

文章编号:1673-1689(2005)06-0054-06

L-异亮氨酸菌种选育及发酵条件优化

李 进, 张伟国*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 以栖糖蜜棒杆菌(*Corynebacterium melassecola*) ATCC17965 为出发菌株, 根据代谢控制发酵原理, 经硫酸二乙酯和⁶⁰Co 诱变处理, 定向选育出一株 L-异亮氨酸产生菌 I31-5(SG^r + Leu-ME^r + Leu⁻ + AHV^r + Suc^g + Eth^r), 在培养基未经优化的情况下产 L-异亮氨酸 14~15 g/L. 同时, 考察了培养基及发酵条件对菌株产酸的影响, 在优化的培养基和发酵条件下积累 L-异亮氨酸 19.2 g/L, 最高时可达 21.3 g/L.

关键词: L-异亮氨酸; 育种; 发酵; 栖糖蜜棒杆菌

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Breeding of L-Isoleucine Producer and its Optimal Fermentation Conditions

LI Jin, ZHANG Wei-guo*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, WuXi 214036, China)

Abstract: Original strain *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 was mutated by DES and ⁶⁰Co, then a L-Isoleucine producing strain named I31-5(SG^r + Leu-ME^r + Leu⁻ + AHV^r + Suc^g + Eth^r), was obtained. This strain could produce 14~15 g/L of L-Isoleucine. The effects of medium and fermentation conditions on the L-Ile producing strain were also studied. I31-5 could accumulate 19.2g/L of L-Isoleucine averagely and a highest L-Isoleucine level of 21.3g/L could be obtained under the optimal fermentation conditions.

Key words: L-Isoleucine; breeding; fermentation; *Corynebacterium melassecola*

L-异亮氨酸是人体 8 种必须氨基酸之一, 同时又是 3 种支链氨基酸之一, 因其特殊的结构和功能, 在人类生命代谢中占有特别重要的地位, 主要用于食品和医药卫生方面. L-异亮氨酸的生产方法有提取法、化学合成法、和发酵法 3 类, 但由于 L-异亮氨酸分子有两个不对称的碳原子, 目前很难采用化学合成法或化学合成法和酶法结合的方法来制造高纯度的 L-异亮氨酸, 在工业生产上实施的只有

发酵法^[1,2].

国内外报道了很多以黄色短杆菌、乳糖发酵短杆菌等为出发菌株选育 L-异亮氨酸产生菌的育种实例, 但采用栖糖蜜棒杆菌为出发菌株选育 L-异亮氨酸产生菌还未见报道^[3]. 作者根据代谢控制发酵原理, 以栖糖蜜棒杆菌 ATCC17965 为出发菌株, 经诱变处理定向选育出一株带有 SG^r + Leu-ME^r + Leu⁻ + AHV^r + Suc^g + Eth^r 遗传标记的 L-异亮氨酸

收稿日期: 2005-01-10; 修回日期: 2005-02-24.

基金项目: 湖北省科技攻关项目(2004AA302A01).

作者简介: 李进(1979-)男, 江苏大丰人, 发酵工程硕士研究生. * 责任作者.

产生菌 I31-5. 由于 L-异亮氨酸生物合成途径的特殊性, 发酵条件及培养基组成对菌株发酵产酸影响很大, 因此作者对 L-异亮氨酸产生菌 I31-5 的摇瓶发酵条件进行了考察, 确定了最佳的培养基组成及发酵条件^[4,5].

1 材料与方法

1.1 菌株

栖糖蜜棒杆菌(*Corynebacterium melassecola*) ATCC17965, 江南大学氨基酸研究室保藏菌种.

1.2 培养基

1.2.1 基本培养基(g/dL) 葡萄糖 20, (NH₄)₂SO₄ 1.5, 尿素 1.5, KH₂PO₄ 1, K₂HPO₄ 3, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, MnSO₄ · 4H₂O 0.01, FeSO₄ · 7H₂O 0.01, 生物素 50 μg/L, 硫胺素 100 μg/L, 琼脂条 20. pH 值 7.0.

1.2.2 完全培养基(g/dL) 葡萄糖 5, 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, NaCl 5, 琼脂条 25. pH 值 7.0.

1.2.3 摇瓶种子培养基(g/dL) 葡萄糖 25, (NH₄)₂SO₄ 5, 玉米浆 40, KH₂PO₄ 1, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, CaCO₃ 10. pH 7.0.

1.2.4 摇瓶发酵培养基(g/dL) 葡萄糖 100, (NH₄)₂SO₄ 40, 玉米浆 15, KH₂PO₄ 1.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, Leu 0.1, CaCO₃ 10. 生物素 30 μg/L, pH 值 7.0.

完全培养基、基本培养基和种子培养基均以 20% 的 NaOH 调至 pH 7.0, 0.1 MPa 下灭菌 20 min; 发酵培养基以 20% 的 NaOH 调 pH 至 7.0, 0.07 MPa 压力灭菌 10 min.

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养 接一环生长良好的斜面种子于装有 40 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 ℃ 于往复式摇床上培养 11 h, 85 r/min, 振幅 90 mm.

1.3.2 发酵培养 接 1 mL 种子液于装有 15 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 ℃ 于往复式摇床上培养 72 h, 100 r/min, 振幅 90 mm.

1.4 诱变筛选方法

采用常规化学诱变. 硫酸二乙酯(DES)的诱变体积分数为 0.02%, 处理时间为 15 min, 用磺胺胍、亮氨酸甲酯(L-Leu methylester · HCl, 简称为 Leu-ME)、α-氨基-β-羟基戊酸^[6]、琥珀酸^[3]及乙硫氨酸筛选^[7]; γ 射线的照射源为⁶⁰Co, 诱变剂量为 100 000 Lux, 处理时间为 60 min, 用基本培养基及氨基酸补充培养基平板筛选. 30 ℃ 恒温培养 3~6 d, 挑选出单菌落于完全培养基平板上, 待用.

1.5 分析方法

1.5.1 pH 测定 国产精密 pH 试纸及 pH 值测定仪.

1.5.2 菌体生长测定 取 0.2 mL 待测液, 加入 0.25 mol/L 盐酸溶液中, 摇匀, 用 721 型分光光度计, 1 cm 光程 562 nm 测 OD 值.

1.5.3 发酵液中还原糖的测定 菲林试剂滴定法和 3,5-二硝基水杨酸测定法(DNS).

1.5.4 发酵液中 L-异亮氨酸含量的测定 采用新华 3 号滤纸在室温下用不饱和法展开, 用展开剂 V (正丁醇: 冰醋酸: 水=12: 3: 5) 上行法展开. 称取一定量的异亮氨酸标准样品, 配成 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% 不同浓度的溶液, 每种溶液点样 1 μL. 发酵液经离心后, 取其上清液点样 1 μL. 层析结束后热风吹干滤纸, 0.5% 茚三酮丙酮溶液显色, 105 ℃ 烘干 5 min, 滤纸上出现紫红色氨基酸斑点, 将对应的斑点剪下, 放入有 5 mL 洗脱剂 (75% 乙醇: 0.2% CuSO₄ · 5H₂O=38: 2) 的试管中进行洗脱(要盖住试管口, 防止乙醇挥发) 40 min, 用 721 分光光度计在 506 nm 处、光程 1 cm 进行测定, 从标准曲线上可求得发酵液中 L-异亮氨酸的含量.

2 结果与讨论

2.1 L-异亮氨酸产生菌选育谱系

从野生型谷氨酸产生菌栖糖蜜棒杆菌(*Corynebacterium melassecola*) ATCC17965 为出发菌株, 经硫酸二乙酯和⁶⁰Co 诱变处理, 依次赋予 SG^r、Leu-ME^r、Leu⁻、AHV^r、Suc^g、Eth^r 遗传标记, 得到一株 L-异亮氨酸产生菌 I31-5, 在适宜的条件下摇瓶产酸平均为 14~15 g/L. 选育过程见图 1.

2.2 发酵培养基优化

优化发酵培养基的根本目的就是为了使菌体能最大限度的合成目的产物, 发酵培养基的好坏直接影响到菌体的生长状态及目的产物的合成. 发酵培养基与种子培养基不同, 它不仅提供菌体生长繁殖所需的营养和能源, 而且也构成 L-异亮氨酸的物质来源, 要积累大量的 L-异亮氨酸, 就要有适量的碳源和氮源, 而且无机盐及生长因子也是必须考虑的影响因素^[8~10].

2.2.1 不同碳源、氮源对 I31-5 合成 L-Ile 的影响

碳源是供应微生物碳元素的营养物质, 是构成菌体细胞的重要材料, 主要用于合成菌体的糖类、脂肪以及次级代谢产物, 是微生物生命活动能量来源

和物质基础^[11]. 作者考察了在发酵培养基中分别加入不同碳源对菌体产酸的影响(添加质量浓度为 100 g/L), 结果见图 2. 氮源是合成菌体蛋白质、核酸、酶及各种初级和次级代谢产物等含氮物质, 在 L-异亮氨酸的生物合成中, 它是合成 L-异亮氨酸氨

基的来源, 在发酵生产中选用合适的氮源很重要^[11]. 为此作者考察了在发酵培养基中分别添加不同氮源(含氮量以硫酸铵 40 g/L 的用量的含氮量来计算其它氮源的添加量)对 I31-5 合成 L-Ile 影响, 结果见图 3.

菌 株	L-异亮氨酸质量浓度(g/L)
栖糖蜜棒杆菌 ATCC17965	未检出
↓ DES	
I 1-177(SG ^r)	2.4
↓ DES	
I 2-5(SG ^r , Leu-ME ^r)	3.8
↓ ⁶⁰ Co	
I 3-110(SG ^r , Leu-ME ^r , Leu ⁻)	5.1
↓ DES	
I 4-34(SG ^r , Leu-ME ^r , Leu ⁻ , AHV ^r)	9.5
↓ DES	
I 5-26(SG ^r , Leu-ME ^r , Leu ⁻ , AHV ^r , Suc ^g)	11.6
↓ DES	
I 6-31(SG ^r , Leu-ME ^r , Leu ⁻ , AHV ^r , Suc ^g , Eth ^r)	13.8
↓ 单菌落分离及工艺改良	
I 31-5(SG ^r , Leu-ME ^r , Leu ⁻ , AHV ^r , Suc ^g , Eth ^r)	14~15

图 1 L-异亮氨酸产生菌 I31-5 选育谱系

Fig. 1 Genealogy of L-Isoleucine producing mutants

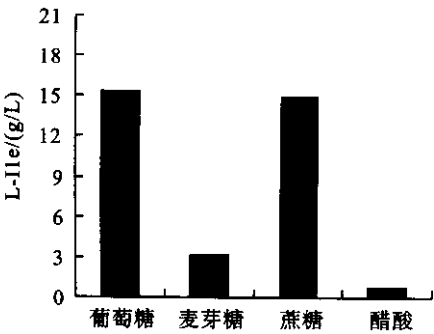


图 2 不同碳源对 L-异亮氨酸发酵的影响

Fig. 2 Effect of Carbon Sources on L-Ile fermentation

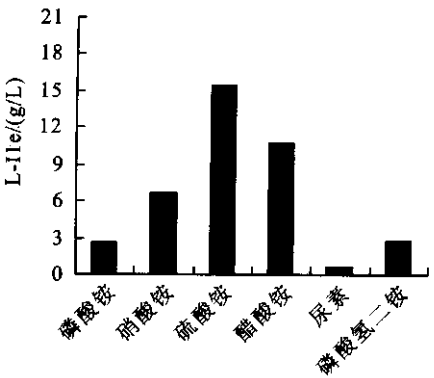


图 3 不同氮源对 L-异亮氨酸发酵的影响

Fig. 3 Effect of Nitrogen Sources on L-Ile fermentation

图 2 表明,葡萄糖和蔗糖对 I31-5 合成 L-Ile 效果都很好,但由于用蔗糖来发酵,发酵过程中残糖的测定较为复杂,所以选择葡萄糖作为碳源更为合适. 图 3 表明,不同氮源对 I31-5 合成 L-Ile 影响很大,从产酸角度看,硫酸铵最好,醋酸铵其次,其它的氮源菌体几乎不利用,因此选择硫酸铵为氮源.

2.2.2 发酵培养基葡萄糖、硫酸铵和玉米浆用量对 I31-5 合成 L-Ile 的影响 据报道,发酵培养基葡萄糖质量浓度对积累 L-Ile 有很大影响,在一定浓度范围内, Ile 产量随糖质量浓度的增加而增加,但糖质量浓度过高对发酵产酸不利;硫酸铵质量浓度也应该在适宜的范围内,否则对菌体生长和产酸都不利;玉米浆由于成分复杂,用量过多,杂酸产量上升,对后续提取工作不利,所以作者考察了发酵培养基中这 3 个主要因素对发酵产酸的影响,结果见图 4~6 所示. 结果表明,以葡萄糖 12 g/dL,硫酸铵 5 g/dL,玉米浆 1.5 g/dL 为宜.

2.2.3 发酵培养基中营养因素用量对 I31-5 合成 L-Ile 的影响 微生物生长发育所必需的养料以及不可缺少的微量有机物质称为生长因素. 在发酵生产过程中,为了促进种子发育和生长,提高目的产物的产量,常常需另外补加生长因素. 作者考察了在发酵培养基中添加生物素、硫胺素及亮氨酸对积累 L-Ile 的影响,结果见图 7,8 及表 1 所示.

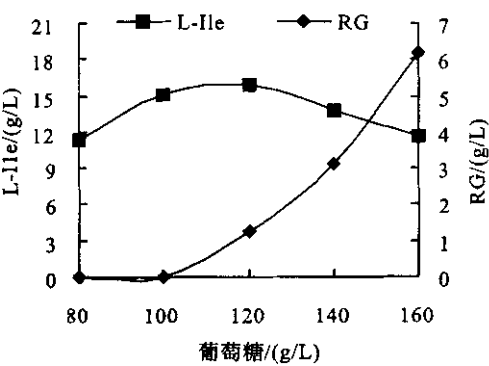


图 4 葡萄糖质量浓度对 L-异亮氨酸发酵的影响
Fig. 4 Effect of Glucose on L-Ile Fermentation

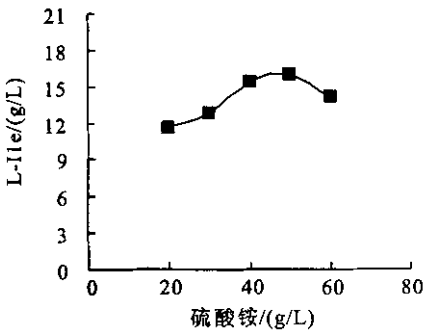


图 5 硫酸铵质量浓度对 L-异亮氨酸发酵的影响
Fig. 5 Effect of (NH₄)₂SO₄ on L-Ile fermentation

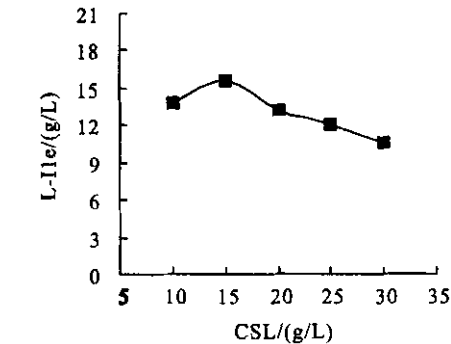


图 6 玉米浆质量浓度对产 L-异亮氨酸的影响
Fig. 6 Effect of Corn Steep Liquor on L-Ile Fermentation

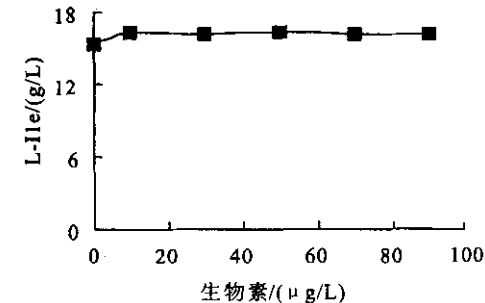


图 7 生物素质量浓度变化对产 L-异亮氨酸的影响
Fig. 7 Effect of biotin on L-Ile fermentation
万方数据

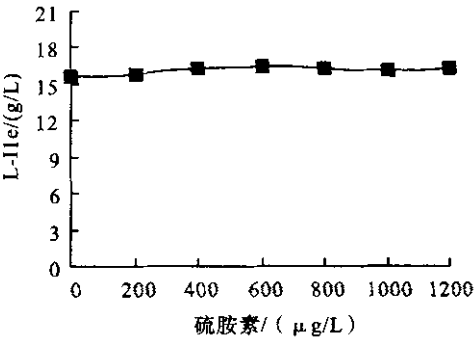


图 8 硫酸素质量浓度变化对产 L-异亮氨酸的影响
Fig. 8 Effect of (NH₄)₂SO₄ on L-Ile fermentation

表 1 添加 Leu 质量浓度变化对 I31-5 合成 L-Ile 的影响

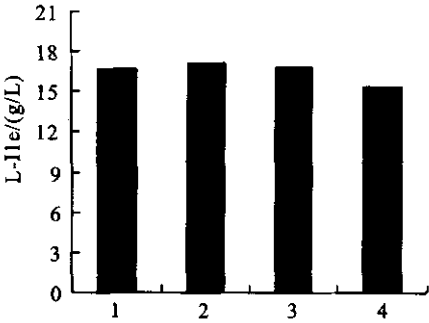
Tab. 1 Effect of Leucine addition on L-Ile Fermentation			
Leu 添加量/ (g/L)	L-Ile 产量/ (g/L)	Leu 添加量/ (g/L)	L-Ile 产量/ (g/L)
0.05	14.7	0.5	量少
0.1	16.9	0.7	不产
0.3	11.3	0.9	不产

实验发现:随着生物素质量浓度的增加,菌体生长也增加,但从产酸角度分析,图 7 表明:当发酵液中生物素质量浓度达到 10~90 μg/L 时,产酸差异不大,趋于稳定,所以选择生物素质量浓度为 10μg/L 较合适;图 8 表明:硫酸素添加量变化对菌体产酸影响不大,600~1 200 μg/L 产酸相差不大,综合考虑,选择硫酸素质量浓度为 600 μg/L;从表 1 可知,Leu 添加过多对菌体产酸不利,甚至阻断合成 L-Ile 的代谢流,所以添加 Leu 的合适质量浓度应为 0.1 g/L.

2.2.4 培养基组分分开灭菌对 I31-5 合成 L-Ile 的影响 在发酵培养基中含有 120 g/L 的葡萄糖和 15 g/L 的玉米浆以及含有 0.1 g/L 的亮氨酸,由于玉米浆中成分复杂,含有各种氨基酸、生长因子等,将其与高质量浓度的葡萄糖一起高温灭菌,会使葡萄糖与各种氨基酸发生美拉德反应、各种营养成分受到不同程度的破坏.为了能够使营养成分更少地被破坏,更多地被菌体利用来维系其生命活动和生产目的氨基酸——L-异亮氨酸,作者考察了将发酵培养基中玉米浆、亮氨酸与培养基分开灭菌(接种时按原先培养基中玉米浆和亮氨酸的配比加入)对产酸的影响,结果见图 9.

图 9 表明,将玉米浆组分、亮氨酸组分与培养基分开灭菌可以提高菌体的产 L-异亮氨酸的水平.比较而言,单独将玉米浆分开灭菌最利于菌体产酸,原因主要是这样可以减少培养基中葡萄糖、氨基酸在灭菌时被破坏的程度;将亮氨酸组分分开灭菌比不分开灭菌的效果要好,这主要是由于减少了

亮氨酸被破坏的程度,更多的用于促进菌体产酸,表 1 说明了培养基中亮氨酸质量浓度要在低质量浓度范围内,当大于 0.3 g/L 时菌体产酸水平下降,将亮氨酸组分分开灭菌产酸提高,说明此时的亮氨酸质量浓度在适宜的范围内;将玉米浆和亮氨酸都分开灭菌,产酸下降,究其原因可能是因为这时实际加入培养基中的亮氨酸质量浓度已经过量,对菌体产酸起到抑制作用.所以,根据以上分析,应选择将玉米浆组分与培养基分开灭菌.



“1”代表培养基组分没有分开灭菌;“2”代表玉米浆组分分开灭菌;“3”代表亮氨酸组分分开灭菌;“4”代表玉米浆和亮氨酸两组分都分开灭菌

图 9 培养基组分分开灭菌对产 L-异亮氨酸的影响

Fig. 9 Effect of separated Sterilization of medium components on L-Ile Fermentation

2.2.5 发酵培养基正交实验 在单因素实验基础

表 2 发酵培养基正交实验的因素与水平的选取及实验结果

Tab. 2 Factors and Data of the Levels in Orthogonal List of Medium

因素	葡萄糖/ (g/L)	硫酸铵/ (g/L)	玉米浆/ (g/L)	磷酸二氢钾/ (g/L)	生物素/ (μg/L)	硫胺素/ (μg/L)	亮氨酸/ (g/L)
水平	100 120 140	40 50 60	10 15 20	1.0 1.5 2.0	5.0 10.0 15.0	400 600 800	0.05 0.10 0.15
1	14.857	15.307	15.448	14.955	15.182	15.058	15.057
2	16.600	15.345	15.742	14.792	15.040	15.443	16.125
3	13.633	14.438	13.900	15.303	14.868	14.588	13.908
R	2.967	0.907	1.842	0.511	0.314	0.855	2.217
因素主次	1	4	3	6	7	5	2
最好水平	120	50	15	2.0	5.0	600	0.10

表 3 正交试验方差分析

Tab. 3 The Variance Analysis Result

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	$F_{0.10}(2,2)$	显著性	$F_{0.05}(2,2)$	显著性
葡萄糖	26.674	2	90.420	9.000	*	19.000	*
硫酸铵	3.155	2	10.695	9.000	*	19.000	
玉米浆	11.750	2	39.831	9.000	*	19.000	*
磷酸二氢钾	0.796	2	2.698	9.000		19.000	
生物素	0.295	2	1.000	9.000		19.000	
硫胺素	2.200	2	7.458	9.000	19.000		
亮氨酸	14.747	2	49.990	9.000	*	19.000	*
误差	0.29	2					

上,基本确定了发酵培养基中各组分及其适宜的使用量.对产 L-异亮氨酸影响较大的因素有葡萄糖、硫酸铵、玉米浆、磷酸二氢钾以及亮氨酸,同时选取生物素和硫胺素,采用 $L_{18}(3^7)$ 正交表进行试验,正交实验的因素与水平的选取及结果见表 2.

对测定的数据进行计算和方差分析,结果见表 3.由表 3 可知,在置信度 $\alpha=0.05$ 时,葡萄糖、玉米浆和亮氨酸这 3 个组分对发酵产酸的影响是显著的;在置信度 $\alpha=0.10$ 时,葡萄糖、硫酸铵、玉米浆和亮氨酸这 4 个因素对发酵产酸的影响是显著的.显著性的排序结果为:葡萄糖>亮氨酸>玉米浆>硫酸铵.因此,由正交实验结果及从实际考虑确定菌种 I31-5 的最优发酵培养基配比(g/L)和发酵的最佳工艺如下:葡萄糖 120,硫酸铵 50,玉米浆 15,磷酸二氢钾 2.0,硫酸镁 0.50,亮氨酸 0.10,碳酸钙 30,生物素 5.0μg/L,硫胺素 600μg/L,硫酸锌 7.5 mg/L,硫酸锰 12.5 mg/L,硫酸铁 7.5 mg/L,初始 pH 值 7.5,种龄 11 h,接种体积分数 10%,250 mL 圆底三角瓶装液量 12.5 mL,往复式摇床 30(±1)℃,摇床转速为 100 r/min,发酵周期为 72 h.采用上述优化的发酵培养基和工艺条件进行 I31-5 菌株的摇瓶发酵,产酸稳定在 19.2 g/L,最高可达 21.3 g/L,比未经优化的情况下产酸提高了 30%~37%.

3 讨 论

1)以栖糖蜜棒杆菌 ATCC17965 为出发菌株,通过筛选 L-Ile 的结构类似物突变株,来调节菌株内部代谢调节机制,使代谢流最大限度地流向 L-Ile 合成途径,从而获得了 I31-5 ($SG^r + Leu-ME^r + Leu^r + AHV^r + Suc^s + Eth^r$)。实验发现,结构类似物 AHV、Eth 对解除菌株内部反馈控制,提高菌体产酸作用明显,应进一步通过提高结构类似物 AHV、Eth 抗性浓度,以使菌株内部反馈调节机制得以遗传性脱敏。

2)菌株 I31-5 除了主要产 L-异亮氨酸外,还产杂酸 L-苏氨酸、L-缬氨酸、L-赖氨酸。根据文献[13~15]报道,上述几种氨基酸均需经过 HMP 途径,其合成均需提供还原力 NADPH,但比较而言,L-异

亮氨酸和 L-苏氨酸均在 HMP 途径流量达到最大时产量最高,这说明 L-异亮氨酸和 L-苏氨酸对 HMP 途径的依赖性很大。在这几种氨基酸中 L-苏氨酸的 TCA 的循环流量要求最大,L-异亮氨酸次之,L-赖氨酸、L-缬氨酸则相对较小,这种差异为发酵控制提供有益的提示,因为 TCA 的流量与发酵过程中的溶氧控制密切相关,在发酵产酸期保持高溶氧有利于 L-异亮氨酸和 L-苏氨酸的生成,有利于抑制 L-赖氨酸、L-缬氨酸等副产物的生成。但是 TCA 流量过大则 HMP 的流量不够,从而不利于需要大量 NADPH 的 L-异亮氨酸的生成,因此 TCA 流量应保持一个最适值。所以,在发酵过程中要注意对溶氧的控制,从而使主代谢流畅通,减少其他氨基酸的产生,增加 L-异亮氨酸的积累。

参考文献:

- [1] 宋文军,陈宁,魏春. 基于代谢流导向与分析的 L-异亮氨酸发酵条件优化[J]. 天津轻工业学院学报, 2003,18(2):15—19.
- [2] 常高峰,陈宁. L-异亮氨酸发酵代谢分析[J]. 生物技术通讯,2004,14(6):502—505.
- [3] 张伟国. L-异亮氨酸高产菌选育及发酵优化的研究[D]无锡:无锡轻工大学,1999.
- [4] Takayasu Tsuchida, Fumihiro Yoshinaga, Koji Kubota. Cultural conditions for L-Leucine production by strain No. 218, a mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256[J]. *Agr Biol Chem*,1975,39(5):1149—1153.
- [5] 张伟国. L-缬氨酸菌种选育[J]. 无锡轻工大学学报,1995,14(3):221—225.
- [6] Isamu Shiio, Akemi Sasaki, Shigeru Nakamori. Production of L-Isoleucine by AHV resistant mutants of *Brevibacterium flavum*[J]. *Agr Biol Chem*,1973, 37(9):2053—2061.
- [7] Shigeo Ikeda, Itsuo Fujita, Fumihiro Yoshinaga. Screening of L-Isoleucine producers among ethionine resistant mutants of L-Threonine producing bacteria[J]. *Agr Biol Chem*,1976,40(3):511—516.
- [8] 方杰. L-亮氨酸产生菌的选育及发酵条件优化[D]. 天津:天津轻工业学院,2000.
- [9] 宋文军,陈宁,魏春. L-异亮氨酸产生菌的选育及发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2003,29(3):34—37.
- [10] 许正宏,陈小静,奚文方. 营养及环境条件对黄色短杆菌 WL-10 发酵生产 L-异亮氨酸的影响[J]. 食品与发酵工业, 2002,28(5):14—17.
- [11] 王文仲. 应用微生物学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996.
- [12] 刘勇,陈雅丽,张长铠. L-异亮氨酸发酵对氧需求的影响[J]. 生物技术,1998,8(1):26—28.
- [13] 浦军平,陈刚,王开国. L-异亮氨酸发酵工艺条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003,29(2):93—96.
- [14] 宋文军,张克旭,张坤生,等. 不同供氧条件对 L-异亮氨酸合成代谢流的影响[J]. 中国食品学报,2003,3(1):23—27.

(责任编辑:李春丽,杨 萌)