

微生物培养基优化方法研究进展

肖怀秋 李玉珍

(湖南化工职业技术学院应用化学系,湖南 株洲 412004)

摘要: 微生物初级代谢产物和次级代谢产物的生物合成与培养基组成和培养条件密切相关,而在一个高度非线性、非结构化的复杂系统中要获得最佳工艺,试验优化技术具有很重要的作用。综述了单因子试验、正交试验、均匀设计、响应面设计、遗传算法和神经网络等优化技术并进行了展望。

关键词: 微生物; 优化方法; 正交试验; 响应面设计; 均匀设计; 遗传算法; 培养基优化

中图分类号: Q93-3; TQ920; TP27

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2010)01-0090-05

Research Progress in the Optimization of Microbial Culture Medium

XIAO Huai-qiu and LI Yu-zhen

(Applied Chemistry Department of Hu'nan Chemical Industry and Vocational Technology College, Zhuzhou, Hu'nan 412004, China)

Abstract: The biosynthesis of primary metabolite and secondary metabolite from microbes are closely related to culture medium compositions and culture conditions. In order to obtain the optimum techniques in a highly non-linear and unstructured complex system, experimental optimization methodology play an key role. Some methodology such as single factor test, orthogonal design, uniform design, response surface optimization design, genetic algorithms, and evolutionary algorithms were summarized in this paper.

Key words: microbe; optimization method; orthogonal experiments; response surface analysis (RSA); uniform design; genetic algorithms(GA); culture medium optimization

微生物发酵是指微生物利用一些原料养分在合适的发酵条件下经特定的代谢途径转变成所需产物的一类复杂的生物过程,涉及到许多相互影响的因素,产物生物合成水平除受微生物内部代谢机理、调控机制等影响外,还有外界环境(培养基组成与配比、发酵温度、发酵 pH、溶氧等)的影响。因此,最大限度地合成目的产物并非易事,并且对于一个高度非线性、非结构化的复杂发酵系统而言,要建立一个准确、满意的合成模型则更为困难,而试验优化技术的应用,特别是多元方程拟合技术(响应技术)的应用可以很好地解决该问题。传统的优化技术(如单因素法)虽然方法简单、易行,结果较直观,但在考察多个因素时会浪费大量时间,且有可能导致不可靠的甚至错误的结论,因此,常常仅作为过程优化的初步试验^[1]。在考察多个因素时,为了减少试验次数,节省时间,通常采用统计优化技术,这是因为统计优化技术无论从试验设计到数据分析以及模型的建立与统计学密切相关,它能够以较少的试验次数获得极为丰富的统计信息。因此,被广泛地应用于微生物发酵培养基配方的优化中,以确定最佳发酵工艺参数,从而实现高产、优质、低消耗等经济目标,本文对常用的优化试验方法进行了综述。

基金项目:学院资助项目,课题编号为 1nhgzy2007B202。

收稿日期:2009-10-27

作者简介:肖怀秋(1981-),男,苗族,湖南武冈人,硕士,主要从事生物制药的教学与科研工作。

1 单因素试验法

单因素试验是在假设因素间不存在交互作用的前提下,通过一次只改变一个因素且保证其他因素维持在恒定水平的条件下,研究不同试验水平对结果的影响,然后逐个因素进行考察的优化方法,是试验研究中最常用的优化策略之一。王晓辉^[2]等人利用单因素试验对 BS070623 蛋白酶高产突变株进行了发酵培养基优化试验,取得了良好效果。然而,对于大多数培养基而言,其组分相当复杂,仅通过单因素试验往往无法达到预期的效果,特别是在试验因素很多的情况下,需要进行较多的试验次数和试验周期才能完成各因素的逐个优化筛选,因此,单因素试验经常被用在正交试验之前或与均匀设计、响应面分析等结合使用^[3-4]。利用单因子试验和正交试验相结合的方法,可用较少的试验找出各因素之间的相互关系,从而较快地确定出培养基的最佳组合。较常见的是先通过单因素试验确定最佳碳、氮源,再进行正交试验,或者通过单因素试验直接确定最佳碳氮比,再进行正交试验。

2 正交设计试验法

正交设计试验法是利用一套表格,设计多因素、多指

标、多因素间存在交互作用而具有随机误差的试验,并利用普通的统计分析方法来分析试验结果。正交设计试验法对因素的个数没有严格的限制,而且无论因素之间有无交互作用,均可使用。利用正交表可于多种水平组合中,挑出具有代表性的试验点进行试验,它不仅能以全面试验大大减少试验次数,而且能通过试验分析把好的试验点(即使不包含在正交表中的)找出来。利用正交设计试验得出的结果可能与传统的单因素试验法的结果一致,但正交试验设计考察因素及水平合理、分布均匀,不需进行重复试验,误差便可估计出来,因而计算精度较高^[5],特别是在试验因素越多、水平越多、因素之间交互作用越多时,优势表现越明显,此时,使用单因素试验法几乎不可能实现。孟和毕力格^[6]等人利用正交试验对传统乳制品中产 γ -GABA 乳酸菌培养基进行了优化,获得了满意结果,采用优化后的培养基于 32℃ 发酵培养 96 h,产物含量高达 10.78 g/L。钟为章^[7]等人采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表对红螺菌科光合细菌液体培养基组成进行了优化,利用优化培养基在光照 3000 lx、(32±2)℃ 条件下培养 3 d,细菌总数由 1.63×10^9 cfu/mL 增殖至 3.68×10^9 cfu/mL。蔡成岗^[8]等人以角蛋白酶为考察指标,采用正交试验对枯草芽孢杆菌菌株 KD-N2 生产角蛋白酶培养基进行了优化研究,产物酶活力可达到 (66.5±2.04)U/mL。在正交试验中,如果所考察的指标涉及到模糊因子时,不能直接使用正交设计试验法,可以把正交试验结果模糊化,然后用模糊数学的理论和方法处理试验数据。陈敏^[9]等人利用模糊正交法,把试验结果模糊化,以模糊综合评价价值为目标函数优化了锌酵母发酵培养基组成。模糊正交法通过把正交试验结果模糊化,然后用模糊数学的理论和方法处理试验数据,不仅能估计因素的主效应,还可以估计因素的最佳搭配,能在同样试验工作量情况下获得更多的信息^[10]。

3 均匀设计法

均匀设计法(Uniform Design)是一种考虑试验点在试验范围内充分均匀散布的试验设计方法^[11],其基本思路是尽量使试验点充分均匀分散,使每个试验点具有更好的代表性,但同时舍弃整齐可比的要求,以减少试验次数,然后通过多元统计方法来弥补这一缺陷,使试验结论同样可靠^[12],均匀设计一般采用二次型回归模型:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^i \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

式中: $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ 为回归系数; ε 为随机误差; $t=C_n^2, i=1,2,\dots,n; i>j$; X_i, X_j 反映两因素交互作用; X_i^2 反映了因素的二次项影响。

由于每个因素每一水平只作一次试验,因此,当试验

条件不易控制时,不宜使用均匀设计法。对波动相对较大的微生物培养试验,每一试验组最好重复 2~3 次以确定试验条件是否易于控制,此外,适当地增加试验次数可提高回归方程的显著性。均匀设计法与正交设计试验法相比,试验次数大为减少,因素、水平容量较大,利于扩大考察范围,如当因素数为 5,各因素水平为 31 的试验中,如果采取正交设计来安排试验,则至少要做 $31^2=961$ 次试验,而用均匀设计只需要做 31 次试验。在试验数相同的条件下,均匀设计法的偏差比正交设计试验法小。在使用均匀设计法进行条件优化时,应注意几个问题:①正确使用均匀设计表,可参考方开泰制定的常用均匀设计表,每个均匀设计表都应有一个试验安排使用表,要注意变量、范围和水平数的合理选择。②不要片面追求过少的试验次数,试验次数最好是因素的 3 倍。③要重视回归分析,为了避免回归时片面追求回归模型的项数、片面追求大的 R^2 值和误差自由度过小等问题,可通过选择 n 稍大的均匀设计表,误差自由度 ≥ 5 ,回归模型最好不大于 10,在已知实际背景时少用多项式,在采用多项式回归时尽量考虑二次的。④善于利用统计图表,在均匀设计中,各种统计点图,如残差图、等高线图、正态点图、偏回归图等,对数据特性判定和建模满意度的判断非常有用。⑤均匀设计包的使用,如 DPS、SPSS、Sigmaplot、SAS 等。王剑锋^[13]等人利用均匀设计、二次多项式逐步回归分析对烟管菌 *Bjerkandera adusta* WZFF.W-Y11 产漆酶液态发酵培养基进行优化,在优化条件下进行液态培养可稳定获得 9672 U/L 的漆酶活力。

4 响应面优化设计法

响应面优化设计法是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法,是数学方法和统计方法结合的产物,它可以用来对人们受多个变量影响的响应问题进行数学建模与统计分析,并可以将该响应进行优化。它能拟合因素与响应间的全局函数关系,有助于快速建模,缩短优化时间和提高应用可信度。一般可以通过 Plackett-Burman (PB)设计法或 Central composite design (CCD) 等从众多因素中精确估计有主效应的因素,节省实验工作量^[14-15]。响应面分析法以回归法作为函数估算的工具,将多因子试验中因子与试验结果的相互关系,用多项式近似,把因子与试验结果(响应值)的关系函数化,依此可对函数的面进行分析,研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系,并进行优化。周海鸥^[16]等人应用 PB 设计法对影响桑黄发酵的培养基组成进行筛选,再采用 CCD 设计结合响应面对影响菌丝得率的关键因素最佳水平进行了深入研究,并通过二次方程回归求解得到最优化条件,此

模型与预测值极为接近,吻合性较好。姜丽艳^[17]等人应用PB设计法对影响乳链菌肽液体发酵培养基组分进行了筛选,然后采用最陡爬坡实验逼近3个关键因素的最大响应区域,找到了最优化的水平,在此培养条件下进行发酵培养,发酵液中乳链菌肽效价为6033 U/mL,是优化前的4.48倍。钟国华^[18]等人采用中心组分旋转设计技术,根据菌丝干重和高效氯氟菊酯降解率,按照统计学要求检测模型显著性,分析了配方组合对降解菌生长量、高效氯氟菊酯降解率的影响和效应,采用二次多项式逐步回归分析模型,根据响应面模型和预测回规模型方差分析对模型进行评价,以确定最佳培养基配方。利用优化培养基进行培养,菌体干重为450.30 mg/50 mL培养菌液,处理24 h对50 mg/L高效氯氟菊酯降解率高达93.78%。王普^[19]等人用部分因子试验筛选了影响*Candida tropicalis* 104产高选择性羧基还原酶的因素,继而采用最陡爬坡路径逼近最大响应区域并结合CCD和RSM对3个显著性因素进行分析,得到了优化的培养基组成,采用该优化培养基进行发酵培养,供试菌株羧基还原酶活力达到851.13 U/L,较优化前提高了65.2%。

5 二次正交旋转组合法

前面介绍的几种方法具有试验设计和结果分析简单、实际应用效果好的优点,在微生物培养基优化中得到了广泛的应用,但它们不能对各组分进行定量分析,不能对产量进行预测。所以,在正交设计试验法的基础上,加入组合设计和旋转设计的思想,并与回归分析方法有机结合,建立了二次回归正交旋转组合法(rotation regression orthogonal combination),它是旋转设计的一种,不仅基本保留了回归正交设计的优点,还能根据测量值直接寻求最优区域,适用于分析参试因子的交互作用。它既能分析各因子的影响,又能建立定量的数学模型,属更高层次的试验设计技术。基本思路是利用回归设计安排试验,对试验结果用方程拟合,得到数学模型,利用计算机对模型进行图形模拟或数学模拟,求得模型的最优解和相应的培养基配方,并在一定范围内预估出在最佳方案时的产量^[20],与响应面法有相似之处。张钟元^[21]等人为了提高*Proteus mirabilis*产L-肉碱脱水酶的活力,通过单因素试验研究了碳源、氮源及诱导物等对酶生物合成的影响的基础上,采用二次正交旋转组合法优化了培养基组分分配比,使L-肉碱脱水酶活力由最初的1.90 U/mL提高到了5.32 U/mL,与模型预测值较为接近,取得了预期效果。刘晓永^[22]等人为提高酵母菌中 β -葡聚糖的含量,在单因素试验基础上,应用二次正交旋转组合法设计培养基成分,获得了优化后的培养基配

方,培养基经优化后,酵母菌中 β -葡聚糖产量由原来的65.80 mg/100 mL提高至108.18 mg/100 mL,获得了满意的结果。

6 遗传算法与神经网络

遗传算法(genetic algorithms,GA)是一新型智能优化算法,由美国的Holland提出,是进化算法(evolutionary algorithms,EA)中的一种,是基于达尔文的进化论和孟德尔的遗传学说,仿效生物的进化与遗传,根据“生存竞争”和“优胜劣汰”的原则,借助复制、交换、突变等操作,使所要解决的问题从初始解一步步逼近最优解,遗传算法模拟生物遗传和进化原理,在反复迭代的过程中,将适应度高的个体更多的遗传到下一代,为确保在整个n维空间搜索最优解,群体由一定数量的个体组成,在遗传的同时,个体在一定的概率下发生交叉互换,并在一定的概率下发生变异,所以,将在最终的群体中得到一个或若干个优良的个体,其对应的表现型即为达到或接近问题的最优解,培养基配方优化的遗传算法基本过程见图1^[23],遗传算法在整个可行域内进行随机寻优,并对搜索空间的多个解进行评估,能有效防止搜索过程限于局部最优解,最终达到或逼近全局最优解。最早报道GA应用于培养基优化的是Freyer等^[24],其后Zuzek^[25]等也进行了尝试,由于它在培养基优化方面不需要建立数学模型确定各因素之间的相互影响,有目标函数值即可的优越性而受青睐。与其他传统搜索方法相比,GA在搜索过程中不易陷入局部最优,即使所定义的目标函数非连续、不规则或伴有噪声,它也能以很大的概率找到全局最优解,同时,由于GA固有的并行性,使得它适合于大规模的并行分布处理,而且GA容易介入到已有的模型中并且具有可扩展性,易于和其他技术如神经网络、模糊推理、混沌行为和人工生命等相结合,形成性能更优的问题求解方法^[26]。运用配方优化的遗传算法所搜索出的决策因素最优区间,可以免馈到进一步的配方试验中,有效地缩短确定优化配方的时间与减少试验次数。

神经网络是一种“黑箱”模型,具有很强的非线性映射能力,可用于反映非线性条件下,难以用常规的数学模型描述的问题^[27]。遗传算法以自然选择和遗传理论为基础,将生物进化过程中适者生存规则与群体内部染色体的随机信息交换机制相结合的高效全局寻优搜索算法^[28]。神经网络和遗传算法的结合可以通过引入非线性的模型来描述各因素间复杂的关系,并在遗传算法的基础上,通过全局寻优找出最佳值。罗剑飞^[29]等人利用神经网络(ANN)和遗传算法(GA)结合的优化方法优化了培养基组成,并获得了最高“性价比”的培养基,通过发酵经济

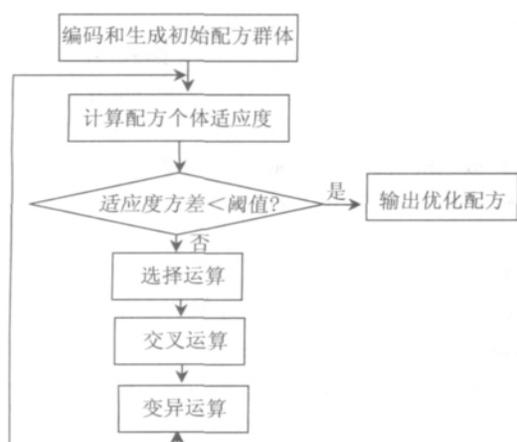


图1 培养基配方优化遗传算法基本流程

学的初步统计发现,优化后的培养基比初始培养基,其“性价比”提高了27.36%。试验表明,通过优化可以大大减少生产中的成本消耗。宋文军^[30]等应用GA优化了L-Ile发酵培养基组成,并运用ANN技术对发酵过程进行建模并预测,取得了良好效果,实现发现,ANN在L-Ile发酵的模拟和预测是一种快速方法。

7 模式识别

模式识别方法是从空间区域划分和属性类别判断角度出发,处理多元数据的一种非函数方法。该方法用一组表示被研究对象特征的变量构成模式空间,按“物以类聚”的观点分析数据结构,划分出具有特定属性模式类别的空间聚集区域,并辨认每一个模式的类别。由计算机按模式识别原理处理数据信息,做出最优决策。熊明勇^[31]等人应用模式识别,以培养基组成构筑模式空间,以黄色短杆菌TV10为出发菌株,通过主成分分析(PCA)揭示模式空间的可视化区域,选择优化点并逆推回到高维空间得到最优培养基组成,结果表明,该菌株可积累-缬氨酸26.38 g/L,比初始值提高7.8%。

8 展望

微生物初级代谢产物和次级代谢的生物合成其发酵机理十分复杂,受很多因素的影响,如培养基组成、培养温度、pH、发酵时间、菌种理化特性及发酵工艺等。适宜的培养基配方和合适的发酵条件成为产物生成量高低和原料利用率高低的决定因素。一般情况下,培养基组分繁多且各成分间还可能存在着错综复杂的交互作用。因此,微生物培养基的组成优化就显得十分重要和必要。培养基优化常规方法有单因素试验法、正交设计试验法及响应面分析法,还有一些实践应用相对较少的,如均匀设计法、二次回归旋转组合法、遗传算法等。培养基优化方法的选择,可以采取单一方法,也可以用几种方法的组合,

要根据实际情况合理选择。培养基优化方法除本文中提到的常用培养基优化方法外,还有研究者不断开拓新方法或采用不同方法交叉对培养基进行优化,如聚类分析方法等^[32]。笔者相信,随着数理统计方法和优化技术的发展和运用,将来一定还会出现更适用、更方便、可行性更好的微生物培养基优化方法。

参考文献:

- [1] Isar J, Agarwal L, Saran S, et al. A statistical approach to study the interactive effects of process parameters on succinic acid production from *Bacteroides fragilis*[J]. *Anaerobe*, 2007, 13: 50-56.
- [2] 王晓辉, 蔡少华, 迟乃玉, 等. 海洋低温 BS070623 菌株选育及其发酵培养基优化(I)[J]. *渤海大学学报*, 2009, 30(2): 97-100.
- [3] Dan Y, Zhi-Nan X, Pei-Lin C. Medium optimization for enhanced production of cytosine-substituted Miltiomycin Analogue (MIL-C) by *Streptovercillium rimofaciens* ZJU 5119[J]. *Zhejiang Univ. Sci B*, 2008, 9(1): 77-84.
- [4] Liu C, Ruan H, Shen H, et al. Optimization of the fermentation medium for alpha-galactosidase production from *Aspergillus Foetidus* ZU-G1 using response surface methodology[J]. *J. food Sci*, 2007, 72(4): 120-125.
- [5] Saudagar P S, Singhal R S. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*[J]. *Bioresour technol*, 2007, 98(10): 2010-2017.
- [6] 孟和毕力格, 冀林立, 罗斌, 等. 传统乳制品中产 γ -氨基丁酸乳酸菌的培养基优化[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(7): 124-127.
- [7] 钟为章, 罗一菁, 张忠智, 等. 红螺菌科光合细菌液体培养基的优化[J]. *化学与生物工程*, 2009, 26(7): 67-69.
- [8] 蔡成岗, 郑晓冬. 以羽毛为底物发酵产角蛋白酶培养基的优化[J]. *科技通报*, 2009, 25(4): 451-455.
- [9] 陈敏, 王静馨. 模糊正交法用于产酵母发酵培养基条件优化的研究[J]. *食品与发酵工业*, 1994, 5: 24-28.
- [10] 盛冠忠, 李龙, 蒋芳. 模糊正交法用于棉秆皮纤维提取工艺参数优化的研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2009, 17(1): 12-16.
- [11] Liu D, Wang P, Li F. Application of uniform design in l-isoleucine fermentation[J]. *China J Biotechnol*, 1991, 7(3): 207-212.
- [12] Wang F Q, Gao C J, Yang C Y. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation[J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(2): 233-236.
- [13] 王剑锋, 李江, 王璋. 均匀设计法优化烟管菌产漆酶培养基[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 625-628.
- [14] 陆燕, 梅乐和, 陆悦飞, 等. 响应面法优化工程菌产细胞色素 P450BM23 的发酵条件[J]. *化工学报*, 2006, 57(5): 1187-1192.
- [15] Wu Q L, Chen T, Gan Y. Optimization of Riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical design[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(4): 783-794.
- [16] 周海鸥, 汪传高, 张益波. 统计学分析方法应用于桑黄菌发酵培养基的优化[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(5): 44-48.

- [17] 姜丽艳,李雪,逯家辉,等.应用统计学分析方法优化乳链菌肽发酵培养基[J].化学反应工程与工艺,2008,24(6):562-567.
- [18] 钟国华,何玥,罗建军,等.高效氯氟菊酯降解菌株 HG-P-01 的培养基筛选及优化[J].微生物学通报,2009,36(5):672-677.
- [19] 王普,孙立明,何军邀.响应面法优化热带假丝酵母 104 菌株产羧基还原酶发酵培养基[J].生物工程学报,2009,25(6):863-868.
- [20] 王惠,吴兆亮,董应凯,等.应用二次回归正交旋转组合设计优化黄霉素发酵培养基[J].食品研究与开发,2006,27(6):19-22.
- [21] 张钟元,王强,田金强.奇异变形杆菌产 L-肉碱脱水酶的培养基优化[J].食品工业科技,2009,30(7):181-184.
- [22] 刘晓永,王强,刘红芝.基于二次正交旋转回归试验的酵母 β -葡聚糖发酵培养基优化[J].酿酒科技,2007,4:32-36.
- [23] 刘雄恩,陈聪,骆兰,等.基于遗传算法的苏云金芽孢杆菌培养基配方优化[J].应用与环境生物学报,2008,14(5):705-709.
- [24] Freyer S, Weuster B.D, Wandrey C. Medium optimization using genetic algorithms [J]. Biochem eng, 1992,(8):16-25.
- [25] Zuzek M, Friedrich J, Cestnik B, et al. Optimization of fermentation medium by a modified method of genetic algorithms[J]. J Biotechnol technol, 1996, 10: 991-996.
- [26] Nagata Y, Chu K H. Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms[J]. Biochnol Lett, 2003,25(21):1837-1842.
- [27] Franco-Lara E, Link H, Weuster-Botz D. Evaluation of artificial neural networks for modeling and optimization of medium composition with a genetic algorithm[J]. Process Biochemistry, 2006,41:2200-2206.
- [28] Desai K M, Akolkar S K, Badhe Y P, et al. Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques[J]. Process Biochemistry, 2006,41:1842-1848.
- [29] 罗剑飞,林炜铁.基于神经网络和遗传算法培养基优化的发酵经济学[J].食品与生物技术学报,2009,28(3):424-428.
- [30] 宋文军,陈宁,熊明勇,等. L-异亮氨酸发酵培养基的遗传算法优化及发酵过程的神经网络建模[J].天津师范大学学报(自然科学版),2003,23(1):46-50.
- [31] 熊明勇,陈宁,张克旭. L-缬氨酸生产菌的选育及其发酵培养基的模式识别优化[J].氨基酸与生物资源,2003,25(1):52-54.
- [32] 罗致强,宫衡,付水林.聚类分析在红霉素摇瓶培养基无机盐分析中的应用[J].中国抗生素杂志,2006,31(3):172-175.

(上接第 89 页)

- [17] 武仙山,何立千.交联酶聚集体——一种无载体酶固定化方法[J].生物技术,2005,15(2):90-92.
- [18] Linqu Cao, Fred van Rantwijk. Cross - linked enzyme aggregates :A simple and effective method for the immobilization of *Penicillin acylase* [J]. Org.Lett. ,2000 ,2 (10):1361-1364.
- [19] 董晓毅,夏仕文.交联脲酶聚集体的制备和初步应用[J].生物工程学报,2003,19(3):332-336.
- [20] 潘延芳,孔珊珊,陈怡倩,吴自荣,王隆华.交联重组枯草杆菌纤溶酶聚集体的制备及其性质研究[J].中国生化药物杂志,2007,28(5):318-321.
- [21] 邵卫祥,莫晓燕,李黎.磁性交联核酸酶 P1 聚集体的制备及性质研究[J].西安交通大学学报,2008,42(8):1035-1039.
- [22] 曹黎明,陈欢林.酶的定向固定化方法及其对酶生物活性的影响[J].中国生物工程杂志,2003,23(1):22-28.
- [23] 刘琳琳,曾力希,刘婷,邓乐.金属螯合载体定向固定化木瓜蛋白酶的研究[J].生物工程学报,2005,21(5):789-793.
- [24] 周建芹,陈韶华,王剑文.以伴刀豆球蛋白为介质定向固定化脲酶的研究[J].生物工程学报,2008,24(4):617-621.
- [25] 闫跃文,侯红萍.共固定化技术的发展现状[J].畜牧兽医科技信息,2006,(3):90-91
- [26] 沈雪亮,夏黎明.共固定化细胞协同糖化发酵纤维素原料产乳酸[J].化工学报,2008,59(1):167-172.
- [27] 李雪雁,戈凌云.乳糖酶和酿酒酵母的共固定化及其在乳清发酵中的应用[J].中国酿造,2008,(3):54-57.
- [28] Lin S S, Miyawaki O, Nakamura K. Continuous production of L - alanine with NADH regeneration by a nanofiltration membrane reactor[J]. Biosci Biotech Bioch ,1997 ,61 :2029-2033.
- [29] Spohn U , Preuschoff F, Blankenstein G, et al . Chemilumino-metric enzyme sensors for flow - injection analysis[J] . Anal Chim Acta ,1995 ,303 :109-120.
- [30] Conrath N , Grundig B ,Huwel St , et al . A novel enzyme sensor for the determination of inorganic phosphate [J] .Anal Chim Acta ,1995 ,309 :47-52.

欢迎订阅《酿酒科技》