

文章编号:1001-6880(2016)12-1880-07

# 超高压酶解酪蛋白及其产物 在动物细胞培养中的应用

靳冬武<sup>1,2</sup>, 魏锁成<sup>2</sup>, 冯玉萍<sup>1,2</sup>, 马忠仁<sup>1,2,3</sup>, 郑 荣<sup>2</sup>, 李明生<sup>1,2,3\*</sup><sup>1</sup>西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室; <sup>2</sup>西北民族大学生命科学与工程学院;<sup>3</sup>甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 兰州 730030

**摘要:**以牦牛酪蛋白为底物, 游离氨基酸含量为指标, 在超高压条件下分别采用胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和胰酶六种不同的酶水解酪蛋白并筛选出最佳用酶, 并在单因素实验的基础上采用正交实验确定最佳用酶水解酪蛋白的最佳工艺条件。最后探讨水解产物在细胞培养中的应用。结果表明, 胰酶水解效果最好, 用其在底物浓度 15%, E/S=1:5、水解压力 150 MPa, 温度为 45 °C, pH 7.5 条件下水解 4 h 后水解产物中游离氨基酸含量高达 52.18%。酶解产物对 BHK-21 细胞没有细胞毒性, 而具有促生长作用。这为酪蛋白的进一步开发利用和蛋白质水解产物在细胞培养中的应用奠定基础。

**关键词:**超高压; 酶解; 酪蛋白; 氨基酸含量; 细胞培养

中图分类号:Q814.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.005

## Ultra-high Pressure Enzymatic Hydrolysis of Casein and its Application in Animal Cell Culture

JIN Dong-wu<sup>1,2</sup>, WEI Suo-cheng<sup>2</sup>, FENG Yu-ping<sup>1,2</sup>, MA Zhong-ren<sup>1,2,3</sup>, ZHENG Rong<sup>2</sup>, LI Ming-sheng<sup>1,2,3\*</sup><sup>1</sup>The Key Bio-engineering and Technology Laboratory of Nationality Commission Northwest<sup>2</sup>Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities;<sup>3</sup>Engineering Technology Research Center for Animal Cell GanSu, Lanzhou 730030, China

**Abstract:** Yak casein was used as the substrate, the content of free amino acids was used as evaluation index, six different enzymes, including trypsin, pepsin, papain, neutrase, alcalase and pancreatin, were used to hydrolysis casein under ultra-high pressure. The optimal process of casein hydrolysis was optimized by single factor analysis and orthogonal experiments. At the same time, the application of hydrolysates in animal cell culture was investigated. The results showed that pancreatin was more suitable for the hydrolysis of yak casein, the optimal process was as follows: substrate concentration 15%, E/S=1:5, hydrolysis pressure 150 MPa, temperature was 45 °C, pH 7.5 and hydrolyzed for 8 h. Under these conditions, the content of free amino acids of hydrolysate was determined to be 52.18%. The hydrolysates did not appear any toxic to BHK-21 cells when supplemented in the medium, and cells growth well. The study can be served for the further exploitation and utilization of the yak casein and the application of protein hydrolysates in animal cell culture.

**Key words:** ultra-high pressure; enzymatic hydrolysis; casein; amino acids content; cell culture

蛋白水解物是蛋白质经过酶、酸或碱水解之后得到的产品, 其主要成分为肽类, 还包含少量氨基酸、糖类、脂类、矿物质和维生素等物质<sup>[1]</sup>。近 10 年来, 蛋白质水解产物作为无/低血清培养基的添加剂广泛的应用于微生物细胞蛋白表达<sup>[2]</sup>, 哺乳动物细胞的蛋白表达<sup>[3]</sup>、昆虫细胞的蛋白表达<sup>[4]</sup>、疫苗<sup>[5]</sup>

等生物技术领域中。酪蛋白在乳体系中的主要生理作用是新生牛生长所需氨基酸的主要来源。因此, 酪蛋白成为一种重要的蛋白水解物的前体。根据其氨基酸序列大小的不同, 其在生物体内或体外具有免疫调节、抑制细菌和病毒、抗癌、抗氧化和清除自由基、改善元素吸收等生理功能和作用<sup>[6,7]</sup>。从而作为酪蛋白磷酸肽( Casein phosphopeptides, CPPs )、血管紧张素转化酶( Angiotensin converting enzyme, ACE )抑制肽、抗氧化肽( antioxidant peptide )和水解乳蛋白( Lactoalbumin hydrolysate, LH )等生物活性肽

收稿日期:2016-07-04 接受日期:2016-08-31

基金项目:兰州市科技计划(2014-1-158); 中央高校项目(ZYP2015007); 甘肃省科技计划(1504WKCA094)

\* 通讯作者 Tel:86-013919994913; E-mail:limingsheng@xbmu.edu.cn

的原材料。目前,生物技术领域所用的蛋白水解物主要采用酶解法水解制得,但原材料的溶解度、乳化性能及泡沫性能与水解产物的水解度有直接的关系<sup>[8]</sup>,为了提高原材料的溶解度采用物理或化学改性法。而超高压技术是一种物理改性法,是通过给蛋白质体系提供一定的压力而改变蛋白质的结构从而提高蛋白质原本的生物学功能的一种方法<sup>[9,10]</sup>。因此,本文采用超高压协同酶解的方法对酪蛋白的水解方法进行了工艺优化,并将其水解产物作为培养基的添加剂并在动物细胞培养初步进行了应用,为酪蛋白的进一步开发利用和蛋白质水解产物在细胞培养领域中的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

酪蛋白(casein)购自甘肃华羚生物技术有限公司;胰蛋白酶(trypsin)购自兰州百灵生物技术有限公司;胰酶(pancreatin)和胃蛋白酶(pepsin)购自重庆奥力生物制药有限公司;木瓜蛋白酶(papain)购自南宁市天微生物科技有限公司;中性蛋白酶(neutrase)购自南宁庞博生物工程有限公司;碱性蛋白酶(alcalase)由甘肃省动物细胞工程中心提供;水解乳蛋白购自Hyclone公司;叙利亚仓鼠肾细胞(BHK-21)由甘肃省动物细胞工程中心提供;MEM培养基购自兰州百灵生物技术有限公司;新生牛血清购自兰州民海生物工程有限公司,茚三酮缓冲液和茚三酮溶液购自日本Wako公司;PF系统缓冲液购自日本Wako公司;其它试剂均为分析纯。

高压生物反应器,凯兰德科技有限公司;L8900型全自动氨基酸分析仪,日本HITACHI公司;LC-6M离心机,上海市离心机械研究所;LGJ-200F真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;CKX41型倒置生物显微镜,OLYMPUS;Multiskan XK3酶标仪,Theromo。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酶种类的筛选

取酪蛋白适量,按照酶与底物的比例(E/S,w/w)1:5的比例,分别加入碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶和胰酶在各自的适宜条件下酶解牦牛酪蛋白一定时间后,85℃水浴灭活15 min,迅速冷却后于3800 rpm条件下离心20 min,取上清液喷雾干燥后检测游离氨基酸含量,选择最佳水解用酶。各种酶的最佳水解条件见表1。

表1 酶的最佳反应条件<sup>[11,12]</sup>

Table 1 The optimal reaction conditions of enzyme

酶种类 Enzyme	温度 Temperature (°C)	pH
碱性蛋白酶 Alcalase	55	8.0
木瓜蛋白酶 Papain	40	7.0
中性蛋白酶 Neutrase	50	7.0
胰蛋白酶 Trypsin	37	8.0
胃蛋白酶 Pepsin	37	2.0
胰酶 Pancreatin	45	7.5

#### 1.2.2 单因素实验

##### 1.2.2.1 底物浓度对氨基酸含量的影响

超高压酶解酪蛋白过程中,E/S为1:5,水解时间为4 h,压力120 MPa,pH 7.5,温度为45℃,将底物浓度分别设置为7.5%、10%、12.5%、15%、20%。考察底物浓度对氨基酸含量的影响。

##### 1.2.2.2 水解压力对氨基酸含量的影响

超高压酶解酪蛋白过程中,底物浓度为15%,E/S为1:5,水解时间为4 h,pH 7.5,温度为45℃,将水解压力分别设置为60、90、120、150和180 MPa,考察水解压力对氨基酸含量的影响。

##### 1.2.2.3 水解温度对氨基酸含量的影响

超高压酶解酪蛋白过程中,底物浓度为15%,E/S为1:5,水解时间为4 h,压力150 MPa,pH 7.5,将水解温度分别设置为40、45、50、55和60℃,考察水解温度对氨基酸含量的影响。

##### 1.2.2.4 水解pH对氨基酸含量的影响

超高压酶解酪蛋白过程中,底物浓度为15%,E/S为1:5,水解时间为4 h,压力150 MPa,温度为45℃,将水解pH分别设置为6.5、7.0、7.5、8.0和8.5,考察水解pH对氨基酸含量的影响。

#### 1.2.3 正交实验设计

根据单因素实验得出的结果,选择合适的水平采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验确定超高压酶解酪蛋白的最佳工艺参数,正交实验L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)因素水平设计见表2。

##### 1.2.4 游离氨基酸的测定

取超高压酶解酪蛋白产物100 mg溶解至100 mL纯化水中,用5%的三氯乙酸溶液将原液浓度稀释2倍后,8000 rpm离心15 min后,采用L-8900型全自动氨基酸分析仪检测上清液中的游离氨基酸,同时以Hyclone水解乳蛋白为对照。

表 2 正交实验  $L_9(3^4)$  因素水平Table 2 Factors and levels of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors			
	(A) 底物浓度 Substrate concentration (%)	(B) 水解压力 Pressure (MPa)	(C) 水解温度 Temperature (°C)	(D) pH
1	12.5	90	40	7.0
2	15.0	120	45	7.5
3	17.5	150	50	8.0

### 1.2.5 细胞培养及活力分析

用含有 0.25% 酪蛋白水解产物基础培养基 (45% MEM, 45% 欧氏液, 10% FBS) 培养 BHK-21 细胞。同时以 MEM 培养基为空白组, 含有 0.25% Hyclone 水解乳蛋白的基础培养基为对照组。

细胞活力采用 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 法<sup>[13]</sup> 进行分析, 具体步骤为: 将 BHK-21 细胞消化后制成细胞悬液, 按照  $1 \times 10^5$  个/mL 的浓度接种 100  $\mu$ L 与 96 孔板中 37 °C 培养 24 h 后, 将细胞培养液更换为含有 0.25% 和 0.5% 酪蛋白酶解产物的维持液 (48.5% MEM, 48.5% 欧氏液, 3% FBS) 37 °C 培养 48 h, 每孔加入 25  $\mu$ L MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h。小心吸去孔内培养液终止培养。每孔加入 125  $\mu$ L 二甲基亚砜 (DMSO), 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光值。同时以 MEM 培养基为空白组。含有 0.25% Hyclone 水解乳蛋白的基础培养基为对照组。

### 1.2.6 数据处理

每组实验平行三次, 实验数据采用 SPSS 19.0 进行统计分析, 最后结果用均数 ± 标准差 ( $X \pm S$ ) 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶种类筛选结果

根据表 3 可以看出, 胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和胰酶六种酶在超高压条件下水解牦牛酪蛋白后, 其水解产物中的氨基酸顺序从高到低依次为胰酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶、中性蛋白酶, 其中胰酶水解酪蛋白水解产物中的氨基酸含量高达 43.045%。Liu 等<sup>[12]</sup> 人采用六种不同的蛋白酶水解核桃蛋白制备抗氧化生物活性肽, 并分析了水解产物中的游离氨基酸含量, 结果表明胰酶的水解效果最佳, 这与本文的研究结果一致。因此在水解酪蛋白的最佳酶选择胰酶进行进一步研究。

表 3 六种不同酶水解酪蛋白水解产物游离氨基酸含量

Table 3 Free amino acid contents of hydrolysates prepared by six proteases

氨基酸名称 Amino acid	六种不同酶水解酪蛋白游离氨基酸含量 Free amino acid contents of hydrolysates prepared by six proteases (%)					
	中性蛋白酶 Neutrase	碱性蛋白酶 ALcalase	胰蛋白酶 Trypsin	胃蛋白酶 pepsin	木瓜蛋白酶 papain	胰酶 Pancreatin
天冬氨酸 (Asp)	0.044	0.475	0.000	0.204	0.313	1.028
苏氨酸 (Thr)	0.150	0.920	0.053	0.132	0.373	1.831
丝氨酸 (Ser)	0.260	0.946	0.035	0.086	0.541	1.448
天冬酰胺 (AspNH <sub>2</sub> )	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.578
谷氨酸 (Glu)	0.220	3.985	0.000	0.177	0.860	3.835
谷氨酰胺 (GluNH <sub>2</sub> )	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.581
甘氨酸 (Gly)	0.080	0.183	0.055	0.038	0.389	0.326
丙氨酸 (Ala)	0.274	1.152	0.145	0.145	0.566	1.963

氨基酸名称 Amino acid	六种不同酶水解酪蛋白游离氨基酸含量 Free amino acid contents of hydrolysates prepared by six proteases (%)					
	中性蛋白酶 Neutrase	碱性蛋白酶 ALcalase	胰蛋白酶 Trypsin	胃蛋白酶 pepsin	木瓜蛋白酶 papain	胰酶 Pancreatin
缬氨酸(Val)	0.493	1.601	0.434	0.337	0.362	2.856
胱氨酸(Cys)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.244	0.911
蛋氨酸(Met)	0.100	0.558	0.306	0.334	0.428	1.902
异亮氨酸(Ile)	0.705	0.764	0.253	0.251	0.614	2.484
亮氨酸(Leu)	0.683	3.588	1.120	1.366	1.988	6.422
酪氨酸(Tyr)	0.986	1.663	2.007	0.744	1.307	0.508
苯丙氨酸(Phe)	1.114	1.682	1.462	1.319	1.340	3.232
赖氨酸(Lys)	0.415	1.307	1.680	0.160	1.646	6.119
组氨酸(His)	0.029	0.590	0.251	0.007	0.252	1.163
精氨酸(Arg)	0.278	1.023	1.179	0.146	1.293	2.858
氨基酸总含量 Total amino acid content	5.830	20.437	8.979	5.445	12.514	43.045

注:结果为三次平行实验的平均值。

Note: Values were given as mean from triplicate determinations.

## 2.2 单因素实验结果

由图1A可以看出,随着底物浓度的增加氨基酸含量也随之增加,在7.5%~15%范围内,氨基酸含量随着底物浓度的增加同比例的增加( $P < 0.05$ ),在15%~20%范围内,氨基酸含量变化不明显( $P > 0.05$ ),说明底物浓度过高会影响酪蛋白的水解效果,这可能是因为底物浓度过高,酶的含量随之增加,从而酶在溶液中的溶解度降低,随之与底物的接触机会减少。由此,底物浓度为15%最佳。

由图1B可以看出,随着水解压力的增加氨基酸含量呈先增后减的趋势,在60~120 MPa范围内,氨基酸明显增加( $P < 0.01$ );在120~150 MPa之

间,氨基酸含量有所增加( $P < 0.05$ );在150 MPa氨基酸含量达到最大值,为48.855%,在150~180 MPa氨基酸含量略有下降( $P > 0.05$ )。由此,水解压力为150 MPa最佳。

由图1C可以看出,随着水解温度的上升氨基酸含量呈先增后减的趋势,在40~50 °C范围内,氨基酸明显增加( $P < 0.05$ );在50 °C达到最大值为49.564%,在50~55 °C氨基酸含量缓慢降低( $P > 0.05$ );在55~60 °C氨基酸含量急剧降低( $P < 0.01$ )。由此,水解温度为50 °C最佳。

由图1D可以看出,随着水解pH的增加氨基酸含量呈先增后减的趋势,在6.5~7.5范围内,氨基

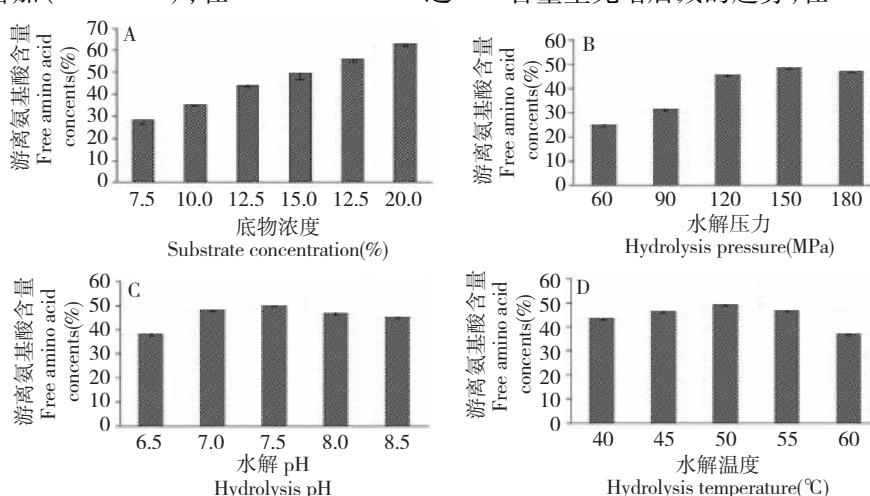


图1 底物浓度(A)、压力(B)、pH(C)及温度(D)对氨基酸含量的影响

Fig. 1 Effect of substrate concentration (A), pressure (B), pH (C) and temperature (D) on amino acid content

酸含量明显上升( $P < 0.05$ )；在7.5时达到最大值为50.523%；在7.5~8.5之间，氨基酸含量明显下降( $P < 0.05$ )，由此，水解pH为7.5最佳。

### 2.3 正交实验结果

由表4的极差R得出影响水解产物中氨基酸含量的主次顺序为B(水解压力)>A(底物浓度)>D(水解pH)>C(水解温度)；根据九实验的结果得

表4 正交实验结果与分析  
Table 4 Results of orthogonal test

实验号 No.	因素 Factors				氨基酸含量 Amino acid content (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	31.271
2	1	2	2	2	40.326
3	1	3	3	3	44.381
4	2	1	2	3	35.683
5	2	2	3	1	47.594
6	2	3	1	2	48.996
7	3	1	3	2	36.569
8	3	2	1	3	46.258
9	3	3	2	1	48.811
K1	38.658	34.508	42.175	42.557	
K2	44.091	44.726	41.606	46.044	
K3	43.879	47.391	42.848	42.107	
极差 R	5.433	12.883	1.242	3.937	
主次顺序			B > A > D > C		
最优组合			A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> D <sub>2</sub>		

### 2.4 超高压酶解酪蛋白产物中的氨基酸分析

根据图2和表5可以看出，超高压酶解酪蛋白产物与Hyclone水解乳蛋白均有19种相同的氨基酸，并且每种氨基酸的含量均高于Hyclone水解乳蛋白氨基酸含量( $P < 0.01$ )，其总量分别为24.340%和52.178%。这说明超高压对酪蛋白的

出，最佳实验组合为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>；根据K<sub>i</sub>值得知，实验的最佳组合为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>。经验证，A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>的氨基酸含量为47.532%，A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>的氨基酸含量为52.178%；由此，超高压酶解酪蛋白的最佳工艺为：底物浓度15%，水解压力为150 MPa，温度为50℃，pH为7.5。

酶解效果具有很好的作用。这可能是因为超高压技术能够诱导蛋白质变性使其疏水键和盐桥破坏<sup>[14]</sup>，从而增加蛋白质自溶液中的溶解度，从而使酶与底物充分作用。另外超高压技术对奶制品中的食源性微生物具有很好的灭活作用<sup>[10]</sup>，从而减少了在水解过程中微生物对氨基酸的消耗。

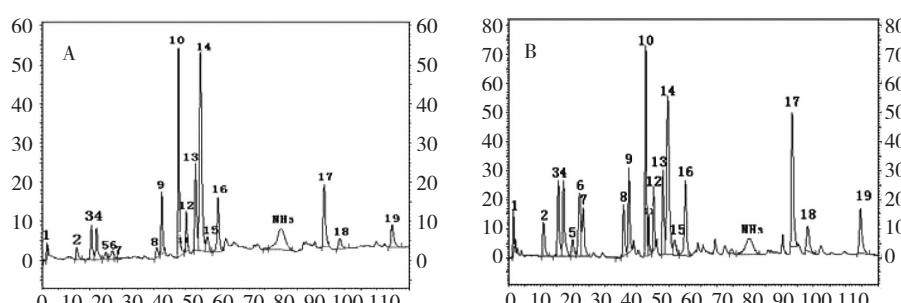


图2 Hyclone水解乳蛋白(A)和超高压酶解酪蛋白产物(B)氨基酸分析图谱

Fig. 2 Amino acid chromatograms of hyclone hydrolysate (A) and sample (B)

表 5 Hyclone 水解乳蛋白和超高压酶解酪蛋白产物中氨基酸含量对照表  
Table 5 Amino acids composition of hyclone hydrolysate and sample

序号 No.	氨基酸名称 Amino acid	Hyclone (%)	超高压 Ultra-high pressure (%)	序号 No.	氨基酸名称 Amino acid	Hyclone (%)	超高压 Ultra-high pressure (%)
1	磷酸丝氨酸(P-Ser)	0.291	1.024	11	胱氨酸(Cys)	0.053	1.351
2	天冬氨酸(Asp)	0.358	1.301	12	蛋氨酸(Met)	0.952	1.933
3	苏氨酸(Thr)	0.832	2.503	13	异亮氨酸(Ile)	2.328	3.095
4	丝氨酸(Ser)	0.684	2.241	14	亮氨酸(Leu)	6.357	6.903
5	天冬酰胺(AspNH <sub>2</sub> )	0.592	1.918	15	酪氨酸(Tyr)	0.786	1.233
6	谷氨酸(Glu)	0.533	4.196	16	苯丙氨酸(Phe)	2.005	3.926
7	谷氨酰胺(GluNH <sub>2</sub> )	0.054	2.550	17	氨(NH <sub>3</sub> )	0.272	0.245
8	甘氨酸(Gly)	0.079	0.456	18	赖氨酸(Lys)	2.331	6.396
9	丙氨酸(Ala)	1.109	2.028	19	组氨酸(His)	0.658	1.947
10	缬氨酸(Val)	2.748	3.431	20	精氨酸(Arg)	1.318	3.501

## 2.5 BHK-21 细胞贴壁培养结果

BHK-21 细胞贴壁培养结果表明,在 24 h 时空白组、实验组和对照组的细胞均能生长至 50% 以上;在 48 h 均生长成致密单层,细胞生长正常,形态良好。但在 24 h 实验组和对照组的细胞密度明显高于空白组。这说明 Hyclone 水解乳蛋白和超高压酶解酪蛋白产物对 BHK-21 细胞均有促生长作用。

## 2.6 MTT 法细胞活力分析结果

根据图 4 可以看出,用含有 Hyclone 水解乳蛋白和超高压酶解酪蛋白产物的 MEM 培养基处理 48 h 的 BHK-21 细胞与空白组比较均有较高的存活率,并具有明显差异( $P < 0.05$ )。其中对照组、实验组(0.25% zz)和实验组(0.5% zz)的细胞存活率分别为 1.281%、1.373% 和 1.618%。因此,MTT 分析证实,超高压酶解酪蛋白产物对 BHK-21 细胞没有细胞毒性,反而具有促生长作用,这与 BHK-21 细胞贴壁培养的结果相符合。

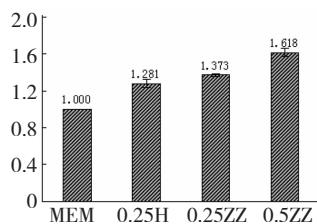


图 4 BHK-21 细胞存活率结果

Fig. 4 Results of cell viability of BHK-21 cells

## 3 结论

超高压结合胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、

中性蛋白酶、碱性蛋白酶和胰酶六种不同的酶解酪蛋白,超高压结合胰酶的酶解效果最好,其氨基酸含量达到 47.187%。超高压胰酶解酪蛋白的最佳工艺为底物浓度 15%,水解压力为 150 MPa,温度为 50 °C, pH 为 7.5 条件下水解 4 h。在该条件下制备的酪蛋白酶解产物与 Hyclone 水解乳蛋白相比,均有 19 种相同的氨基酸,其总含量高于 Hyclone 水解乳蛋白,分别为 52.178% 和 24.340%。超高压酶解酪蛋白产物对 BHK-21 细胞没有细胞毒性,而具有促生长作用。这为蛋白质水解产物在细胞培养中的应用奠定了基础。

## 参考文献

- Gu RZ(谷瑞增),Liu Y(刘艳),Lin F(林峰),et al. Application and research progress of protein hydrolysates in animal cell culture. *Biotechnol Bull(生物技术通报)*,2012,9:21-27.
- Frachon E,Bondet V,Munier-Lehmann H,et al. Multiple microfermentor battery:a versatile tool for use with automated parallel cultures of microorganisms producing recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Appl Environ Microbiol*,2006,72:5225-5231.
- Kunert R,Gach J,Katinger H. Expression of a Fab fragment in CHO and *Pichia pastoris*. A comparative case study. *Bio Proc Int*,2008,6(4):34-40.
- Mendonça RZ,Oliveira EC,Pereira CA,et al. Effect of bioactive peptides isolated from yeastolate,lactbyumin and NZ-Case in the insect cell growth. *Bioproc Biosystems Eng*,2007,30:157-164.

(下转第 1928 页)