



## 低温碱性脂肪酶产生菌的筛选及产酶培养基的优化

刘瑞娟, 王海宽, 路福平, 戚 薇

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 以橄榄油为唯一碳源, 从渤海湾盐碱地被油污染的土样中分离筛选出 1 株产低温碱性脂肪酶菌株 34-5, 初步酶学性质研究表明, 该菌所产脂肪酶的最适温度为 25 °C, 最适 pH 为 9.6. 该菌的 16S rDNA 基因序列与伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia*) 的同源性为 99%. 摇瓶实验表明, 该菌株最适产酶培养基为 (g/L): 淀粉 10, 黄豆饼粉 20, 玉米浆 20,  $K_2HPO_4$  1, 聚乙烯醇大豆油乳化液 20. 其最高酶活为 6.87 U/mL.

**关键词:** 低温脂肪酶; 碱性脂肪酶; 筛选

中图分类号: Q933

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2009)01-0006-05

## Screening and Optimization of Fermentation Medium of Bacterium Producing Cold-Adapted and Alkaline Lipase

LIU Rui-juan, WANG Hai-kuan, LU Fu-ping, QI Wei

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** A bacterium which produces cold-adapted alkaline lipase was isolated from soil on a selective medium that contained olive oil as the only source of carbon. The soil was collected from bay of Bohai. The optimal temperature and pH of the lipase were 25 °C and pH 9.6, respectively. The sequence of 16S rDNA of strain 34-5 showed 99% homology to *Burkholderia*. The optimal medium for lipase production were determined as follows (g/L): starch 10, bean flour 20, corn syrup 20,  $K_2HPO_4$  1, emulsified bean oil 20. The alkaline lipase activity reached maximal level of 6.87 U/mL.

**Keywords:** cold-adapted lipase; alkaline lipase; screening

脂肪酶 (EC3.1.1.3, 又称三酰基甘油酰基水解酶), 是一种特殊的酯键水解酶, 它能在油水界面催化天然底物油脂 (甘油三酯) 水解, 产生脂肪酸和甘油, 在水解过程中存在中间产物甘油单酯和甘油二酯, 具有高度的化学选择性和对应选择性. 低温碱性脂肪酶在 pH 8.0~10.5, 温度 10~35 °C 的范围内有高催化活性, 耐有机溶剂以及对热敏感等特点, 因此在洗涤、食品、制药、脂类加工、毛纺和低温环境修复等工业上有着巨大的应用潜力. 低温碱性脂肪酶最大的市场是洗涤业, 其主要功能是去除脏衣物、洗碟机上的油污以及疏通堵塞的下水道<sup>[1]</sup>.

自然界中许多微生物都产脂肪酶, 目前发现细菌

中有 28 个属, 放线菌有 4 个属, 酵母菌有 10 个属, 其他真菌有 23 个属, 共计达 65 个属的微生物能产脂肪酶. 尽管产脂肪酶的微生物很多, 但用于商业化生产的细菌很少, 主要有: *Burkholderia* (伯克霍尔德氏菌)、*Achromobacter* (无色杆菌属)、*Bacillus* (芽胞杆菌属)、*Chromobacterium* (色杆菌属)、*Alcaligenes* (产碱菌属)、*Arthrobacter* (节杆菌属)、*Pseudomonas* (假单胞菌属)<sup>[2]</sup>. 伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*) 所产脂肪酶具有对长碳链甘油三酯 (大于  $C_8$ ) 的水解性、转脂性<sup>[3]</sup>、酯化性<sup>[4]</sup>、化学选择性、对应选择性、对溶剂的耐受性、耐热性<sup>[5]</sup>等特点, 该脂肪酶是过去 20 年工业用酶研究的重点, 许多源自 *Burkholderia* 的脂肪酶的

收稿日期: 2008-07-02; 修回日期: 2008-10-07

基金项目: 天津市应用基础研究计划面上项目资助 (07JCYBJC07900)

作者简介: 刘瑞娟 (1982—), 女, 内蒙古人, 硕士研究生; 通信作者: 王海宽, 副教授, haikuanwangcn@yahoo.com.cn.

酶学性质、催化结构<sup>[6-7]</sup>等得到了阐述,但是对该菌产低温碱性脂肪酶的特性未见报道。

本文从渤海湾盐碱地被油污染的土样中筛选产低温碱性脂肪酶的菌株,并对其产酶条件进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 土样来源

渤海湾盐碱地天津惠鑫大豆油科技有限公司和大港油田被油污染的土样。

### 1.2 试剂与培养基

#### 1.2.1 试剂

聚乙烯醇橄榄油乳化液:取 20 g 聚乙烯醇加蒸馏水约 1 000 mL,水浴加热至溶,冷却后定容至 1 000 mL,配成 2% 的聚乙烯醇溶液,双层纱布过滤备用。将橄榄油与上述 2% 的聚乙烯醇溶液以 1:3 的比例混合。用高速组织捣碎机处理 6 min,分两次,每次 3 min,间隔 5 min,即成乳白色聚乙烯醇橄榄油乳化液。

聚乙烯醇大豆油乳化液:将大豆油与上述 2% 的聚乙烯醇溶液以 1:3 的比例混合。用高速组织捣碎机处理 6 min,分两次,每次 3 min,间隔 5 min,即成乳白色聚乙烯醇大豆油乳化液。

#### 1.2.2 培养基

富集培养基(g/L):酵母浸出粉 10, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2, 聚乙烯醇橄榄油乳化液 20, pH 9.5。

分离平板培养基(g/L):K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, NaNO<sub>3</sub> 3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 琼脂 20, pH 9.5, 经 121℃ 灭菌 20 min 后,降温至 50℃ 左右,加聚乙烯醇橄榄油乳化液 20 g (该乳化液含 0.2% 的维多利亚蓝 B)。

复筛培养基(g/L):蛋白胨 40, 蔗糖 20, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, 大豆油 5, pH 9.5。

初筛测酶活平板(g/L):甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(0.2 mol/L) 900, 琼脂 20, 经 121℃ 灭菌 20 min 后,降温至 60℃ 左右,加橄榄油乳化液 100 g (该乳化液含 0.2% 的维多利亚蓝 B)。

斜面培养基(g/L):酵母浸出粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, pH 7.5。

### 1.3 测酶活方法

#### 1.3.1 平板扩散法<sup>[8-9]</sup>

平板扩散法又名维多利亚蓝透明圈法,即在初筛测酶活平板上打 4 mm 孔,将酶液加入孔中培养 24 h,测其出圈大小以判断酶活力。

#### 1.3.2 分光光度法<sup>[10-11]</sup>

溶液 A:90 mg *p*-棕榈酸硝基苯酯溶于 30 mL 异丙醇中。

溶液 B:450 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0),并含有 1% 的 Triton X-100. 2.7 mL 基质溶液(由溶液 A 和溶液 B 按 1:9 比例,缓慢混合,新鲜配制而成,该溶液至少可稳定 2 h)25℃ 预培养,然后加入 0.3 mL 稀释至一定程度的粗酶液,继续在 25℃ 保温 15 min. 然后-20℃ 冷冻 15 min 终止反应。

用分光光度计 400 nm 测定溶液中已释放对硝基酚的数量(以不加酶的溶液作对照).以 pH 8.0, 25℃ 条件下,分解底物(对棕榈酸硝基苯酯)释放 1 μmol/min 对硝基酚所需酶量定义为 1 个碱性脂肪酶活力单位(U),以 U/mL 表示。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 产脂肪酶菌株的分离

富集培养:取 1 g 土样直接加入 50 mL 富集培养基中,26℃,180 r/min 振荡培养,3 d 后取 5 mL 培养液加入 50 mL 新鲜培养基中继续培养 3 d,如此重复 3 次后,进行平板分离。

平板分离:将富集培养液用无菌水梯度稀释至 10<sup>-3</sup>,用移液管取 10<sup>-3</sup> 的稀释液 0.1 mL 于分离平板中,用涂布器连涂三块板,并标记。将涂布好的平板,在 25℃ 培养箱倒置培养 3 d 挑选出较大蓝色圈的单菌落,进行编号,接种于斜面培养基,并对应点接到平板上。

初筛:从分离后的斜面上分别接菌于初筛发酵培养基,在 26℃,180 r/min 的摇床中培养 36 h. 将发酵液 4℃、10 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液。用平板扩散法测酶活。

复筛:将菌接于装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 摇瓶中,于 26℃,180 r/min 下培养 12 h;在无菌条件下,用移液管取 1 mL 菌液于装有 50 mL 复筛培养基的 250 mL 摇瓶中,于 26℃,180 r/min 下发酵培养 36 h,将发酵液 4℃、10 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液。用分光光度法测酶活。

#### 1.4.2 菌株的 16 S rDNA 序列测定

煮沸粗提 DNA 法提取 DNA,按照文献<sup>[12]</sup>进行 16S rDNA 序列 PCR 扩增,上游引物为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGG-3';下游引物为 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 扩增产物交由宝生物技术公司进行测序,序列通过 GenBank 中的 BLAST 检索进行同源性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株筛选

从被油污染的土样中分离出 430 株产脂肪酶的菌株,进一步用平板扩散法检测有 52 株菌产碱性脂肪酶,其中 8 株菌产低温碱性脂肪酶.复筛用分光光度法测酶活,结果表明菌株 34-5 发酵液酶活性较高,平板检测结果如图 1 所示(图 1 a、b、c 平板中第二排四个孔均为 34-5 菌所产脂肪酶,其他三排为其他菌株;a、b、c 表示脂肪酶在不同 pH 和温度下的出圈情况).比较图 1 中 a、b 可知,该脂肪酶在 pH 9.6 时的活性高于 8.0 时的活性.比较图 1 中 b、c 可知,菌株 34-5 所产脂肪酶在 25 °C 时的活性高于 35 °C 时的活性.通过平板扩散测酶活方法定性的研究结果表明,34-5 菌株所产脂肪酶的最适温度为 25 °C,最适 pH 为 9.6,该脂肪酶是低温碱性脂肪酶.

平板扩散测酶活方法是一种简便、灵敏、快速的直观方法,可用于产碱性脂肪酶菌株的筛选,极大减少初筛阶段测酶活的工作量.

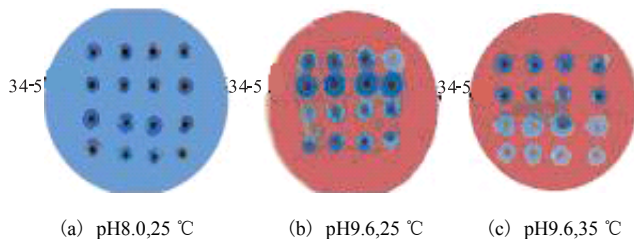


图 1 菌株 34-5 初酶液在维多利亚兰 B 琼脂平板上所形成的变色圈大小

Fig.1 Size of rings formed on Victoria Blue agar plate with strain 34-5 enzyme solution

### 2.2 菌株 34-5 的 16S rDNA 测序结果

所得 16S rDNA 基因序列长度大约为 1 500 bp,将菌株 34-5 的 16S rDNA 基因序列在 GenBank 核酸数据库中进行比对,结果与伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)的同源性为 99%.该菌所产脂肪酶经初步研究为低温碱性脂肪酶,与文献报道不一致.目前报道的伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)所产脂肪酶大多是高温酶,对该菌产低温碱性脂肪酶未见报道.Pooja Rathi<sup>[13]</sup>报道的 *Burkholderia cepacia* 所产脂肪酶的最适温度为 50 °C, Jiangke Yan<sup>[14]</sup>报道的 *Burkholderia cepacia* strain G63 所产脂肪酶的最适温度为 40~70 °C,70 °C 保持 1 h 时该酶能保持 98.3% 的酶活,Doo-Sang<sup>[1]</sup>报道的 *Burkholderia sp.*HY-10 所产脂肪酶最适温度为 60 °C,pH 为 8.5,Chien-hung Liu<sup>[15]</sup>报

道的 *Burkholderia sp.*C20 所产脂肪酶的最适温度为 55 °C,pH 为 9.0.

### 2.3 菌株 34-5 产酶条件的优化

#### 2.3.1 碳源对产酶的影响

以复筛培养基为基础,改变不同的碳源及其含量,2%的接种量,26 °C,180 r/min 下发酵培养 36 h,将发酵液 4 °C,10 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液.用分光光度法测酶活.结果如表 1 所示.

表 1 碳源对菌株 34-5 产酶的影响  
Tab.1 Effect of different additive carbon on lipase production by strain 34-5

碳源	酶活/ (U·mL <sup>-1</sup> )	碳源	酶活/ (U·mL <sup>-1</sup> )
蔗糖 1.0%(对照)	1.26	淀粉 0.5%	3.76
蔗糖 0.5%	2.41	淀粉 1.0%	4.46
蔗糖 1.5%	0.80	淀粉 1.5%	3.12
葡萄糖 0.5%	0.78	糊精 0.5%	2.54
葡萄糖 1.0%	1.09	糊精 1.0%	2.23
葡萄糖 1.5%	0.24	糊精 1.5%	1.28

结果表明,碳源为淀粉 1.0%时酶活最高,其酶活为 4.46 U/mL.

#### 2.3.2 氮源对产酶的影响

##### (1) 单一氮源对产酶的影响

氮源是微生物生长必不可少的一部分,选择合适的氮源可以补充微生物生长过程中对氮元素的需求,能够提供迅速而且容易利用含氮成分供微生物生长利用.以上述优化培养基为基础,改变不同的氮源,采用上述方法发酵测酶活.结果如表 2 所示.

表 2 单一氮源对菌株 34-5 产酶的影响  
Tab.2 Effect of different additive nitrogen on lipase production by strain 34-5

氮源	酶活/ (U·mL <sup>-1</sup> )	氮源	酶活/ (U·mL <sup>-1</sup> )
蛋白胨(对照)	4.53	酵母粉	3.28
棉籽粉	2.72	牛肉膏	2.56
尿素	3.12	豆饼粉	5.03
NaNO <sub>3</sub>	1.89	玉米浆	4.29
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.63	KNO <sub>3</sub>	1.52
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.26	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.41

结果表明,此菌株利用不同的氮源产低温碱性脂肪酶差异较大.有机氮源以豆饼粉最佳,无机氮源以 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 最佳.

##### (2) 复合氮源对产酶的影响

考虑到不同的有机氮源和无机氮源对菌株产脂肪酶的影响,将豆饼粉、蛋白胨、玉米浆、NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

以不同的配比作为产酶培养基的混合氮源,采用上述方法发酵测酶活.结果如表3所示.

表3 复合氮源对产酶的影响

Tab.3 Effect of different additive nitrogen on lipase production by strain 34-5

氮源	酶活/ (U·mL <sup>-1</sup> )	氮源	酶活/ (U·mL <sup>-1</sup> )
4%豆饼粉 (对照)	5.11	4%蛋白胨	4.41
2%豆饼+ 2%玉米浆	5.52	2%蛋白胨+ 2%玉米浆	3.98
3%豆饼+ 1%玉米浆	5.28	3%蛋白胨+ 1%玉米浆	4.24
2%豆饼粉+ 2%NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.08	2%蛋白胨+ 2%NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.50

结果表明,复合氮源为2%豆饼粉+2%玉米浆时产酶最高,产量为5.52 U/mL.玉米浆是能迅速利用的氮源,黄豆饼粉是能缓慢利用的氮源,发酵初期,玉米浆是菌体发育、生长和繁殖所用的主要氮源,而缓慢利用的氮源黄豆饼粉要在容易利用的氮源消耗差不多时才被利用,发酵中后期,菌体正常代谢和合成产物所需的氮主要来自缓慢利用的氮源.缓慢利用的氮源对延长次级代谢产物的分泌期、提高产物的产量是有好处的.黄豆饼粉和玉米浆由于价格低廉、来源广泛而成为理想的发酵原料.

2.3.3 诱导剂对产酶的影响

脂肪酶为诱导酶,需有脂肪作为诱导剂产酶.

(1) 油脂的种类对产酶的影响

采用上述优化培养基,改变不同的油脂作为诱导剂,采用上述方法发酵测酶活.结果如表4所示.

表4 油脂的种类对菌株34-5产酶的影响

Tab.4 Effect of different additive oils on lipase production by strain 34-5

油脂的种类	酶活/ (U·mL <sup>-1</sup> )	油脂的种类	酶活/ (U·mL <sup>-1</sup> )
大豆油(对照)	5.50	三丁酸甘油酯	2.28
橄榄油	4.12	棕榈油	3.05
椰子油	4.41	花生油	1.84
芥末油	3.89	葵花油	4.38

结果表明,诱导剂为大豆油时酶活最高,酶活为5.50 U/mL.以植物油作为诱导剂,菌株能高产脂肪酶.据Pooja Rathi<sup>[13]</sup>的报道,*Burkholderia cepacia*的最佳诱导剂为棕榈酸油,其次为椰子油、芥菜油和橄榄油.此实验结果与文献报道有差异,可能是该实验菌株筛选自被大豆油长期污染的土样,它更适合于分解和利用大豆油.

(2) 大豆油的添加量对产酶的影响

以大豆油为诱导剂,以不同的添加量加入上述优化培养基中,采用上述方法发酵测酶活,结果如图2所示.

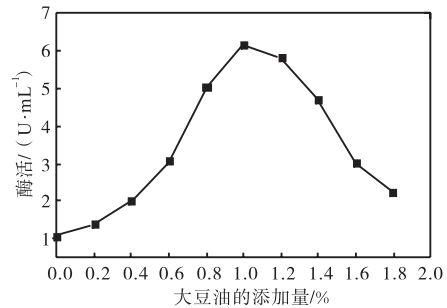


图2 大豆油的添加量对菌株34-5产酶的影响

Fig.2 Effect of different volumes of soybeanoil on lipase production by strain 34-5

结果表明,大豆油的添加量为1%时产酶最高,酶活为6.12 U/mL.随着油量的增加,产酶量降低.此结果与Gupta R<sup>[2]</sup>的报道相符,起始的油浓度影响脂肪酶的产量,随着油的浓度增加,脂肪酶产量上升,但过量的脂肪抑制脂肪酶的产生.

2.3.4 聚乙烯醇大豆油乳化液对产酶的影响

聚乙烯醇大豆油乳化液是含有表面活性剂的大豆油,由于表面活性剂的存在,乳化液中的油珠呈更小的微粒状态,小微粒更容易进入细胞膜诱导脂肪酶的产生.本实验以1%大豆油为诱导剂时作对照,以聚乙烯醇大豆油乳化液作为诱导剂,分别以2%、3%、4%、5%的添加量加入上述优化培养基中,采用上述方法发酵测酶活.结果如图3所示.

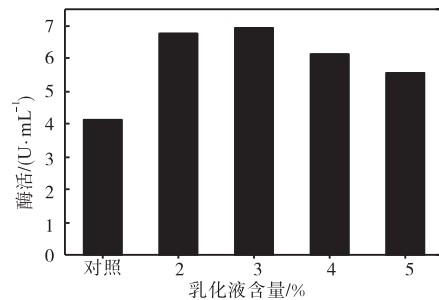


图3 乳化液对菌株34-5产酶的影响

Fig.3 Effect of emulsion on lipase production by strain 34-5

结果表明,以3%乳化液为诱导剂时产酶最高,2%乳化液为诱导剂时产酶次之.因为聚乙烯醇大豆油乳化液含有表面活性剂,有利于油脂的分散,细胞对其利用率高,因而减少了大豆油的用量.加2%乳

液与加 3% PVA 乳化液时产酶相差不多,考虑到成本,以 2%乳化液为诱导剂进行后续实验. 目前报道的产脂肪酶诱导剂大都是油脂类,关于乳化液作诱导剂还未见报道.

### 2.3.5 pH 对产酶的影响

用 HCl 或 NaOH 在 3.0~14.0 范围内改变上述优化培养基的 pH, 用上述方法发酵测酶活. 结果如图 4 所示.

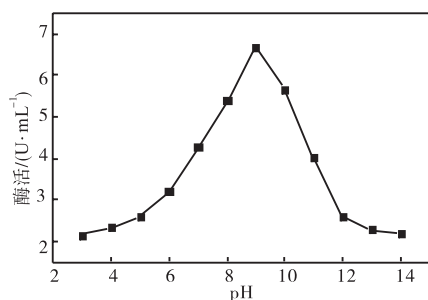


图 4 pH 对菌株 34-5 产酶的影响

Fig.4 Effect of different pH on lipase production by strain 34-5

结果表明,pH 为 9.0 时产酶最高为 6.87 U/mL. 一般来说,大多数脂肪酶在中性或者碱性条件下产生,同时在中性或碱性条件下有最佳活力. 经过初步酶学性质研究该脂肪酶的最适 pH 为 9.6.

## 3 结 论

从渤海湾盐碱地取被油污染的土样,以橄榄油为唯一碳源,维多利亚兰 B 为指示剂,筛选出产低温碱性脂肪酶的菌株.

对筛选出的菌株 34-5 进行初步酶学性质研究表明,该菌所产脂肪酶的最适温度为 25 °C,最适 pH 为 9.6. 该菌的 16S rDNA 基因序列与伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)的同源性为 99%. 摇瓶实验表明,该菌株最适产酶培养基为(g/L):淀粉 10,黄豆饼粉 20,玉米浆 20, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,聚乙烯醇大豆油乳化液 20,发酵最高酶活达 6.87 U/mL.

### 参考文献:

[1] Doo Sang Park, H W O, Sun Yeon Heo, et al. Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle[J]. The Journal of Microbiology, 2007, 45 (5): 409-417.

[2] Gupta R, G N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64: 763-781.

[3] Olivier Orc, aire, P B, Alain C Pierre. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 42: 106-113.

[4] Sylvie Maury, Paulette Buisson, Alain Perrard, et al. Compared esterification kinetics of the lipase from *Burkholderia cepacia* either free or encapsulated in a silica aerogel[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005, 32: 193-203.

[5] IEGEL. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications[J]. Advances in Applied Microbiology, 2007, 61: 253-283.

[6] Luigi Mandrich, Luigia Merone, Margherita Pezzullo, et al. Role of the N terminus in enzyme activity, stability and specificity in thermophilic esterases belonging to the HSL family[J]. J Mol Biol, 2005, 345: 501-512.

[7] Kim K K, H K Song, D H Shin, et al. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor[J]. Structure, 1997, 5: 173-185.

[8] 吴敏辰, 孙崇荣, 吴显章. 平板扩散法粗略确定碱性脂肪酶的活性[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(2): 168-172.

[9] 施巧琴. 碱性脂肪酶的研究-I. 菌株的分离和筛选[J]. 微生物学通报, 1981, 8(3): 108-110.

[10] Vorderwillebecke T, Erdmann H. Comparison of lipases by different assays[J]. Enzyme Microbiol Biotechnol, 1992, 14: 631-649.

[11] Winkler U K. Glycogen hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*[J]. Bacteriol, 1979, 138: 663-701.

[12] 林容霞, 马延和, 谭天伟. 低温脂肪酶产生菌的筛选及鉴定[J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(1): 31-35.

[13] Pooja Rathi, R K S, Rani Gupta. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation [J]. Process Biochemistry, 2001, 37: 187-192.

[14] Jiangke Yang, D G, Yunjun Yan. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 45: 91-96.

[15] Chienhung Liu, W B L, Jo Shu Chang. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology[J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 1940-1944.