

[文章编号] 1003—4684(2019)05-0032-05

# 富含巯基化合物酿酒酵母的筛选及发酵培养基优化

褚金磊, 李 欣, 王 志, 代 俊, 陈 雄

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 发酵工程教育部重点实验室,  
工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 从实验室保藏的菌种中筛选出一株富含巯基化合物酿酒酵母 YC-5, 在初始培养基中胞内巯基含量最高为 1.14%。采用响应面法对酿酒酵母 YC-5 的培养基配方进行优化, 建立糖蜜、蛋白胨和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  用量的二次回归模型, 确定培养基最佳配方为: 糖蜜, 70 mL/L; 酵母浸粉, 5 g/L; 蛋白胨, 8 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.8 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.6 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 g/L。在通过响应面法优化后的最适培养基中发酵 12 h, 胞内巯基含量最高可达 1.82%, 比未优化前提高了 60%。

[关键词] 酿酒酵母; 巯基含量测定; 培养基优化; 响应面法

[中图分类号] TQ920.6

[文献标识码] A

巯基化合物是生物体内重要的抗氧化剂, 是维持细胞代谢氧化还原稳定性必需的化合物, 巯基化合物的缺乏会造成细胞代谢紊乱, 进而影响生物体整体生命活动<sup>[1]</sup>。半胱氨酸和谷胱甘肽是生物体内比较常见的含巯基化合物, 前者更是含硫化合物生物合成的必需氨基酸, 能有效减少硫进入细胞代谢, 而后者是一种重要的抗氧化剂, 可以清除体内自由基, 保护 DNA、蛋白质和其他生物分子, 抵抗氧化破坏, 延缓机体衰老<sup>[2-3]</sup>, 又因为其抗氧化性突出, 美容化妆类产品中常会添加一定量的谷胱甘肽以起到延缓皮肤衰老的作用。正因为巯基化合物用途广泛, 所以人们对其需求不断增大, 如何扩大生产就成为了现在亟待解决的一大难题<sup>[4-5]</sup>。

目前巯基化合物的生产主要分为化学合成法和发酵法。相较于发酵法而言, 化学合成法生产过程容易产生大量的废水和废气, 污染环境。通过基因工程、蛋白质工程和遗传工程改造的大肠杆菌已经能得到比较可观的产量, 但是大肠杆菌是条件致病菌, 对生产工艺和环境要求更为严格, 导致其生产成本过大, 不利于大规模生产。同时出于食品及药品生产安全标准考虑, 利用工程改造菌种生产的药品和保健品, 其商业化过程会受到国家食品和药物监督管理局的更多限制<sup>[6-8]</sup>。而酿酒酵母属于食品安全级菌株, 将酿酒酵母制作成药品和保健品的工

艺已经成熟, 有着丰富且完善的工艺流程体系, 可以极大地降低生产成本<sup>[9]</sup>。

本研究通过菌种筛选, 得到一株胞内巯基含量高的酿酒酵母菌株, 并利用响应面法对发酵培养基进行优化, 以期提高胞内巯基含量, 为后续进行高密度工业化发酵奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

菌种来源: 湖北省工业微生物重点实验室。

斜面培养基: 蔗糖, 100 g/L; 酵母浸粉, 20 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/L; pH 4.8~5.0; 121 °C 灭菌 20 min。

种子培养基: 蔗糖, 100 g/L; 酵母浸粉, 20 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/L; pH 4.8~5.0; 121 °C 灭菌 20 min。

初始培养基: 糖蜜, 50 mL/L (由安琪酵母股份有限公司提供, 含糖量为 300~350 g/L); 酵母浸粉, 20 g/L; 蛋白胨, 20 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 g/L; pH 4.6; 121 °C 灭菌 20 min。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌种的活化 吸取保藏于安瓿管中的酿酒酵母菌液 1 mL, 转接至 250 mL 三角瓶, 30 °C、200

[收稿日期] 2019—03—13

[第一作者] 褚金磊(1993—), 男, 湖北应城人, 湖北工业大学硕士研究生, 研究方向为发酵工程

[通信作者] 陈 雄(1969—), 男, 湖北荆门人, 工学博士, 湖北工业大学教授, 研究方向为酵母工程

r/min 摇床培养 12 h。将培养后的菌液进行无菌稀释操作,最后制成  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  稀释液,分别取 200 uL 加入平皿中(YEPD 培养基),用涂布棒涂布均匀,30℃培养箱中培养 48 h,采用平板划线操作,获取单菌落并斜面保存。

**1.2.2 富硫化化合物酿酒酵母菌株的筛选** 将斜面保藏菌种用接种环转接到新鲜的试管斜面中,30℃培养 12 h 后,用无菌水在无菌操作条件下洗脱菌体,制成菌悬液,以 10% 的接种量接种到种子培养基中,在 30℃、200 r/min 条件下培养 12 h。然后将培养好的种子液以 7% 接种量转接到初始培养基(250 mL 规格,装液量为 50 mL),培养温度 30℃,摇床转速 200 r/min 培养 12 h。取 2.5 mL 样品离心水洗 2 次后得到干净菌体,再加入 5 mL 去离子水重悬菌体,将重悬后的菌液置于-20℃冰箱冷冻 12 h 后 80℃水浴 60 min,待水浴完再将其冷却至室温后,以 8000 r/min 离心 3 min,收集离心后的上清液体<sup>[10-11]</sup>,检测上清液中巯基的浓度,选择胞内巯基含量最高的菌株进行下一步试验。

**1.2.3 细胞干重的测定** 取 2.5 mL 样品,离心水洗 2 次后得到干净菌体,置于 80℃恒温烘箱中烘干 24 h 后,取出置于干燥器中,冷却至室温后用分析天平准确称量菌体质量。

**1.2.4 酵母胞内巯基测定** 取 2.5 mL 样品离心水洗 2 次后得到干净菌体,再加入 5 mL 去离子水重悬菌体,将重悬后的菌液置于-20℃冰箱冷冻 12 h,再 80℃水浴 60 min,待水浴完再将其冷却至室温后,以 8000 r/min 离心 3 min,收集离心后的上清液体。取上清液 1 mL 加入 3 mL Tris-HCl 缓冲液,再加入 1 mL 去离子水迅速振荡摇匀。

将配置好的 DTNB 显色液加入 5 mL 到试管中,再加入 1 mL 处理好的样品,振荡摇匀后 25℃水浴 5 min,波长 412 nm 处测量吸光值,通过制作的巯基标准曲线计算巯基总量<sup>[12-13]</sup>。

$$\text{胞内巯基含量} = \frac{\text{胞内巯基质量}}{\text{菌体干质量}} \times 100\%$$

**1.2.5 培养基优化** 考虑到实际生产成本以及原料来源等问题,选择糖蜜、酵母浸粉和蛋白胨作为主要碳氮源,同时选择了  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  等无机盐进行单因素优化预试验。用 Design Expert 8.0.6 软件设计实验及分析实验结果,确定影响巯基合成的显著因子,再通过最陡爬坡试验,选取合适的响应面中心点,最后用响应面分析法对显著因子水平进行优化,以得到最适发酵培养基配方。

### 1.3 数据处理

所有数据至少取 3 个平行试验的平均值,使用 Origin 9.0 和 Excel 2003 对实验数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选结果

通过比较不同酿酒酵母菌株发酵 12 h 后的干重以及胞内巯基含量,筛选出一株生长速度快且合成巯基能力强的酿酒酵母菌株。

表 1 不同菌株干重和胞内巯基含量

菌种编号	细胞干重/ (g · L <sup>-1</sup> )	胞内巯基质量/ (mg · L <sup>-1</sup> )	巯基含量/%
YC-1	7.74	56.50	0.73
YC-2	10.29	86.44	0.84
YC-3	5.60	55.44	0.99
YC-4	9.37	67.46	0.72
YC-5	11.25	128.25	1.14
YC-6	10.08	106.91	1.04
YC-7	12.03	116.69	0.97
YC-8	8.74	97.89	1.12
YC-9	11.15	121.54	1.09
YC-10	12.18	125.45	1.03

由表 1 可知,胞内巯基含量最高的酿酒酵母菌株为 YC-5 和 YC-8,其峰值分别达到了 1.14% 和 1.12%,说明 YC-5 菌株和 YC-8 菌株胞内巯基合成能力明显优于其他 8 株酿酒酵母菌。但是 YC-5 菌株发酵 12 h 后的细胞干重远高于 YC-8 菌株,这说明 YC-5 菌株生长能力优于 YC-8 菌株。因此,选择 YC-5 菌株作为实验菌株进行后续试验。

### 2.2 Plackett-Burman 试验设计与分析

PB 试验设计的优点在于能以最少的试验次数从众多变量中筛选出对响应值影响最显著的变量,从而大大减少试验时间和节约试验成本<sup>[14-15]</sup>。以胞内巯基含量为响应值设计 PB 试验,试验设计和结果见表 3,对数据进行回归分析得到各因子的偏回归系数及其显著性(表 2)。

表 2 各因素水平、效应值及显著性分析

因素	水平		效应	贡献 值/%	P 值
	低	高			
A	100 mL/L	200 mL/L	-0.370	85.92	0.0002
B	5 g/L	10 g/L	-0.031	0.60	0.4594
C	10 g/L	20 g/L	-0.067	2.73	0.1490
D	0.8 g/L	1.6 g/L	-0.030	0.57	0.4731
E	0.6 g/L	1.2 g/L	-0.062	2.37	0.1738
F	0.4 g/L	1.8 g/L	-0.071	3.10	0.1292

A 为糖蜜;B 为酵母浸粉;C 为蛋白胨;D 为  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;E 为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;F 为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。下同

由表 2 可知,糖蜜、酵母浸粉、蛋白胨、 $\text{MgSO}_4$

• 7H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 均表现为负效应,贡献值排在前三位的分别为糖蜜、蛋白胨和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,其中糖蜜的可信度大于 95%,且贡献值超过 80%,表现最为显著。蛋白胨和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的可信度也都大于 85%,可信度较高。因此将糖蜜、蛋白胨、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>作为主要影响因素进行下一步最陡爬坡试验。

表 3 Plackett-Burman 试验设计及结果							
试验号	A	B	C	D	E	F	巯基含量/%
1	1	1	-1	1	1	1	0.95
2	1	-1	1	1	1	-1	0.88
3	1	1	1	-1	-1	-1	0.96
4	1	-1	1	1	-1	1	0.92
5	-1	-1	-1	1	-1	1	1.34
6	-1	1	1	1	-1	-1	1.39
7	1	1	-1	-1	-1	1	0.92
8	-1	1	1	-1	1	1	1.25
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.48
10	-1	1	-1	1	1	-1	1.26
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1.07
12	-1	-1	1	-1	1	1	1.23

2.3 最陡爬坡试验结果

根据 PB 试验确定的显著影响因素及效应值,在合适范围内取值,设计最陡爬坡试验,试验设计及结果见表 4。由表 4 可知,最高巯基含量出现在第 8 组,因此选择第 8 组作为响应面实验的中心点,即糖蜜 80 mL/L,蛋白胨 8 g/L,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 g/L。

表 4 最陡爬坡实验及结果				
试验号	糖蜜/ (mL · L <sup>-1</sup> )	蛋白胨/ (g · L <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / (g · L <sup>-1</sup> )	巯基含 量/%
1	150	15	0.9	1.03
2	140	14	0.8	1.45
3	130	13	0.7	1.20
4	120	12	0.6	1.31
5	110	11	0.5	1.39
6	100	10	0.4	1.40
7	90	9	0.3	1.37
8	80	8	0.2	1.56
9	70	7	0.1	1.50
10	60	6	0.05	1.47

2.4 响应面分析的试验设计与结果

根据最陡爬坡试验确定的中心点,用 Design Expert 8.0.6 软件设计中心组合试验,将最陡爬坡试验中的三个显著因素分别标记为 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>,以胞内巯基含量为响应值,标记为 Y,中心组合试验因素变量及水平见表 5,试验设计及结果见表 6,方差分析见表 7。

表 5 中心组合试验因素与水平					
因素	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
X <sub>1</sub> 糖蜜/(mL · L <sup>-1</sup> )	46	60	80	100	114
X <sub>2</sub> 蛋白胨/(g · L <sup>-1</sup> )	4.6	6	8	10	11.4
X <sub>3</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /(g · L <sup>-1</sup> )	0.03	0.1	0.2	0.3	0.37

表 6 中心组合试验设计及结果				
试验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y 巯基含量/%
1	1	1	-1	1.36
2	0	0	0	1.89
3	-1	1	-1	1.62
4	0	0	0	1.74
5	0	0	1.682	1.42
6	-1.682	0	0	1.66
7	-1	-1	1	1.58
8	-1	1	1	1.59
9	1	-1	1	1.47
10	0	0	0	1.87
11	0	0	-1.682	1.48
12	-1	-1	-1	1.55
13	1	-1	-1	1.27
14	0	0	0	1.69
15	0	-1.682	0	1.50
16	0	0	0	1.78
17	1	1	1	1.36
18	0	1.682	0	1.45
19	0	0	0	1.82
20	1.682	0	0	1.25

表 7 方差分析					
方差来源	方差	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	0.78	9	0.07	15.80	0.0001
X <sub>1</sub>	0.18	1	0.18	39.33	0.0001
X <sub>2</sub>	0.01	1	0.05	0.03	0.9244
X <sub>3</sub>	0.02	1	0.04	0.16	0.6958
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.02	1	0.03	0.23	0.6429
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.03	1	0.03	1.26	0.2886
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.04	1	0.03	1.89	0.1989
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.19	1	0.19	40.61	0.0001
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.16	1	0.16	35.77	0.0001
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.20	1	0.20	42.63	0.0001
残差	0.05	10	0.03	—	—
失拟项	0.01	5	0.03	0.45	0.8008
总和	0.83	19	—	—	—

表 5 将三个显著因素分为 5 个不同水平,0 对应为响应面中心点,1 对应中心点数值的 1.25 倍,1.682对应更高值,-1 对应中心点数值的 0.75 倍,-1.682对应更低值。以这 5 个不同水平进行随机组合试验,实验设计和实验结果见表 6。根据表 6 的试验结果通过 Design-Expert 进行响应面分析,建立多元二次回归方程:

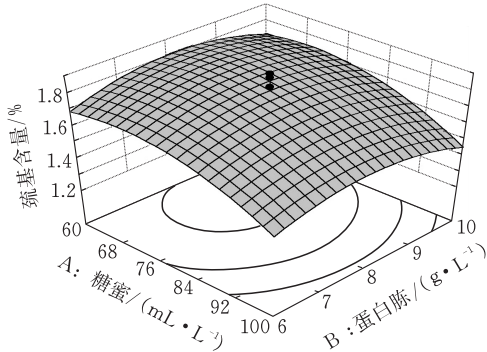
$$Y=1.80-0.12X_1-0.003X_2+0.003X_3-0.011X_1X_2+0.027X_1X_3-0.033X_2X_3-0.11X_1^2-0.11X_2^2-0.12X_3^2$$

(1)

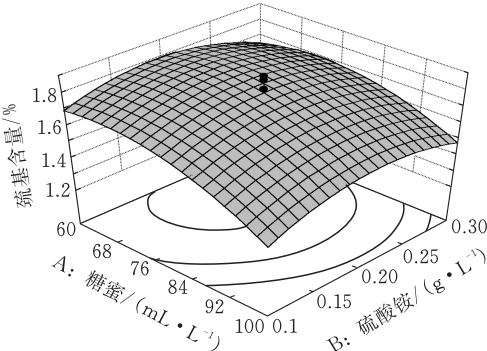
方程的方差分析结果见表 7,模型  $P<0.01$ ,失拟项不显著,这些数据表明回归方程拟合程度良好。决定系数  $R^2=0.9343$ ,说明因变量与考察的自变量之间线性关系显著。因此,使用该模型可以较好地对响应值进行分析和预测。

2.5 最佳浓度的确定及验证试验

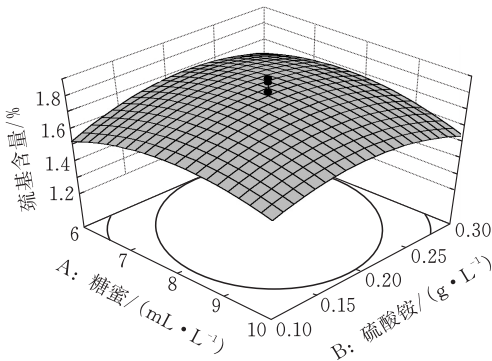
根据响应面试验得到的回归方程绘制出响应面分析图(图 1),用以确定 3 个显著因素对胞内巯基含量的影响。如图 1 所示,该回归方程的抛物线图形开口均向下,说明回归方程存在最大值,即响应面覆盖了最大值所在的区域。由 Design-Expert 分析得到最适培养基中三个显著影响因素对应的实际值分别为:糖蜜,70 mL/L;蛋白胨,8 g/L;(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.2 g/L。综上所述,最适培养基成分组成分别为:糖蜜,70 mL/L;酵母浸粉,5 g/L;蛋白胨,8 g/L;MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub> O, 0.8 g/L;KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 0.6 g/L;(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.2 g/L。将最适培养基成分带入方程(1),预测酿酒酵母胞内巯基含量最高可达 1.83%。以上述最适培养基配方进行摇瓶验证试验,胞内巯基含量达到 1.82%,比未优化前的 1.14%提高了 60%,与模型预测结果相吻合。



(a)糖蜜与蛋白胨



(b)糖蜜与硫酸铵



(c)糖蜜与硫酸铵

图 1 各因素间相互作用响应面分析

3 讨论与结论

通过比较筛选,从实验室保藏的诸多酿酒酵母菌株中得到一株胞内巯基含量最高的酿酒酵母菌株 YC-5,同时选择了 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub> O、KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 等无机盐进行单因素优化预试验,确定其最佳浓度分别为:糖蜜,100 mL/L;酵母浸粉,5 g/L;蛋白胨,10 g/L;MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub> O,0.8 g/L;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.6 g/L;(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.4 g/L。在此基础上,利用 Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和响应面分析试验,对菌株 YC-5 的发酵培养基进行优化,最终得到的最适发酵培养基组成成分为:糖蜜,70 mL/L;酵母浸粉,5 g/L;蛋白胨,8 g/L;MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.8 g/L;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.6 g/L;(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 g/L。在此最优培养基中发酵 12 h 得到最高胞内巯基含量为 1.82%,比未优化前提高了 60%。本试验为中试阶段进行发酵工艺优化和补料策略研究提供了基础数据支持,也为工业化生产奠定了基础。

[ 参 考 文 献 ]

[1] 霍湘,王安利,杨建梅.含硫氨基酸的抗氧化作用[J].生物学通报,2006(4):3-4.

[2] Schmach M, Lorenz E, Senz M. Microbial production of glutathione[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2017,33(6):106-107.

[3] Yan G, Hua Z, Du G, et al. Adaptive response of bacillus sp. F26 to hydrogen peroxide and menadione[J]. Current Microbiology,2006,52(3):238-242.

[4] 尹仁文,陈正行,李娟,等.大米蛋白与米渣蛋白对镉的结合能力对比研究[J].食品工业科技,2019,40(3):1-14.

[5] 贾贞,王丹,游松.谷胱甘肽的研究进展[J].沈阳药科大学学报,2009,26(3):238-242.

[6] 沈亚领,李爽,迟莉丽,等.谷胱甘肽的应用与生产[J].



工业微生物,2000(2):41-45.

[7] Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1830 (5): 3217-3266.

[8] Takagi H, Ohtsu I. L-Cysteine metabolism and fermentation in microorganisms [J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2016, 159(12):129-151.

[9] 汤亚杰,徐小玲,李冬生.发酵法生产谷胱甘肽的研究进展[J].食品与发酵工业,2007(1):75-79.

[10] Zhang J, Quan C, Wang C, et al. Systematic manipulation of glutathione metabolism in Escherichia coli for improved glutathione production [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1):38.

[11] 程超,张宏海,盛文军,等.多重破壁技术提取葡萄酒泥废酵母  $\beta$ -聚糖研究[J].食品工业科技,2016,37(4):111-116.

[12] 刘立聪,胡依雯,王志,等.富含谷氨酸酿酒酵母的筛选及发酵培养基优化[J].中国酿造,2017,36(6):116-120.

[13] 朴玉莲,沈丽,韩玲,等.衍生化法测定水果中还原型谷胱甘肽(GSH)和总巯基含量[J].食品工业科技,2012,33(20):60-64.

[14] 赵少欣,贺小贤.还原型谷胱甘肽简便测定法[J].食品科技,2007(9):219-220.

[15] Ashish A P, Bapi M, Veeranki V D. Medium optimization for high yield production of extracellular human interferon-  $\gamma$  from Pichia pastoris : A statistical optimization and neural network-based approach[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2017, 34(4):1109-1121.

[16] Liu C, Huang C, Liao C C. Medium optimization for glutathione production by Saccharomyces cerevisiae [J]. Process Biochemistry, 1999, 34(1):17-23.

# Screening of High Intracellular Thiol Compounds Saccharomyces Cerevisiae and Optimization of Fermentation Medium

CHU Jinlei, LI Xin, WANG Zhi, DAI Jun, CHEN Xiong

(Key Laboratory of Ministry of Education for Fermentation Engineering ,  
Hubei Provincial Cooperative Innovation Center for Industrial Fermentation ,

School of Biological Engineering and Food Science , Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China )

**Abstract:** A strain of Saccharomyces cerevisiae YC5 which was rich in the sulfhydryl was screened from the strains preserved in laboratory. The highest intracellular thiol content was 1.14% in the initial medium. The response surface method was used to optimize the medium formula of Saccharomyces cerevisiae YC5, and a quadratic regression model of molasses, peptone and  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  dosage was established. The optimal formula for determining the medium was set as follows: molasses 70 mL/L, yeast extract 5 g/L, peptone 8 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.8 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6 g/L,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  0.2 g/L. After 12 h of fermentation in the optimum medium optimized by response surface methodology, the intracellular sulfhydryl content was as high as to 1.82%, which was 60% higher than that before optimization.

**Keywords:** saccharomyces cerevisiae; intracellular thiol content; medium optimization; response surface methodology

[责任编辑: 张 众]