

文章编号 :1009 - 038X(2002)04 - 0350 - 07

恒 pH 补料分批培养技术培养谷胱甘肽合成酶系

童群义, 陈坚

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用一种新的补料分批培养技术, 培养重组大肠杆菌生产谷胱甘肽合成酶系。在分批培养和补料分批培养期间, 采用不同的 pH 控制模式。在发酵前期采用分批培养, 加入碱以补偿 pH 值的降低, 而在发酵后期, 采用一种新的恒 pH 补料分批培养方式, 加入葡萄糖和碱调节发酵液的 pH。在这种模式中, 根据培养过程中的 pH 变化确定 pH 参数。实验结果表明: 同时设置发酵液的 pH 上限和下限可避免恒 pH 补料分批培养过程中葡萄糖的周期性缺乏问题; 对于缓冲能力不同的发酵液, 应设置不同的 pH 参数来进行 pH 的控制。

关键词: pH 补料分批培养; 重组大肠杆菌; 谷胱甘肽合成酶系; 磷酸盐

中图分类号: Q 556.3

文献标识码: A

Production of Glutathione Synthetases by an Improved pH-Stat Fed-Batch Culture of Recombinant *E. coli*

TONG Qun-yi, CHEN Jian

(School of Food Science and Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: An improved pH-stat fed-batch culture strategy was developed for the effective production of glutathione synthetases from recombinant *E. coli* using a novel substrate feeding. pH was controlled by different pH controlling mode during batch culture and pH-stat fed-batch culture. The addition of alkali could keep pH constant to compensate the decrease of pH during the first phase of culture. During the second phase of culture, pH in the medium was controlled by the addition of excessive alkali or glucose. pH parameter during the novel pH-stat fed-batch culture was ascertain by the pH change in the medium. The research results shown that: the pH controlling strategy, which pH high limit and pH low limit was set at one time in the experiment, could avoid periodical absence of glucose during fed-batch culture; the setting of pH parameter was different for the medium with different buffer capacity.

Key words: pH-stat fed-batch culture; Recombinant *E. coli*; Glutathione synthetases; Phosphate

在生物细胞内, 谷胱甘肽是在 ATP 存在下由谷胱甘肽合成酶系催化合成的。谷胱甘肽合成酶系由 γ -谷胱甘肽合成酶(GSH-I) 和谷胱甘肽合成酶

(GSH-II) 组成^[1,2]。为了选育具有高谷胱甘肽合成酶系的菌株, Murata 和 Kimura^[3-5]将编码 GSH-I 和 GSH-II 的基因成功地克隆到大肠杆菌中, 获得

收稿日期 2001-10-12; 修订日期 2002-03-19。

基金项目 霍英东青年教师基金项目资助课题。

作者简介 童群义(1963-), 男, 湖南桃源人, 工学博士, 副教授。

了具有高谷胱甘肽合成酶系活力的菌株。

补料分批培养技术常用于细胞的高密度发酵,因为补料分批培养策略能够避免乙酸之类的代谢抑制物的积累而获得较高的细胞密度^[6],能够通过补料自由地控制营养物浓度,延长传统的分批发酵过程。

用 pH 控制底物的加入是补料分批培养过程中常用的一种补料方法,通常用在培养过程中 pH 增加或降低的微生物培养系统。相对来说,采用恒 pH 的方法进行补料分批培养,设备比较简单,易于控制。Holme 和 Arvidson 报道了大肠杆菌在复合培养基中生长时,在葡萄糖完全消耗之前,pH 一直下降,而在葡萄糖完全消耗之后,pH 逐渐增加,同时细胞继续以较低的速度生长。Suzuki 等人^[7]认为在葡萄糖完全消耗之后的 pH 值增加是由于氨基酸的脱氨基作用引起的。在培养过程中的 pH 值上升可以作为补料分批培养过程中补加葡萄糖的信号^[7~10]。由于这些方法都是设置发酵液的 pH 上限来进行 pH 控制,利用葡萄糖完全消耗之后的 pH 增加来控制葡萄糖的流加。因此,在补料分批培养期间,发酵液中的葡萄糖质量浓度呈现有糖-无糖-有糖-无糖的周期性变化。在无糖的发酵过程中,细胞被迫以氨基酸为碳源进行代谢,而在有糖的发酵过程中,细胞又转为以葡萄糖为碳源进行代谢,这种碳源的反复转换会干扰某些细胞的正常代谢过程。

作者采用一种新的由 pH 控制的补料分批培养方法,通过适当设置的 pH 下限和上限来进行补料的控制,并在分批培养期间和补料分批培养期间采用不同的 pH 控制模式,较好地解决了恒 pH 补料分批培养期间葡萄糖周期性缺乏的问题。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌种 *E. coli* II-1,生物工程学院微生物实验室选育^[11]。

1.1.2 基本培养基 参见文献^[12]。

1.1.3 补料培养基 葡萄糖 400 g/L, NH₄Cl 40 g/L, KH₂PO₄ 5 g/L。培养基分开灭菌,使用前混合,并加入 1 000 μg/L 的无菌氨苄青霉素。

1.2 培养方法

1.2.1 不调 pH 的分批培养 将斜面菌种接种于含 100 mL 基本培养基的 500 mL 三角瓶中培养 8 h,然后将其接种于含有 1.5 L 基本培养基的 2.5 L 发酵罐中,在 37 °C 培养 18 h。空气体积流量为 3 L/(L·min),搅拌转速为 400 r/min。发酵液的 pH

不进行调节。

1.2.2 调节 pH 的分批培养 将斜面菌种接种于含 100 mL 基本培养基的 500 mL 三角瓶中培养 8 h,然后将其接种于含有 1.5 L 基本培养基的 2.5 L 发酵罐中,在 37 °C 培养 18 h。在碱液罐中加入 12 mol/L NaOH 溶液,酸液罐中加入 6 mol/L HCl 溶液,发酵罐的 pH 设定在 7.1~7.3。酸碱流加模式设定为加 2 s、停 2 s,空气体积流量为 3 L/(L·min),搅拌转速为 400 r/min。

1.2.3 pH 控制的补料分批培养 细胞先在发酵罐中分批培养,空气体积流量、搅拌转速等参数均与 1.2.2 相同。由于高质量浓度的葡萄糖对细胞的生长具有抑制作用,因此,发酵液中的葡萄糖应该保持在较低的质量浓度。在发酵的开始阶段,细胞分解葡萄糖产生乙酸,需向发酵液中加入碱性物质使 pH 保持恒定。恒 pH 补料分批培养过程的 pH 参数可根据分批培养实验的结果进行设定,也可在培养过程中根据 pH 的变化情况进行调整。在分批培养期间,发酵罐的 pH 控制范围设定在 pH₁ 和 pH₂ 之间,碱流加模式设定为加 2 s、停 2 s,酸流加模式设定为加 1 s、停 2 s。随着发酵过程中 pH 的降低,向反应器泵入 12 mol/L NaOH 使发酵液的 pH 保持在 pH₁,葡萄糖的补料由发酵液 pH 进行控制。此方法是在发酵罐的酸液瓶中加入 400 g/L 的葡萄糖液代替盐酸,而在碱液瓶中加入 12 mol/L 的 NaOH。

在发酵罐中的葡萄糖将被完全消耗时,可用两种方式进行补料的控制(见图 1)。第一种方式(方法 1)是更改 pH 的控制范围为 pH₁ 和 pH₂。若发酵液的 pH 大于 pH₂,则酸液泵启动加入葡萄糖,葡萄糖的分解将使 pH 下降;若发酵液的 pH 小于 pH₁,则碱液泵泵入 NaOH。如此反复,可根据菌体的生长情况进行补料,菌体生长快,则补料多,菌体生长慢则补料少,同时又可使葡萄糖始终处于较低的浓度水平,可避免葡萄糖引起的底物抑制。第二种方式(方法 2)是更改酸碱流加模式,例如将碱的流加模式由加 2 s、停 2 s 更改为加 5.5 s、停 5.5 s;酸的流加模式(实际是加糖)由加 1 s、停 2 s 更改为加 2 s、停 1 s,增加糖和碱的加入量。

如果初始葡萄糖在 *N* 点被完全消耗,则 pH 参数的设定由 *N* 点分成了两个阶段。在 *N* 点之前的是第一阶段(分批培养阶段),在这一阶段,由于细胞对葡萄糖的利用使 pH 逐渐降低,碱的加入可保持 pH 的恒定,每次碱脉冲所增加的 pH 不会超过所设定的 pH 范围的高限以避免葡萄糖的加入,相反,在 *N* 点之后的是第二阶段(补料阶段),每次碱脉冲

所增加的 pH 应该超过所控制的 pH 范围的高限,以便启动酸液泵加入葡萄糖.因此, pH 参数设定的基本原则是:在第一阶段,所设定的 pH 控制范围要大于每次碱脉冲所能改变的 pH 范围,以避免葡萄糖的加入;而在第二阶段,所设定的 pH 控制范围要小于每次碱脉冲所能改变的 pH 范围,以便启动酸液泵加入葡萄糖.

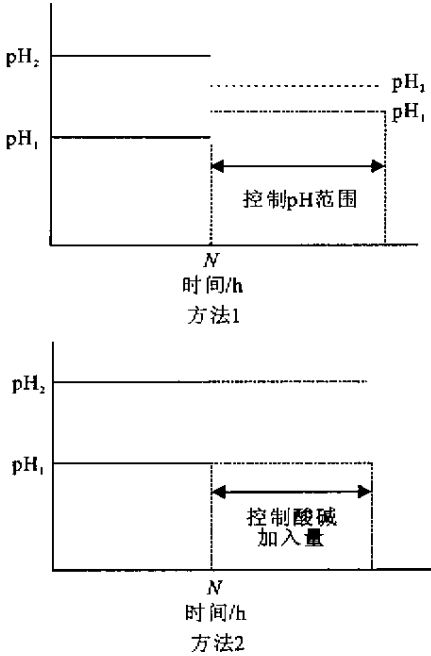


图1 恒 pH 补料分批培养的两种补料控制方法

Fig.1 The two method of pH-stat fed-batch culture

1.2.4 发酵液中的磷酸盐质量浓度 pH 参数的设定与发酵液的缓冲能力有关,为考察具有不同缓冲能力的发酵液对 pH 参数设定的影响,作者将不同质量浓度的磷酸盐加入到基本培养基,磷酸盐的质量浓度见表 1.

表 1 在不同实验中的磷酸盐质量浓度

Tab.1 The concentration of phosphate in different experiment

实验号	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 质量浓度/(g/L)	K ₂ HPO ₄ 质量浓度/(g/L)
A	0	0
B	1	0.24
C	2	0.48
D	3	0.72
E	4	0.96
F	5	1.20

1.3 分析方法

1.3.1 葡萄糖和菌体干重(生物量)的测定 见文

献 [12].

1.3.2 谷胱甘肽合成酶系的测定 见文献 [12].

2 结果与讨论

2.1 分批培养

在分批培养过程中,谷胱甘肽合成酶系产量的增加与细胞干重的增加基本平行.但在发酵后期,谷胱甘肽合成酶系的产量略有下降.

图 2 为不进行 pH 调节的分批培养过程中 pH 和葡萄糖质量浓度的变化曲线.随着发酵过程的进行,葡萄糖质量浓度逐步降低,pH 也逐渐降低,葡萄糖在 8 h 后被完全消耗.在葡萄糖被消耗之后,细胞利用氨基酸作为碳源释放出氨使 pH 逐渐升高.

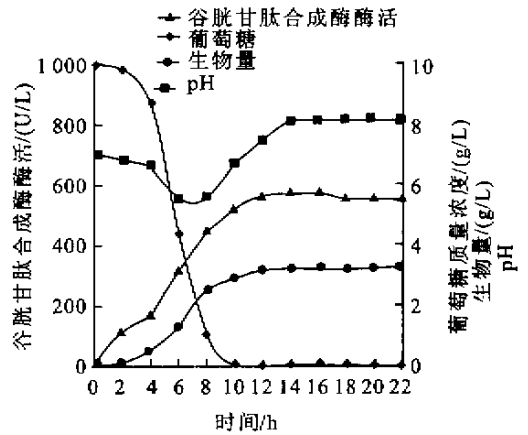


图 2 在分批培养过程中 pH 和葡萄糖的时间曲线(pH 未进行控制)

Fig.2 Time course of pH and glucose during the batch culture (pH-uncontrolled batch culture)

图 3 为进行 pH 调节的分批培养过程中的 pH 和葡萄糖的时间曲线.

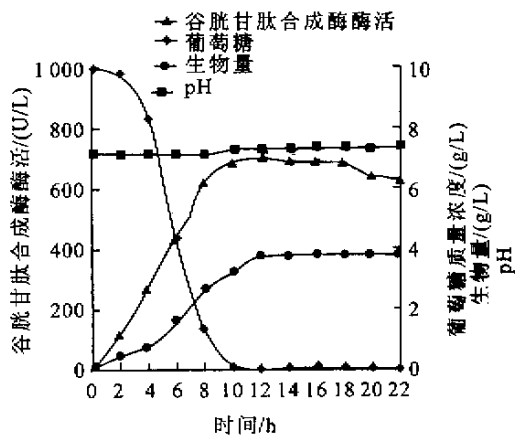


图 3 在补料分批培养过程中 pH 和葡萄糖质量浓度的变化曲线(pH 控制在 7.1~7.3)

Fig.3 Time course of pH and glucose during batch culture (pH was 7.1~7.3)

由于用酸碱对发酵液的 pH 进行控制, 发酵液的 pH 比较稳定, 使细胞的生长和产物的形成均优于不调节 pH 的分批培养过程. 但因为发酵过程进行到 8~10 h 之后, 发酵液中的葡萄糖已基本耗尽, 因而在发酵 8~10 h 之后, 生物量和酶活力均增加得比较缓慢. 因此, 为了延长细胞的产酶期, 应在葡萄糖消耗完之后进行补料.

2.2 恒 pH 补料分批培养

在恒 pH 补料分批培养过程中, 用葡萄糖代替盐酸进行 pH 调节, 因而在调节 pH 的同时增加了葡萄糖的供应, 使发酵液中保持低质量浓度的葡萄糖. 流加的葡萄糖量与所设定的 pH 范围、酸碱流加模式、所流加的 NaOH 和葡萄糖质量浓度、发酵液的缓冲能力等因素有关. 图 4 表示了设定的 pH 范围和酸碱流加模式对发酵液中葡萄糖和 pH 的影响.

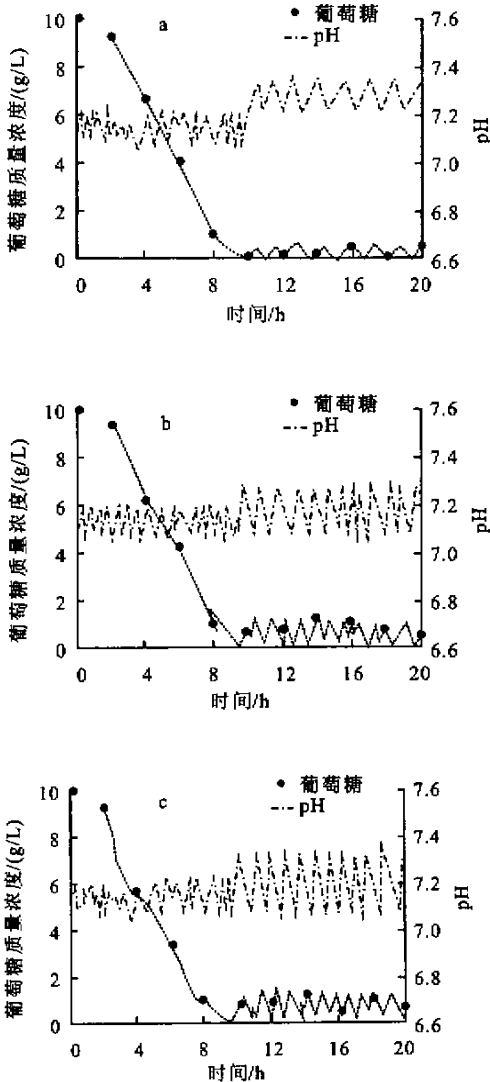


图 4 恒 pH 补料分批培养过程中 pH 和葡萄糖质量浓度的变化曲线

Fig. 4 Time course of pH and glucose during pH-stat fed-batch culture

图 4a 为传统的恒 pH 补料分批培养过程. 在发酵开始阶段, 发酵液的 pH 降低, 蠕动泵自动加入碱液使 pH 保持在 7.1, 当葡萄糖被消耗之后, 由于氨基酸的脱氨基作用使 pH 增高, 当 pH 高于 7.3 时, 酸液泵自动加入葡萄糖液. 葡萄糖的分解使 pH 下降, 由于葡萄糖引起的 pH 降低有一定的延迟作用, pH 范围控制在 7.21~7.36. 糖液的流加是根据葡萄糖完全消耗之后氨基酸的脱氨基作用而引起的上升, 因此总的葡萄糖流加量较低, 为 20 g/L, 在补料过程中仅加入 10 g/L 葡萄糖(其中包括初始葡萄糖 10 g/L).

图 4b, 4c 均为改进的恒 pH 补料分批培养过程, 其中图 4b 为第一种补料控制方法. 在发酵的开始阶段发酵液的 pH 降低, 蠕动泵自动加入碱液使 pH 保持在 7.1, 当葡萄糖将被完全消耗时, 更改 pH 的设定范围, 使 pH_1' 和 pH_2' 分别为 7.15 和 7.25, 当 pH 高于 7.25 时, 酸液泵自动加入葡萄糖液, 葡萄糖的分解将使 pH 下降. 由于所设定的 pH 范围缩小, 糖的分解将使 pH 低于控制的 pH 下限(7.15), 此时启动碱液泵加入 NaOH, pH 将迅速升高到 7.25 以上, 再启动酸液泵加入葡萄糖, 糖的分解将使发酵液的 pH 缓慢降低至 7.15 以下. 如此反复, 可根据发酵液的 pH 补料, 同时又可使葡萄糖始终处于较低的质量浓度水平, 可避免葡萄糖引起的底物抑制. 糖液的流加是根据碱液的过量加入引起的 pH 上升, 总的葡萄糖流加量大约为 40 g/L, 其中包括初始葡萄糖 10 g/L 和在补料过程中加入的葡萄糖量 30 g/L. 在整个发酵过程中, 发酵液始终保持低质量浓度的葡萄糖, 可避免葡萄糖完全消耗引起的菌体代谢失调.

图 4c 为第二种补料控制方法. 首先设定的 pH_1 和 pH_2 分别为 7.1 和 7.3, 碱加入模式为加 2 s, 停 2 s, 酸加入模式为加 1 s, 停 2 s. 在发酵开始阶段, 发酵液的 pH 降低, 蠕动泵自动加入碱液使 pH 保持在 7.1, 当葡萄糖将被完全消耗时, 更改碱加入模式为加 5.5 s, 停 0.5 s, 酸加入模式为加 2 s, 停 1 s, 当 pH 高于 7.3 时, 酸液泵自动加入葡萄糖液. 葡萄糖的分解将使发酵液的 pH 下降. 由于改变了酸碱的加入模式, NaOH 和葡萄糖的流加量增大, 葡萄糖的分解将使发酵液的 pH 降低到 7.1 以下, 低的 pH 将启动碱液泵加入 NaOH, pH 将迅速升高到 7.3 以上; 再启动酸液泵加入葡萄糖, 糖的分解将使发酵液的 pH 降低到 7.1 以下. 如此反复, 可根据发酵液的 pH 进行补料, 总的葡萄糖流加量大约为 40 g/L, 其中包括初始葡萄糖 10 g/L 和在补料过程中加入的葡

萄糖量约 30 g/L.在这 3 种补料方式中所产生的谷胱甘肽合成酶系产量和细胞干重见表 2.

表 2 3 种补料分批培养过程的实验结果

Tab.2 The experiment results in the three kinds of fed-batch culture

实验号	生物量/(g/L)	谷胱甘肽合成酶活/(U/L)	初始葡萄糖质量浓度/(g/L)	总葡萄糖质量浓度/(g/L)
a*	7.17	863.5	9.89	19.87
b*	12.58	1 274.5	9.92	39.07
c*	12.84	1 259.3	9.93	40.93

* 表 a, b, c 表示不同的补料分批培养过程.

图 4 和表 2 的结果表明, pH 控制模式的变化对补料过程有明显的影响.图 4、表 2 中的 a 为传统的恒 pH 补料分批培养过程.由于加入的碱和糖所能改变的 pH 小于所设定的 pH 控制范围,在补料过程中加入的葡萄糖使 pH 降低的程度不能达到 pH 控制范围的下限,因而在补料过程中没有碱的流加.在每次流加的葡萄糖消耗完之后,细胞代谢氨基酸作为碳源.氨基酸的代谢使 pH 增加,当 pH 超过所设定的 pH 控制上限后,又再次流加葡萄糖.这种方式所流加的葡萄糖较少,细胞干重和酶系的产量增加不太大.图 4、表 2 中的 b, c 为改进的两种恒 pH 补料分批培养模式.由于在补料过程中改变了 pH 控制模式(所设定的 pH 控制范围缩小,或碱和糖的流加量增加),补料过程中碱液泵加入的碱使发酵液的 pH 迅速增加到 pH 控制限之上,此时酸液泵启动,加入葡萄糖,葡萄糖的分解将使 pH 缓慢降低,加入的葡萄糖将使发酵液的 pH 低于设定的 pH 控制下限.从图 4 和表 2 可知,用两种改进的恒 pH 补料分批培养模式进行培养时,细胞干重分别达到 25.68 g/L 和 25.16 g/L,谷胱甘肽合成酶系的活力分别达到 1 259.3 U/L 和 1 274.5 U/L,明显优于传统的恒 pH 补料分批培养技术(细胞干重和谷胱甘肽合成酶系的活力分别为 14.34 g/L 和 863.5 U/L).由图 4、表 2 还可以看出,缩小 pH 控制范围或增加碱和糖的流加量均可作为恒 pH 补料控制的参数,采用适当调节的控制参数,二者没有明显的差别.

2.3 不同浓度磷酸盐溶液中的补料分批培养过程

在不同浓度的磷酸盐溶液中,发酵液的缓冲能力不同,因此,用葡萄糖或碱对发酵液的 pH 进行控制时,每次加入的葡萄糖或碱脉冲使发酵液 pH 降低或增加的幅度不同,发酵液的缓冲能力大则 pH 的变化较小.因此,恒 pH 补料分批培养过程的 pH 参数应根据培养过程中的 pH 变化情况进行调整.

按表 1 的比例将磷酸盐加入到基本培养基中, pH 参数由 1.3 的第一种方法确定,实际使用的 pH 参数见表 3.

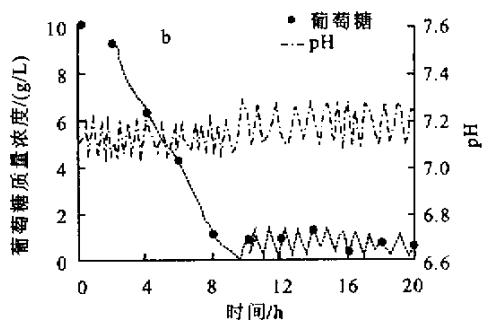
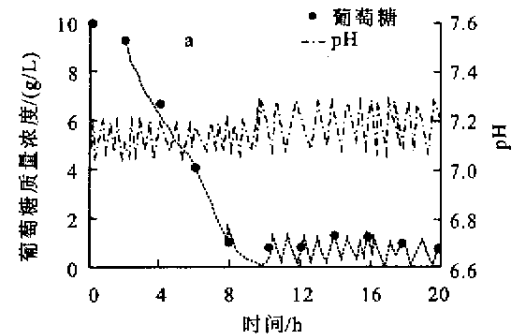
表 3 不同缓冲能力的发酵液对 pH 参数确定的影响

Tab.3 pH parameter during the pH -stat fed-batch culture in the medium of the different buffer capacity

实验号	pH_1	pH_2	pH_1'	pH_2'
a	7.10	7.30	7.15	7.25
b	7.10	7.30	7.15	7.24
c	7.13	7.27	7.16	7.23
d	7.16	7.24	7.18	7.22
e	7.17	7.23	7.19	7.21
f	7.18	7.22	7.19	7.20

由表 1, 3 确定每次实验的磷酸盐含量和 pH 控制参数.在 pH 控制的补料分批培养过程中,用葡萄糖代替盐酸调节 pH ,因而在调节 pH 的同时增加了葡萄糖的供应,使发酵液中保持低质量浓度的葡萄糖.流加的葡萄糖量与所设定的 pH 范围、酸碱流加模式、所流加的 NaOH 和葡萄糖质量浓度、发酵液的缓冲性等因素有关.图 5 表示在不同质量浓度的缓冲溶液中进行恒 pH 补料分批培养的实验结果.

图 5 中的 a, b, c, d, e, f 表示不同的实验号(见表 2).由图 5 可以看出,在具有不同缓冲能力的发酵液中进行恒 pH 补料分批培养时, pH 的变化幅度是不一样的,但是,在控制好 pH 参数的情况下,葡萄糖的流加量基本上可控制在一个适当的范围之内.实验结果见表 4.



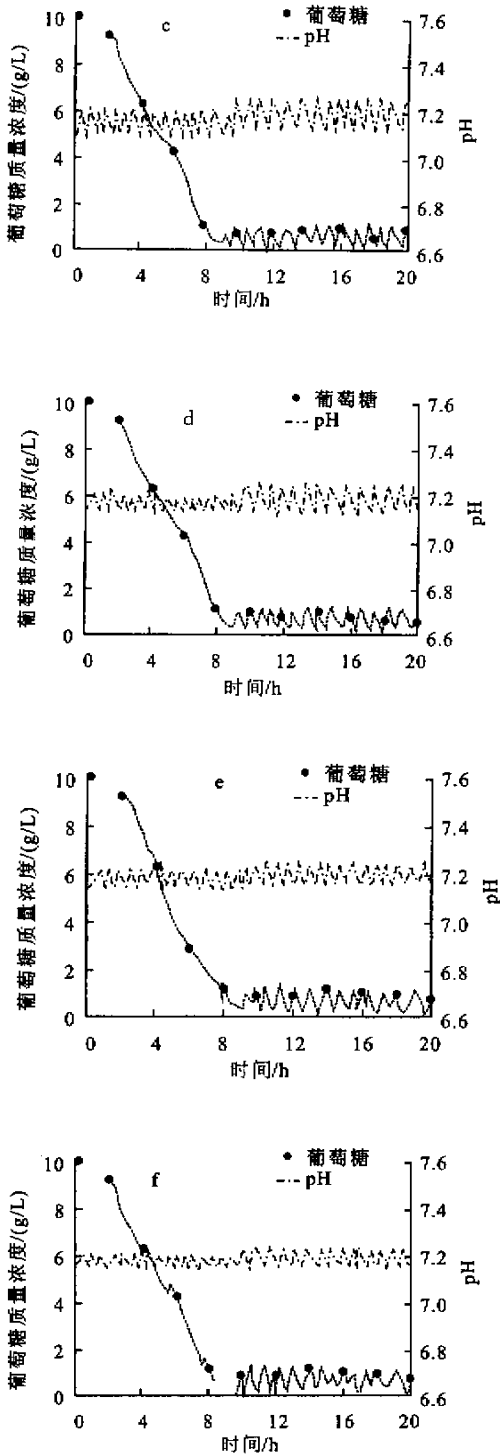


图 5 在具有不同缓冲能力的发酵液中进行恒 pH 补料分批培养的实验结果

Fig.5 The time course of pH and glucose during pH-stat fed-batch culture

表 4 恒 pH 补料分批培养过程的实验结果

Tab.4 The experiment results during pH-stat fed-batch culture

实验号	菌体干重(g/L)	谷胱甘肽合成酶酶活(U/L)	初始葡萄糖质量浓度(g/L)	总葡萄糖质量浓度(g/L)
a	12.58	1 274.5	9.92	39.07
b	13.12	1 278.5	9.92	39.86
c	13.69	1 316.8	9.94	40.63
d	14.13	1 216.4	9.96	38.56
e	14.23	1 056.3	9.96	39.67
f	14.51	941.8	9.96	39.03

实验中,每次所流加的葡萄糖量大约为 30 g/L,加上初始葡萄糖量为 10 g/L,因而每次实验的总葡萄糖量大约为 40 g/L.显然,采用恒 pH 补料分批培养过程可流加较多的葡萄糖,并获得较高的谷胱甘肽合成酶产量,总的酶活力可达到 1 316.8 U/L.从表 4 也可以看出,不同质量浓度的磷酸盐溶液对细胞干重和谷胱甘肽合成酶系的活性有不同的影响.在磷酸盐质量浓度较低的发酵液中,谷胱甘肽合成酶系产量和细胞干重均随磷酸盐质量浓度的增加而增加,说明低质量浓度的磷酸盐对细胞的生长和谷胱甘肽合成酶系的合成均有刺激作用.但 3 g/L 磷酸盐即对谷胱甘肽合成酶系的合成产生抑制作用,磷酸盐质量浓度越高,对谷胱甘肽合成酶系合成的抑制作用越大.但在实验的磷酸盐质量浓度范围内,磷酸盐对细胞的生长均有刺激作用.

传统的恒 pH 补料分批培养方法是利用培养过程中的 pH 上升来作为补加葡萄糖的信号,通过设置发酵液的 pH 上限来进行 pH 控制.本实验结果表明:同时设置发酵液的 pH 上限和 pH 下限可避免恒 pH 补料分批培养过程中葡萄糖的周期性缺乏问题.对于缓冲能力不同的发酵液,应设置不同的 pH 参数来进行 pH 控制.

参考文献

[1] JOHNSTONE R B, BLOCH K. The synthesis of glutathione in cell-free peigon liver extracts[J]. J Biol Chem , 1949 , 179 :

- [2] JOHNSOTONE R B , BLOCH K. Enzymatic synthesis of glutathione[J]. **J Biol Chem** , 1951 , 188 : 221 – 240.
- [3] MURATA K , KIMURA A. Cloning of a glutathione biosynthesis in *E. coli* [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1982 , 44 : 1444 – 1449.
- [4] MURATA K , MIYA T , GUSHIMA H , *et al.* Cloning and amplification of a gene for glutathione synthetase in *E. coli* [J]. **Agric Biol Chem** , 1983 , 47 : 1381 – 1383.
- [5] GUSHIMA H , YIYA T , MURATA K , *et al.* Construction of glutathione – producing strains of *E. coli* B by recombinant DNA techniques[J]. **J Appl Biochem** , 1983 , 5 : 210 – 218.
- [6] ZABRISKI D W. Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of a expression of a recombinant malaria antigen in *E. coli*[J]. **J Industrial Microbiol** , 1987 , 2 : 87 – 92.
- [7] SUZUKI T , YAMANE T , SHIMIZU S. Mass production of thiostrepton by fed-batch culture of *Streptomyces laurentii* with pH-stat mode feeding of multi-substrat[J]. **Appli Microbiol Biotechnol** , 1987 , 25 : 526 – 531.
- [8] BROWN D E , MCAVORY A. A pH-controlled fed-batch process for dextransucrase production[J]. **J Chem Tech Biotechnol** , 1990 , 48 : 405 – 414.
- [9] NISHIO N , TSUCHIYA Y , HAYASHI M. A fed-batch culture of methanol-utilizing bacteria with pH-stat[J]. **J Ferment Technol** , 1977 , 55(2) : 151 – 155.
- [10] TULIN E E , UEDA S , YAMAGATA H , *et al.* Effective extracellular production *Bacillus stearothermophilus* esterase by pH-stat mode fed-batch culture of recombinant *Bacillus brevis*[J]. **Biotechnol Bioeng** , 1992 , 40 : 844 – 850.
- [11] 李华钟 林金萍 方芳等. 高谷胱甘肽合成活性的重组大肠杆菌的构建及反应条件[J]. 无锡轻工大学学报 , 1999 , 18(6) : 56 – 59.
- [12] 董群义 陈坚. 重组大肠杆菌生产谷胱甘肽合成酶系的摇瓶发酵条件[J]. 无锡轻工大学学报 , 2001 , 20(3) : 228 – 232.

(责任编辑 李春丽)

(上接第 343 页)

参考文献 :

- [1] 龚剑 朱亮. MATLAB 5X 入门与提高[M]. 北京 清华大学出版社 , 2000.
- [2] BAILEY J E , OLLIS D F. Biochemical engineering fundamental(2nd Edition) [M]. New York ;Mc-Graw-Hill Book Company , 1986.
- [3] 王沫然. MATLAB 5X 与科学计算[M]. 北京 清华大学出版社 , 2000.
- [4] 李友荣 马辉文. 发酵生理学[M]. 长沙 湖南科技出版社 , 1988.
- [5] 马红武 赵学明 赵晓芸. 应用 Excel 处理生化过程数据(II)——动力学参数估值[J]. 计算机与应用化学 , 1999 , 16(1) : 41 – 47.
- [6] HOLLAND J H. Adaptation in Natural ans Artificial System[R]. Ann Arbor :MI University of Michigan , 1975. 11 – 14.
- [7] GOLDBERG D. Genetic Algorithm in Search , Optimazation and Machine Learning[M]. MA , USA : Addison-Wesley Reading , 1989. 123 – 128.
- [8] DAVIDOR Y. Genetic Algorithm and Robotics , A Heuristic Strategy for Optimaziation[M]. New Jersey , USA : World Scientific Pub Co , 1991. 431 – 438.
- [9] 蔡煜东 陈常庆. 用遗传算法辨识发酵动力学参数[J]. 化工学报 , 1995 , 46(3) : 338 – 342.
- [10] 李涛 贺勇军 刘志俭. MATLAB 工具箱应用指南——应用数学篇[M]. 北京 : 电子工业出版社 , 2000.

(责任编辑 秦和平)