假丝酵母菌 GXU08 产脂肪酶发酵条件的优化

沈芳¹, 刘雄民^{1*}, 刘力恒², 黄荣韶³, 李志刚³

(1. 广西大学 化学化工学院, 南宁 530004; 2. 玉林师范学院 化学与生物系, 广西 玉林 537000; 3. 广西大学 农学院, 南宁 530004)

摘要: 以假丝酵母菌 GXU08 产脂肪酶催化合成麝香类香料—环十五内酯目前已备受关注, 在一定条件下, 环十五内酯的转化率与脂肪酶的水解酶活有直接关系, 酶活越高其催化合成环十五内酯的能力越强。通过单因素试验和正交试验, 对假丝酵母菌 GXU08 产脂肪酶的发酵条件进行优化。结果表明: 最佳发酵培养基配方为蔗糖 0.5%, 淀粉 0.5%, 蛋白胨 1.5%, K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4$ 0.15%, $(NH_4)_2SO_4$ 1%, 茶油 1.5%, 菜籽油 1.5%, pH=8, 此培养基在 28 °C, 180 r/min 的条件下发酵培养 48h, 脂肪酶水解活力达到 27.53 U/mL, 是初始发酵培养基条件下所得脂肪酶酶活的 3.74 倍; 其环十五内酯的转化率为 16.6%, 是优化前的 4 倍。

关键词: 假丝酵母菌; 脂肪酶; 发酵条件; 正交实验; 环十五内酯

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0689-05

The optimization of fermentation conditions of *Candida* sp. GXU08 lipase

SHEN Fang¹, LIU Xiong-Min^{1*}, LIU Li-Heng², HUANG Rong-Shao³, LI Zhi-Gang³

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;
2. Department of Chemistry and Biology, Teachers College, Yulin 537000, China;
3. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: The synthesizing of cyclopentadecanolide (a kind of macrocycle musk) by *Candida* sp. GXU08 lipase has been concerned. Under certain conditions, the converse of cyclopentadecanolide was directly connected with lipase activity. The higher the lipase activity was, the stronger the conversions were. The fermentation conditions of *Candida* sp. GXU08 lipase were optimized through the single factor and the orthogonal experiments. The results showed that: The compositions of optimal fermentation medium were sucrose 0.5%, starch 0.5%, peptone 1.5%, K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4$ 0.15%, $(NH_4)_2SO_4$ 1%, camellia oil 1.5%, rapeseed oil 1.5%, pH=8.0 Under the fermentation condition of 28 °C, 180 r/min, 48 h, the lipase activity would reach 27.53 U/mL, which was 3.74 times of the original culture medium. The conversion of cyclopentadecanolide was 16.6%, which was 4 times of unoptimized.

Key words: *Candida* sp.; lipase; fermentation condition; orthogonal experiments; cyclopentadecanolide

环十五内酯是一种重要的巨环麝香, 具有良好的定香作用, 能使香精持久地保持芬芳气息。目前国内尚无能力生产环十五内酯, 完全依赖进口, 因而对环十五内酯的研究有非常重要的经济意义。广西特产蒜头果 (*Malania Oleifera*) 油中含有 50% 左右

的二十四碳-15 烯酸 (黄品鲜等, 1998; 周永红等, 2001), 经臭氧化—还原反应及甲酯化后, 得到 15-羟基十五烷酸甲酯, 刘雄民等 (2004) 以假丝酵母菌株 GXU08 所产脂肪酶催化该酯合成环十五表 10 的方差分析验证了这一结果, 从而得出最佳的培养

收稿日期: 2008-01-09 修回日期: 2009-01-17

基金项目: 广西大学科研基金 (DD040045) [Supported by the Scientific Research Foundation of Guangxi University (DD040045)]

作者简介: 沈芳 (1978-), 女, 湖北天门人, 在读博士, 主要从事植物有效成分的提取及天然香料的合成研究, (E-mail) nnbonnie@126.com.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: xmliu1@gxu.edu.cn)

基配方:蔗糖 0.5%,淀粉 0.5%,蛋白胨 1.5%, K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4$ 0.15%, $(NH_4)_2SO_4$ 1%,茶油 1.5%,菜籽油 1.5%,pH 值 8,发酵时间 48 h。内酯。研究表明(沈芳等,2006):在一定条件下,环十五内酯的转化率随脂肪酶酶活的增加而增加,因而要提高环十五内酯的转化率,有必要开展提高脂肪酶酶活的研究。尽管目前国内外对产酶菌株发酵条件的优化试验有很多研究(牛冬云等,2003;张博等,2007;Zheng 等,2000;Li 等,2002;伍时华等,2006),但对于提高可催化合成环十五内酯脂肪酶活性的研究尚未见任何报道。本研究主要通过单因素实验和正交实验,对假丝酵母菌株 GXU08 所产脂肪酶的发酵条件进行优化,优化条件下所产脂肪酶将对提高天然香料环十五内酯的合成转化率具有极大的意义。

1 材料与方 法

1.1 菌种

假丝酵母菌株 *Candida* sp. GXU08,从广西大学南区食堂下水道附近筛选得到。

1.2 培养基

种子培养基(%):葡萄糖 2.0, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1,蛋白胨 2.5,橄榄油 1.0,pH=7.0。搅拌均匀后分装于 500 mL 锥形瓶中,每瓶装量 100 mL,高温灭菌待用。发酵培养基(%):蛋白胨 1.0,酵母膏 0.2,牛肉膏 0.2,橄榄油 1.0,pH=6.0,搅拌均匀后分装于 500 mL 锥形瓶中,每瓶装量 100 mL,高温灭菌 20 min,待用。

1.3 培养方法

种子培养 24 h,接种量 10%至发酵培养基,28 °C、180 r/min 摇床培养 72h。

1.4 分析方法

脂肪酶活力测定方法:用橄榄油乳化液法测定。一个酶活单位是在 pH7.0,40 °C 条件下,每 1 min 释放 1 mmol 游离脂肪酸的酶量(郭杰炎等,1986)。

2 结果与讨论

2.1 单因素条件对产酶的影响

2.1.1 碳源对产酶的影响 试验考察了 8 种碳源,发现不同碳源对菌株产酶的影响不同,其中麦芽糖对菌株产脂肪酶最有利,发酵液酶活为 7.78 U/mL,是葡萄糖的 5.33 倍。其次是甘露醇,但这两者都比较昂贵,从经济角度选择蔗糖和淀粉作为正交试验的碳源(表 1)。

2.1.2 氮源对产酶的影响 氮源分为有机氮源和无机氮源,本试验分别研究了这两类氮源对产酶的影响。(1)有机氮源对产酶的影响:考察了 6 种有机氮源对菌株产酶的影响。从表 2 可知,牛肉膏和蛋白胨对产酶有较好的促进作用,但牛肉膏比较昂贵,从经济角度考虑选择蛋白胨作为正交试验的有机氮源。(2)无机氮源对产酶的影响:考察了 6 种无机氮源对菌株产酶的影响。从表 3 可知,硫酸铵对产酶最有利,发酵液酶活达 10.96 U/mL,是硝酸钾的 4.61 倍,因此选择硫酸铵作为正交试验的无机氮源。

表 1 不同碳源对菌株 GXU08 产酶的影响

Table 1 Effect of different carbon sources on the lipase production of GXU08

碳源 Carbon sources	葡萄糖 Glucose	果糖 Fructose	甘露醇 Mannitol	麦芽糖 Maltose	糊精 Dextrin	淀粉 Starch	蔗糖 Sucrose
酶活力 Lipase activity (U/mL)	1.46	3.47	7.14	7.78	6.90	6.96	7.42
R	0.685	0.864	0.918	1.285	1.328	1.458	1.175

表 2 不同有机氮源对菌株 GXU08 产脂肪酶的影响

Table 2 Effect of different organic nitrogen sources on the lipase production of GXU08

有机氮源 Organic nitrogen sources	蛋白胨 Peptone	酵母膏 Yeast extract	牛肉膏 Beef extract	玉米粉 Corn flour	尿素 Urea	豆粉 Soybean meal
酶活力 Lipase activity (U/mL)	7.37	0.137	7.40	0.630	2.86	1.28
R	0.489	2.190	1.170	1.587	1.850	0.781

2.1.3 油料对产酶的影响 分别考察了 6 种油料对 GXU08 菌株产酶的影响。从表 4 可知,茶油和菜籽油对菌株产酶最有利,这两种油料价格适中,且原料易得,故选茶油和菜籽油作为正交试验的油料。

2.1.4 初始 pH 值对产酶的影响 使用精密 pH 计将发酵液调成不同的 pH 值,研究 pH=5.0~9.4 范围内发酵液的产酶情况。从表 5 可知,当 pH 值为 9.0 时对菌株产酶最有利,发酵液酶活高达 27.4

表 3 不同无机氮源对菌株 GXU08 产脂肪酶的影响

Table 3 Effect of different inorganic nitrogen sources on the lipase production of GXU08

无机氮源 Inorganic nitrogen sources	硝酸铵 Ammonium nitrate	硫酸铵 Ammonium sulfate	硝酸钾 Potassium nitrate	氯化铵 Ammonium chloride	乙酸铵 Ammonium acetate	草酸铵 Ammonium oxalate
酶活力 Lipase activity (U/mL)	6.026	10.96	2.375	6.941	4.019	2.923
R	0.418	1.106	3.158	1.281	3.900	0.712

表 4 不同油料对菌株 GXU08 产酶的影响

Table 4 Effect of different oil on the lipase production of GXU08

油料 Oil	芝麻油 Sesame oil	大豆油 Soybean oil	花生油 Peanut oil	菜籽油 Rapeseed oil	橄榄油 Olive oil	茶油 Camellia oil
酶活力 Lipase activity (U/mL)	8.80	7.38	5.13	10.58	3.93	14.5
R	3.006	1.434	2.108	2.105	0.673	1.824

U/mL,是酸性条件 pH=5.0 的 19.6 倍,其次为 pH=8.0 和 pH=7.0。因此,可选择 pH=7.0, 8.0,9.0 分别作为正交试验的条件。

2.1.5 发酵时间对产酶的影响 每一种菌株都有一个最适发酵时间,在最适时间下产酶量最高,而随着时间的延续,菌株逐渐衰退,产酶量随之下降。为寻找最适发酵时间,实验分别考察了 GXU08 菌株在发酵不同时间后的产酶情况。从表 6 可知,菌株发酵 36 h 和 48 h 对产酶比较有利,发酵液酶活可达 12.55 U/mL 和 11.40 U/mL。故选择 36h 和 48 h 作为正交试验的发酵时间。

2.1.6 发酵温度对产酶的影响 脂肪酶作为一种蛋白质,在 45 °C 以上极易失活。一般来说,在一定范围内,酶的活力随温度的升高而增加,超过一定温度

表 5 不同初始 pH 值对菌株 GXU08 产脂肪酶的影响

Table 5 Effect of different original pH on the lipase production of GXU08

pH 值	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	9.4
酶活力(U/mL) Lipase activity	1.40	5.67	9.15	9.78	27.4	8.1
R	4.461	2.450	1.446	0.354	1.931	3.241

表 6 不同发酵时间对菌株 GXU08 产脂肪酶的影响

Table 6 Effect of different time on the lipase production of GXU08

时间 Time(h)	24	36	48	60	72	84
酶活力(U/mL) Lipase activity	9.28	12.55	11.40	7.13	8.85	2.77
R	0.707	2.280	3.163	2.898	3.057	0.955

表 7 不同温度对菌株 GXU08 产脂肪酶的影响

Table 7 Effect of different temperature on the lipase production of GXU08

温度 Temperature (°C)	20	22	24	26	28	30	32	34
酶活力 Lipase activity(U/mL)	12.30	12.79	12.97	17.36	17.58	17.49	14.42	13.66
R	3.544	2.854	2.142	3.893	3.985	2.658	1.927	3.517

酶活即下降。为了寻找最适发酵温度本试验按 10% 的接种量接入菌株后,分别置于 8 种温度的摇床中以 180 r/min 的速度振荡培养 48 h,测定发酵液酶活。由表 7 可见,在 26、28、30 °C 的条件下发酵液酶活相对较高,且三者酶活大小几乎相等,因而直接选择 28 °C 作为发酵温度。

上述讨论的单因素条件:碳源、氮源、油料、初始 pH 值、时间、温度的实验中 R 值均小于 5,在正常误差范围内,因而实验数据具有科学依据。

2.2 正交试验

2.2.1 三水平十因素正交试验 根据单因素试验的

结果,选择三水平十因素对发酵培养基进行正交试验(表 8、9、10)。从表 9 可见,不同的试验因子对菌株产酶的影响次序:时间>茶油>蛋白胨>pH 值>菜籽油>K₂HPO₄>淀粉>蔗糖>(NH₄)₂SO₄>MgSO₄。表 10 的方差分析验证了这一结果,从而得出最佳的培养基配方:蔗糖 0.5%,淀粉 0.5%,蛋白胨 1.5%,K₂HPO₄0.05%,MgSO₄0.15%,(NH₄)₂SO₄ 1%,茶油 1.5%,菜籽油 1.5%,pH 值 8,发酵时间 48 h。

2.3 验证试验及结论

在最优化培养基组成和发酵条件下,测定发酵液酶活。结果表明:初始发酵培养基条件下所得脂肪

表 8 发酵培养基的 L27(310)正交设计表

Table 8 L27(310)Orthogonal design for fermentation medium

编号 No.	时间 Time (h)	蔗糖 Sucrose (%)	淀粉 Starch (%)	蛋白胨 Peptone (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	MgSO ₄ (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	茶油 Camellia oil (%)	菜籽油 Rapeseed oil (%)	pH	酶活(U/mL) Lipase activity
1	24	0.5	0.5	0.5	0.05	0.05	0.5	0.5	0.5	7	11.30
2	24	0.5	0.5	0.5	0.10	0.10	1.0	1.0	1.0	8	17.76
3	24	0.5	0.5	0.5	0.15	0.15	1.5	1.5	1.5	9	14.53
4	24	1.0	1.0	1.0	0.05	0.05	0.5	1.0	1.0	8	11.73
5	24	1.0	1.0	1.0	0.10	0.10	1.0	1.5	1.5	9	28.13
6	24	1.0	1.0	1.0	0.15	0.15	1.5	0.5	0.5	7	14.70
7	24	1.5	1.5	1.5	0.05	0.05	0.5	1.5	1.5	9	22.30
8	24	1.5	1.5	1.5	0.10	0.10	1.0	0.5	0.5	7	9.20
9	24	1.5	1.5	1.5	0.15	0.15	1.5	1.0	1.0	8	14.53
10	36	0.5	1.0	1.5	0.05	0.10	1.5	0.5	1.0	9	14.83
11	36	0.5	1.0	1.5	0.10	0.15	0.5	1.0	1.5	7	13.23
12	36	0.5	1.0	1.5	0.15	0.05	1.0	1.5	0.5	8	13.86
13	36	1.0	1.5	0.5	0.05	0.10	1.5	1.0	1.5	7	8.33
14	36	1.0	1.5	0.5	0.10	0.15	0.5	1.5	0.5	8	14.57
15	36	1.0	1.5	0.5	0.15	0.05	1.0	0.5	1.0	9	9.83
16	36	1.5	0.5	1.0	0.05	0.10	1.5	1.5	0.5	8	16.50
17	36	1.5	0.5	1.0	0.10	0.15	0.5	0.5	1.0	9	10.80
18	36	1.5	0.5	1.0	0.15	0.05	1.0	1.0	1.5	7	14.90
19	48	0.5	1.5	1.0	0.05	0.15	1.0	0.5	1.5	8	19.96
20	48	0.5	1.5	1.0	0.10	0.05	1.5	1.0	0.5	9	14.77
21	48	0.5	1.5	1.0	0.15	0.10	0.5	1.5	1.0	7	16.86
22	48	1.0	0.5	1.5	0.05	0.15	1.0	1.0	0.5	9	17.16
23	48	1.0	0.5	1.5	0.10	0.05	1.5	1.5	1.0	7	17.46
24	48	1.0	0.5	1.5	0.15	0.10	0.5	0.5	1.5	8	17.36
25	48	1.5	1.0	0.5	0.05	0.15	1.0	1.5	1.0	7	15.50
26	48	1.5	1.0	0.5	0.10	0.05	1.5	0.5	1.5	8	12.73
27	48	1.5	1.0	0.5	0.15	0.10	0.5	1.0	0.5	9	14.47

表 9 L27(310)正交试验结果分析(直观分析法)

Table 9 Analysis of L27(310) orthogonal design (visual analysis)

试验因子 Test factor	均值 1 Mean value1	均值 2 Mean value2	均值 3 Mean value3	极差 Range
时间 Time (h)	14.857	12.983	16.252	3.269
蔗糖 Sucrose	15.233	14.311	14.548	0.922
淀粉 Starch	15.308	14.301	14.483	1.007
蛋白胨 Peptone	13.224	15.320	15.548	2.324
K ₂ HPO ₄	15.290	14.242	14.560	1.048
MgSO ₄	14.320	14.774	14.998	0.678
(NH ₄) ₂ SO ₄	14.736	15.092	14.264	0.828
茶油 Camellia oil	13.412	14.098	16.582	3.170
菜籽油 Rapeseed oil	14.059	14.367	15.667	1.608
pH	13.498	15.444	15.150	1.946

酶的酶活为 7.36 U/mL, 而优化条件下所得脂肪酶的酶活为 27.53 U/mL, 是优化前酶活的 3.74 倍。以优化条件下所得脂肪酶为催化剂, 15-羟基十五烷酸甲酯为底物, 在 40 °C, 180 r/min 条件下反应 72 h, 所得环十五内酯的转化率为 16.6%, 是未优化前转化率 4.1% 的 4 倍。与查阅的相关文献报道的微生物产脂肪酶催化长链脂肪酸酯合成环十五内酯相比较, 该技术尚处于国内外领先水平。

表 10 L27(310)正交试验结果分析(方差分析法)

Table 10 Analysis of L27(310) orthogonal design (variance analysis)

因素 Factor	偏差平方和 Widage- quadratic sum	自由度 Degree of freedom	F 比 Ratio of F	F 临界值 Critical value of F	显著性 Signifi- cance
时间 Time (h)	48.428	2	18.449	6.940	*
蔗糖 Sucrose	4.129	2	1.573	6.940	
淀粉 Starch	5.179	2	1.973	6.940	
蛋白胨 Peptone	29.523	2	11.247	6.940	*
K ₂ HPO ₄	5.195	2	1.979	6.940	
MgSO ₄	2.147	2	0.818	6.940	
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.103	2	1.182	6.940	
茶油 Camellia oil	50.074	2	17.076	6.940	*
菜籽油 Rapeseed oil	13.109	2	4.994	6.940	
pH	19.818	2	7.550	6.940	*
误差 Deviation	5.25	4			

参考文献:

- 郭杰炎. 1986. 微生物酶[M]. 北京: 科学出版社, 255-259
 Hou XW(侯学文), Guo Y(郭勇). 1995. The effects of carbon sources on the growth and respiration of suspension Roselle cell (不同碳源对悬浮培养玫瑰茄细胞呼吸强度及产生辅 Q 的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), 19(2): 150-153

- Huang PX(黄品鲜), Li PY(李飘英), Li WG(李伟光). 1998. Extraction and separation of *Malania oleifera* Chum oil by organic solvent(有机溶剂萃取分离蒜头果油的研究)[J]. *Guangxi Chemical Industry*(广西化工), **27**(3):1-3
- Li C, Bai J, Cai Z, et al. 2002. Optimization of cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology[J]. *Biotechnology*, **93**:27-34
- Liu XM(刘雄民), Shen F(沈芳), Liang JJ(梁静娟), et al. 2004. Study on screening of lactonizing lipase and effect of activity on yield of cyclopentadecanolide(合成环十五内酯脂肪酶产生菌的筛选及酶活对转化的影响)[J]. *J Guangxi Univ*(广西大学学报), **29**(4):274-277
- Niu DY(牛冬云), Zhang YZ(张义正). 2003. Selection of an alkaline lipase-producing strains and optimalization of its fermentation conditions(碱性脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件的优化)[J]. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业), **29**(5):28-31
- Shen F(沈芳), Liang JJ(梁静娟), Liu XM(刘雄民). Lipase catalyzed synthesis of cyclopentadecanolide from methyl hydroxyl pentadecanate(脂肪酶催化 ω -羟基十五烷酸甲酯合成环十五内酯)[J]. *Chin J Appl Chem*(应用化学), **24**(2):63-66
- Wu SH(伍时华), Xu YF(徐雅飞), Zhang J(张健), et al. 2006. Study on medium optimization of L-leucine fermentation(L-亮氨酸发酵培养基优化试验)[J]. *Guihaia*(广西植物), **26**(6):692-696
- Zhang B(张搏), Yang JK(杨江科), Su HW(苏华武), et al. 2007. Screening identification of lipase production bacteria and optimization of the lipase production(脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件优化)[J]. *Biotechnology*(生物技术), **17**(1):23-26
- Zheng Y, Das PK. 2000. Improved response surface method and its application to stiffened plate reliability analysis[J]. *Engineering Structures*, **22**:544-551
- Zhou YH(周永红), Li WG(李伟光), Yi FP(易封萍), et al. 2001. Determination of fatty acids in *Malania oleifera* oil by gas chromatography-mass spectrometry(气相色谱-质谱法测定蒜头果油中的脂肪酸)[J]. *Chin J Chromatography*(色谱), **19**(2):147-148

(上接第 643 页 Continue from page 643)

burg, 1994; Rascio 等, 1998)。通常把束缚水当作抗旱重要因素, 植物保水力与束缚水含量有关, 束缚水多干旱时植物体内保持的水量也就多, 从而不易受旱害。渗透调节是植物在逆境条件下降低渗透势, 抵抗逆境胁迫的一种重要方式, 在一定胁迫范围内, 某些植物通过自身的渗透调节作用表现出抗外界胁迫的能力, 它是植物重要的抗逆生理机制(朱志梅等, 2003; Levitt, 1980)。甘草是典型的耐旱沙生植物, 耐旱机理除已有的研究指出其具有发达的根系能吸收沙地、沙漠深层水分外, 本研究发现可溶性多糖是甘草重要的渗透调节物质, 并且叶片专门分化出具有遗传特征和生物活性的能分泌多糖的外分泌腺, 通过腺体向外分泌多余的多糖来维持叶片内部一定的多糖含量和渗透势, 在一定范围内主动调节自身和干旱环境的适应性也是甘草在形态和生理上特有的重要耐旱特征和作用。

参考文献:

- 何兰. 2004. 枸杞甘草[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 152-161
- 刘家琼, 丘明新, 刘金祥. 2003. 大漠之绿[M]. 北京: 化学工业出版社, 45-53
- 王惟杰. 1994. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 16
- Feng JZ(冯建忠), Lu XZ(陆行舟), Lv JM(吕建民), et al. 1995. A study on development of animal husbandry by using *Glycyrrhiza uralensis* resources(利用甘草资源发展畜牧业生产的探讨)[J]. *J Arid L Res Environ*(干旱区资源与环境), **9**(2):84-89
- Franca MGC, Thi ATP, Pimentel C, et al. 2000. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress[J]. *Environ Experimental Bot*, **43**(3):227-237
- Gao LJ(高丽娟), Tian XY(田晓燕). 2002. Determination of polysaccharides in residues of *glycyrrhiza* with spectrophotometry(甘草残渣中多糖含量的分光光度法测定)[J]. *J Ningxia Univ(Nat Sci Edi)*(宁夏大学学报), **23**(2):182-184
- Garg BK, Kathtu S, Burman U. 2001. Influence of water stress on water relations, photosynthetic parameters and nitrogen metabolism of moth bean genotypes[J]. *Biologia Plantarum*, **44**(2):289-292
- Levitt J. 1980. Responses of plants to Environmental Stress[M]. Second Edition New, London, Academ icpress II:5-6
- Rascio A, Russo M, Patani C, et al. 1998. Drought intensity effects on genotypic differences in tissue affinity for strongly bound water[J]. *Plant Sci*, (132):121-126
- Vanrensburg L. 1994. Osmoregulation. Monitored by pressure-volume tissue water component analysis, in cultivars of *nicotiana tabacum-l* of different drought tolerance[J]. *South Africal J Bot*, **60**(3):139-144
- Wang ZL(王照兰), Du JC(杜建材), Yu LQ(于林清), et al. 2002. The utilization value, current research and problems of *Glycyrrhiza*(甘草的利用价值、研究现状及存在的问题)[J]. *Grass-land of China*(中国草地), **24**(1):73-76
- Wang L(王立), Li JH(李家恒). 1999. Technical system of artificial cultivating *Glycyrrhiza uralensis* fisch innorthwest region(西北地区甘草人工栽培技术体系研究)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), **35**(1):129-133
- Wei SL(魏胜林), Wu LJ(吴李君), Yu ZL(余增亮). 2007. Effects of N^+ implantation on polysaccharide and osmosis stress resistance of liquorice(N^+ 注入对甘草多糖及耐渗透胁迫的影响)[J]. *J Radiat Res Radiat Process*(辐射研究与辐射工艺学报), **25**(5):271-274
- Zhu ZM(朱志梅), Yang C(扬持). 2003. Research summarizing of plant's change and adapation in sandy desertification process(沙漠化过程中植物的变化和适应机理研究概述)[J]. *Acta Sci Nat Univ Nei Mongol*(内蒙古大学学报), **34**(1):103-114