

重组大肠杆菌生产海藻糖合酶发酵工艺优化

张悦^{1,2}, 宿玲恰^{1,2}, 吴敬^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了实现来源于嗜热柄热菌的海藻糖合酶的高效表达, 对 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-TreS 基因工程菌在 3 L 发酵罐进行了发酵工艺优化, 获得的最优发酵条件为: 诱导温度 32 °C, 当 OD₆₀₀ 达到 50 时以 0.2 g/(L·h) 的速率补加乳糖进行诱导产酶, 在该条件下发酵 35 h 时酶活达到 472 U/mL, 是优化前的 2.3 倍; 进而采用该条件在 30 L 发酵罐进行了初步放大研究, 酶活达到 356 U/mL。由于该海藻糖合酶热稳定性好, 因此尝试了高温处理破碎 *E. coli* 细胞以释放海藻糖合酶, 结果表明, 80 °C 处理 30 min, 海藻糖合酶的得率可达 72.3%, 具有工业化应用前景。

关键词: 海藻糖合酶; 高效表达; 基因工程菌; 发酵罐; 高温处理

中图分类号: TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)09—0913—07

Optimization of Trehalose Synthase Fermentation Conditions from Recombinant *Escherichia coli*

ZHANG Yue^{1,2}, SU Lingqia^{1,2}, WU Jing^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to achieve efficient production of the trehalose synthase from *Thermus thermophilus*, the optimization of fermentation conditions was investigated in *E. coli* BL21(DE3) harboring the plasmid pET24a(+)-TreS. The optimized fermentation conditions were as follows: the inducing temperature is 32 °C, the adding rate of lactose is 0.2 g/(L·h) When OD₆₀₀ reached 50. Under the condition, the enzyme activity reached 472 U/mL at cultivation of 35 h, was 2.3 times than before. In addition, the fermentation was performed in 30 L bioreactor under the condition of preceding narrative, the enzyme activity reached 356 U/mL. Because the thermal stability of trehalose synthase is good, *E. coli* cell was broken up through high temperature. The results showed that treated it 30 min under 80 °C the yield of trehalose synthase reached 72.3%. It have industrial application prospect.

Keywords: trehalose synthase, high-efficiency expression, genetically engineered bacterium, fermentor, high-temperature processing

收稿日期: 2015-01-19

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年基金项目(31425020)。

* 通信作者: 吴敬(1969—), 女, 江苏镇江人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品与发酵工程方面的研究。

E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

海藻糖 (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) 是自然界普遍存在的一种非还原性二糖, 无色无味, 自身性质非常稳定^[1-2], 能保护生物大分子免受环境压力造成的伤害^[3]。大量研究结果显示, 海藻糖是蛋白质、生物膜、医药制剂、单细胞生物以及动植物组织和器官的优质保护剂^[2-4]。海藻糖对酸和热的高度稳定、防止淀粉老化和蛋白质变性、抑制脂肪酸败、矫味矫臭、高玻璃化转变温度、低吸湿性、低甜度等特性, 也使它在食品加工工业、医药业、农业、生化制品业和化妆品产业得到广泛应用, 成为上万种产品的添加剂^[5-6]。

早期商品化的海藻糖是从酵母中提取的, 该方法生产周期长、提取率低、过程复杂, 20 世纪 90 年代之后发展到酶转化技术才使海藻糖走进千家万户。酶法制备海藻糖分为磷酸化酶法、麦芽寡聚糖基海藻糖合成酶和麦芽寡聚糖基海藻糖水解酶双酶法以及海藻糖合酶法。在海藻糖的工业生产中, 海藻糖合酶与其他海藻糖合成酶系相比具有更大的优势, 只需要一种酶一步反应就能获得海藻糖, 而且其底物为廉价的淀粉水解而得的麦芽糖^[7]。海藻糖合酶是一类分子内转糖苷酶, 催化麦芽糖和海藻糖之间糖苷键的转化^[8]。海藻糖合酶在麦芽糖和海藻糖之间的转糖苷作用是一个可逆的过程, 但大部分都倾向于海藻糖的生成反应。海藻糖合酶除了具有分子内转糖苷作用外, 也有微弱的水解活性^[8-11]。常温菌中的海藻糖合酶, 最适反应温度为 25~35 °C, 最适 pH 为 6.5~8.0, 由于该条件适用于多种微生物生长, 因此采用常温酶制备海藻糖时易受到杂菌污染, 影响初始 pH 使得反应条件难以控制, 消耗反应底物和产物造成原料浪费等。嗜热菌来源的海藻糖合酶最适温度为 65 °C, 80 °C 下保温 60 min, 在 pH 5.5~9.5 的范围内酶活力仍然保持稳定^[12], 便于提高酶反应温度来抑制杂菌生长, 减少污染。作者对实验室前期构建的含有嗜热栖热菌海藻糖合酶基因的重组大肠杆菌进行了发酵工艺优化, 并尝试了高温处理破碎 *E.coli* 细胞以释放海藻糖合酶, 为工业化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

含嗜热栖热菌海藻糖合酶基因的重组大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-TreS 为作者所在

实验室保藏。

1.2 主要仪器

LS-B50L 型立式圆形压力蒸气灭菌器: 上海医用核子仪器厂; 空气恒温摇床: 上海精密仪器仪表有限公司; Agilent 1200 高效液相色谱系统: 美国 Agilent 公司; DYY-6C 型核酸电泳仪: 北京六一电泳仪厂; pH 计: Mettler-Toledo 公司; 超声波细胞粉碎仪: 宁波新芝生物科技股份有限公司; 电热恒温培养箱: 上海医疗器械研究所; DKB-600A 型电热恒温水槽: 上海森信实验仪器有限公司; 凝胶成像系统: Bio-Rad 公司; INFORS 3 L 全自动发酵罐: 伊孚森生物技术有限公司; 30 L 全自动发酵罐: NBS 公司。

1.3 培养基

1.3.1 培养基 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, 卡那霉素 0.1; pH 7.0。

1.3.2 发酵培养基

1) 发酵培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4.0, KH_2PO_4 13.5, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4, 蛋白胨 1.0, 酵母粉 2.0, 甘油 8; 微量元素液 10 mL/L。

2) 微量元素液(g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.3, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.2, CaCl_2 2.0, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.1。

3) 补料培养基(g/L): 甘油 600.0, MgSO_4 9.0, 蛋白胨 2.4, 酵母粉 4.8。

1.4 培养方法

1.4.1 种子培养 从-80 °C保藏的甘油管中接种 100 μL 菌液于种子培养基中 (50 mL 培养基/250 mL 三角瓶), 于 37 °C、200 r/min 回转式摇床培养 8 h。

1.4.2 3 L 发酵罐培养 将培养好的种子液以 10% 的接种体积分数接入 3 L 全自动发酵罐 INFORS 中, 装液量 1.2 L。初始通气量为 1.5 L/min, 搅拌转速 300~800 r/min, 通过调节转速控制溶氧 30%, 培养温度 37 °C, 用氨水控制 pH 7.0。溶氧水平维持在 30%, 当溶氧迅速反弹(甘油快消耗完)时, 开始以指数流加方式补加补料液。当 OD_{600} 为 50 时, 开始恒速流加乳糖进行诱导。

1.5 分析方法

1.5.1 细胞光密度 菌液稀释后于波长 600 nm 处进行比色, 用去离子水为对照, 测定菌浓。

$$\text{OD}_{600} = \text{读数} \times \text{稀释倍数}$$

1.5.2 胞内酶液的获取 收集发酵液,12 000 r/min 离心 10 min 后,将菌体沉淀用 20 mmol/L、pH 7.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液重新悬浮,混匀。用超声波细胞粉碎机破碎悬浮液中菌体的细胞壁(超声细胞破碎仪的工作条件: $\phi 6$ 工作探头,时间 10 min,工作 3 s 停 3 s,功率为 20%),然后 12 000 r/min 离心 10 min,离心后上清液即为发酵胞内粗酶液。

1.5.3 海藻糖合酶活力测定 取 400 μL 稀释适当倍数的粗酶液,加入 400 μL 用 20 mmol/L、pH 7.0 磷酸缓冲液配制的 10 g/dL 麦芽糖溶液,混合溶液 60 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min,然后沸水浴 10 min 终止酶反应,用 HPLC 测定生成的海藻糖含量。

HPLC 检测条件为:流动相(乙腈:水=80:20),流速:0.8 mL/min,柱温:40 $^\circ\text{C}$, NH_2 柱 (APS-2 HYPERSIL, Thermo Scientific),示差折光检测器。

酶活单位定义:在上述反应条件下,每分钟形成 1 μmol 海藻糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.5.4 SDS-PAGE 电泳 取 1 mL OD_{600} 为 5 的菌体发酵液,12 000 r/min 离心 2 min,去上清液,沉淀用去离子水洗涤两遍,再离心,沉淀用 pH 7.0 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液悬浮,超声处理 10 min,离心后沉淀为包涵体,上清液为可溶性蛋白质。包涵体用 20 μL 上样缓冲液溶解,于沸水浴中 5 min,离心,海藻糖合酶包涵体存在于上层上样缓冲液中,包涵体的上样量为 3 μL 。取 20 μL 上清液,加入 5 μL 上样缓冲液混匀,于沸水浴中 5 min,离心,上样量为 8 μL 。

1.5.5 加热处理菌悬液方法 于 75、80、85 $^\circ\text{C}$ 3 个温度下将菌悬液加热振荡处理 0.5 h,离心后测定上清液残留酶活。

2 结果与讨论

2.1 3 L 罐发酵工艺优化

作者采用实验室前期构建的重组菌,首先进行 3 L 发酵罐产酶优化,继而用所获最优条件进行 30 L 发酵罐初步放大。作者采用分批补料发酵,以指数流加进行补料,在发酵过程中补加充足的营养物质,以达到重组菌的高密度发酵,最终实现重组酶的高效表达。

2.1.1 诱导温度对重组菌生长以及产酶的影响 诱导温度是重组大肠杆菌产外源蛋白质的关键因

素。温度对菌生长以及产酶的影响较大。在较高的诱导温度时,蛋白质合成较快,常常由于不能及时正确折叠形成包涵体。在较低的诱导温度时,可降低无活性聚集体形成的速率和疏水相互作用,从而减少包涵体的形成。温度降低重组大肠杆菌生长速度降低,并且其蛋白质表达水平也将随之降低^[4]。作者在诱导剂乳糖补加速率为 0.2 g/(L·h) 的条件下,分别尝试了 25、32、37 $^\circ\text{C}$ 为诱导温度,考察了其对于菌体生长和产酶的影响。

由图 1 可知,不同的诱导温度对重组菌生长的影响并不明显,达到稳定期时菌体浓度只有些微的差别。当诱导温度为 25 $^\circ\text{C}$ 和 37 $^\circ\text{C}$ 时能够达到的最高菌体浓度相近,在 32 $^\circ\text{C}$ 诱导下所得的菌浓 OD_{600} 最高,达到 213,为 25 $^\circ\text{C}$ 和 37 $^\circ\text{C}$ 诱导下的 1.2 倍。然而,菌体的产酶状况与生物量的多少并不呈正比。菌体在 32 $^\circ\text{C}$ 诱导下所得酶活最高,为 472 U/mL,分别是 25 $^\circ\text{C}$ 和 37 $^\circ\text{C}$ 诱导时酶产量的 2.3 倍和 1.5 倍。因此,发酵重组大肠杆菌生产海藻糖合酶时应采用 32 $^\circ\text{C}$ 的诱导温度。

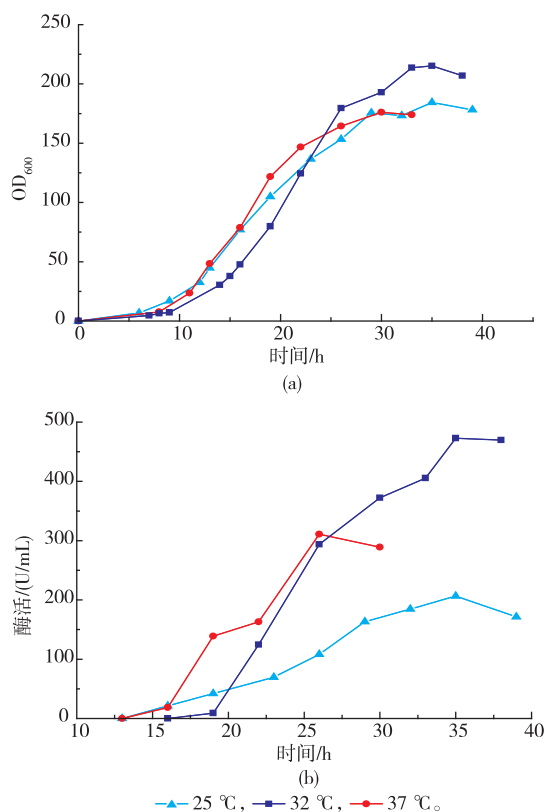
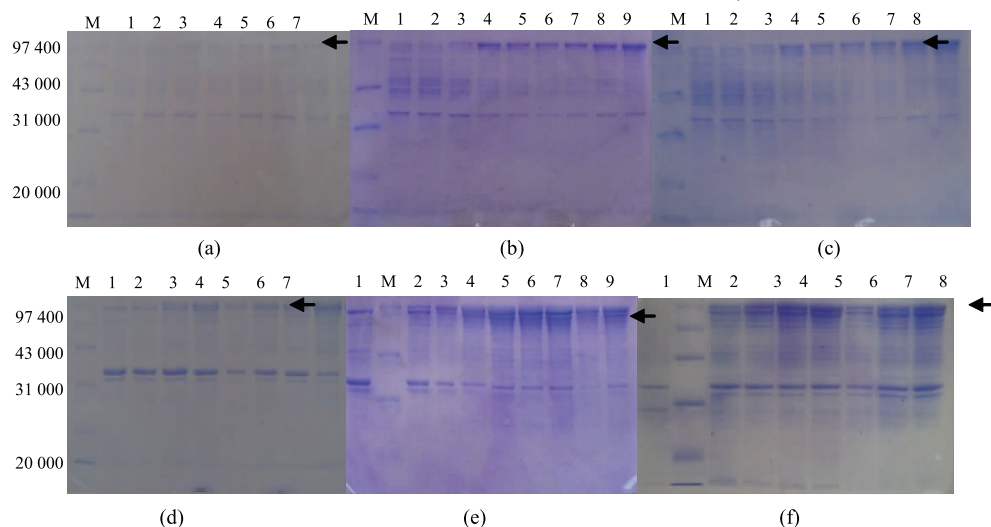


图 1 诱导温度对重组大肠杆菌生长和产酶的影响
Fig. 1 Effects of inducing temperature on *E. coli* growth and production of trehalose synthase

从图 2 可知, 细胞破碎上清液和沉淀的 SDS-PAGE 分析可知, 诱导温度为 32 °C 时, 可溶性蛋白质表达量最多, 说明这个诱导温度最佳。诱导温度为 25 °C 时, 电泳图中的海藻糖合酶的可溶性蛋白质条带不明显, 并且包涵体的条带也比较细, 可能是由于诱导温度较低, 使得重组大肠杆菌的蛋白质表达水平低。当诱导温度为 37 °C 时, 海藻糖合酶的可溶性蛋白质条带比诱导温度为 32 °C 时细, 但是包涵体的条带比较粗, 可能由于诱导温度过高使得基因表达过快而导致蛋白质折叠易发生错误, 或者蛋白质聚集的速度过快形成致密的不可溶包涵体, 降低了重组大肠杆菌可溶性蛋白质的表达。

2.1.2 补加乳糖的速率对重组菌生长以及产酶的影响 T7 启动子表达系统中, 需要添加乳糖来诱导蛋白质的表达。乳糖是一种温和型的诱导剂, 无毒, 价廉。通常情况下, 高强度诱导不利于重组大肠杆菌的高密度生长和产酶^[15], 为了缓解乳糖诱导对菌体造成的伤害并降低工业化生产中诱导剂的成本问题, 作者比较了诱导温度为 32 °C 的情况下, 不同乳糖诱导浓度对大肠杆菌生长以及产海藻糖合酶的影响。实验中乳糖采用流加方式进行诱导, 当 OD₆₀₀ 达到 50 时, 乳糖通过 3 种不同的速率补加, 分别为 0.1、0.2、0.4 g/(L·h)。

由图 3 可知, 补加乳糖的速率对重组大肠杆菌



(a)(b)(c)为 25、32、37 °C 破碎上清液; (d)(e)(f)为 25、32、37 °C 破碎沉淀

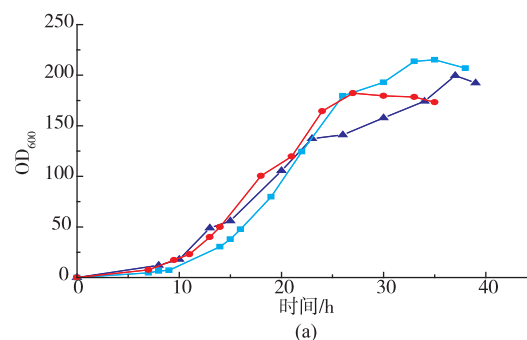
M: Mark; 1~9: 乳糖诱导后每 3 小时所取的样品

图 2 诱导温度对产酶影响的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the effects of inducing temperature on production of trehalose synthase

生长的影响较小, 但对产酶的影响较大。当乳糖补加速率为 0.2 g/(L·h) 时, 重组大肠杆菌的生长情况最好, OD₆₀₀ 能达到 213, 分别是乳糖补加速率 0.1 g/(L·h) 和 0.4 g/(L·h) 下的 1.1 倍和 1.2 倍。当乳糖补加速率为 0.1 g/(L·h) 时, 产酶速率最低, 并且最终酶活仅有 141 U/mL, 可能由于 0.1 g/(L·h) 诱导强度不够导致了重组大肠杆菌蛋白质表达水平较低。当提高乳糖补加速率至 0.2 g/(L·h) 和 0.4 g/(L·h) 时, 发酵过程中产酶速率明显提高, 并且乳糖补加速率为 0.2 g/(L·h) 时的产酶量最高, 达到 472 U/mL, 分别是乳糖补加速率 0.4 g/(L·h) 和 0.1 g/(L·h) 下的 1.4 倍和 3.3 倍。所以乳糖补加速率应选择 0.2 g/(L·h)。

由图 4 细胞破碎上清液和沉淀的 SDS-PAGE 分析可知, 乳糖补加速率为 0.2 g/(L·h) 的时候, 可溶性表达蛋白质最多, 与上述酶活情况一致。当诱导浓度为 0.4 g/(L·h) 时形成了大量的包涵体, 可能



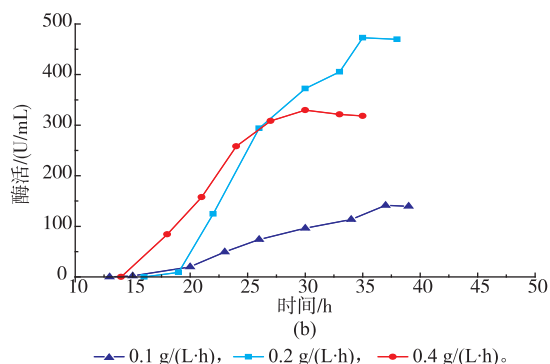
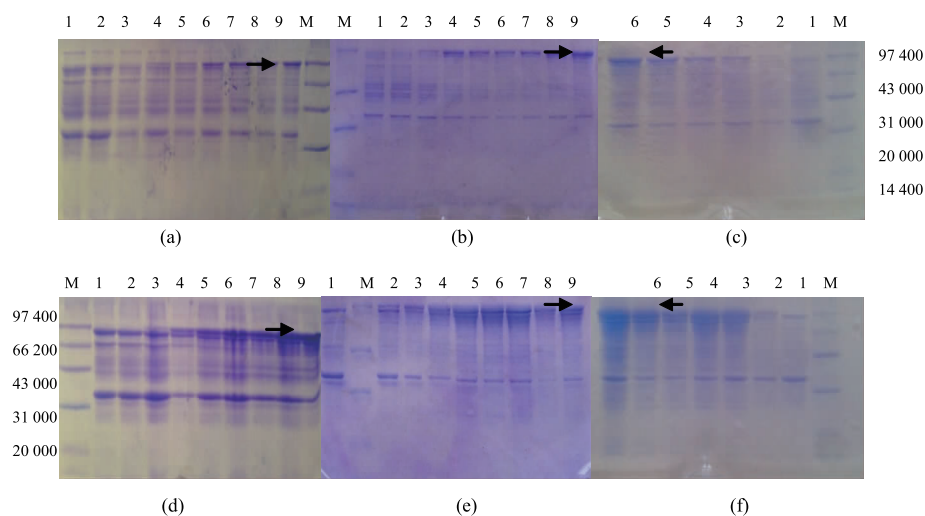


图3 乳糖补加速率对重组大肠杆菌生长和产酶的影响
Fig. 3 Effects of lactose feeding rate on *E.coli* growth and production of trehalose synthase

由于诱导剂量较大使得蛋白折叠速度过快并且大量聚集形成的,导致海藻糖合酶可溶性蛋白质表达水平降低。

2.2 30 L 发酵罐初步放大

要实现重组酶的工业化生产,必须进行发酵规模放大研究。自20世纪中期以来,发酵罐的比拟放大,主要采用的是一种在解决主要矛盾的基础上,协调解决放大后可能被激化的次要矛盾的方法,即经验法^[13]。因此采用3 L 发酵罐最优发酵条件进行30 L 发酵罐初步放大试验来研究重组大肠杆菌发酵产酶的效果。如图5所示,随着发酵的进行,菌浓和胞内酶活逐渐升高,当发酵39 h时,菌浓 OD₆₀₀



(a)(b)(c) 0.1、0.2、0.4 g/(L·h)破碎上清液;(d)(e)(f) 0.1、0.2、0.4 g/(L·h)破碎沉淀
M:Mark;1~9:乳糖诱导后每3小时所取的样品

图4 乳糖补加速率对产酶影响的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the effects of lactose feeding rate on production of trehalose synthase

达到126.9,海藻糖合成酶酶活也达到最高,为356.2 U/mL。在30 L 发酵罐发酵过程中,由于发酵过程中不通纯氧,为了满足菌体对溶氧的需求,搅拌转速最高提升到900 r/min,通气量最大时升至55 L/min,罐压最高时提至0.08 MPa。发酵16 h后,按3 L 发酵罐条件指数流加补料,其溶氧无法维持在30%,所以调控甘油补加速率约为3 L 发酵罐的50%以维持溶氧水平,由此导致30 L 发酵罐的重组菌生长周期较长且菌浓较低,但并不影响重组大肠菌可溶性蛋白质的表达水平。结果表明,30 L 发酵罐达到的最高菌浓 OD₆₀₀ 是3 L 发酵罐的60%,每单位OD的酶活为3 L 发酵罐的1.2倍。

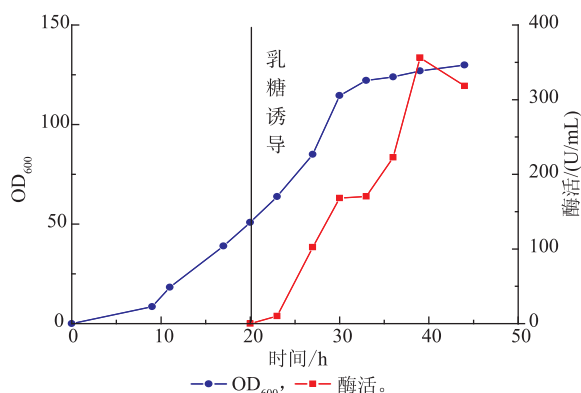


图5 30 L 发酵罐生产海藻糖合酶的发酵过程曲线
Fig. 5 Fermentation process curve of the trehalose synthase by 30 L fermentation tank

2.3 加热处理菌悬液释放胞内海藻糖合酶

由于海藻糖合酶在 *E.coli* BL21 (DE3) 宿主菌中为胞内表达, 需要细胞破碎提取。高温处理发酵菌悬液可破坏菌体细胞释放细胞内的海藻糖合酶。温度越高对于细胞膜的破坏越有利, 但温度过高容易导致海藻糖合酶因热变性而失去酶活, 所以需要选择一个合适的温度。以高压匀浆法破碎细胞所得酶活计为 100%。如图 6 所示, 80 °C 水浴处理 30 min 时相对酶活最高, 为 72.3%。

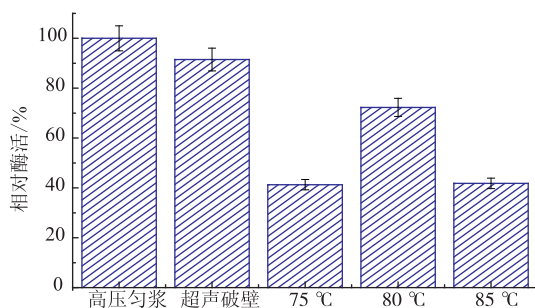


图 6 加热处理后的相对酶活

Fig. 6 Relative enzyme activity after heat treatment

3 结语

近年来, 我国在海藻糖的基础理论和应用方面的研究较多, 但海藻糖工业生产方面涉及较少。作者对 *E.coli* BL21 (DE3)/pET24a(+)-TreS 基因工程菌在 3 L 发酵罐进行了发酵工艺优化, 发酵 35 h 时酶活达到 472 U/mL, 是优化前的 2.3 倍, 并且是摇瓶的 12 倍左右, 进而采用该条件在 30 L 发酵罐进行了初步放大研究, 发酵 39 h, 酶活达到 356 U/mL。与陈颖等^[7] 10 L 罐高密度发酵的酶活 3.197 U/mL 相比, 酶活是其 100 倍以上。由于该海藻糖合酶热稳定性好, 因此尝试了高温处理破碎 *E.coli* 细胞以释放海藻糖合酶。结果表明, 80 °C 处理 30 min, 海藻糖合酶的得率可达 72.3%, 简化了海藻糖生产程序, 为海藻糖合酶用于海藻糖的工业化提供了依据。

参考文献:

- [1] ELBEIN A D. The metabolism of α, α -trehalose[J]. *Adv Carbohyd Chem Biochem*, 1974, 30:227-256.
- [2] RICHARDS A B, KRAKOWKA S, DEXTER L B, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40:871-898.
- [3] PAUL M J, PRIMAVESI L F, JHURREEA D, et al. Trehalose metabolism and signaling [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 417-441.
- [4] SCHIRALDI C, DI Lernia I, DE Rosa M. Trehalose production: exploiting novel approaches [J]. *Trends Biotechnol*, 2002, 20 (10): 420-425.
- [5] 黄日波. 海藻糖-21 世纪的新型糖类[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [6] 陈云辉, 徐程, 余小林, 等. 海藻糖对荔枝罐头非酶褐变特性的影响[J]. *食品与机械*, 2011, 27(1): 15-18.
CHEN Yunhui, XU Chen, YU Xiaolin, et al. Effect of trehalose on non-enzymatic browning in canned litchi [J]. *Food and Machinery*, 2011, 27(1): 15-18. (in Chinese)
- [7] 韦航, 马少敏, 张云光, 等. 海藻糖的酶转化法生产技术[J]. *安徽农业科技*, 2010, 38(22): 12016-12018.
WEI Hang, MA Shaomin, ZHANG Yunguang, et al. Production of trehalose by enzymatic conversion [J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2010, 38(22): 12016-12018. (in Chinese)
- [8] NISHIMOTO T, NAKANO M, NAKADA T, et al. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996a, 60(4): 640-644.
- [9] NISHIMOTO T, NAKADA T, CHAEN H, et al. Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1996b, 60(5): 835-839.
- [10] WEI Y T, ZHU Q X, LUO Z F, et al. Cloning, expression and identification of a new trehalose synthase gene from *Thermobifida fusca* genome[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, 36(7): 477-484.
- [11] CHEN Y S, LEE G C, SHAW J F. Gene cloning, expression, and biochemical characterization of a recombinant trehalose synthase from *Picrophius torridus* in *Escherichia coli*[J]. *Agric Food Chem*, 2007a, 55: 1256-1263.
- [12] 吴秀丽, 岳明, 丁宏标. 海藻糖合酶的研究进展[J]. *微生物学报*, 2009, 36(7): 1067-1072.
WU Xiuli, YUE Ming, DING Hongbiao. Reseach progress on trehalose synthase[J]. *Microbiology*, 2009, 36(7): 1067-1072. (in Chinese)

- Chinese)
- [13] 张泉,于可响,郭晓宇,等. 重组大肠杆菌的高密度发酵放大工艺研究[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2007,28(1):17-20.
ZHANG Quan,YU Kexiang,GUO Xiaoyu,et al. Amplification of high-density fermentation of recombinant *E. coli* for production of recombinant plasmid DNA [J]. **Journal of Yangzhou University:Agricultural and Life Science Edition**, 2007,28(1):17-20.(in Chinese)
- [14] MICHAEL J W,MARIA P,SHAWN R C,et al. Stabilization of apogobin by low temperature increases yield of soluble recombinant hemoglobin in *Escherichia coli*[J]. **Applied and Environment Microbiology**, 1997,63(11):4313-4320.
- [15] 张毅,屈贤铭,杨胜利. 乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响[J]. 生物工程学报,2000,16(4):464-468.
ZHANG Yi,QU Xianming,YANG Shengli. The influences of lactose as an inducer on the expression of the recombinant proteins in *Escherichia coli*. BL21 (DE3)[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2000,16(4):464-468.(in Chinese)
- [16] 霍向东,石玉瑚. 大肠杆菌高密度发酵补料调控测量的研究进展[J]. 新疆农业科学(专刊),2004,41:16-18.
HUO Xiangdong,SHI Yuhu. The research progress on regulation and control of high density fermentation of *Escherichia Coli*. [J]. **Xinjiang Agricultural Sciences**,2004,41:16-18.(in Chinese)
- [17] 陈颖,杨丽雅,齐欣,等. 重组海藻糖合酶工程菌高密度发酵条件的研究[J]. 食品工业科技,2012,17(4):125-129.
CHEN Ying,YANG Liwei,QI Xin,et al. High cell density fermentation condition of trehalose synthase genetic engineering bacteria[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2012,17(4):125-129.(in Chinese)

会议信息

会议名称(中文): 第二届抗菌科学与技术论坛

开始日期:2016-10-27 结束日期:2016-10-28

所在城市:江苏省 苏州市

具体地点:西交利物浦国际会议中心

主办单位:全国卫生产业企业管理协会抗菌产业分会 西安交通大学苏州纳米科学与工程技术学院 西安交通大学苏州研究院

全文截稿日期:2016-09-10

联系电话:010-82543499/62521791

传真:010-82543499

E-MAIL:ciaa2001@126.com

会议网站:http://ciaa.kjj.com.cn/2016/xiehuidongtai_0307/2838.html

会议背景介绍:抗菌科学与技术论坛是全国卫生产业企业管理协会抗菌产业分会主办的学术大会,两年一届。大会坚持以“推动抗菌学术研究,促进抗菌学科发展”为宗旨,致力于为国内外从事抗菌相关科学研究高校、科研院所的专家、学者、科技工作者,政府有关部门及领导,企业技术人员、工程师,搭建一个开放式的专业学术交流平台,以达到共同提高目的,并提高抗菌技术在我国国民经济和社会发展中的地位和作用。第二届抗菌科学与技术论坛由全国卫生产业企业管理协会抗菌产业分会和西安交通大学苏州纳米科学与工程技术学院联合主办,将于2016年10月27日-28日在江苏省苏州市召开。大会将开展包括大会邀请报告、专题报告、快速报告(口头报告)、墙报交流、汇编交流等多种形式的学术交流。目前,论文征集活动已经启动,欢迎从事抗菌相关研究的科研人员、技术人员和在校学生踊跃投稿并积极参会。