

响应面法优化热带假丝酵母 104 菌株产羰基还原酶发酵培养基

王普, 孙立明, 何军邀

浙江工业大学药学院, 杭州 310032

摘要: 通过菌种优选得到产高选择性羰基还原酶的热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) 104 菌株, 可不对称还原 1-(3,5-二氟甲基)苯基乙酮生成(S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇, 对映体过量值>99.9%。采用部分因子实验设计考察发酵培养基中各组分对产酶的影响, 结果表明, 酵母粉、葡萄糖和 NH_4Cl 浓度对产酶影响显著。继而采用最陡爬坡路径逼近最大响应区域, 并结合中心组合实验和响应面对 3 个显著性因素进行分析, 得到优化的发酵培养基组成: 葡萄糖 47.14 g/L, 酵母粉 13.25 g/L, NH_4Cl 2.71 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, KH_2PO_4 1 g/L 和 K_2HPO_4 1 g/L。采用该优化培养基, 供试菌株的羰基还原酶活力达 851.13 U/L, 较优化前提高了 65.2%。

关键词: 热带假丝酵母, 羰基还原酶, (S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇, 响应面, 培养基优化

Medium optimization for enhanced production of carbonyl reductase by *Candida tropicalis* 104 by response surface methodology

Pu Wang, Liming Sun, and Junyao He

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China

Abstract: Using response surface method, we optimized the medium for the asymmetric whole cell biotransformation by *Candida tropicalis* 104. This strain was used for microbial reduction of 1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] ethanone to (S)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] alcohol, with enantiomeric excess(e.e.) reached more than 99.9%. Fractional factorial design was used to evaluate the effects of medium components on carbonyl reductase activity of *Candida tropicalis* 104. Yeast extract, glucose and NH_4Cl were the most important factors among six tested variables that influence the enzyme activity for the biotransformation process. Based on the experimental results, the path of steepest ascent was undertaken to approach the optimal region of these factors. Central composite design and response surface analysis were subsequently employed for further optimization. The optimal medium for *Candida tropicalis* 104 was composed of (in g/L): glucose 47.14, yeast extract 13.25, NH_4Cl 2.71, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 1. Under the optimum conditions, the maximum enzyme activity of 852.75 U/L in theory and 851.13 U/L in the experiment were obtained, with an increase of 65.2% compared to the original medium components.

Keywords: *Candida tropicalis*, carbonyl reductase, (S)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] alcohol, response surface methodology, medium optimization

Received: February 20, 2009; **Accepted:** April 7, 2009

Corresponding author: Pu Wang. Tel: +86-0571-88320389; E-mail: wangpu@zjut.edu.cn

浙江省高校优秀青年教师资助计划项目 (No. G0801116042610)资助。

手性醇是合成手性药物和农业化学品等的重要中间体,在医药、精细化学品等领域用途广泛,如光学活性的 2-氯-1-(2,4-二氟苯基)乙醇可用于合成光学活性氮唑类抗真菌药物^[1]。采用生物法制备手性醇已成为近年来的研究热点。(S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇为重要的药物中间体,可用于合成 NK-1 受体拮抗剂^[2,3],该药物可有效地治疗抑郁及其他精神疾病,在治疗一系列中枢和末梢神经系统抑制中具有很好的潜在疗效。

催化前手性酮不对称还原制备(S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇的方法主要有化学法和生物法。生物法具有高效专一、环境友好和成本低廉等特点,在不对称还原中的应用越来越受到重视。David 等^[3]采用来自红平红球菌 *Rhodococcus erythropolis* 的醇脱氢酶法合成(S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇,对映体过量值>99.9%,转化率>98%,在需要辅因子 NADH 的醇脱氢酶催化还原过程中需要加入甲酸脱氢酶(Formate dehydrogenase, FDH)以实现辅因子的原位再生。张芳等^[4]采用红酵母 *Saccharomyces rhodotorula* 在辛烷/缓冲液两相体系中催化 1-(3,5-二氟甲基)苯基乙酮生成(S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇,产率和对映体过量值分别为 81.7%和 88.5%。该菌种的产率较高,但其产生的羰基还原酶的对映体选择性不甚理想。本研究通过菌种筛选,获得了具有高选择性羰基还原酶活力的热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 104 菌株,利用该菌株不对称还原 1-(3,5-二氟甲基)苯基乙酮制备(S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇时,对映体过量值>99.9%。为提高该菌株生物合成(S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇的能力,有必要优化其发酵培养基组成,以提高产酶能力。

考察培养基组分对产酶的影响通常采用的优化手段多为单因素实验。因其未考虑各因素之间的交互作用,故无法提供未考察区域的信息,以及进行预测和控制。响应面法可同时对多因子水平及其交互作用进行优化与评价,并能快速有效地确定多因子系统的最优条件。近年来采用响应面法对生物反应过程进行优化已有一些报道,并取得了较好的优化结果^[5-8]。本研究利用部分因子实验设计(Fractional factorial design)对影响热带假丝酵母 104 菌株产羰基还原酶的诸因素进行考察和评价,对筛选得到的重要因素采用中心组合实验设计(Central

composite design)进行实验,通过实验数据拟合响应面模型,对模型进行数学处理,得到最优的发酵培养基组成。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 104、出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* ACCC 30142 和 ACCC 30156、膜醭毕赤酵母 *Pichia membranaefaciens* Hansen、红酵母 *Rhodotorula glutis* 2.102、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* B5、莫根假丝酵母 *Candida mogii* IFFI 01257 等,浙江工业大学生物制药研究所保藏菌株。

1.2 培养基及培养条件

斜面培养基(g/L):葡萄糖 10,酵母粉 3,蛋白胨 5,琼脂 20。30°C 培养 3~5 d。

种子及发酵培养基(g/L):葡萄糖 30,酵母粉 6, NH₄Cl 6, MgSO₄·7H₂O 0.4, KH₂PO₄ 1, K₂HPO₄ 1。取一满环斜面种子接种装有 75 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶,30°C、摇床转速 200 r/min 条件下培养 16 h,制得种子液。以 10%接种量接种装有 75 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶,30°C、200 r/min 条件下培养 20 h,制得含酶细胞。

1.3 酶活力测定方法

酶活力定义:30°C 下,每分钟还原 1-(3,5-二氟甲基)苯基乙酮生成 1 μg 1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

酶活力测定:取 100 mL 发酵液,离心分离菌体,用 pH 8.0 磷酸缓冲液洗涤 2 次,湿菌体重悬于 10 mL 磷酸缓冲液中,加入 50 mmol/L 的 1-(3,5-二氟甲基)苯基乙酮,30°C、200 r/min 反应 1 h,离心除菌体,上清液用 10 mL 乙酸乙酯萃取,加入内标物十二烷,采用气相色谱分析产物 1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇的生成量,并计算酶活力(U/L)。

1.4 气相色谱分析

转化反应结束后,反应液用乙酸乙酯萃取,采用岛津 GC-2014 气相色谱仪分析,HP Chiral 10% Cyclodextrin(30 m×0.25 mm×0.25 μm)手性色谱柱。底物和产物标准品以及热带假丝酵母 104 菌株还原产物的 GC 图谱见图 1 和 2。载气为氮气;进样器温度 220°C;色谱柱温度 60°C~160°C;检测器温度

250°C; 分流比 20%; 氦离子火焰检测器。

产物的光学纯度由对映体过量值(e.e.)表征, 计算式为:

$$e.e. = (C_S - C_R)/(C_S + C_R) \times 100\%$$

式中, C_S 为(S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇的浓度, C_R 为(R)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇的浓度。

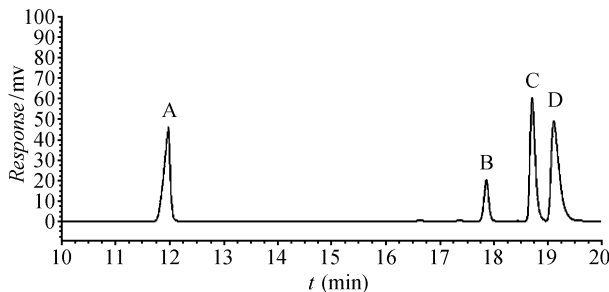


图 1 标准品的 GC 分析图谱

Fig. 1 Chromatogram of standard sample. A: 1-[3,5-bis(trifluoromethyl) phenyl] ethanone (11.982 min); B: dodecane (17.865 min); C: (S)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] alcohol (18.715 min); D: (R)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] alcohol (19.147 min).

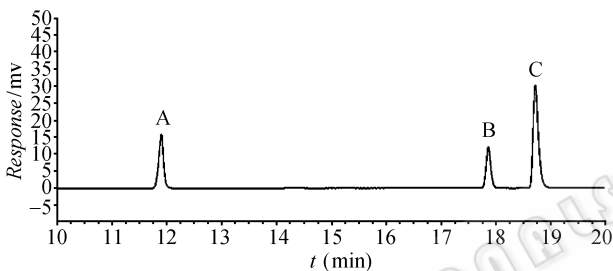


图 2 热带假丝酵母 104 菌株还原产物的 GC 图谱

Fig. 2 Chromatogram of substrate, product and internal standard with *Candida tropicalis* 104. A: 1-[3,5-bis(trifluoromethyl) phenyl] ethanone (11.982 min); B: dodecane (17.865 min); C: (S)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl) phenyl] alcohol (18.715 min).

1.5 实验设计

1.5.1 部分因子实验设计

热带假丝酵母 104 菌株产羰基还原酶的发酵培养基成分主要有: 葡萄糖, 酵母粉, NH_4Cl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 。采用 6 因素 2 水平的 1/8 部分因子实验设计, 实验次数为 8。拟合出线性方程:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_5X_5 + a_6X_6$$

式中: X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 分别为葡萄糖、酵母粉、 NH_4Cl 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 的质量浓度(g/L), Y 为酶活力(U/L), a_0 、 a_1 、 a_2 、 a_3 、 a_4 、 a_5 、 a_6 为方程系数。

1.5.2 最陡爬坡实验设计

找出主要因素后, 根据拟合的一阶模型的回归系数的符号和大小来设计显著因素的最陡上升路径

(其他因素的取值则根据各因素效应的正负和大小, 正效应的因素均取较高值, 负效应的因素均取较低值^[9]), 通过使主要因素同时朝响应值增大的方向变化, 找出峰值, 从而逼近最大响应区域。

1.5.3 中心组合实验设计

3 因素 3 水平的中心组合实验共需 15 次实验。拟合出一个二次多项式方程。该方程为描述响应变量与自变量的经验模型。对于 3 因子系统, 模型可表述为^[10-12]:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1X_1 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{22}X_2X_2 + b_{23}X_2X_3 + b_{33}X_3X_3$$

式中: X_1 、 X_2 、 X_3 为由部分因子实验确定对响应值影响显著的 3 种培养基组分的质量浓度(g/L), Y 为预测响应值, 即酶活力(U/L), b_0 、 b_1 、 b_2 、 b_3 、 b_{11} 、 b_{12} 、 b_{13} 、 b_{22} 、 b_{23} 、 b_{33} 为方程系数。用统计软件 SAS/Statistic (Version 8.1) 对实验进行回归分析, 其中回归系数的显著性用 t 检验, 用 F (Fischer) 检验评价数学模型方程的显著性, 方程的拟合性由确定系数 R^2 确定。

1.6 模型验证

对该多元函数进行简单的性状分析便可确定出其极值点以及取得极值的相应的自变量的取值。再按照计算所得到的参数进行实验, 以验证模型的可靠性, 并确定最后的优化结果。

2 结果与讨论

2.1 产高选择性羰基还原酶菌株的优选

对本实验室保藏的 5 株酵母菌和 2 株类酵母丝状真菌进行了生物催化 1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇生成(S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇的能力考察(表 1)。转化条件为: 20 mL pH 8.0 的磷酸钠缓冲液, 底物 1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇浓度为 50 mmol/L, 葡萄糖浓度 50 g/L, 菌体浓度 200 g/L, 30°C、200 r/min 条件下转化 30 h。结果表明, 该转化过程遵循普雷洛格规则(Pregel's rule), 生成产物以(S)-1-(3,5-二氟甲基)苯基乙醇为主。其中 *Candida tropicalis* 104 菌株产生的羰基还原酶具有较高的选择性, 产物对映体过量值大于 99.9%。将该菌株用于后续的优化试验。

2.2 重要因素的筛选

采用部分因子设计法, 对培养基中 6 个组分进行考察, 每个因子取高(+1)和低(-1)2 个水平(见表 2)。各因素所代表的参数水平和方差分析结果见表 3。

表 1 不同菌株催化 1-(3,5-二氟甲基)苯基乙酮不对称还原的反应结果

Table 1 Bioreduction of 1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] ethanone with different microbial cells

Strain	Substrate concentration (mmol/L)	Time (h)	Enzymatic activity (U/L)	e.e. (%)
<i>Pichia membranaefaciens</i> Hansen	50	30	546.51	97.2(S)
<i>Rhodotorula glutis</i> 2.102	50	30	411.82	80.3(S)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> B5	50	30	491.51	91.4(S)
<i>Candida mogii</i> IFFI 01257	50	30	597.30	96.5(S)
<i>Aureobasidium pullulans</i> ACCC 30142	50	30	649.51	50.6(S)
<i>Aureobasidium pullulans</i> ACCC 30156	50	30	614.73	51.3(S)
<i>Candida tropicalis</i> 104	50	30	515.21	>99.9(S)

结果表明,对供试菌株产酶有显著影响的因素为酵母粉、 NH_4Cl 和葡萄糖($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度较低影响不显著)。其中酵母粉和葡萄糖浓度对产酶呈现正效应, NH_4Cl 浓度则呈现出负效应。这3个显著因素对产酶的影响可用以下方程表示:

$$Y = 1202.11 + 96.98X_1 + 134.595X_2 - 107.515X_3$$

方程的决定系数 $R^2=0.9891$,表明该回归方程拟合良好。由显著因子效应可看出,要提高产酶量,应适当提高酵母粉和葡萄糖浓度,降低 NH_4Cl 浓度。其他因子对产酶影响不大。

表 2 两水平 1/8 部分因子实验设计与响应值($n=6$)Table 2 Two levels 1/8 fractional factorial design and responding value($n=6$)

Run	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	Y(U/L)
1	-1	-1	-1	1	1	1	578.54
2	1	-1	-1	-1	-1	1	593.43
3	-1	1	-1	-1	1	-1	650.73
4	1	1	-1	1	-1	-1	796.71
5	-1	-1	1	1	-1	-1	465.90
6	1	-1	1	-1	1	-1	497.22
7	-1	1	1	-1	-1	1	515.14
8	1	1	1	1	1	1	710.93

表 3 各种因素的影响

Table 3 Effects of different factors

Variables		Level		Test of significance	
Code	Factors(%)	Low(-1)	High(+1)	t	$Pr > t $
X_1	Glucose	2.00	4.00	11.6144	0.0547
X_2	Yeast extract	0.50	1.00	16.1191	0.0394
X_3	NH_4Cl	0.40	0.80	-12.8760	0.0493
X_4	MgSO_4	0.03	0.06	8.8497	0.0716
X_5	K_2HPO_4	0.07	0.14	1.9838	0.2972
X_6	KH_2PO_4	0.07	0.14	-0.3808	0.7683

2.3 最陡爬坡实验研究最大响应值的响应区域

响应面拟合方程只有在考察的临近区域里才能充分近似真实情况,故应先逼近最大产酶区域后再建立有效的拟合方程。根据 Fractional factorial design 法筛选出的显著因子效应大小设计它们的步长,进行最陡爬坡试验设计,寻找最大产酶区。试验设计及结果如表 4 所示。最大产酶区在第 4 次试验附近,故以试验 4 的条件为响应面实验因素水平的中心点。响应面实验因素水平见表 5。

表 4 最陡爬坡试验设计及结果

Table 4 Experimental design and results of steepest ascent

Run	X_1	X_2	X_3	Y(U/L)
1	4.00	1.00	0.40	773.12
2	4.20	1.10	0.35	784.40
3	4.40	1.20	0.30	797.25
4	4.60	1.30	0.25	806.95
5	4.80	1.40	0.20	789.74
6	5.00	1.50	0.15	765.18

表 5 响应面分析试验因素水平表

Table 5 Factors and level value of response surface analysis

Variables		Level		
Code	Factors (%)	Low(-1)	Center(0)	High(+1)
X_1	Glucose	4.40	4.60	4.80
X_2	Yeast extract	1.20	1.30	1.40
X_3	NH_4Cl	0.20	0.25	0.30

2.4 中心组合实验优化培养基浓度

采用 Box-Behnken 响应面试验设计确定显著因子的最优水平,试验设计见表 6。由 SAS8.0 软件拟合得到多元回归模型:

$$Y = 833.4367 + 41.375X_1 + 18.775X_2 + 25.155X_3 - 32.90208X_1X_1 - 0.3275X_1X_2 - 9.2075X_1X_3 -$$

$$26.48208X_2X_2 - 13.2525X_2X_3 - 20.11208X_3X_3$$

回归模型方差分析见表 7, 系数估计见表 8。

结果表明, 决定系数 $R^2=0.9592$, 说明回归方程的拟合较好。模型的 $F=0.0007$, 该值远远小于 0.05, 表明回归方程的 F 检验显著, 所拟合的二次回归方程合适。由响应面回归分析和回归方程拟合绘制响应面图形(图 3~5)。

表 6 Box-Behnken 响应面设计及试验结果
Table 6 Response surface Box-Behnken design and corresponding response

Run	X_1	X_2	X_3	Y(U/L)
1	-1	-1	0	728.13
2	-1	1	0	751.47
3	1	-1	0	797.29
4	1	1	0	819.32
5	0	-1	-1	715.20
6	0	-1	1	806.07
7	0	1	-1	794.12
8	0	1	1	831.98
9	-1	0	-1	704.59
10	1	0	-1	820.00
11	-1	0	1	759.26
12	1	0	1	837.84
13	0	0	0	831.30
14	0	0	0	836.98
15	0	0	0	832.03

表 7 回归模型的方差分析
Table 7 ANOVA of quadratic polynomial model

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	9	29687.51	3298.612	13.06938	0.005641
Error	5	1261.962	252.3924		
Total	14	30949.47			

表 8 回归方程系数显著性检验表
Table 8 Significance test of regression coefficient

Term	Estimate	t	Pr > t
X_1	41.375	7.366224	0.000724
X_2	18.775	3.342619	0.020494
X_3	25.155	4.478486	0.006528
X_1X_1	-32.9021	-3.97955	0.010535
X_1X_2	-0.3275	-0.04123	0.968709
X_1X_3	-9.2075	-1.15913	0.298746
X_2X_2	-26.4821	-3.20304	0.023914
X_2X_3	-13.2525	-1.66836	0.156117
X_3X_3	-20.1121	-2.43258	0.059192

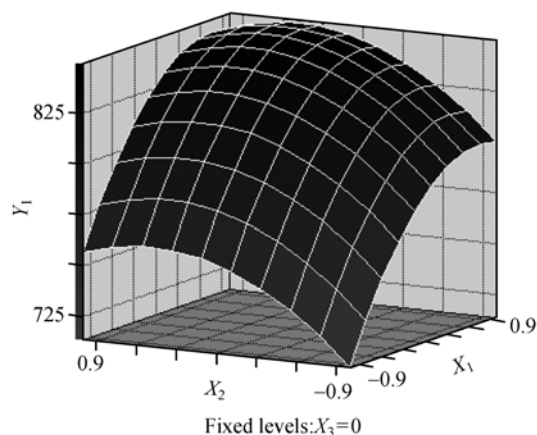


图 3 酵母粉和葡萄糖浓度对酶活力影响的响应面图
Fig. 3 Surface layer of the mutual-affecting of yeast extract and glucose concentration on enzyme activity.

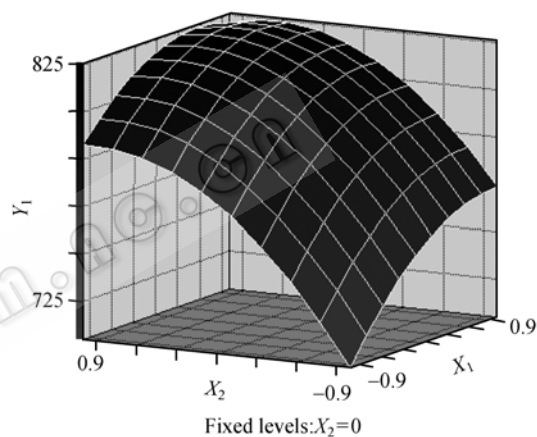


图 4 葡萄糖和 NH4Cl 浓度对酶活力影响的响应面图
Fig. 4 Surface layer of the mutual-affecting of glucose and ammonium chloride concentration on enzyme activity.

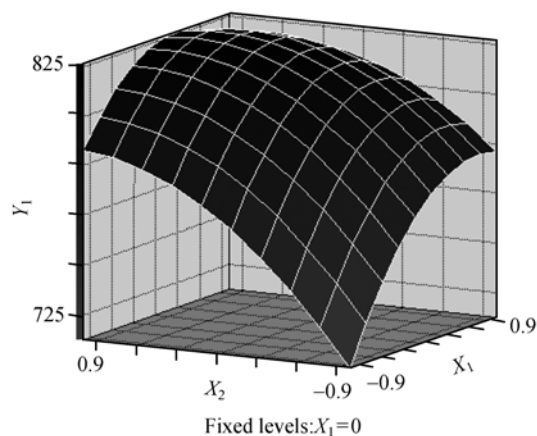


图 5 NH4Cl 和酵母粉浓度对酶活力影响的响应面图
Fig. 5 Surface layer of the mutual-affecting of ammonium chloride and yeast extract concentration on enzyme activity.

由图 3~5 的响应面图可看出, X_1 、 X_2 、 X_3 存在极值点, 对 Y 进行岭分析, Y 的最大估计值为 852.75 U/L, 此时 3 个因子最优试验点(X_1 、 X_2 、 X_3)的代码值(0.57、0.25、0.41)。即葡萄糖浓度为 47.14 g/L, 酵母粉和 NH_4Cl 浓度分别为 13.25 g/L 和 2.71 g/L 时, 该模型预测的最高酶活力为 852.75 U/L。

2.5 验证实验

为检验模型预测的准确性, 在优化条件下进行 5 组 250 mL 摇瓶发酵实验, 所得酶活分别为 848.65 U/L、854.26 U/L、850.40 U/L、852.63 U/L、849.70 U/L, 平均酶活力为 851.13 U/L, 与模型预测值非常接近, 表明该模型能很好地预测实际的发酵情况。

3 结论

采用响应面优化法可快速筛选影响热带假丝酵母 104 菌株产羧基还原酶的培养基组成中的显著因素, 并通过建立多项数学模型, 采用统计分析对模型进行显著性检验来优化发酵培养基。优化得到的最佳培养基组成为(g/L): 葡萄糖 47.14, 酵母粉 13.25, NH_4Cl 2.71, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, KH_2PO_4 1 和 K_2HPO_4 1。在优化的条件下, 热带假丝酵母 104 菌株的羧基还原酶活力达 851.13 U/L, 较优化前提高了 65.2%, 表明采用响应面法优化发酵培养基组成是提高菌株产酶的有效途径之一。该菌株产生的羧基还原酶具有较高的选择性, 产物对映体过量值 >99.9%, 是一株很有应用开发潜力的微生物转化菌种。

REFERENCES

- [1] Wang MH, Yang G, Yang LR. Preparation of chiral 2-Chloro-1-(2,4-difluorophenyl)ethanol by lipase-catalyzed resolution and synthesis of optically active antifungal drug. *Chin J Org Chem*, 2008, **28**(8): 1398-1403.
王明慧, 杨光, 杨立荣. 酶催化拆分制备手性 2-氯-1-(2,4-二氟苯基)乙醇及光学活性抗真菌药物的合成. *有机化学*, 2008, **28**(8): 1398-1403.
- [2] Mirjana Gelo-Pujic, Frédéric Le Guyader, Thierry Schlama. Microbial and homogenous asymmetric catalysis in the reduction of 1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] ethanone. *Tetrahedron: Asymm*, 2006, **17**: 2000-2005.
- [3] David P, Matthew T, Jennifer P, et al. Efficient synthesis of (S)-3,5-bistrifluoromethylphenyl ethanol by asymmetric enzymatic reduction. *Tetrahedron: Asymm*, 2006, **17**: 554-559.
- [4] Zhang F, Wang JS, Liu CM, et al. Asymmetric synthesis of (S)-3,5-bis(trifluoromethyl)acetophenol by yeast in organic solvent system. *Pharm Biotechnol*, 2007, **16**(1): 411-414.
张芳, 王江曙, 刘春美, 等. 红酵母静息细胞催化 (S)-3,5-双三氟甲基苯乙醇的不对称还原反应. *药物生物技术*, 2007, **16**(1): 411-414.
- [5] Lv GY, Wang P, He JY, et al. Medium optimization for enzymatic production of L-cysteine by *Pseudomonas* sp. Zjwp-14 using response surface methodology. *Food Technol Biotech*, 2008, **46** (4): 395-401.
- [6] Yu XJ, Guo N, Chi ZM, et al. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *Biochem Eng J*, 2009, **43**: 266-271.
- [7] Wu RQ, Du SK, Li ZX, et al. Optimization of bacterial cellulose fermentation medium and observation of bacterial cellulose ultra-micro-structure. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(6): 1068-1074.
毋锐琴, 杜双奎, 李志西, 等. 细菌纤维素发酵培养基的优化及超微观结构分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(6): 1068-1074.
- [8] Guo YX, Pan DD, Masaru T. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chem*, 2009, **114**: 328-333.
- [9] Luo JM, Jin ZH, Cen PL. Optimizing the fermentation conditions for production natamycin by *Streptomyces gilvosporeus*. *J Chem Eng Chin Univ*, 2006, **20**(1): 68-73.
骆健美, 金志华, 岑沛霖. 褐黄孢链霉菌纳他霉素发酵条件优化. *高校化学工程学报*, 2006, **20**(1): 68-73.
- [10] Ye D, Xu ZN, Cen PL. Medium optimization for enhanced production of cytosine-substituted mildiomycin analogue (MIL-C) by *Streptoverticillium rimofaciens* ZJU 5119. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, **9**(1): 77-84.
- [11] Nemukula A, Mutanda T, Wilhelmi BS, et al. Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Bioresource Technol*, 2009, **100**: 2040-2045.
- [12] Guo WQ, Ren NQ, Wang XJ, et al. Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology. *Bioresource Technol*, 2009, **100**: 1192-1196.