应器,并用于催化己醇与乙酸乙酯的转酯反应,收到了较好的催化效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

PCL 酶粉 购于日本天野制药株式会社 (33U/mg);CMC 由施瑞客(天津)生物技术有限公司提供;正己醇、乙酸乙酯及其他试剂 皆为分析纯。

固定化操作和催化反应所用仪器为恒温摇床 HZQ-X,哈尔滨;动力学分析仪器为气相色谱仪 仪盟 A90,上海;配有氢火焰检测器和毛细管柱 (SE-30 30m $\times$ 0.32mm $\times$ 0.33 μ m)。

1.2 PCL 生物反应器的制备方法

参考以前的研究^[15-16],选择 PCL 作为转酯催化剂。为实验方便,选用 10mL 的锥形瓶作为固定化容器。加入 10mg 的酶粉和 0.2mL 的水(或 0.05% 的 CMC 水溶液),在摇床中,固定化条件为:敞口、37℃、150r/min、10h,恰好可以使酶均匀地吸附在锥形瓶的内壁上,形成简易的固定化 PCL 酶生物反应器。

1.3 反应器催化转酯及活化方法

固定化 PCL 酶生物反应器中,加入一定体积的正己醇与乙酸乙酯的混合物,盖磨口塞并用封口膜密封,在摇床中,在 37℃ 和 150r/min 的条件下催化反应。反应液一旦倒出反应器,反应即刻停止,反应液无需过滤,即可用于分析。反应器用少量石油醚冲洗后,可继续用于下次催化反应。多次使用后的反应器,经石油醚洗涤后,再加入 0.2mL 水,重复

前述固定化方法,可使衰减的酶活性重新恢复。

1.4 转酯动力学分析方法

反应器中,转酯反应一段时间后的反应液,取出 20 μ L,用 0.5mL 的正己烷稀释,用于气相色谱(Gas chromatography,GC)分析。如果是酶粉催化,用 0.25 μ m 的滤膜过滤,取出 20 μ L,用 0.5mL 的正己烷稀释,用于气相色谱分析。气相色谱条件,氮气为载气(0.4MPa,分流比 20:1)。分析程序:135℃ 保留 1min,以 50℃/min 升温到 200℃,并保留 2min。进样和检测温度分别为 280℃ 和 300℃。底物的转化率,通过比较正己醇和乙酸正己酯的峰面积得出^[17]。

2 结果与讨论

2.1 PCL 生物反应器与反应体系

因为酶是蛋白质,具有亲水性,因此酶在玻璃壁上吸附牢固,用于催化反应时,在 150r/min 的条件下,摇动的有机相不能将酶从瓶壁上剥落,优于酶在非极性载体上的固定化,酶与非极性载体结合不够牢固,容易在使用中脱落^[14];当然,这种反应器不适于催化水相反应。反应底物为正己醇,在 PCL 酶催化下,与酰化试剂乙酸乙酯转酯生成乙酸正己酯,同时生成的乙醇醇自发异构为乙醛,借此拉动反应不可逆地进行^[5]。该无溶剂非水反应体系,没有水的参与和生成,所以不必考虑溶液 pH 影响。反应后减压蒸馏,即可除去剩余的乙酸乙酯和乙醛,得产物。使用 10mg 的 PCL 酶粉,首先催化 2mL 反应液反应 12h,根据转化率,并考虑到尽可能地减少酰化试剂的用量,确定正己醇和乙酸乙酯的体积比为 1:1(表 1)。然后,在这个比例下,改变它们的用量,根据转化率,并考虑到尽可能地提高酶催化反应液的体积,确定反应液中正己醇和乙酸乙酯的体积皆为 1.5mL(表 2)。同时,从转化率可以看出酶粉的活性较低(表 1)。

2.2 PCL 固定化中水的作用

根据脂肪酶的界面活性和已报到的研究,可知酶的活性与其构象密切相关,而酶构象与其结合的必需水分子的数量相关^[14,17-18]。进一步的研究揭示,必需水分子的作用是维持酶蛋白的正确构象,以激活酶^[19]。以此为依据,我们以少量水为溶剂,通过固定化操作,将 10mg PCL 吸附在锥形瓶内壁上,多余的水分经挥发除去。结果表明,在反应前期,酶生物反应器中的 PCL 催化反应 7h,底物转化率为 39.9%,相对于酶粉催化反应底物转化率 5.4%,提高了 7 倍多;生物反应器催化反应 48h,转化率 $\geq$ 99%,而酶粉

表 1 底物体积比对转化率的影响

Table 1 Effect of substrate volume ratio on conversion

正己醇:乙酸乙酯(v:v)	1.1:0.9	1.0:1.0	0.9:1.1	0.8:1.2	0.7:1.3	0.6:1.4
转化率 c(%)	9.0	11.5	11.6	10.5	10.5	10.1

表 2 反应液体积对转化率的影响

Table 2 Effect of reaction solution volume on conversion

正己醇 + 乙酸乙酯(mL)	0.5 + 0.5	0.75 + 0.75	1.0 + 1.0	1.25 + 1.25	1.5 + 1.5	1.75 + 1.75
转化率 c(%)	13.8	12.1	11.6	11.5	11.2	10.8

催化反应的转化率 < 20% (图 1)。从气相色谱图可以看到,两种形式酶的活性差别显著,7h 后,PCL 生物反应器中,2.23min 处的产物乙酸正己酯的峰较大,而酶粉催化的反应体系中,产物峰不明显(图 2)。如果将酶从器壁上小心地刮掉,用于催化反应,酶的活性类似于固定化酶;或者向使用多次、活性衰减的固定化酶中,加入少量水,重复固定化操作,酶的非水活性可以重新激活。这说明,酶激活,主要是水的修饰作用。固定化时,水的作用类似于界面上水相的作用,优化了酶的构象;用于催化时,反应液相当于界面上的有机相的作用,酶活性部位上的盖子被打开,表现出较高的催化活性^[13]。即酶生物反应器催化非水反应,相当于分步模拟了脂肪酶的界面活性。然而,由于不存在水油界面,这种模拟,却难于长期保持其催化活性,这种固定化 PCL,在催化 24h 后,再次催化时,从底物的转化率来看,催化活性降低幅度较大,催化转酯反应的转化率平均每次降低 8.3%,10 次催化、共 10d 与有机相的接触,催化活性仅为最初的 12.8% (最后一次催化底物转化率 11.1% 与首次催化底物转化率的比率 86.6%) (图 3)。原因是,酶长时间与有机相的接触,酶必要的水分子被有机相带走,而被变性,失去优势构象,因而活性降低^[11]。显然,要维系酶的活性,就要进一步稳定酶的优势构象。

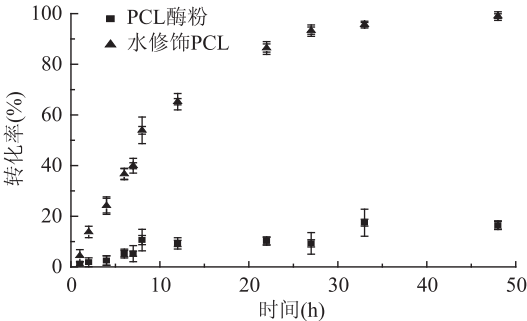


图 1 PCL 酶粉与水修饰固定化 PCL 的催化动力学
Fig.1 Kinetics of transesterification catalyzed by native and water-modified immobilized PCL

2.3 CMC 对 PCL 活性的稳定化

从蛋白质涂层微晶研究得到启示,可以使用水性大分子稳定 PCL 构象^[20]。基于 CMC 的水溶性和大分子结构^[21],CMC 被选作稳定剂,用于稳定 PCL 的优势构象,延长其催化活性。经实验发现,CMC 浓度过低不足以维持酶的构象,浓度过高会阻碍底物分子进入活性部位,0.2mL 0.05% CMC 的溶液适合固定化使用(表 3)。在固定化时,用 0.2mL 0.05% CMC 溶液代替同体积的水,用于固定化 PCL,则得 CMC 稳定化的 PCL 酶生物反应器。与单纯使用水固定化相比,CMC 稳定化的 PCL 固定化酶的催化反应动力学与之相近,即活性相近(图 4)。但是 CMC 使

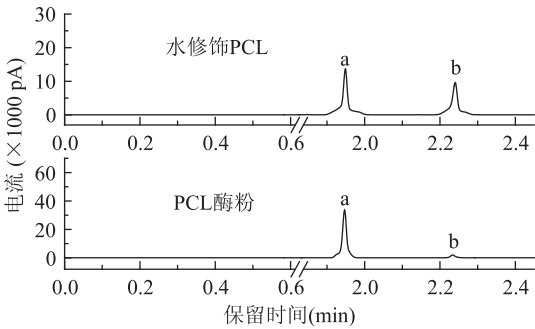


图 2 PCL 酶粉与水修饰 PCL 催化反应体系的 GC (7h)
Fig.2 GC analysis on reaction mixture catalyzed by water-modified and native PCL after 7 h
注:a.正己醇 1.94min;b.乙酸正己酯 2.23min。

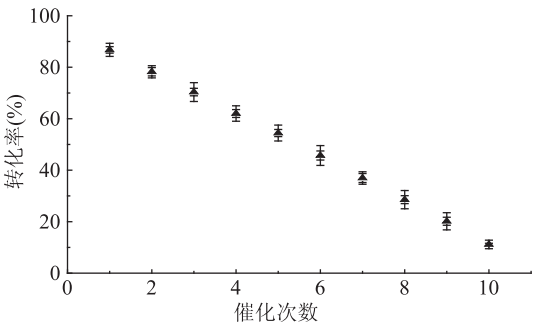


图 3 水修饰 PCL 催化转酯反应转化率(24h/次)
Fig.3 Conversions of reactions catalyzed by water-modified immobilized PCL for 24h each time

酶在有机相中的稳定性明显升高,24h 的催化后,再次催化时,酶催化活性的衰减明显降低,催化反应转化率平均每次降低 4.7%,10 次催化、共 10d 与有机相的接触,催化活性仍保留最初的 52% (最后一次催化底物转化率 46.0% 与首次催化底物转化率的比率 88.6%) (图 5)。气相色谱图显示,每次催化 24h,第 10 次催化后,仅用水修饰的 PCL 催化转酯合成乙酸正己酯的色谱峰较弱,而 CMC 稳定的 PCL 催化转酯合成乙酸正己酯的色谱峰依然较强(图 6)。可见,相对于仅使用水固定化,CMC 稳定化的 PCL 酶生物反应器,其催化作用的稳定性明显升高;同样,多次使用后,酶活性也可通过加入 0.2mL 水,重复固定化操作,使之恢复。这种酶生物反应器制备方便,操作简便,催化活性和稳定性不亚于报道的固定化酶^[22]。相对于酶在非极性材料上的固定化^[14,23],这种 CMC 稳定的固定化酶更为稳定;从界面活化机理的角度来看^[13],这种酶固定化及其在非水相中的应用,是对脂肪酶界面活性的分步模拟,第一步通过固定化以水分子优化和 CMC 稳定化酶的构象,第二步依靠反应相的疏水作用打开酶活性部位上的盖子,激活酶;可见,制备的固定化脂肪酶生物反应器具有更大的应用潜力。

表 3 CMC 浓度对转化率的影响(催化反应时间 24h)

Table 3 Effect of CMC concentration on conversion(reaction catalyzed for 24h)

CMC 浓度 (%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.10
转化率 c (%)	86.9	83.9	84.7	89.6	93.4	87.7	89.9	79.0	80.0

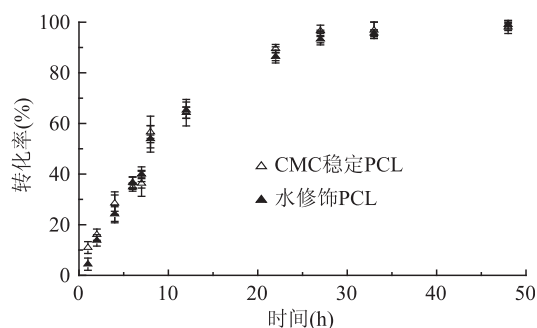


图4 CMC 稳定与水修饰固定化 PCL 的催化动力学

Fig.4 Kinetics of transesterification catalyzed by CMC-stabilized and water-modified immobilized PCL

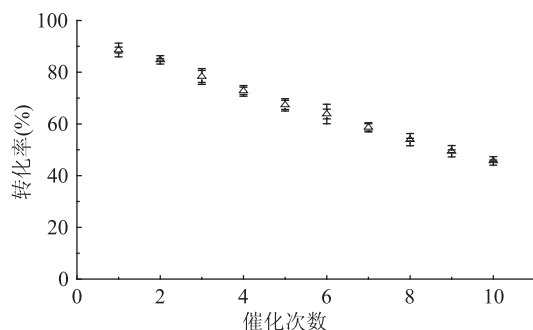


图5 CMC 稳定 PCL 催化转酯反应转化率(24h/次)

Fig.5 Conversions of reactions catalyzed by CMC-stabilized immobilized PCL for 24h each time

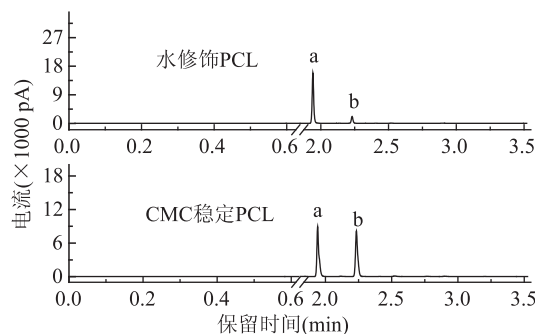


图6 水修饰与 CMC 稳定 PCL 催化反应液的 GC(10 次后,24h/次)

Fig.6 GC of reaction mixtures catalyzed by water-modified and CMC-stabilized PCL after 10 recycles once 24h

3 结论

固定化脂肪酶 PCL 生物反应器,制备方便,操作便利,酶与反应液的分离,只需将液体倒出即可,无需过滤。反应器中酶的活性相对于酶粉,从底物的转化率来看,反应初期 7h 后,转化率提高了 7 倍。而且,因 CMC 的存在,酶对有机相的耐受性增强,活性稳定。催化 48h 后,转化率达到 99%,产物容易分离提纯。本文的研究为乙酸正己酯的生物合成提供了一种绿色、简易,而又有效的途径;今后,稳定脂肪酶构象方法和分子机制的研究,还需要深入,进一步推进乙酸正己酯的生物工业技术生产进程。

参考文献

[1] Selvam K, Vishnupriya B, Maanvizhi M. Enzymatic Synthesis of Fragrance Ester by Lipase from Marine Actinomycetes for

Textile Industry[J]. Int J Eng Adv Technol, 2013, 3(2): 91-96.

[2] 石月丹, 孟昊. 固体超强酸 $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 催化合成乙酸正己酯[J]. 广州化工, 2013, 41(3): 69-70, 90.

[3] 王家荣, 李力波, 潘俊杰, 等. 氯化铁催化合成乙酸正己酯工艺研究[J]. 化学工程师, 1998, 6: 9, 40.

[4] 陈曦, 王俊, 韩越, 等. 常温下超声辅助合成乙酸正己酯的影响因素[J]. 声学技术, 2011, 30(3): 246-249.

[5] Garlapati V K, Banerjee R. Solvent-Free Synthesis of Flavour Esters through Immobilized Lipase Mediated Transesterification[J]. Enzyme Res, 2013, 2013: 1-6.

[6] Yu Z R, Chang S W, Wang H Yu, et al. Study on Synthesis Parameters of Lipase-Catalyzed Hexyl Acetate in Supercritical CO_2 by Response Surface Methodology[J]. JAACS, 2003, 80(2): 139-143.

[7] 杨本宏, 蔡敬民, 吴克, 等. 非水相中脂肪酶催化合成乙酸正己酯[J]. 食品工业科技, 2006, (6): 144-147.

[8] Drauz K, Waldmann H. Enzyme catalysis in organic synthesis: a comprehensive handbook. 2nd ed[M]. Wiley-VCH, University of Michigan Press, Michigan, USA, 2002, p86.

[9] Stergiou P Y, Foukis A, Filippou M, et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(8): 1846-1859.

[10] Verger R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts[J]. Trends Biotechnol, 1997, 15: 32-38.

[11] Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, et al. Strategies for Stabilization and Activation of Biocatalysts in Organic Solvents[J]. ACS Catal, 2013, 3: 2823-2836.

[12] Rehm S, Trodler P, Pleiss J. Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study[J]. Protein Sci, 2010, 19(11): 2122-2130.

[13] Brzozowski A M, Derewenda U, Derewenda Z S, et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex[J]. Nature, 1991, 351: 491-494.

[14] Adlercreutz P. Immobilisation and application of lipases in organic media[J]. Chem Soc Rev, 2013, 42: 6406-6436.

[15] Petursson S, Jonsdotti S. Mono-etherification of racemic propane-1,2-diol by a tin(II) bromide catalyzed reaction with diazofluorene and a study of the Pseudomonas cepacia lipase catalyzed acetylation of the mono-ethers[J]. Tetrahedron - Asymmetr, 2012, 23: 157-163.

[16] Cong F D, Wang Y H, Ma C Y, et al. A way for resolution of (R,S)-2-octanol by combining dynamic kinetic resolution with double kinetic resolution[J]. Enzyme Microb Tech, 2005, 36: 595-599.

[17] Herbst D, Peper S, Niemeyer B. Enzyme catalysis in organic solvents: influence of water content, solvent composition and temperature on Candida rugosa lipase catalyzed transesterification[J]. J Biotechnol, 2012, 162: 398-403.

[18] Shieh C J, Chang S W. Optimized synthesis of lipase-catalyzed hexyl acetate in n-hexane by response surface methodology[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 1203-1207.

[19] Halling P J. What can we learn by studying enzymes in non-

(下转第 183 页)

(1):567-581.
 [2] Wei T, Feng SX, Mao DB, et al.Characterization of a new thermophilic and acid tolerant esterase from *Thermotoga maritima* capable of hydrolytic resolution of racemic ketoprofen ethyl ester [J].J Mol Catal B:Enzym,2013,85(1):23-30.
 [3]王顺民,董文宾.嗜热酶的研究及其在食品等相关工业的应用[J].自然杂志,2004,26(6):339-341.
 [4]龙彪,饶国华,彭志英,等.食品应用新酶源-极端酶[J].中国食品添加剂,2005,3(3):47-49.
 [5]Barriuso J, Prieto A, Martinez MJ.Fungal genomes mining to discover novel sterol esterases and lipases as catalysts [J].BMC Genomics,2013,14:712.
 [6]Margolin AL.Enzymes in the synthesis of chiral drugs [J]. Enzyme Microb Technol,1993,15(6):266-280.
 [7]韩波,姚安庆,王勇,等.应用植物酯酶测定农药残留研究进展[J].长江大学学报:自然科学版,2009,6(3):60-65.
 [8]陈路清,张秀艳,唐彦捷,等.嗜热酶的稳定机制和稳定策略的研究进展[J].科技通报,2008,24(6):792-798.
 [9]王秋岩.嗜热酯酶 APE1547 催化活性的定向进化研究

(上接第 174 页)

aqueous media? [J].Philos Trans R Soc London Ser B,2004, 359:1287-1297.
 [20]Zheng J J, Xu L, Liu Y, et al.Preparation of lipase-coated micro-crystals and application in biodiesel production from various oil feedstocks [J]. Bioresour Technol, 2012, 110: 224-231.
 [21] Mario P, Adinugrada D W, Haryadi M. Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from Cavendish banana pseudo stem (*Musa cavendishii* LAMBERT) [J].Carbohydr

(上接第 178 页)

Biol Fertil Soils,2011,47:239-248.
 [9]Zhang N, Wu K, He X, et al.A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11 [J].Plant Soil,2011,344:87-97.
 [10]凌宁,王秋君,杨兴明,等.根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究[J].植物营养与肥料学报,2009,15(5): 1136-1141.
 [11]孙微微,丁婷.杜促内生真菌中抗苹果炭疽病活性菌株的筛选[J].安徽农业大学学报,2013,40(6):981-987.
 [12]袁建军.大蒜拮抗性内生细菌的筛选[J].科技资讯, 2013,14:217-218.
 [13]张俊亚,宋任涛,许政瞢,等.*Cupriavidus necator* JMP134 细菌人工染色体基因组文库的构建与鉴定[J].上海大学学报 (自然科学版),2011,17(5):675-680.
 [14]赵庆芳,马艳,李巧峡.若干技术在根际微生物研究中的应用[J].生物学通报,2014,49(4):1-4.
 [15]戴青松,韩锡荣,黄浩,等.根际微生物对土壤有机物修复现状和发展[J].环境科技,2014,27(1):30-33.
 [16]马成龙,李深,张宏敏.根际有益微生物对植物的促生抗

[J].微生物学报,2006,46(6):259-262.
 [10]Gross R A, Kumar A, Kalra B.Polymer synthesis by *in vitro* enzyme catalysis [J].Chem Rev,2001,101(11):2097-2124.
 [11]Atomi H, Imanaka T.Thermostable carboxylesterases from hyperthermophiles. [J].Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15(7): 2729-2735.
 [12]刘爱民,黄为一.极端酶的研究[J].微生物学杂志,2004, 24(6):47-50.
 [13]Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, et al.Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima* [J].Nature,1999,399(6734):323-329.
 [14]Kakugawa S, Fushinobu S, Wakagi T, et al.Characterization of a thermostable carboxylesterase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* [J].Appl Microbiol Biotechnol, 2007,74(23):585-591.
 [15]Gutiérrez-Fernández J, Vaquero ME, Prieto A, et al.Crystal structures of ophiostoma piceae sterol esterase: structural insights into activation mechanism and product release [J].J Struct Biol, 2014,187(3):215-22.

Polym,2005,62:164-169.

[22]Dhake K P, Karoyo A H, Mohamed M H, et al.Enzymatic activity studies of *Pseudomonas cepacia* lipase adsorbed onto copolymer supports containing β -cyclodextrin [J].J Mol Catal B, 2013,87:105-112.
 [23]Guncheva M, Tashev E, Zhiryakova D, et al.Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis [J]. Process Biochem,2011,46:923-930.

逆作用[J].吉林农业,2011,4:65.

[17]石杰.施用根际有益微生物对盆栽紫花苜蓿土壤中微生物区系的影响[J].黑龙江科学,2013,4(3):17-23.
 [18]Trillas M I, Casanova E, Cotxarrera L, et al.Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings [J]. Biol Control,2006,39:32-38.
 [19]Zhang N, Wu K, He X, et al.A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11 [J].Plant Soil,2011,344:87-97.
 [20]Cao Y, Zhang Z, Ling N, et al.*Bacillus subtilis* SQR9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots [J]. Bio Fertil Soils,2011,47:495-506.
 [21]Zhang S, Raza W, Yang X, et al.Control of *Fusarium* wilt disease of cucumber plants with the application of a bioorganic fertilizer [J].Bio Fertil Soils,2008,44:1073-1080.
 [22]Zhao Q, Dong C, Yang X, et al.Biocontrol of *Fusarium* wilt disease for *Cucumis melo* melon using bio-organic fertilized [J]. Appl Soil Ecol,2011,47:67-75.