

氧载体对绿色产色链霉菌发酵生产阿维拉霉素的影响

Effects of oxygen vectors on microbial production of avilamycin

章梅^{1,2} 宋元达^{1,2} 刘青^{1,2} 王友玲^{1,2} 吴翰^{1,2}

ZHANG Mei^{1,2} SONG Yuan-da^{1,2} LIU Qing^{1,2} WANG You-ling^{1,2} WU Han^{1,2}

(1. 山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东 淄博 255000;

2. 山东省高校农产品功能化技术重点实验室, 山东 淄博 255000)

(1. School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255000, China; 2. Key Laboratory of Technologies for Functional Agricultural Products in Universities of Shandong, Zibo, Shandong 255000, China)

摘要:为了提高阿维拉霉素发酵液中氧传递效率,改善发酵液中溶氧水平,增加阿维拉霉素的产量,研究各种氧载体对发酵过程中阿维拉霉素的合成和绿色产色链霉菌的影响。试验结果显示,吐温 80 作为氧载体的效果最好,能有效地提高生物量和单位菌体的阿维拉霉素的产率。在发酵开始的 8 h,添加 3 g/L 吐温 80,生物量达到了 11.82 g/L,阿维拉霉素效价达到了 340 mg/L,与对照组比较,分别提高了 20.63% 和 21.42%,研究表明氧载体吐温 80 能通过提高生物量和得率系数来提高阿维拉霉素的产量。

关键词:绿色产色链霉菌;阿维拉霉素;氧载体;发酵

Abstract: In order to improve oxygen delivery efficiency and dissolved oxygen levels for the production of avilamycin in the fermentation broth, the effects were studied, including the various oxygen carriers on the synthesis of avilamycin and the growth of *Streptomyces viridochromogenes*. The results showed that Tween-80 was the most effective vector to promote growth and the ability of *Streptomyces viridochromogene* to produce avilamycin. With the addition of 3 g/L tween at 8 h fermentation, the biomass reached 11.82 g/L and the avilamycin titer increased to 340 mg/L, which was 20.63% and 21.42% higher than the control group. Result show that the oxygen carrier of Tween-80 can increase the production of avilamycin by increasing the biomass and yield coefficient.

Keywords: *Streptomyces viridochromogene*; avilamycin; oxygen-vector; fermentation

阿维拉霉素又名肥拉霉素,是一种正糖霉素族的寡糖类抗生素,具有调节动物肠内细菌代谢^[1-2]和促进动物生长的

作用^[3]。阿维拉霉素对革兰氏阳性菌具有较好的抑制效果,对大肠杆菌有着间接的影响,能有效地减小动物的感染率^[4],还可以促进动物生长、提高饲料回报率同时具有低残留和低毒性、无交叉耐药性等优点,已经作为一种饲料添加剂用于猪和肉鸡的养殖^[5-6]。

阿维拉霉素的生产是好氧发酵过程,发酵液中溶氧水平的高低与细胞内酶的活性有着直接的关系,决定了何种代谢途径生成 ATP、还原力及各种代谢物^[7];对细胞的生长和细胞内阿维拉霉素的合成有重大影响。为了满足发酵过程中氧的要求,常用搅拌转速和增大通气量等方法来提高发酵液中溶氧水平,但过大的剪切力会引起菌丝损伤,造成菌丝断裂、泡沫增多和变大以及发酵不易控制等^[8]。也有学者利用转基因技术将透明颤菌血红蛋白的基因克隆到目的菌株,降低菌株对氧的敏感度,使菌株适应发酵液中较低的溶氧水平,提高对氧的利用^[9];向发酵液中加入过氧化氢等^[10]分子氧底物。以上 2 种方法存在基因的表达不稳定或丢失^[11]和本身有着较大毒性等^[12]问题。通过添加氧载体来改善发酵液的溶氧水平,也能提高发酵产量^[13]。

氧载体是一种对细胞没有毒性,具有比水更高的溶氧能力的有机化合物^[14]。在发酵液中添加正己烷、煤油和表面活性剂等氧载体,引入新的液相,减小气液之间的传氧阻力,提高 K_{La} (传氧系数)值,在同一发酵系统中能提高 30%~300%,或达到同样混合效果时降低搅拌功率 30% 以上^[15]。目前国内外尚未发现有氧载体用于发酵生产阿维拉霉素的研究。本试验拟研究各种氧载体对绿色产色链霉菌产阿维拉霉素的影响,进一步观察其发酵参数,对氧载体的效果进行评价和筛选,并考察添加时间和浓度对生物量及阿维拉霉素合成的影响,以期氧载体在阿维拉霉素工业化生产的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

绿色产色链霉菌(*S. viridochromogene* LY013):浙江凌

基金项目:国家自然科学基金(编号:31670064);江苏凌云药业“链霉菌基因工程改造横向合作项目”(编号:2016-科技-90)

作者简介:章梅,男,山东理工大学在读硕士研究生。

通信作者:宋元达(1964—),男,山东理工大学教授,博士。

E-mail: ysong@sdut.edu.cn

收稿日期:2017-10-06

云药业有限公司。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 主要试剂

Avilamycin 标准品:80%,美国历来公司;

吐温 20、吐温 80:分析纯,上海沪试剂厂;

正己烷:分析纯,上海沃凯生物技术有限公司。

1.2.2 主要仪器

超净工作台:ZHJH-C1115C 型,上海智城分析仪器制造有限公司;

隔水式恒温培养箱:GRP-9160 型,上海森信仪器有限公司;

液相色谱仪:waters600e 型,沃特世科技(上海)有限公司。

1.3 培养基与培养方法

1.3.1 培养基

斜面培养基:可溶性淀粉 20.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、 KNO_3 1.0 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、NaCl 0.5 g/L、琼脂 20.0 g/L,pH 7.2~7.4;

种子培养基:豆饼粉 32 g/L、甘露醇 22 g/L、蛋白胨 5 g/L、葡萄糖 10 g/L、NaCl 5 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.4 g/L、 MgSO_4 0.05 g/L,pH 7.2~7.4;

发酵培养基:甘露醇 25 g/L、豆饼粉 34 g/L、可溶性淀粉 6.4 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/L、葡萄糖 2 g/L、 MgSO_4 0.05 g/L、 CaCO_3 5 g/L,pH 7.2~7.4。

1.3.2 培养方法

液体种子培养:挑选斜面培养基中长势较好的绿色产色链霉菌的孢子,接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶内。在 28 °C 的摇床里以 200 r/min 振荡培养 24 h;

液体发酵培养:以 6% 的接种量,将已培养种子培养液接入到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,在 28 °C 条件下 200 r/min 振荡培养 72 h。

1.4 分析方法

1.4.1 样品处理 取 5.0 mL 发酵液于离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 9.0 mL 无水甲醇,用振荡器充分振荡后,浸提 30 min,用滤膜过滤,经无水甲醇稀释的上清液即为待测液。

1.4.2 菌体生物量的测定 在发酵 48 h 后,吸取发酵液 10 mL,4 000 r/min 离心 10 min,倒出上清液,沉淀物烘干至恒重的质量即为菌体生物量。

1.4.3 还原糖的测定 采用 DNS 法^[16]。

1.4.4 阿维拉霉素的测定 取 1 mL 的发酵液移至装有 3 mL 甲醇的 5 mL 的离心管中,旋涡震荡 3 min,超声 10 min 后经 0.22 μm 过滤膜过滤,摇匀,备用。

采用高效液相色谱分析(HPLC)法。色谱条件:流动相为乙腈:0.2% 磷酸二氢铵=51:49(体积比);流速 1 mL/min;色谱柱 Agilent C₁₈,4.6 mm×250 mm;检测波长 214 nm,柱温 35 °C,进样量 20.0 μL 。

1.4.5 得率系数的计算 按式(1)计算得率系数。

$$R = \frac{M}{DCW}, \quad (1)$$

式中:

R——得率系数,mg/g;

M——阿维拉霉素,mg/L;

DCW——生物量,g/L。

2 结果与分析

2.1 氧载体对阿维拉霉素的影响

选择 7 种常用氧载体以 2 g/L 的添加量进行绿色产色链霉菌发酵试验,结果见图 1。由图 1 可知,添加氧载体均可以提高阿维拉霉素的产量。其中吐温 20、吐温 80、正己烷的效果明显;其余的氧载体也有一定的促进作用,但与前三组比较,效果不显著。与对照组相比,正己烷提高了 21 mg/L,吐温 20 提高了 26 mg/L,吐温 80 的促进效果最好,增加了 40 mg/L。显然吐温对阿维拉霉素的合成具有较好的促进作用,从促进效果和经济性角度综合考虑,选择正己烷、吐温 20 和吐温 80 作为研究对象,进一步研究其对阿维拉霉素产量的促进作用。

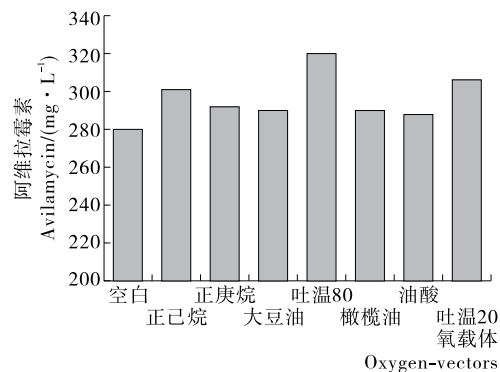


图 1 氧载体对阿维拉霉素产量的影响

Figure 1 Effect of different oxygen-vectors on the yield of avilamycin

2.2 氧载体添加量对发酵的影响

2.2.1 吐温 20、吐温 80 和正己烷添加量对阿维拉霉素产量的影响 由图 2 可知,添加量低于 3 g/L 时,随着氧载体添加量的增加,阿维拉霉素产量也随着增加。添加量为 3 g/L 时,阿维拉霉素产量均达到最高。吐温 80 的提升效果要优于吐温 20 与正己烷的。当添加量超过 3 g/L 时,阿维拉霉素产量均有所减小,说明过高浓度的氧载体对菌生产阿维拉霉素不利,可能是氧的浓度对抗生素的产量影响降低。其中添加量为 3~4 g/L 时正己烷组产量下降较快,可能是高浓度的正己烷影响了阿维拉霉素相关酶系导致产量下降^[17]。高浓度的氧载体能提高 K_{la} 系数^[18],提高发酵液的溶氧水平,促进阿维拉霉素产量的提高,但是过高浓度氧载体却不利于绿色产色链霉菌的发酵,使得发酵液中阿维拉霉素含量降低。

2.2.2 吐温 20、吐温 80 和正己烷添加量对生物量的影响

图 3 显示,在添加量为 3 g/L 时菌体量达到最大值,添加正己烷、吐温 80 和吐温 20 的发酵液生物量与对照组生物量(9.80 g/L)相比,分别提高了 15.58%,20.63%,16.58%。与正己烷组相比,吐温 80 对生物量促进的效果更为明显。

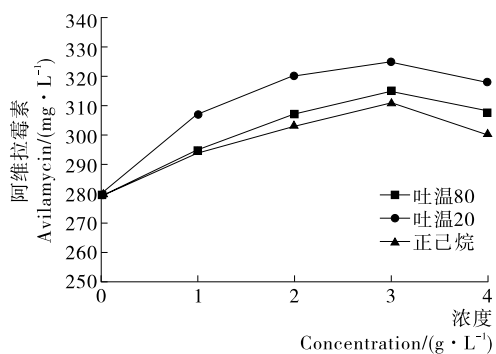


图 2 正己烷、吐温 20 和吐温 80 添加量对阿维拉霉素产量的影响

Figure 2 Effect of different *n*-hexane, Tween-20 and Tween-80 concentration on the yield of avilamycin

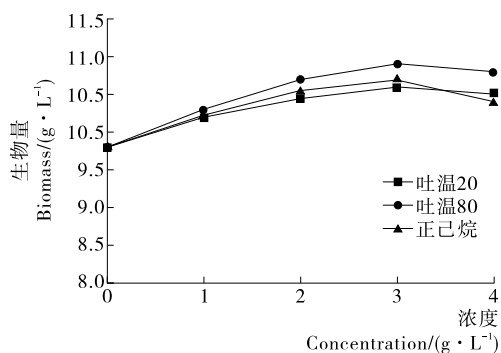


图 3 正己烷、吐温 20 和吐温 80 添加量对生物量的影响

Figure 3 Effect of different *n*-hexane, Tween-20 and Tween-80 concentration on dry weight of cells

这可能是吐温 80 本身就可以作为营养源,供给微生物生长,而且吐温可以增大细胞的通透性,使细胞的新陈代谢较为容易^[19],从而促进了细胞的生长,提高了生物量。同时发现添加量超过 3 g/L 时,正己烷、吐温 20 和吐温 80 组的生物量都有所降低。其中正己烷组的生物量下降速度较快,可能是由于高浓度烷烃类氧载体对菌体的伤害较强,使得菌丝体在发酵后期快速降解^[20],与冯杰等^[21]研究结果相符。说明氧载体的浓度过高不利于菌体量的增长,同时会干扰微生物的发酵,抑制菌体合成次生代谢产物的能力,造成单位菌体产阿维拉霉素能力下降。

2.2.3 吐温 20、吐温 80 和正己烷添加量对得率系数的影响

由图 4 可知,添加不同氧载体的发酵液中得率系数的趋势大致相同,添加 0~2 g/L 时随着氧载体浓度的提高,正己烷、吐温 20 和吐温 80 组的菌体得率系数逐渐增大,说明低浓度氧载体均有利于单位细胞产阿维拉霉素的能力提高。比较图 2~4 的数据可知,添加量为 2~3 g/L 时,添加氧载体能促进阿维拉霉素的产量和生物量的提高,与颜日明等^[22]的研究结果相同,但阿维拉霉素的得率系数基本维持不变甚至有所降低,说明产量的增加与生物量的提高有很大关系,不仅仅是单位细胞产率增大的结果。添加量超过 3 g/L 时,3 种氧载体的得率系数、生物量和产量都没有提高,甚至有所降低。这可能是菌体在生长阶段和代谢阶段受

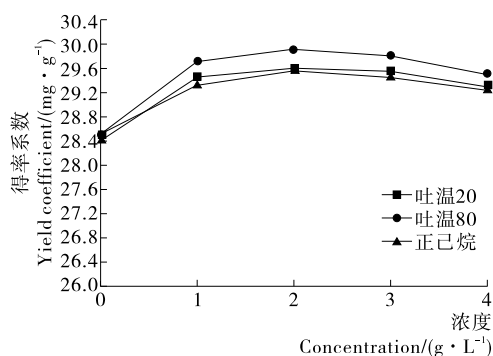


图 4 正己烷、吐温 20 和吐温 80 添加量对得率系数的影响

Figure 4 Effect of *n*-hexane, Tween-20 and Tween-80 concentration on dry weight of cells and the yield of avilamycin

到的限制主要因素不仅仅是氧浓度,还受到发酵本身的碳源和氮源限制。

2.3 吐温 20、吐温 80 和正己烷添加时间对阿维拉霉素产量的影响

在上述试验的基础上,以 3 g/L 的添加量进一步研究氧载体在发酵过程中的添加时间对阿维拉霉素产量的影响,结果见图 5。由图 5 可知,发酵后 24 h 内添加氧载体比发酵开始时添加能显著提高阿维拉霉素产量;前 8 h,随着添加时间的推迟,阿维拉霉素的产量整体呈上升趋势,提示氧载体最适的添加时间为链霉菌的对数生长期,可能是菌体在对数生长期对氧的要求较高,添加氧载体解除溶氧极限,有利于菌体的生长;而在发酵后期(24 h 后)添加氧载体,随着添加时间推迟,阿维拉霉素的产量低于发酵初始添加,这是因为进入生长稳定期,氧载体的添加对菌体量的促进效果减低。另外吐温组的产量超过了正己烷组,可能是氧载体吐温 80 对生物量有明显提升效果,与王爽等^[19]的研究结果一致。但是抗生素是次级代谢产物,其产量的高低受多种因素影响,菌体量只是其中的一个方面;液态烷烃在发酵液中可以起到分散剂的作用,使细胞间的絮凝性降低,较大的菌丝团在剪切力的作用下会分散成数个小菌丝团。与大菌丝团相

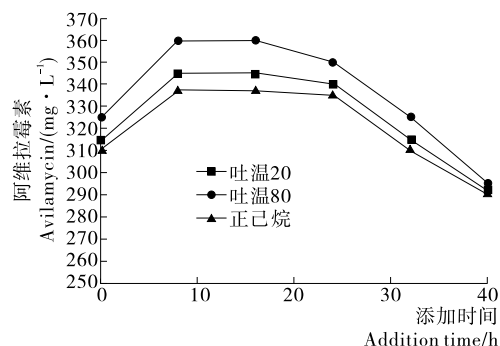


图 5 正己烷、吐温 20 和吐温 80 添加时间对阿维拉霉素产量的影响

Figure 5 Effect of *n*-hexane, Tween-20 and Tween-80 concentration addition time on and avilamycin production

比,分散的较小菌丝团界面面积会有所增加,从而加快了氧传递到菌丝体内的总速度。但是烷烃较高的毒性会抑制菌体产抗生素的能力,降低阿维拉霉素的产量。

2.4 吐温 80 对阿维拉霉素发酵过程的影响

以吐温 80 为氧载体,添加时间为 8 h、添加量为 3 g/L 进行发酵试验,其发酵过程中绿色产色链霉菌的生物量、产量、培养基 pH 值、残糖含量的变化趋势见图 6。由图 6 可知,添加氧载体能加快菌体的生长,提高生物量,并提高了单位菌体产阿维拉霉素的能力,两者共同作用促使阿维拉霉素产量显著提高。在 0~16 h 菌体的对数生长期,发酵液中阿维拉霉素的含量较低,pH 值和还原糖的含量都急剧下降;在 16 h 后,生物量逐渐保持稳定,菌体进入稳定期,并保持不变,而阿维拉霉素的含量呈指数上升,并在 40 h 达到最大值,这种发酵类型属于非生长偶联型发酵;同时发酵液中 pH 值由发酵早期的逐渐减小转变为逐渐增大,还原糖的消耗速率也有着明显的降低,可能与菌体在发酵过程中产生的有机酸有关^[20]。葡萄糖经 EMP 途径等生成的有机酸被部分排出细胞外,使得发酵液的有机酸含量增高,pH 值下降,但在阿维拉霉素生产期,由于发酵液中碳源量的降低,有机酸被菌体重新利用^[23-25],pH 值逐渐上升;同时菌体进入次生代谢期,生物量不再增加,还原糖的消耗速率也逐渐减小,阿维拉霉素含量也急剧上升^[26]。因此在 8 h 发酵的对数生长期添加吐温 80 解除溶氧限制,能提高生物量和阿维拉霉素的产量^[27-28]。

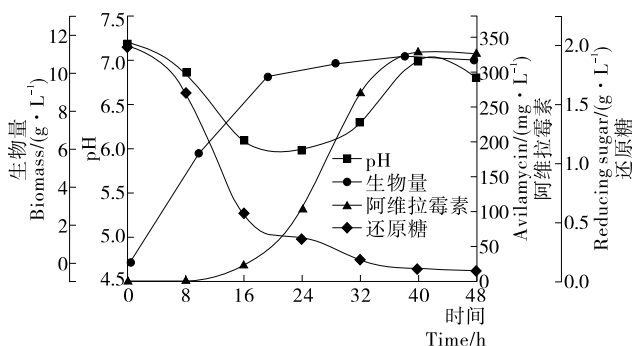


图 6 发酵过程中 pH、还原糖、生物量、阿维拉霉素的曲线图

Figure 6 The curve of pH, deoxidize sugar, Biomass, avilamycin during fermentation

3 结论

本研究将 7 种氧载体添加到绿色产色链霉菌的发酵过程中,结果显示添加的氧载体均可以提高其阿维拉霉素的产量,其中吐温 20、正己烷和吐温 80 效果最好。在此基础上考察这 3 种氧载体对绿色产色链霉菌合成阿维拉霉素的影响,发现 3 种氧载体均可以提高生物量,同时能提高绿色产色链霉菌的得率系数,从而提高绿色产色链霉菌产阿维拉霉素的能力,其中吐温 80 作为氧载体的效果最好。另外,还研究了氧载体添加时间对阿维拉霉素产量的影响,在发酵开始的第 8 天添加 3 g/L 的吐温 80 与对照组相比,生物量提高了

20.63%,得率系数增加到 3.12%。

本试验证明了氧载体能强化氧传递速率,提高菌体的生物量和得率系数,促进代谢产物的合成。下一步将研究各种氧载体的协同作用对阿维拉霉素产量提高的影响以及对菌体糖代谢的关键酶活性的影响,进一步发掘氧载体的促进机制。

参考文献

- [1] SCHABERG D R, CULVER D H, GAYNES R P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection[J]. American Journal of Medicine, 1991, 91(3B): 72S.
- [2] SWARTZ M N. Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(7): 2 420-2 427.
- [3] HERNANDEZ F, MADRID J, GARCIA V, et al. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size[J]. Poult Sci, 2004, 83(2): 169-174.
- [4] PARADIS M A, MCMILLAN E, BAGG R, et al. Efficacy of avilamycin for the prevention of necrotic enteritis caused by a pathogenic strain of Clostridium perfringens in broiler chickens [J]. Avian Pathology, 2016, 45(3): 365-369.
- [5] AARESTRUP F M, BAGER F, ANDERSEN J S. Association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among Enterococcus faecium from broilers: epidemiological study and changes over time[J]. Microbial Drug Resistance, 2000, 6(1): 71-75.
- [6] 王东卫, 王瑛. 饲用抗生素在雏鸡生产中应用效果的比较[J]. 饲料工业, 2011, 32(24): 62-64.
- [7] 张克旭, 陈宁, 张蓓. 代谢控制发酵[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 25-50.
- [8] YE Rui-fang, WANG Qian, ZHOU Xiao-fang. Lincomycin, rational selection of high producing strain and improved fermentation by amino acids supplementation[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2009, 32(4): 521-529.
- [9] 吴益民, 王洪军, 孙艳, 等. 透明颤菌血红蛋白基因在红色糖多孢菌株中表达及对红霉素产量的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(10): 599-601.
- [10] 翁雪清, 施巧琴, 吴松刚. 氧载体、表面活性剂及 H₂O₂ 对 L-phen 发酵影响的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(2): 39-42.
- [11] 文莹, 宋渊, 李季伦. 透明颤菌血红蛋白在肉桂地链霉菌中的表达对其细胞生长及抗生素合成的影响[J]. 生物工程学报, 2001, 17(1): 24-28.
- [12] 李书良, 焦鹏, 曹竹安. 流加 H₂O₂ 对提高供氧及微生物代谢的影响[J]. 微生物学报, 2002, 42(1): 129-132.
- [13] 崔培梧, 胡亚强, 钟瑜萍, 等. 氧载体对茯苓菌液态深层发酵的影响[J]. 中药材, 2015, 38(6): 1 157-1 160.
- [14] NARTA U, ROY S, KANWAR S S, et al. Improved production of L-asparaginase by Bacillus brevis cultivated in the presence of oxygen-vectors[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 2 083-2 085.

(下转第 128 页)

表 1 苹果果实准确率
Table 1 Accuracy of apple fruit

项目	单位	苹果果实类别			总计
		A ₁	A ₂	A ₃	
苹果数	个	60	120	221	401
准确检测数	个	58	115	208	381
漏检数	个	2	5	13	20
准确率	%	96.6	95.8	94.1	95.0

在被检测苹果图像中,无相邻、遮挡及重叠的苹果属于 A₁。由于没有遮挡和重叠的现象,A₁ 果实的新型特征提取算法下的检测最准确,因而识别准确率最高。

在被检测苹果图像中,相邻、不重叠的苹果属于 A₂。A₂ 果实可以在通过去除小面积噪声后,使用新型特征提取算法获取苹果的圆形特征,识别率亦较高。

在被检测苹果图像中,相邻、重叠的苹果属于 A₃。由于 A₃ 果实受外界条件的影响,苹果果实表面将有大面积噪声产生,在小面积遮挡情况下,新型特征提取算法具有较高的准确率,若被检测苹果图像中有大面积遮挡的现象,则会影响苹果果实识别的准确率,此种情况下苹果的识别准确率较低,但也能达到 94.1%。

Hough 算法仅仅在边缘平滑的情况下,对近似圆形果实的识别率较高,若被检测图像的边缘出现残缺,则就难以检测出相应的圆形,见图 12(c)。另外,Hough 算法具有较大的计算量,过多的资源占用率,若被检测图像的背景复杂,其检测圆形的能力相当差,见图 11(c)。

由图 10~12 可知,A₁、A₂、A₃ 3 类不同状态的苹果果实,在新型苹果果实特征提取算法下都能有较高的果实识别率,而利用 Hough 算法仅仅对 A₁ 果实有较高的准确率,A₂、A₃ 果实的识别率较低,因此,本试验提出的新型苹果果

实提取算法的鲁棒性更强,即使在 A₃ 情况下也能有较好的果实识别率。

4 结论

针对传统 Hough 算法在苹果相邻及重叠检测中准确度低、实时性不强的缺陷,提出了一种新型的果实提取算法,该算法利用一个滑动的高斯模板和苹果图像进行卷积运算提取圆形,使用被检测苹果图像所在的连通区域的最小包络矩阵,获取果实的半径。通过试验发现,该圆形检测算法比传统圆形检测算法的效果更好,且果实的检测准确率可达 96.6%,能够满足果实分级的要求。然而,该算法对于复杂场景的苹果检测还存在实时性提高的空间,需要加以改进。

参考文献

[1] 王丹丹, 宋怀波, 何东健. 苹果分级机器人视觉系统研究进展[J]. 农业工程学报, 2017, 33(10): 59-69.

[2] PAULUS I, DE BUSSCHER P, SCHREVEN E. Use of image analysis to investigate human quality classification of apples[J]. J. Agric. Engng Res., 1997, 68(4): 341-353.

[3] LEEMANS V, MAGEIN H, DESTAIN M F. Defects segmentation on ‘Golden Delicious’ apple by using colour machine vision[J]. Computer Electron Agric., 1998, 20(2): 117-130.

[4] 冯斌, 汪懋华. 基于计算机视觉的水果大小检测方法[J]. 农业机械学报, 2003, 34(1): 73-75.

[5] 付鹏. 基于机器视觉的苹果检测与识别关键技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012: 24-35.

[6] 徐凯. 基于图像识别的苹果果实检测技术[J]. 实验室研究与探索, 2016, 35(10): 36-39.

[7] 张健, 张莉华. 基于改进二进制粒子群算法的苹果多特征提取分级研究[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(9): 1 609-1 615.

[8] 谈英. 苹果采摘机器人在线分级系统设计[D]. 南京: 南京农业大学, 2014: 7-28.

(上接第 45 页)

[15] WANG Jiang-long. Enhancement of citric acid production by Aspergillus niger using n-dodecane as an oxygen-vector[J]. Process Biochemistry, 2000, 35(10): 1 079-1 083.

[16] 赵凯, 许鹏举, 谷广辉. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.

[17] XU Fang, YUAN Qi-peng, ZHU Yan. Improved production of lycopene and b-carotene by Blakeslea trispora with oxygen-vectors[J]. Process Biochemistry, 2006, 42(2): 289-293.

[18] 王英燕, 张芙蓉, 田智斌. 氧载体对番茄红素发酵影响[J]. 药学研究, 2014, 33(4): 196-199.

[19] 王爽, 周魏, 刘红冉, 等. 几种氧载体对纳他霉素发酵的影响[J]. 食品科学, 2015, 40(6): 102-107.

[20] 彭超, 黄和, 刘欣, 等. 添加正十六烷对高山被孢霉发酵生产花生四烯酸的影响[J]. 食品科技, 2010(5): 2-5.

[21] 冯杰, 冯娜, 唐庆九, 等. 氧载体正十二烷对灵芝三萜液态深层发酵的影响[J]. 食用菌学报, 2016, 23(2): 52-58.

[22] 颜日明, 艾佐佐, 汪涯, 等. 双液相体系强化氧传递促进微生物

油脂生产[J]. 生物工程学报, 2013, 29(4): 536-539.

[23] 王衡伟, 陈长华, 付水林, 等. 腺苷发酵液中有机的代谢规律[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2004, 30(2): 223-226.

[24] 谌颖, 储炬, 庄英萍, 等. 阿维菌素发酵过程有机酸积累规律与生物合成的关系[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2005, 31(6): 731-734.

[25] LOPES D S T, REIS A. The use of multi-parameter flow cytometry to study the impact of n-dodecane additions to marine dinoflagellate microalga Cryptocodinium cohnii batch fermentations and DHA production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(8): 875-887.

[26] 李娜娜, 吴晓英, 吴振强. 液态烷烃氧载体对粘红酵母发酵产番茄红素的影响[J]. 生物技术通报, 2015, 31(2): 196-201.

[27] 刘芳, 李晓荣, 邹祥. 阿维拉霉素生物合成与代谢调控研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(12): 25-30.

[28] SEIFU D G, ISIMJAN T T, MEQUANINT K. Tissue engineering scaffolds containing embedded fluorinated-zeolite oxygen vectors[J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(10): 3 670-3 678.