

薛氏丙酸杆菌 产抑菌性代谢物发酵培养基优化

潘 森¹, 付雅欣¹, 洪 枫¹, 杨雪霞^{1,*}, 高红亮²

(1. 东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620;

2. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 本文利用单因子实验和响应面实验设计对薛氏丙酸杆菌产抑菌性代谢物的发酵培养基组成进行优化, 以降低培养基成本和进一步提高代谢物抑菌活性。实验结果表明, 玉米浆和大豆蛋白胨可以代替原始培养基中的酵母提取物和胰蛋白胨, 通过 Box-Behnken 实验设计和响应面分析法优化得到了薛氏丙酸杆菌产抑菌性代谢物的发酵培养基组成为葡萄糖 8.2g/L, 大豆蛋白胨 5.1g/L, 玉米浆 12.7g/L, 在此条件下, 代谢物抑菌活性的理论值为 29.5AU/mL, 实际测定值为 29.4AU/mL。优化之后, 薛氏丙酸杆菌代谢物抑菌性提高了 57.2%, 培养基成本大大降低。

关键词: 丙酸杆菌, 抑菌性代谢物, 培养基优化, 响应面设计

Optimization research of fermentation mediums for antimicrobial metabolites producing strain *Propionibacterium shermanii*

PAN Miao¹, FU Ya-xin¹, HONG Feng¹, YANG Xue-xia^{1,*}, GAO Hong-liang²

(1. College of Chemistry Chemical Engineering and Biotechnology, Dong Hua University, Shanghai 201620, China;

2. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The fermentation medium was optimized to reduce the medium cost and promote the antimicrobial metabolites production of *Propionibacterium shermanii* by simple factor experiment and response surface methodology. The results showed that the yeast extract and tryptone of original medium could be replaced by the corn steep liquor power and soy peptone. According to Box-Behnken design and response surface methodology, the optimal medium were as follows: glucose 8.2g/L, soy peptone 5.1g/L, and corn steep liquor 12.7g/L. After medium optimization, the theory value of antimicrobial activity was 29.5AU/mL, and was improved by 57.2%. The actual operation of the experiment turned out to be 29.4 AU/mL, and the medium cost was reduced.

Key words: *Propionibacterium*; antimicrobial metabolites; medium optimization; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)13-0166-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.026

乳品丙酸杆菌是来自发酵食品中的一类丙酸杆菌^[1], 其生长代谢过程中产生多种抑菌性代谢物, 如丙酸、乙酸等有机酸和细菌素等。这些抑菌性代谢物能抑制革兰氏阴性菌、霉菌和酵母等^[2-3]。作为食品来源的微生物, 乳品丙酸杆菌被认为是安全的微生物^[4], 利用其抑菌性代谢物生产食品防腐剂代替化学防腐剂有很大的优势, 日益受到国内外研究人员的关注^[5-7]。法国罗地亚公司利用谢氏丙酸杆菌的代谢物开发了一种新型生物防腐剂 MicrogardTM, 已被美国医药和食品管理局 (FDA) 批准可用于食品中。国内学者也注意到丙酸杆菌抑菌性代谢物的价值, 并进行相关菌株的选育、发酵条件优化等研究^[8-11]。

利用丙酸杆菌发酵产生抑菌性代谢物时, 丙酸杆菌培养基的组成不仅影响代谢物抑菌活性, 而且影响生产成本。目前丙酸杆菌培养所用培养基的成分主要为葡萄糖、胰蛋白胨和酵母提取物。胰蛋白胨和酵母提取物作为工业发酵用培养基成分时存在价格较高的问题, 因此有必要研究价格相对低廉的工业用培养基成分。另外, 丙酸杆菌所产抑菌物质的活性也受培养基成分影响^[9]。为提高抑菌性代谢物活性和降低发酵生产成本, 筛选适合工业发酵用的培养基是非常必要的。本论文以一种能产生抑菌代谢物的薛氏丙酸杆菌为对象, 选择工业用培养基成分, 通过单因素实验和 Box-behnken 响应面分析法对薛氏丙酸杆菌发酵培养

收稿日期: 2014-10-23

作者简介: 潘森 (1990-), 男, 硕士, 研究方向: 食品微生物。

* 通讯作者: 杨雪霞 (1971-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 细菌纤维素的高效生产。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (11D10509); 国家大学生创新计划项目 (12T1050401)。

基的成分和配比进行优化, 以期为丙酸杆菌抑菌性代谢物工业化生产提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

薛氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*), 本实验室保存。恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida* 1.2309), 中科院微生物所购买。玉米浆干粉 (山东郓城康源生物科技有限公司), 植物水解蛋白: HVP-FSA (水解大豆蛋白)、HVP-FSC (水解大豆蛋白) (保定新味康食品配料有限公司), 植物水解蛋白 HVP-AK (水解玉米蛋白)、EVP-AA (水解大豆蛋白)、HVP-AG (水解小麦蛋白)、HVP-B (水解大豆蛋白) (保定味群食品科技股份有限公司), 小麦水解蛋白 (江苏麦凯乐生物科技有限公司), 鱼粉蛋白胨、大豆蛋白胨、胰蛋白胨 (国药集团)。酵母提取物 (安琪酵母股份有限公司)。丙酸杆菌种子培养基为 SLB 培养基^[12]。发酵培养基: 胰蛋白胨 10g/L, 酵母提取物 10g/L, 葡萄糖 10g/L, pH6.5~7.0, 115℃ 灭菌 30min。指示菌培养基为 LB 培养基。软琼脂培养基是在原液体培养基中加入 0.75% 的琼脂, 固体培养基是在原液体培养基中加入 1.5% 的琼脂。

SW-CJ-2FD 双人单面洁净工作台 上海一恒科技有限公司; YXQ-LS-SII 型全自动高压蒸汽灭菌锅 上海博迅实业有限公司医疗设厂; 9080 型隔水式恒温培养箱 上海一恒科技有限公司; HYG-B 型培英全温度控制摇瓶柜 太仓市实验设备厂; Centrifuge 5804R 型高速冷冻离心机 艾本德 (effendorf) 公司; BS 224 型电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 丙酸杆菌的培养: 取保藏于甘油冻存管中的丙酸杆菌菌种, 按 1% 接种量接到 SLB 培养基中, 在具盖三角瓶中 30℃ 静置培养 48h, 即可用做种子。按 3% 的接种量接入活化的丙酸杆菌种子于装有发酵培养基的具盖三角瓶中, 30℃ 静置培养, 每隔 24h 将三角瓶置于磁力搅拌器上搅拌 10min, 避免菌体沉积底部。

指示菌的培养: 从斜面上取 1 环恶臭假单胞菌, 接入装有 50mL LB 培养基的三角瓶中, 于 30℃, 160r/min 摇床培养 12h。

1.2.2 丙酸杆菌代谢物抑菌性的测定

1.2.2.1 丙酸杆菌代谢物的制备 培养 5d 的丙酸杆菌发酵液于 8000r/min, 4℃ 离心 10min, 收集上清液, 用 0.22μm 水系滤膜过滤, 所得滤液即为丙酸杆菌代谢物粗提液。用 1mol/L 的 NaOH 和 0.5mol/L 的柠檬酸将丙酸杆菌代谢物粗提液 pH 调至 5.3 备用。

1.2.2.2 丙酸杆菌代谢物抑菌性的测定 双层琼脂扩散法^[13]: 将 6mL 混有指示菌的软琼脂培养基覆盖在素琼脂上。待凝固后, 用内径 7mm 的不锈钢打孔器打孔, 每孔注入 150μL 丙酸杆菌代谢物。将平板于 4℃ 冰箱中放置 5h, 使丙酸杆菌代谢物在琼脂中充分扩散。随后将平板置于 30℃ 培养箱中倒置培养

24h, 观察抑菌圈, 测抑菌圈大小 (抑菌圈大小 = (外直径 - 内直径) / 2)。酶标法^[14]: 将 OD₆₃₀ 为 0.2 的指示菌稀释 10 倍, 作为酶标板指示菌液。每孔加入 20μL 丙酸杆菌代谢产物和 180μL 指示菌, 每个样品 5 个平行, 并设置空白组 and 对照组, 30℃ 恒温培养 6h。在酶标检测仪上测定每孔的 OD₆₃₀ 值, OD 值为对照组一半时代谢物的稀释度为一个抑菌活性单位 (AU)。

1.2.3 培养基替代物的选择 分别选择玉米浆干粉和 7 种植物水解蛋白 (小麦水解蛋白、HVP-FSA、HVP-FSC、HVP-B、HVP-AK、HVP-AG、EVP-AA) 来代替现有培养基中的酵母提取物, 添加量为 10g/L, 考察丙酸杆菌代谢物的抑菌性。

分别选择大豆蛋白胨、鱼粉蛋白胨和 3 种水解植物蛋白 (HVP-FSC、HVP-AG、HVP-AK) 来代替现有培养基中的胰蛋白胨, 添加量为 10g/L, 考察丙酸杆菌代谢物的抑菌性。

1.2.4 响应面法优化发酵培养基成分 采用 Design Expert 8.0 软件进行 Box-Behnken 响应面实验设计, 选择对丙酸杆菌抑菌性代谢物产量有显著影响的三个因素 (葡萄糖、大豆蛋白胨、玉米浆) 作为 Box-Behnken 设计所考察的变量, 各因素与编码水平设计见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验设计因素水平及编码

Table 1 Levels and codes of variables in Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
X ₁ 葡萄糖 (g/L)	5	10	15
X ₂ 大豆蛋白胨 (g/L)	0	5	10
X ₃ 玉米浆 (g/L)	5	10	15

2 结果与讨论

2.1 培养基成分筛选

2.1.1 培养基中酵母提取物替代物的筛选 酵母提取物含有氨基酸、多肽、维生素、核苷酸及微量元素等多种营养物质, 是实验室常用的培养基成分, 但用作工业发酵培养基成分, 酵母提取物价格略高。本实验考虑用工业发酵培养基原料玉米浆和植物蛋白水解物来代替原培养基中的酵母提取物, 添加量为 10g/L。实验选择了 7 种水解植物蛋白和玉米浆干粉代替培养基中酵母提取物, 考察其对丙酸杆菌代谢物抑菌活性的影响, 结果如图 1 所示。以玉米浆干粉代替酵母提取物时, 丙酸杆菌代谢物的抑菌活性最高, 为 25.5 AU/mL, 琼脂扩散法所测的抑菌圈最大, 为 11mm。在几种水解植物蛋白中, 以水解大豆蛋白 EVP-AA 代替酵母提取物时所产抑菌性物质活性较高, 但加入该物质后培养基颜色深, 影响最终产品的外观。其它几种植物水解蛋白对代谢物抑菌活性的影响和酵母提取物相差不大。从结果来看, 抑菌圈测定结果与活性单位法有一定偏差, 这主要是因为抑菌圈法适合作为定性测定方法, 作为定量方法, 偏差较大。玉米浆干粉营养丰富, 代替酵母提取物可以促进抑菌物质的活性, 而且其来源广, 成本

低,故选用玉米浆干粉替代原发酵培养基中的酵母提取物。

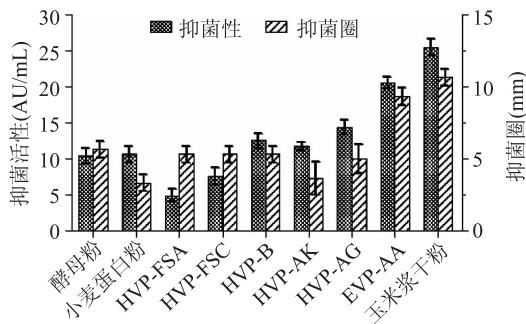


图1 不同物质替代酵母提取物对丙酸杆菌代谢物抑菌性的影响

Fig.1 Effect of alternatives of yeast extract on antimicrobial properties of *Propionibacterium metalibite*

2.1.2 培养基中胰蛋白胨替代物的筛选 在上述实验的基础上,用玉米浆干粉替代培养基中的酵母提取物,分别选取大豆蛋白胨、鱼粉蛋白胨和3种水解植物蛋白(HVP-FSC、HVP-AG、HVP-AK)替换原培养基中的胰蛋白胨,添加量为10g/L,结果如图2所示。当以大豆蛋白胨替代胰蛋白胨时,丙酸杆菌代谢物的抑菌性最高。鱼粉蛋白胨和胰蛋白胨对抑菌性代谢物活性的影响相当。而三种植物水解蛋白所产生的抑菌代谢物的活性均较低。可见,用大豆蛋白胨代替胰蛋白胨是可行的,促进了抑菌性代谢物的产生。

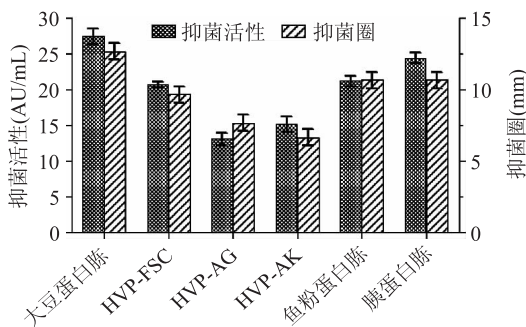


图2 不同物质替代胰蛋白胨对丙酸杆菌代谢物抑菌性的影响

Fig.2 Effect of alternatives of tryptone on the antimicrobial properties of *Propionibacterium metalibite*

2.2 培养基各成分添加量对抑菌活性的影响

2.2.1 葡萄糖浓度对代谢物抑菌性的影响 在其它培养基组分不变时,考察了葡萄糖添加量对丙酸杆菌代谢物抑菌性的影响。由图3可见,随着葡萄糖浓度的增加,代谢物抑菌活性增强,当葡萄糖浓度为10g/L时,代谢物抑菌活性为26.4AU/mL;但当葡萄糖浓度继续增加时,代谢物抑菌活性反而下降,原因可能是过高的葡萄糖浓度导致细菌产酸较多,抑制了细菌的生长,影响丙酸杆菌肽类抑制物的合成。在本实验的考察范围内,葡萄糖的最佳浓度为10g/L。

2.2.2 大豆蛋白胨浓度对代谢物抑菌性的影响 如图4所示,当大豆蛋白胨浓度达到5g/L时,代谢物抑菌活性为25.5AU/mL;但当大豆蛋白胨浓度继续增加时,代谢物抑菌活性反而下降,这表明过高的

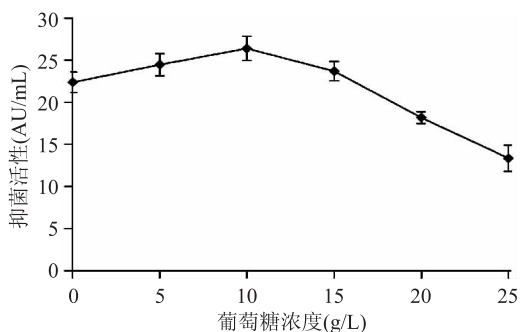


图3 葡萄糖浓度对代谢物抑菌性的影响

Fig.3 Effect of glucose content on antimicrobial activity
大豆蛋白胨浓度不利于抑菌性代谢物的产生。

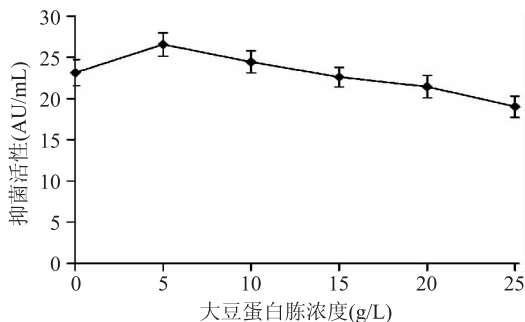


图4 大豆蛋白胨浓度对代谢物抑菌性的影响

Fig.4 Effect of soy peptone on antimicrobial activity

2.2.3 玉米浆浓度对代谢物抑菌性的影响 玉米浆浓度对丙酸杆菌代谢物抑菌性的影响如图5所示,当玉米浆浓度为10g/L时,代谢物抑菌活性为26.8AU/mL;当玉米浆浓度继续增加时,对抑菌性代谢物的产生没有显著影响。在本实验考察的范围内,玉米浆的浓度以10g/L为宜。

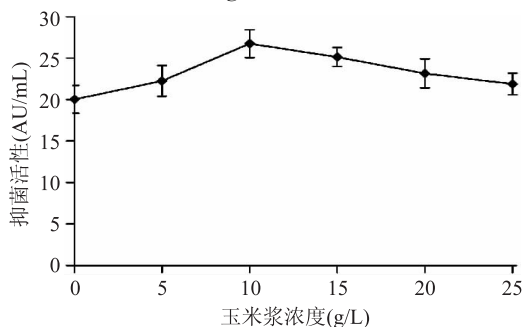


图5 玉米浆浓度对代谢物抑菌性的影响

Fig.5 Effect of corn steep liquor content on antimicrobial activity

2.3 响应面实验优化结果

通过对培养基成分的筛选,初步判定用玉米浆替代酵母提取物、大豆蛋白胨替代胰蛋白胨优化效果显著。实验以培养基主要成分葡萄糖、大豆蛋白胨、玉米浆为考察因子,采用 Box-Behnken 响应面实验设计^[15]进一步优化培养基组成。实验共有17个实验点,其中12个为析因点,5个为中心点,实验结果见表2。

对实验结果进行回归拟合,所得回归方程为:

$$Y = 28.18 - 4X_1 + 0.8X_2 + 2.18X_3 + 0.12X_1X_2 +$$

$$1.33X_1X_3 - 1.33X_2X_3 - 4.45X_1^2 - 1.75X_2^2 - 1.55X_3^2$$

其中, Y 为代谢物抑菌活性; X_1 为葡萄糖含量; X_2 为大豆蛋白胨含量; X_3 为玉米浆含量。

该模型方程方差分析和显著性检验结果见表 3。在实验设计范围内, 回归模型非常显著 ($p < 0.001$), 模型失拟项影响不显著 ($p = 0.1054$), 说明所拟合的二次回归方程合适, 能够正确反应抑菌活性与葡萄糖、大豆蛋白胨和玉米浆之间的关系。决定系数 (R^2) = 0.9799, 表明回归方程的拟合度较好。回归方程各项的方差分析表明, 因素 X_1 (葡萄糖)、因素 X_3 (玉米浆) 对抑菌性代谢物活性的线性效应极显著 ($p < 0.01$), $X_1 X_2$ 的交互影响不显著 ($p > 0.05$)。

表 2 Box-Behnken 实验设计和结果

Table 2 Experimental design and result of Box-Behnken

实验号	X_1	X_2	X_3	抑菌性(AU/mL)
1	1	0	1	21.7
2	0	0	0	27.2
3	-1	-1	0	26.1
4	0	-1	-1	20.2
5	1	1	0	17.8
6	-1	0	1	26.3
7	1	-1	0	16.4
8	0	0	0	28.9
9	0	-1	1	28.2
10	0	0	0	28.4
11	-1	1	0	26.7
12	1	0	-1	16.4
13	-1	0	-1	25.1
14	0	1	1	26.8
15	0	0	0	29.1
16	0	0	0	28.2
17	0	1	-1	25.2

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression model

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	p
模型	300.46	9	33.38	37.95	<0.0001
X_1	128	1	128	145.5	<0.0001
X_2	5.12	1	5.12	5.82	0.0466
X_3	37.84	1	37.84	43.02	0.0003
X_1X_2	0.062	1	0.062	0.071	0.7975
X_1X_3	7.02	1	7.02	7.98	0.0256
X_2X_3	7.02	1	7.02	7.98	0.0256
X_1^2	84.47	1	83.47	94.89	<0.0001
X_2^2	12.93	1	12.93	14.7	0.0064
X_3^2	10.15	1	10.15	11.54	0.0115
残差	6.16	7	0.88		
失拟项	4.63	3	1.54	4.04	0.1054
纯误差	1.53	4	0.38		

$$R^2 = 0.9799 \quad R_{adj}^2 = 9541$$

注: $p < 0.05$ 为显著, $p < 0.01$ 为极显著, $p > 0.05$ 为不显著。

利用响应面曲线所具有的特性, 在尽可能节省实验次数的条件下, 寻求一种既能改善现有实验水平, 又甚至接近最优点的方法^[16]。通过 Design-Expert 软件对三个实验因素分别两两交互, 做出二次回归方程的响应面及等高线, 如图 6 所示。由图 6 可以看出, 影响薛氏丙酸杆菌代谢物抗菌性最显著的因素为葡萄糖 (X_1), 表现为其响应面变化弧度较大。大豆蛋白胨 (X_2) 和玉米浆 (X_3) 响应面弧度变化平缓, 说明对响应值影响相对较小。大豆蛋白胨在响应图中呈现较为完整的弧型, 说明在实验水平范围内, 响应值随大豆蛋白胨含量先上升后下降。图形中葡萄糖随着添加量的升高, 响应值下降, 说明最佳取值应靠近较低浓度的葡萄糖含量。玉米浆在响应面图形中其最佳取值靠近编码值的右侧, 即较高浓度的玉米浆含量。

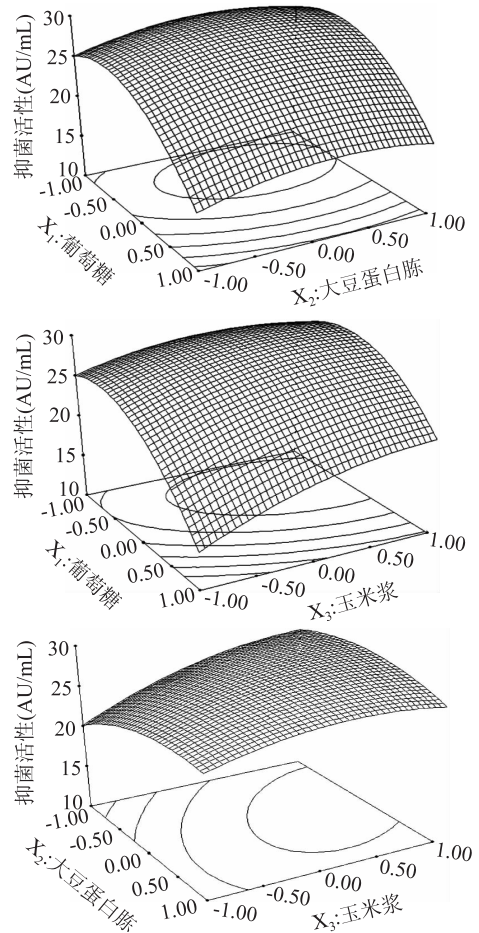


图 6 各因素交互作用

对代谢物抑菌活性影响的响应曲面图

Fig.6 Response surface plots showing the cross effects of factors on antimicrobial activity

对回归方程进行分析, 可得到响应面最佳条件及抑菌性代谢物活性预测值, 本实验中, 得到的最佳理论条件为: $X_1 = -0.369$, $X_2 = 0.012$, $X_3 = 0.538$, 即葡萄糖的添加量为 8.2g/L, 大豆蛋白胨的添加量为 5.1g/L, 玉米浆的添加量为 12.7g/L, 在该条件下理论预测抑菌活性为 29.5AU/mL。对预测的最佳点进行验证实验, 实验进行三次, 得出代谢物抑菌活性分别

为 28.9, 30.0, 29.3AU/mL, 平均抑菌活性为 29.4AU/mL, 实验结果与模型吻合较好。

2.4 培养基优化前后的抑菌活性与成本

通过对比培养基优化前后代谢物的抑菌活性, 丙酸杆菌在优化后的培养基上所产代谢物平均抑菌活性为 29.4AU/mL, 而在原始培养基上所产代谢物平均抑菌活性为 18.7AU/mL, 抑菌性提高了 57.2%。优化后不仅降低了葡萄糖的使用量, 而且培养基主要成分玉米浆替换原始培养基中的酵母提取物、大豆蛋白胨代替原始培养基的胰蛋白胨, 成本显著降低。可见, 丙酸杆菌发酵培养基经优化后不仅提高了代谢物抑菌活性, 而且大大降低了培养基成本, 为该产品的工业化生产提供参考。

3 结论

实验优化了薛氏丙酸杆菌产抑菌性代谢物的培养基, 筛选出玉米浆干粉和 大豆蛋白胨分别代替原培养基中的酵母提取物和胰蛋白胨, 并依据响应面分析中的 Box-behnken 实验设计对培养基各成分含量进行优化, 所得薛氏丙酸杆菌产抑菌性代谢物的最佳培养基组成为: 葡萄糖 8.2g/L, 大豆蛋白胨 5.1g/L, 玉米浆 12.7g/L, 模型预测抑菌性最高可达 29.5AU/mL, 与验证实验的 29.4AU/mL 非常接近, 说明了该模型有较好拟合性。优化后的培养基发酵丙酸杆菌不仅使代谢物抑菌活性提高了 57.2%, 而且培养基成本大大降低, 实验结果为工业化生产丙酸杆菌抑菌性代谢物作为新型食品防腐剂奠定了基础。

参考文献

- [1] Stackebrandt E, Cummins C S, Johnson J L. Family Propionibacteriaceae: The Genus *Propionibacterium* [J]. Prokaryotes, 2006, 3: 400-418.
- [2] Yuksekdag Z N, Darilmaz D O, Beyatli Y. Dairy propionibacterium strains with potential as biopreservatives against foodborne pathogens and their tolerance - resistance properties [J]. Eur Food Res Technol, 2014, 238: 17-26.
- [3] Tharmaraj N, Shah N P. Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeasts and moulds in cheese-

based dips[J]. Int J Food Sci Technol, 2009, 44: 1916-1926.

- [4] Meile L, Le Blay G, Thierry A. Safety assessment of dairy microorganisms: Propionibacterium and Bifidobacterium [J]. Int J Food Microbiol, 2008, 126: 316-320.
- [5] Ratnam P, Barefoot S F, Lisa D. Prince, et al. Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Propionibacterium jensenii* B1264 [J]. Lait, 1999, 79: 125-136.
- [6] Faye T, Langsrud T, Nes IF, et al. Biochemical and Genetic Characterization of Propionicin T1, a New Bacteriocin from *Propionibacterium thoenii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4230-4236.
- [7] Lind H, Sjogren J, Gohil S, et al. Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 271: 310-315.
- [8] 刘靖, 王立梅, 齐斌. 丙酸杆菌素高产菌株的诱变选育 [J]. 生物工程, 2012, 33(9): 187-189.
- [9] 陈玉梅, 常忠义, 王疆元, 等. 乳酸钠和葡萄糖对薛氏丙酸杆菌生长及代谢物抑菌活性的影响 [J]. 西北农林科技大学学报, 2007, 35(2): 178-182.
- [10] 王海晶, 王玉华, 齐斌. 响应面法优化产丙酸杆菌素菌株的培养条件 [J]. 中国乳品工业, 2011, 39(2): 13-16.
- [11] 王晓云, 金凤杰, 计芬芬, 等. 补加氨水对薛氏丙酸杆菌分批发酵及代谢物抑菌活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2012, 14: 224-227.
- [12] Brede D A, Faye T, Johnsborg O, et al. Molecular and Genetic Characterization of Propionicin F, a bacteriocin from *Propionibacterium freudenreichii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7303-7310.
- [13] Tagg JR, McGiven AR. Assay system for bacteriocins [J]. Appl Microbiol, 1971, 21: 943.
- [14] Holo H, Nilssen O, Nes I F. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris: isolation and characterization of the protein and its gene [J]. J Bacteriol, 1991, 173(12): 3879-3887.
- [15] Montgomery D C. Design and analysis of experiments (3rd ed) [M]. New York: John Wiley & Sons, 1991.
- [16] 任露泉. 实验优化设计与分析 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.

(上接第 165 页)

performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008(47): 790-794.

- [5] 刘欢, 李艳, 严明, 等. 重组酿酒酵母全细胞催化合成莱鲍迪苷 A [J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 6-10.
- [6] Zhang K, Rathod PK. Divergent regulation of dihydrofolate reductase between malaria parasite and human host [J]. Science, 2002(296): 545-547.
- [7] West RW, Chen SM, Putz H, et al. GAL1/GAL10 divergent promoter region of *Saccharomyces cerevisiae* contains negative control elements in addition to functionally separate and possibly overlapping upstream activating sequences [J]. Genes Dev, 1987, (1): 1118-1131.
- [8] Lohr D, Venkov P, Zlatanova J. Transcriptional regulation in

the yeast GAL gene family: a complex genetic network [J]. FEBSJ, 1995(9): 777-787.

- [9] Hauf J, Zimmermann FK, Muller S. Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Enzyme Microb Technol, 2000(26): 688-698.
- [10] 刘欢, 李艳, 严明, 等. 甜叶菊糖基转移酶 UGT76G1 的克隆表达及其性质研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 187-190.
- [11] Partow S, Siewers V. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2010, (27): 955-964.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1601-1604.