

利用响应面方法优化转小鼠金属硫蛋白-I 基因聚球藻 7002 的培养基成分

曾文炉^{1,2}, 赵飞飞¹, 曹照根¹, 茹炳根¹

1 北京大学生命科学学院, 蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871

2 南开大学环境科学与工程学院, 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300071

摘要: 为实现转小鼠金属硫蛋白基因-I聚球藻 7002 的高密度培养, 并将其应用于实际的重金属废水处理过程, 首先需要对培养基的成分进行优化。本文利用响应面这一多因素过程优化的有效工具, 通过全因子实验、最陡爬坡实验和中心组合实验, 对转小鼠金属硫蛋白基因-I聚球藻 7002 培养基的主要成分以及初始pH进行了优化。优化后的培养基组成为: NaHCO₃ 1.696 g/L, NaNO₃ 8.57 g/L, 初始pH为 8.57, 其他成分同Medium A。优化条件分别在 2 L和 20 L气升式光生物反应器中得到了验证, 最大细胞浓度分别达到每升 4.16 g干重和每升 3.12 g干重, 分别比优化前提高了 9倍和 7倍, 从而为其产业化应用打下基础。

关键词: 小鼠金属硫蛋白-I, 聚球藻 7002, 转基因, 响应面方法, 优化

Medium Optimization by Response Surface Method for Transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 with Mouse Metallothionein-I Gene

Wenlu Zeng^{1,2}, Feifei Zhao¹, Zhaogen Cao¹, and Binggen Ru¹

1 The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

2 College of Environmental Science and Engineering, Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: To implement high cell density cultivation of transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 with mouse metallothionein-I gene, and its applications in heavy metal wastewater, we optimized the medium components. We used response surface method, a useful tool for multi-factor process optimization, through a three- step experiment design: full factor design, the steepest climbing and central composite design. The selected three factors were NaHCO₃, NaNO₃, and initial pH. The optimized medium contained 1.696 g/L NaHCO₃ and 8.57 g/L NaNO₃, at initial pH 8.57. The optimized medium was validated in 2-L and 20-L air lift photo-bioreactor, respectively. The maximum cell concentration reached 4.16 g/L for 2-L bioreactor, and 3.12 g/L for 20-L bioreactor.

Received: April 3, 2007; Accepted: June 4, 2007

Supported by: the National Science Foundation for Post-doctoral Scientists of China (No. 2003033079).

Corresponding author: Wenlu Zeng. Tel: +86-22-66229527; E-mail: zengwl2007@hotmail.com.

国家第三十三批博士后科学基金(No. 2003033079)。

本项研究得到的结果, 其知识产权归北京大学所有。

Key words: mouse metallothionein-I, *Synechococcus* sp. PCC 7002, transgenic, response surface method, optimization

微藻细胞除可应用于食品、医药和精细化工等领域外, 还可在积累自身生物量的同时, 通过吸附或生物转化作用, 净化废水中的重金属等, 因而具有重要的环保价值。微藻细胞净化重金属废水具有独特的优势, 如操作条件(pH、温度等)比较温和; 适宜于低浓度重金属废水; 工艺简化、净化体系易于建立、运营成本较低。但同时也存在着一些缺点, 主要表现在: 对重金属选择性和耐受性较差; 净化效率易受微藻种类、细胞生理状况以及环境条件等因素的制约。

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一类低分子量、富含半胱氨酸的小分子蛋白。自 1957 年被发现以来, 因其具有多种复杂多样的生理活性和功能, 而受到广泛关注。研究表明, 金属硫蛋白在生物体内, 不仅参与必需金属元素如 Zn、Cu 等的储存、运输及代谢^[1], 还具备清除自由基^[2]、抗辐射^[3]、参与激素调节增进机体对外界刺激的应激反应^[4]和重金属解毒作用^[5-6]。尤其值得关注的是, 由于其分子结构的特异性, 金属硫蛋白可特异、稳定、高效地结合多种金属, 尤其是重金属如 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 等, 因而具有重要的环保价值。而利用基因工程手段, 将转金属硫蛋白基因转入适应性强、分布广泛的微藻细胞, 将有力地强化微藻对重金属废水的净化潜力, 也为生物工程技术在环境保护上的应用开辟新的思路。

北京大学生命科学学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室经过多年研究, 已相继构建得到了类型多样、用途各异的转金属硫蛋白基因蓝藻^[7-12]。为了加快其向现实生产力的转化, 尽早应用于实际的重金属废水处理过程, 亟需解决转 MT 基因蓝藻生长条件的优化, 以及工业化大规模培养等瓶颈问题。响应面方法是多因素过程优化的有效工具。近几年来, 随着统计软件的发展和计算机应用的普及, 响应面方法的应用越来越普及。而在生物技术领域中, 现已被广泛应用于培养基优化、发酵过程参数优化、产物分离与纯化条件的探索等各个方面^[13-16]。但用于转小鼠金属硫蛋白-I 基因聚球藻 7002 培养条件的优化尚未见报道。

本文在前期工作的基础上, 首次利用响应面方

法对影响转小鼠金属硫蛋白-I 基因聚球藻 7002 生长的培养基主要成分进行优化, 并在 2 L 和 20 L 气升式光生物反应器中扩大化培养, 以期为其的产业化高密度培养和实际工业应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 藻种

实验所用的转小鼠金属硫蛋白基因(mMT-I)聚球藻 7002(*Synechococcus* sp. PCC 7002)由北京大学生命科学学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室构建得到^[12]。

1.2 培养基及培养条件

培养基采用 Medium A^[17]。

摇瓶培养: 根据不同实验的设计要求, 将适量的对数期藻种细胞接种到 250 mL 三角瓶, 置于恒温光照摇床(型号 HZQ-R, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司)中培养, 条件为 150 r/min, 30 °C, 光强 60.5 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。每隔 24 h 取样测定细胞浓度, 直至生长达到稳定期。

光生物反应器培养: 取处于对数期藻种细胞接种于 20 L 内循环气升式光生物反应器中培养(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室研制), 培养液体积 15~16 L, 反应器表面光强(光合有效辐射计, FGH-1 型, 北京师范大学光学仪器厂)为 126.7 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 温度通过恒温水浴控制在 30 ± 1 °C, 循环空气流量为 60 L/h。每隔 24 h 取样测定细胞浓度, 直至生长达到稳定期。

1.3 细胞生物量浓度测定

光密度值(OD_{750}): 待测定藻液经离心或过滤后, 以新鲜培养液补充至相同体积。然后以新鲜培养液作对照, 测定藻液在 750 nm 处的吸光值 OD_{750} 。

细胞干重浓度(g/L): 先按上述方法测定 OD 值, 再将其代入标准曲线即可求得藻细胞干重浓度。

OD_{750} 与干重浓度的回归关系式为(适用 OD 范围: 0.05~0.5)

$$\text{g/L} = 0.023 + 0.484OD_{750}$$

1.4 实验设计

全因子实验设计: 以 Medium A 培养基为基础, 研究不同碳源(葡萄糖、醋酸钠和碳酸氢钠)、氮源(硝

酸铵、尿素和硝酸钠)、光强、初始pH、CO₂气体补给等条件对细胞生长的影响,初步确立主要的影响因子。之后开展2³全因子试验。

中心组合设计:在上述实验基础上,进行2³中心组合实验。对于3个因素,此设计由全2³因子设计构成的8个点,6个中心点的重复以及6个星臂点即每个因素轴上距中心点±α处各一个点组成。轴距离选择为1.682使得该设计为正交设计。为了预测最佳点,用二次多项式拟合中心组合设计的实验数据。该多项式方程为:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

上式中, Y为预测响应值,即藻细胞光密度值或细胞干重浓度, X₁、X₂和X₃分别为NaHCO₃、NaNO₃和培养基初始pH。

实验设计通过 Design Expert 6.0(Stat-Ease, Inc.)完成,用 SPSS 11.0(Spss, Inc.)对获得的实验数据进行回归分析。

2 结果与讨论

2.1 转 MT-I 基因聚球藻培养基成分的响应面优化
前期实验表明,转小鼠金属硫蛋白-1基因聚球藻 7002 不能利用葡萄糖、醋酸钠、硝酸铵和尿素等碳源和氮源进行生长。但培养体系中的碳酸氢钠、硝酸钠、光强、初始pH、CO₂和培养装置等对藻细胞的生长具有明显的影响。

为进一步考察上述因素的影响及其相互作用,以提高细胞培养密度,缩短培养时间,为工业化大规模培养提供技术依据,本实验中首次采用响应面设计方法,以寻找优化的培养条件。

考虑到将来实际产业化培养过程中工艺的实用性,在进行响应面设计之前,需要选定适宜的试验因素。如前所述,虽然通入CO₂气体对细胞生长有利,但浓度过高,对细胞生长的促进作用便不再明显,相反,由于此时培养液呈酸性将对细胞产生毒害作用。另外,CO₂浓度过高将会提高培养成本。因此,在进行响应面设计时,CO₂气体流率将被固定在循环气体的1%。而光强由于在实际的培养过程中不具可调节性,同样不把它作为待优化因素。

于是,在进行转MT基因聚球藻生长条件的响应面优化设计时,仅考虑NaHCO₃、NaNO₃和初始pH

值三个因素。其余条件为:30℃,光强为95.6 μmol photon m⁻² s⁻¹,150 r/min(三角瓶)或通入1%循环气体的CO₂(气升式反应器)。

2.1.1 2³全因子设计(Full Factor Design, FFD)

以NaHCO₃(X₁)、NaNO₃(X₂)和初始pH(X₃)值作为影响因素,以稳定期的细胞浓度OD₇₅₀作为响应变量Y。用三因素二水平2³全因子设计作为拟合一次模型的一次设计。设计有8个处理组合,但为了进行方差分析,另在设计中心点处加上5次重复,因而总共需要13次实验。三因素的变化范围分别设置为: X₁ = (2 g/L, 10 g/L), X₂ = (4 g/L, 10 g/L), X₃ = (7.5, 9.1)。X_i=(X_i-X₀)/ΔX_i。X_i是自变量的编码值, X_i是自变量的自然值, X₀是自变量在中心点处的值, ΔX_i是自变量的步长。各因子的自然变量与编码变量之间的变换见表1。

表1 2³全因子实验设计自然变量与编码变量的对应关系
Table 1 Variables and its levels of the 2³ FFD

Variables X _i	Code level		
	-1	0	+1
X ₁ (NaHCO ₃ , g/L)	2	6	10
X ₂ (NaNO ₃ , g/L)	4	7	10
X ₃ (pH)	7.5	8.3	9.1

$$X_1=(X_1-6)/4 \quad X_2=(X_2-7)/3 \quad X_3=(X_3-8.3)/0.8$$

2³全因子实验设计见表2,实验结果见表3。

表2 2³全因子设计及实验结果

Table 2 2³ FFD and the results

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Response Y	
				Observed	Predicted
1	-1	-1	-1	3.261	3.466
2	+1	-1	-1	1.025	1.163
3	-1	+1	-1	7.349	7.488
4	+1	+1	-1	1.859	2.064
5	-1	-1	+1	6.265	6.404
6	+1	-1	+1	1.785	1.990
7	-1	+1	+1	8.235	8.440
8	+1	+1	+1	0.767	0.905
9	0	0	0	4.462	3.990
10	0	0	0	4.053	3.990
11	0	0	0	4.398	3.990
12	0	0	0	4.143	3.990
13	0	0	0	4.268	3.990

表 3 2³全因子实验结果的回归分析
Table 3 Results of the FFD regression analysis

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower	Upper
Intercept	3.990	0.097	3.752	4.228
X ₁	-2.459	0.124	-2.763	-2.156
X ₂	0.734	0.124	0.431	1.038
X ₃	0.445	0.124	0.141	0.748
X ₁ *X ₂	-0.780	0.124	-1.084	-0.477
X ₁ *X ₃	-0.528	0.124	-0.831	-0.224
X ₂ *X ₃	-0.496	0.124	-0.800	-0.193

R squared = 1-Residual SS / Corrected SS = 0.988

由回归分析表可写出拟合一次多项式：

$$Y = 3.990 - 2.459X_1 + 0.734X_2 + 0.445X_3 - 0.780X_1X_2 - 0.528X_1X_3 - 0.496X_2X_3$$

对该多项式进行方差分析，发现该模型的确系数为 0.988，显著性水平 $\alpha=0.01$ 。由此表明，该模型可对实验数据进行准确的预测。

此外，从上述回归方程可以看出，NaHCO₃(X₁)浓度过高，对转MT基因聚球藻细胞生长有抑制作用，而适当提高NaNO₃(X₂)浓度和初始pH值(X₃)，将有利于细胞生长。

2.1.2 最陡爬坡实验

由于响应面拟合方程只在考察的紧相邻域里才能充分地近似真实情形，而在其他区域，拟合方程与被近似的函数方程毫无相似之处，几乎无意义。所以，要先逼近最大响应值后才能建立有效的响应面拟合方程。

最陡爬坡法以实验值变化的梯度方向为爬坡方向，而最陡爬坡路径的方向及步长则根据上述一次多项式三个因素效应值的大小与比例设定来确定。实验设计与响应见表 4。

表 4 最陡爬坡路径及实验结果
Table 4 Experiment design of the ascent and corresponding responses

Run	X ₁ /(g/L)	X ₂ /(g/L)	X ₃ (pH)	OD ₇₅₀ of steady phase
1	6.0	7.0	8.3	4.265
2	4.0	7.45	8.37	6.875
3	2.0	7.90	8.45	8.523
4	1.0	8.12	8.48	7.548

表 4 可知，处理 3 的稳定期细胞浓度最大，而处

理 4 的终浓度开始下降，说明响应已充分接近最大值。故以处理 3 的因子变量值作为下文中心组合设计的大致中心点值。

2.1.3 中心组合实验设计(Central Composite Design, CCD)

根据上述最陡爬坡实验，中心组合设计选用的实验因素仍然为NaHCO₃(X₁)、NaNO₃(X₂)和初始pH(X₃)，自然变量与编码变量之间的变换见表 5。

表 5 2³中心组合设计自然变量与编码变量之间的对应关系
Table 5 Variables and its levels of the CCD

Variables X _i	Code level				
	-1.682	-1	0	+1	+1.682
X ₁ (NaHCO ₃ , g/L)	0.318	1.0	2.0	3.0	3.682
X ₂ (NaNO ₃ , g/L)	6.318	7.0	8.0	9.0	9.682
X ₃ (pH)	7.66	8.0	8.5	9.0	9.34

$$X_1=(X_1-2) \quad X_2=(X_2-8) \quad X_3=(X_3-8.5)/0.5$$

2³中心组合设计及实验结果列于表 6。

表 6 2³中心组合设计及实验结果
Table 6 Experiment design and results of the 2³ full factor CCD

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Response Y	
				Observed	Predicted
1	1	1	1	6.039	6.292
2	1	1	-1	6.045	6.292
3	1	-1	1	6.559	6.498
4	1	-1	-1	6.456	6.866
5	-1	1	1	8.162	7.376
6	-1	1	-1	8.132	7.376
7	-1	-1	1	7.651	6.944
8	-1	-1	-1	7.024	7.184
9	-1.682	0	0	6.625	6.882
10	+1.682	0	0	4.884	4.241
11	0	-1.682	0	8.850	8.917
12	0	+1.682	0	8.825	8.917
13	0	0	-1.682	8.900	8.917
14	0	0	+1.682	8.902	8.917
15	0	0	0	8.794	8.917
16	0	0	0	8.903	8.917
17	0	0	0	9.042	8.917
18	0	0	0	8.980	8.917
19	0	0	0	8.789	8.917
20	0	0	0	8.845	8.917

由此实验观察值用二次多项式进行回归，其结果见表 7。

由表 7 中的回归系数可以写出二次多项式回归方程为:

$$Y = 8.917 - 0.644X_1 + 0.047X_2 + 0.055X_3 - 0.319X_1X_2 - 0.070X_1X_3 - 0.088X_2X_3 - 1.270X_1^2 - 0.179X_2^2 - 0.157X_3^2$$

表 7 2³中心组合实验设计的回归分析

Table 7 Results of the regression analysis of the CCD

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower	Upper
Intercept	8.917	0.188	8.497	9.336
X ₁	-0.644	0.125	-0.923	-0.366
X ₂	0.047	0.125	-0.231	0.326
X ₃	0.055	0.125	-0.223	0.334
X ₁ *X ₂	-0.319	0.163	-0.683	0.045
X ₁ *X ₃	-0.070	0.163	-0.434	0.294
X ₂ *X ₃	-0.088	0.163	-0.452	0.276
X ₁ ²	-1.270	0.122	-1.540	-0.998
X ₂ ²	-0.179	0.122	-0.450	0.092
X ₃ ²	-0.157	0.122	-0.428	0.114

R squared = 1-Residual SS / Corrected SS = 0.934

对该多项式进行方差分析,发现该模型的确定系数为 0.934,显著性水平α=0.01。由此表明,该模型可对实验数据进行准确的预测。

2.2 关键因素对细胞生长影响的响应面分析和优化条件的确定

上述模型方程中各因素及其相互作用对响应的影 响可通过图 1~图 3 所示的响应面三维图直观反映出来。

从三维面可以看出,碳酸氢钠浓度过高,对细胞生长不利;而硝酸钠和 pH 对细胞浓度的影响存在一个较宽的高峰区域,说明在所实验的范围内,硝酸钠浓度和 pH 的改变对细胞生长影响较小。

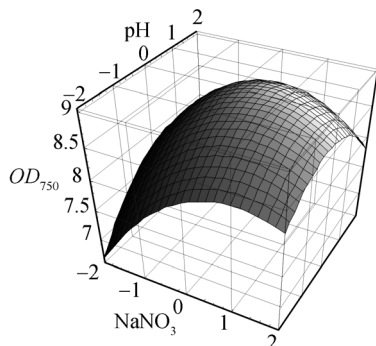


图 1 硝酸钠和 pH 对细胞浓度的响应面分析图

Fig. 1 Surface response plot of NaNO₃ and pH to OD₇₅₀

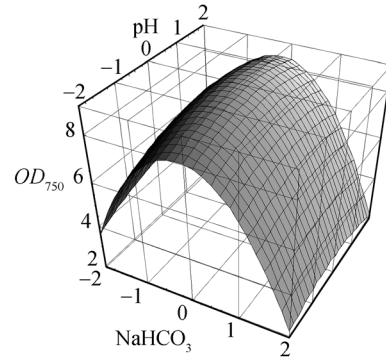


图 2 碳酸氢钠和 pH 对细胞浓度的响应面分析图

Fig. 2 Surface response plot of NaHCO₃ and pH to OD₇₅₀

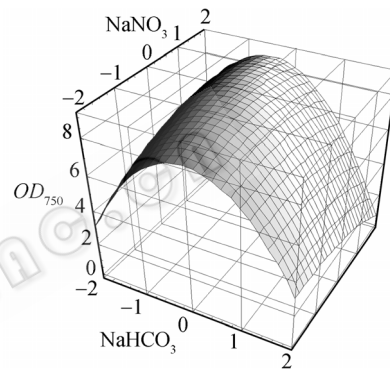


图 3 碳酸氢钠和硝酸钠对细胞浓度的响应面分析图

Fig. 3 Surface response plot of NaHCO₃ and NaNO₃ to OD₇₅₀

对上述二次多项式模型方程分别求X₁、X₂和X₃的偏导数,得

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = -0.644 - 2.540X_1 - 0.319X_2 - 0.070X_3$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_2} = 0.047 - 0.319X_1 - 0.358X_2 - 0.088X_3$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_3} = 0.055 - 0.070X_1 - 0.088X_2 - 0.314X_3$$

联解上述线性方程组,求得极值点:

$$X_1 = -0.304 \quad X_2 = 0.367 \quad X_3 = 0.140 \quad Y_{\max} = 9.027$$

2.3 模型验证

由于以上最佳组合未被包含在所设计的 20 个中心组合实验中,为进一步验证模型的可靠性,在 2 L 气升式生物反应器中对转MT基因聚球藻细胞进行了培养,结果如图 4 所示。从图中可以看出,转MT基因聚球藻细胞在优化条件下培养,稳定期的细胞浓度 (OD₇₅₀=8.59) 基本达到了理论预期值 (OD₇₅₀=9.027),更是比未优化前提高了近 9 倍^[12],培养时间也由此得以缩短。

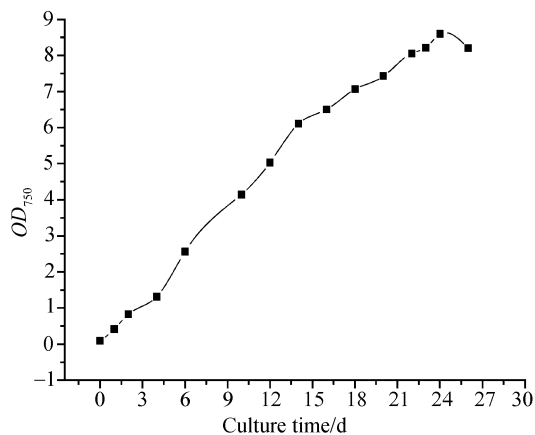


图4 优化条件下转 MT 基因聚球藻细胞在 2 L 气升式生物反应器中的生长

Fig. 4 Growth behavior of MT transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 in 2 liter ALR with 1% CO₂ under optimum condition

2.4 优化条件下转 MT 基因聚球藻细胞的扩大培养

微藻资源开发利用的前提是微藻细胞的高密度、大规模工业化培养。同样, 转 MT 基因聚球藻无论是应用于重金属废水处理过程还是生物医药领域, 都需要有一定的藻细胞生物量作为物质基础。基于此, 本节对转 MT 基因聚球藻细胞在 20 L 气升式生物反应器中的生长特性进行了初步研究, 以期工业应用提供参考。

采用上述优化条件培养, 实验结果如图 5 所示。

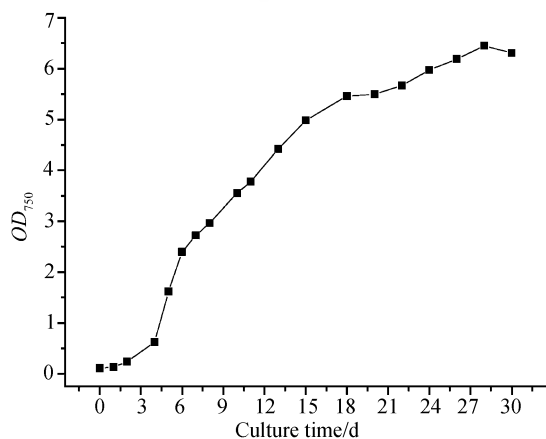


图5 优化条件下转 MT 基因聚球藻细胞在 20 L 气升式生物反应器中的生长

Fig. 5 Growth behavior of MT transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 in 20 liter ALR with 1% CO₂ under optimum condition

从图中可以看出, 转 MT 基因聚球藻细胞在 20

L 气升式生物反应器中生长良好, 稳定期的生物量浓度 ($OD_{750}=6.45$) 比优化前提高了近 7 倍^[12]。这再次证明了上述优化条件的可靠性以及气升式光生物反应器用于转基因微藻扩大化培养的可行性。

REFERENCES

- [1] Pillet S, Fournier M, Bouquegneau JM, *et al.* Modulation by zinc and estradiol of metallothionein levels in grey seal peripheral blood leukocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2000, **126**(Supplement 1): S120.
- [2] Haase, Hajo, Maret, *et al.* A differential assay for the reduced and oxidized states of metallothionein and thionein. *Analytical Biochemistry*, 2004, **333**(1): 19–26.
- [3] Cols, Neus, Romero-Isart, *et al.* Binding of Excess Cadmium(II) to Cd7-metallothionein from Recombinant Mouse Zn7-metallothionein 1. UV-VIS Absorption and Circular Dichroism Studies and Theoretical Location Approach by Surface Accessibility Analysis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1997, **68**(3): 157–166.
- [4] Sarkar, Sagartirtha, Duttgupta, *et al.* Effects of heavy metals on population growth and metallothionein gene expression in the mosquito *Culex quinquefasciatus*, from Calcutta, India. *Environmental Pollution*, 2004, **127**(2): 183–193.
- [5] Tallkvist J, Yoshioka M, Oskarsson A. Metallothionein expression in the mammary glands of mice—Effects of cadmium. *Toxicology Letters*, 2003, **144**(Supplement 1): s137.
- [6] Sterenberg L, van Gestel CAM, van Straalen NM. Metallothionein in different non-tolerant and metal-tolerant populations of the springtail *Orchesella cincta*. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2000, **126**(Supplement 1): S140.
- [7] Ren L, Shi DJ, Dai JX, *et al.* Expression of the mouse metallothionein-I gene conferring cadmium resistance in a transgenic cyanobacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, **158**(1): 127–132.
- [8] Guo XX, Shi DJ, Xu XD, *et al.* Metal-induced expressing of mammal Metallothionein-I gene in cyanobacteria to promote cadmium-binding preferences. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, **52**(6): 806–810.
- [9] Chen Z, Ren L, Shao Q, *et al.* Expression of Mammalian Metallothionein-I Gene in Cyanobacteria to Enhance Heavy Metal Resistance. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, **39**: 155–158.

- [10] Zhou J, Hao FY, Shi DJ, *et al.* Expression of mouse MT-I as a fusion protein in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(1): 98–101.
- [11] Ru BG, Zeng WL. Researches on Transgenic microalgae with Mouse Metallothionein-I gene. In: Proceedings of Chinese Marine Biochemistry, Yichang, Hubei, 2004, 7–15.
茹炳根, 曾文炉. 转金属硫蛋白 (Metallothionein) 基因微藻的研究, 全国首届海洋生物化学与分子生物学学术会议论文集, 2004 年 5 月 (三峡宜昌), 7–15.
- [12] Zhou J, Luo N, Ning Y, *et al.* Expression of mouse metallothionein-I gene in *Synechococcus* sp. PCC 7002 by homologous recombination. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29**(1): 149–153.
周杰, 罗娜, 宁叶, 等. 通过同源重组在聚球藻 7002 中表达小鼠金属硫蛋白- 的初步研究. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29**(1): 149–153.
- [13] Acero-Ortega, Claudia, Dorantes, *et al.* Response surface analysis of the effects of Capsicum extract, temperature and pH on the growth and inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Engineering*, 2005, **67**(1–2): 247–252.
- [14] Khuri, André I. An overview of the use of generalized linear models in response surface methodology. *Nonlinear Analysis*, 2001, **47**(3): 2023–2034.
- [15] Shieh CJ. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology*, 2003, **88**(2): 103–106.
- [16] Zeboudj S, BelhanÃÃche-Bensemra N, BelabbÃÃs R. Use of surface response methodology for the optimization of the concentration of the sweet orange essential oil of Algeria by wiped film evaporator. *Journal of Food Engineering*, 2005, **67**(4): 507–512.
- [17] Casteholz RW. Culturing Methods for Cyanobacteria. in: Methods in Enzymology. London: Academic Press, 1988, **167**(1): 63–93.

《生物工程学报》专刊出版的有关规定

一、申请人资格和定义

申请人应是我国生物技术领域的学术带头人, 熟悉该领域某个方向的现状, 能够把握该方向的发展动态, 并有能力组织国内外专家撰写论文。申请者 (即特约编辑) 应是组织专刊申请和正式提出专刊申请的负责人。在专刊出版计划批准后的实施过程中, 是该专刊的实际负责人, 应保证有足够的时间和精力从事专刊的组织工作。

二、特约编辑职责

1. 认真填写专刊申请表 (见下载专区), 保证所提交申请表内容的真实性;
2. 与编辑部签定出版专刊责任书;
3. 专刊应在确定选题后至少于截稿前半年向国内外公布征稿通知, 来稿仍统一从编辑部网上投稿系统提交, 审稿由专刊特约编辑组织;
4. 负责专刊出版时间进度控制、审稿专家的组织、专刊内容以及质量的把关;
 - (1) 制定出版时间进度计划, 包括审稿时间、审定时间、出版时间等;
 - (2) 组织审稿专家小组 (至少 6 人, 其中含国外专家 1~2 人), 审稿专家小组成员要精干、务实, 学风端正, 成员专业知识背景结构合理;
 - (3) 参照《生物工程学报》论文审稿程序, 严格把关论文质量;
 - (4) 专刊内容以及质量: 专刊应反映该研究方向的国内外现状及水平, 包括国内外关键性的研究工作, 鼓励邀请国外作者稿件。应以论文质量作为最高选取原则, 即公平原则, 不偏向任何单位或个人; 专刊组织合理、文章分布均衡; 专刊最终稿由编委会审定签发;
 - (5) 任何作者在同一期专刊中不能多于 2 篇论文, 第一作者论文不得超过 1 篇。

三、申请专刊流程

1. 下载填写专刊申请表, 向编辑部提交申请;
2. 报送主编及编委会讨论专刊申请;
3. 一个月内告知专刊申请结果, 并确定出版的卷、期数;
4. 负责专刊的特约编辑与编辑部签订出版专刊责任书。