

研究论文

谷氨酸棒杆菌合成生物絮凝剂分批 发酵过程的动力学模拟

安仲涛, 李清彪, 何 宁, 陈仁彬, 江新德, 杨 坤
(厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 福建 厦门 361005)

摘要: 对谷氨酸棒杆菌生产生物絮凝剂的分批发酵过程进行了动力学研究。以 Logistic 方程来描述菌体生长过程, 并对 Gaden 生长相关模型进行了修正, 加入时间修正因子, 建立了产物生成动力学模型, 同时还提出了关于葡萄糖和尿素的两个非线性基质消耗动力学模型。利用软件 Origin 8.0 对实验数据进行拟合, 结果显示各模型均能较好地描述谷氨酸棒杆菌合成生物絮凝剂的分批发酵过程。

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 生物絮凝剂; 分批发酵; 动力学

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

文章编号: 0438- 1157 (2009) 12- 3071- 06

Kinetic models for biofloculant fermentation from *Corynebacterium glutamicum*

AN Zhongtao, LI Qingbiao, HE Ning, CHEN Renbin, JIANG Xinde, YANG Kun
(Department of Chemical and Biochemical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: Kinetic models were developed for the batch fermentation of biofloculant from *Corynebacterium glutamicum*. Logistic equation and time-corrected modified Gaden's growth-associated model were used to describe the cell growth and the biofloculant synthesis, respectively. Two kinetic models in the format of nonlinear equations were proposed to predict the consumption of glucose and urea. Curve fittings for the above models by using experimental data were performed with the software Origin 8.0. The results showed that the four models proposed in the work could well characterize the batch culture of *C. glutamicum* in biofloculant production.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; biofloculant; batch fermentation; kinetics

引 言

生物絮凝剂是利用生物技术, 通过微生物发酵获得的一种高效、新型水处理剂。不同于无机和有机合成高分子絮凝剂, 利用大规模的微生物培养可以实现生物絮凝剂的高效生产^[1]。生物絮凝剂以其

安全、可降解、无二次污染的独特性能正在成为环保生物新材料的一个重要研究方向。

当前对生物絮凝剂的研究仍停留在初级阶段, 主要集中在产生菌的筛选, 生物絮凝剂的结构、性质、絮凝机理以及应用等方面。Shih 等^[2]对 *Bacillus licheniformis* CCRC 12826 以柠檬酸、谷

2009- 05- 11 收到初稿, 2009- 09- 08 收到修改稿。

联系人: 何宁。第一作者: 安仲涛 (1984), 男, 硕士研究生。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30700020); 厦门市科技计划项目 (3502Z20093006)。

Received date: 2009- 05- 11.

Corresponding author: HE Ning, hening@xmuel.edu.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (30700020) and the Science and Technology Project of Xiamen (3502Z20093006).

氨酸、甘油为碳源生产的胞外生物絮凝剂的性质进行了详细的分析; Lu 等^[3]研究了 *Enterobacter aerogenes* W223 生产的生物絮凝剂 WF21 的分子组成, 并将其应用于澄清天然碱泥; Fujita 等^[4]对 *Citrobacter sp1* TKF04 利用乙酸、丙酸生产生物絮凝剂的特性进行了研究。

生物絮凝剂发酵过程动力学模型也已有一些报道, 如康建雄等^[5]和崔玉海^[6]都采用 Logistic 方程和 Luedeking-Piret 方程, 并对碳源消耗进行分析, 建立了出芽短梗霉菌体生长、生物絮凝剂普鲁兰合成和底物消耗动力学模型, 3 个动力学方程可以较好地反映出芽短梗霉在菌体生长、普鲁兰多糖合成及玉米淀粉水解物消耗的特征; 刘占英等^[7]采用 Logistic 方程和 Luedeking-Piret 方程对盲肠肠球菌生产生物絮凝剂的发酵过程进行了模拟。尽管这些模型都能较好地模拟絮凝剂的发酵过程, 但是模型中涉及的菌体、产物以及碳源的初始浓度均为模型拟合得出的结果, 因此, 并不适合直接用于发酵过程的预测模拟。

许多文献也对谷氨酸棒杆菌发酵过程的数学模拟进行了报道, 但这些模型大都是针对氨基酸合成发酵过程。Zhang 等^[8]提出了一组经验性、非线性、时间依赖型的动力学模型描述谷氨酸发酵过程中分阶段的菌体生长、底物消耗和产物生成; Khan 等^[9]测定了底物(葡萄糖)对谷氨酸棒杆菌生长限制/抑制的浓度范围, 通过修饰 Monod 方程对发酵过程中谷氨酸对菌体生长产生的抑制情况进行描述; Bona 等^[10]利用修饰的 Logistic 方程对生物素限制情况下谷氨酸棒杆菌菌体生长进行模拟比较; Gayen 等^[11]提出唯象模型描述不同起始糖浓度下发酵过程的不同阶段中谷氨酸棒状杆菌菌体生长和赖氨酸生产; Yang 等^[12]基于关键代谢节点的物质平衡方程, 建立了数学模型描述谷氨酸棒杆菌胞内赖氨酸的合成过程。

可见, 无论絮凝剂的生物合成, 还是谷氨酸棒杆菌发酵过程, 目前所用的菌体生长模型都为经典的经验模型, 如 Monod 方程和 Logistic 方程或其修饰形式, 产物生成模型大多使用 Luedeking-Piret 方程和 Gaden 生长相关/非生长相关模型。经典的经验模型将细胞视为单组分, 不考虑细胞成分的复杂性, 并忽略环境变化对细胞组成的影响, 以速率方程的形式表达控制体内各种物质的转化, 因此, 经典的数学模型往往能够广泛地应用于微生物

的发酵过程, 并且可以根据需要进行修饰, 实现对某一具体发酵过程更好地描述, 具有极大的适用性和灵活性。本论文即利用经典的数学模型模拟谷氨酸棒杆菌合成一种新型生物絮凝剂的分批发酵过程, 探求絮凝剂发酵过程规律, 以期为其后续的生产过程预测和控制提供指导。

本研究所用生物絮凝剂产生菌谷氨酸棒杆菌由本课题组自筛得到^[13], 在前期工作中对该菌合成絮凝剂的培养条件及基本代谢特征已进行了系统研究^[14,17], 该菌合成的絮凝剂是一种蛋白聚糖类新型絮凝剂, 絮凝效率高, 适用范围广, 显示出潜在的产业化价值^[15]。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 实验所用菌种是谷氨酸棒杆菌, 现保藏于中国典型培养物保藏中心, 编号 CCTCC M201005。

1.1.2 培养基 斜面培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 葡萄糖 5, 酵母膏 1, 牛肉膏 1, 胰蛋白胨 2, 琼脂 15, 硫酸亚铁微量, pH 7.2。

种子培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 葡萄糖 10, 酵母膏 0.5, 尿素 0.5, 磷酸二氢钾 0.1, 磷酸氢二钾 0.1, 氯化钠 0.1, 硫酸镁 0.2, pH 8.0。

发酵培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 葡萄糖 10, 酵母膏 1, 尿素 1, 磷酸二氢钾 0.1, 磷酸氢二钾 0.1, 氯化钠 0.1, 硫酸镁 0.2, pH 8.0。

1.2 实验方法

1.2.1 培养条件 斜面种子培养: 于新鲜斜面取一环菌, 接入斜面(划线), 28℃, 恒温培养箱培养约 16 h 后, 4℃ 冰箱保存。

摇瓶种子培养: 于斜面取两环菌, 接入种子培养基 (100 ml/250 ml 锥形瓶), 28℃, 150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 16 h。

小罐分批培养: 将培养 16 h 的种子液以 5% 的接种量接入装有 2 L 发酵液的 3 L 发酵罐中, 通气量 1 $\text{L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 搅拌转速 100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 28℃, 初始 pH 8.0。溶氧与 pH 在线自动检测, 在发酵过程中不作调整。

1.2.2 菌体生长量测定 干重法 (dry cell weight, DCW)。

1.2.3 葡萄糖检测 DNS 比色法^[18]。

1.2.4 尿素残余量检测 对二甲氨基苯甲醛

(PDAB) 比色法^[19]。

1.2.1.5 产物活性测定 高岭土活性测定法^[20,21], 以 F1 R1 (flocculating rate, U # ml⁻¹) 表示。

2 结果与讨论

2.1 谷氨酸棒杆菌分批发酵生成生物絮凝剂的过程曲线

谷氨酸棒杆菌 CCTCC M201005 合成生物絮凝剂的分批发酵过程曲线如图 1 所示。

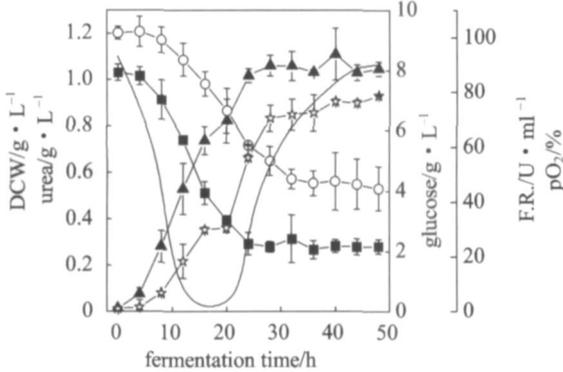


图 1 谷氨酸棒杆菌分批发酵生物絮凝剂过程曲线

Fig 1 Time courses of batch fermentation of biofloculant by *Cl glutamicum*
w DCW; u urea; o glucose; m F1 R1;))) pO₂

由图 1 可见, 谷氨酸棒杆菌合成生物絮凝剂的发酵过程中, 葡萄糖初始浓度为 10 g # L⁻¹ 时, 已经不成为限制菌体生长的营养因素 (发酵结束葡萄糖残留浓度 > 4.5 g # L⁻¹)。作者进一步尝试将初始葡萄糖浓度提高到 100 g # L⁻¹, 谷氨酸棒杆菌的生长开始受到明显的抑制 (DCW < 0.67 g # L⁻¹)。因此在本论文中讨论谷氨酸棒杆菌分批发酵产生生物絮凝剂的动力学模型时, 不考虑葡萄糖受限和底物抑制的影响。

2.1.2 菌体生长模型的建立

作者分别尝试利用 Logistic 方程^[22]、Gompertz 方程^[7]和 Richards 方程^[23]对谷氨酸棒杆菌菌体生长过程进行描述, 结果表明 3 个方程都能达到很好的拟合效果, 相关系数 R² 分别为 0.9698、0.9739 和 0.9733。考虑到 Logistic 方程中的参数少, 并且都有明确的物理意义^[7], 所以选择 Logistic 方程作为谷氨酸棒杆菌合成蛋白聚糖类生物絮凝剂发酵过程的菌体生长模型。

Logistic 方程为

$$\frac{dC_X}{dt} = L_m C_X \left(1 - \frac{C_X}{C_{X,max}} \right) \quad (1)$$

积分得

$$C_X = \frac{C_{X,0} \exp(L_m t)}{1 - \frac{C_{X,0}}{C_{X,max}} [1 - \exp(L_m t)]} \quad (2)$$

对以上动力学方程结合多批实验数据用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合, 求得 Logistic 方程中的参数: L_m = 0.351 h⁻¹, C_{X,max} = 11.027 g # L⁻¹, R² = 0.9698, C_{X,0} 的数值为菌体初浓度的实验测定值。以 C_{X,0} = 0.013 g # L⁻¹ 利用 Logistic 模型通过 Origin 8.0 软件进行菌体生长的模拟并与实验结果进行比较, 结果如图 2 所示。

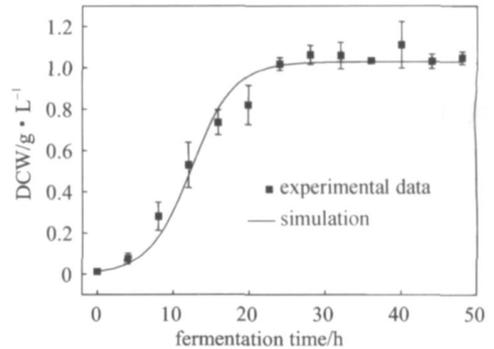


图 2 Logistic 方程模拟谷氨酸棒杆菌菌体生长曲线

Fig 2 Experimental data and simulation of biomass concentration with Logistic equation in batch culture of *Cl glutamicum*

由图 2 可见, 该模型的模拟结果与实验结果能够较好吻合。

2.1.3 产物生成模型的建立

由图 1 可见, 生物絮凝剂的合成过程与菌体的生长过程基本偶联, 故采用 Gaden^[24] 提出的生长相关模型来模拟产物的生成。Gaden 生长相关模型动力学方程可用产物生成速率与菌体生长速率的关联式表示

$$r_P = Y_{P/X} r_X = Y_{P/X} \frac{dC_X}{dt} \quad (3)$$

将式 (3) 积分并将式 (2) 求得的参数结果代入, 得产物生成量方程

$$C_P = \frac{C_{X,0} Y_{P/X} \exp(0.351t)}{1 - \frac{C_{X,0}}{11.027} [1 - \exp(0.351t)]} + C_{P,0} \quad (4)$$

以该模型对谷氨酸棒杆菌的絮凝剂合成过程进行拟合 (R² = 0.7815, 图略), 结果表明, 该模型虽然在发酵的前 12 h 拟合效果较好, 但发酵后期拟合效果较差, 因此, 需对模型进行修饰。

由图 1 可见, 接种后的一段时间内菌体表现为生长, 产生絮凝剂量微小, 把这段时间称为产物生

成相对菌体生长的延迟期^[25], 式 (3) 引入时间修正因子 t_d 修饰为

$$r_p = Y_{p/x} \frac{dC_x}{d(t - t_d)} \quad (5)$$

$$C_p = Y_{p/x} \left\{ \frac{C_{x,0} \exp[\alpha 351(t - t_d)]}{1 - \frac{C_{x,0}}{11.027} \{1 - \exp[\alpha 351(t - t_d)]\}} - \frac{C_{x,0} \exp(-0.1351 t_d)}{1 - \frac{C_{x,0}}{11.027} [1 - \exp(-0.1351 t_d)]} \right\} + C_{p,0} \quad (6)$$

结合多批实验数据对式 (6) 用 Origin 8.0 进行非线性拟合, 求得: $Y_{p/x} = 681.076 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, $t_d = 41.328 \text{ h}$, $R^2 = 0.9071$. $C_{x,0}$ 、 $C_{p,0}$ 的数值分别为细胞初始浓度和初始产物活性的实验测定值。以 $C_{x,0} = 0.013 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{p,0} = 0.767 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 利用加入时间修正因子 t_d 后的 Gaden 生长相关模型通过 Origin 8.0 软件进行产物合成过程曲线模拟, 并与实验结果进行比较, 结果如图 3 所示。

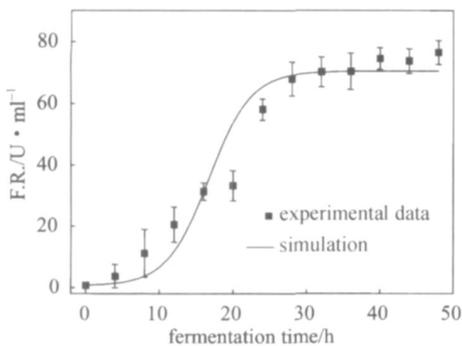


图 3 修正的 Gaden 相关模型模拟生物絮凝剂合成曲线
Fig 3 Experimental data and simulation of biofloculant production with modified Gaden's growth-associated model in batch culture of *C. glutamicum*

由图 3 可见, 加入时间修正因子 t_d 修饰后, Gaden 生长相关模型能够较好地描述絮凝剂的分批发酵过程。

作者曾尝试采用 Luedeking-Piret 方程来对絮凝剂的整个发酵过程进行模拟 (图略), 虽然初期阶段 ($< 16 \text{ h}$) 模拟效果有所提高 ($R^2 = 0.9326$), 但进入对数期, 即生物絮凝剂的大量积累期后, Luedeking-Piret 方程的模拟效果很差。因此, 最终选择修正的 Gaden 生长相关模型用以描述谷氨酸棒杆菌分批发酵合成生物絮凝剂过程。

2.1.4 底物消耗模型

葡萄糖与尿素是絮凝剂合成过程中两种重要的营养因子, 建立它们的消耗模型对节约能源与经济最优化都有很大意义。

2.1.4.1 葡萄糖消耗动力学模型

将式 (5) 积分并将式 (2) 求得的参数结果代入, 得产物生成方程

消耗可近似分为三部分: 一部分用于菌体的自身生长, 一部分用于产物合成, 一部分用于菌体的维持代谢^[26]。方程形式为

$$\frac{dC_s}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dC_x}{dt} + \frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dC_p}{dt} + mC_x \quad (7)$$

对式 (7) 积分并进行拟合, 结果显示 $m = -0.0385 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 忽略该项, 于是得到式 (7) 的积分简化式

$$C_s = \frac{1}{Y_{x/s}} C_x + \frac{1}{Y_{p/s}} C_p + C_{s,0} \quad (8)$$

结合多批实验数据对式 (8) 进行拟合, 得到: $Y_{x/s} = -11.379 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, $Y_{p/s} = -171.502 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, $R^2 = 0.8831$. $C_{s,0}$ 的数值为葡萄糖初始浓度的实验测定值, 以 $C_{x,0} = 0.013 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{s,0} = 91.246 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对式 (8) 利用 Origin 8.0 软件进行葡萄糖消耗的模拟并与实验结果进行比较, 结果见图 4。

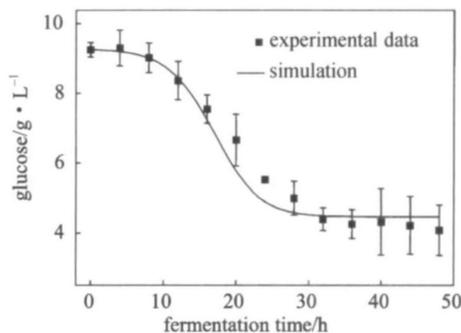


图 4 葡萄糖消耗模型模拟曲线与实验结果
Fig 4 Experimental data and simulation of glucose consumption in batch culture of *C. glutamicum*

由图 4 可见, 葡萄糖消耗动力学模型能很好地描述谷氨酸棒杆菌合成生物絮凝剂发酵过程中葡萄糖的消耗。28 h 后模拟曲线趋于平稳, 说明菌体生长进入稳定期、产物含量趋于平稳后, 菌体基本不再消耗葡萄糖。

2.1.4.2 尿素消耗动力学模型 前期的研究表明, 谷氨酸棒杆菌 CCTCC M201005 合成的生物絮凝剂主要活性成分是聚半乳糖醛酸^[14], 据此推测尿素的消耗可能主要用于菌体的生长过程。

尿素消耗模型可表示为

$$\frac{dC_U}{dt} = \frac{1}{Y_{XU}} \frac{dC_X}{dt} \quad (9)$$

积分得

$$C_U = \frac{1}{Y_{XU}} C_X + C_{U,0} \quad (10)$$

结合多批实验数据对式 (10) 用 Origin 8.1.0 进行非线性拟合, 结果得到: $Y_{XU} = -11.472 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, $R^2 = 0.9670$ 。 $C_{U,0}$ 的数值为尿素初浓度实验测定值。以 $C_{U,0} = 11.031 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{X,0} = 0.013 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 利用式 (10) 对尿素消耗进行模拟, 模拟结果如图 5 所示。

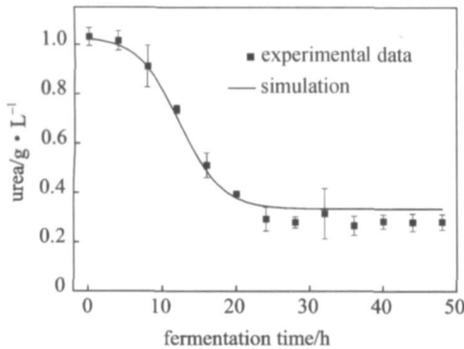


图 5 尿素消耗模型模拟曲线与实验结果

Fig 5 Experimental data and simulation of urea consumption in batch culture of *C. glutamicum*

由图 5 可见, 以式 (10) 对谷氨酸棒杆菌合成生物絮凝剂发酵过程中尿素消耗过程进行模拟, 与实验数据能够很好地吻合, 表明该模型能够很好地描述尿素消耗过程, 同时证实了尿素的消耗主要用于菌体的生长过程。

3 结论

本研究在利用 Origin 8.1.0 软件进行多批数据非线性拟合过程中, 以实验测定的菌体、碳源、氮源初始浓度和初始产物活性值为相应的参数计算起始值, 其他参数 (L_m , $C_{X,max}$, $Y_{P/X}$, t_d , $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, $Y_{X/U}$) 设置为共享, 进而对实验数据进行拟合, 求得了实验控制条件下 L_m , $C_{X,max}$, $Y_{P/X}$, t_d , $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, $Y_{X/U}$ 的最优拟合值, 分别建立了 Logistic 方程、修正的 Gaden 生长相关模型、葡萄糖消耗模型和尿素消耗模型, 并根据 $C_{X,0}$, $C_{S,0}$, $C_{U,0}$, $C_{P,0}$ 等初始条件对发酵过程进行了模拟。结果表明, 4 个模型都能够较好地模拟 *C. glutamicum* 合成蛋白聚糖类生物絮凝剂的分批发酵过程。

本研究采用的参数属性设置方式使该模型可以在实验控制条件下预测不同初始接种条件下的絮凝剂分批发酵过程。分别以初始菌浓为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对絮凝剂的分批发酵过程进行模拟预测, 发现初始菌浓增大能够缩短菌体生长的延迟期和达到最大菌量的时间, 使产物合成周期缩短。初始菌浓在 0.01~0.03 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对产物合成的影响最为明显, 当初始菌浓提高到 0.06 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时对絮凝剂的合成周期不再有显著影响。这一预测结果可以实现通过改变接种条件控制絮凝剂的合成过程, 缩短发酵周期, 降低絮凝剂的生产成本, 对于谷氨酸棒杆菌合成生物絮凝剂的发酵过程具有重要的指导意义。

符号说明

- C_P))) 产物絮凝活性, $U \cdot \text{ml}^{-1}$
- $C_{P,0}$))) 产物絮凝初始活性, $U \cdot \text{ml}^{-1}$
- C_S))) 葡萄糖浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
- $C_{S,0}$))) 葡萄糖初始浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
- C_U))) 尿素浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
- $C_{U,0}$))) 尿素初始浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
- C_X))) 菌体浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
- $C_{X,m}$))) 最大菌体浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
- $C_{X,0}$))) 菌体初始浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
- m))) 细胞的维持系数, $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
- r_P))) 产物活性生成速率, $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- r_X))) 菌体生成速率, $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- t))) 发酵时间, h
- $Y_{P/S}$))) 相对于葡萄糖的产物活性得率系数, $U \cdot \text{g}^{-1}$
- $Y_{P/X}$))) 相对于菌体的产物活性得率系数, $U \cdot \text{g}^{-1}$
- $Y_{X/S}$))) 相对于葡萄糖的菌体得率系数, $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
- $Y_{X/U}$))) 相对于尿素的菌体得率系数, $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
- L))) 菌体比生长速率, h^{-1}
- L_m))) 最大菌体比生长速率, h^{-1}

References

- [1] Salehizadeh H, Shojaosadati S Al Extracellular biopolymeric flocculants recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 2001, 9: 372-385
- [2] Shih I L, Van Y T, Yeh L C, Lin H G, Chang Y N. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus Licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresour Technol*, 2001, 78: 267-272
- [3] Lu W Y, Zhang T, Zhang D Y, Li C H, Wen J P, Du L X. A novel bioflocculant produced by *Enterobacter aerogenes*

- and its use in defecating the trona suspensionl *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 27: 127
- [4] Fujita M, Ike M, Taxhibana S, Kitada G, Kim S Ml Characterization of a bioflocculant produced by *Citrobacter spli* TKF04 from acetic and propionic acids *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89 (1): 40246
- [5] Kang Jianxiong (康建雄), Meng Shaokui (孟少魁), Wu Lei (吴磊). Model of fermentation dynamics based on bioflocculant pullulan production by *Aureobasidium pullulans*l *Journal of Harbin Institute of Technology (哈尔滨工业大学学报)*, 2005, 37 (10): 13721372
- [6] Cui Yuhai (崔玉海). Fermentation conditions of *Aureobasidium pullulans* Q258 and its kinetic study [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008
- [7] Liu Zhanying (刘占英), Zhang Tong (张通), Zhang Dongyan (张冬艳), Kang Ru (康茹), Tian Chun (田春), Zhang Jianbin (张建斌). Kinetic models of bioflocculant producing strain under batch fermentationl *Journal of Inner Mongolia University of Technology (内蒙古工业大学学报)*, 2007, 26 (2): 932100
- [8] Zhang X W, Sun T, Sun Z Y, Liu X, Gu D Xl Time2 dependent kinetic models for glutamic acid fermentationl *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 22 (3): 2052209
- [9] Khan N S, Mishra I M, Singh R P, Prasad B Modeling the growth of *Corynebacterium glutamicum* under product inhibition in L2glutamic acid fermentationl *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 25: 1732178
- [10] Bona R, Moser Al Modelling of growth of *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitationl *Bioprocess Engineering*, 1997, 17: 122125
- [11] Gayen K, Venkatesh K Vl A phenomenological model to represent the kinetics of growth by *Corynebacterium glutamicum* for lysine productionl *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007, 34: 3632372
- [12] Yang C, Hua Q, Shimizu Kl Development of a kinetic model for L2lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* and its application to metabolic control analysisl *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 88 (4): 3932403
- [13] He Ning (何宁), Wu Haijun (吴海军), Deng Xu (邓旭), Lu Yinghua (卢英华), Sun Daohua (孙道华), Li Qingbiao (李清彪). Mutagenesis and screening for a strain with high capacity of bioflocculant productionl *Industrial Microbiology (工业微生物)*, 2004, 34 (3): 7211
- [14] He N, Li Y, Chen J, Lun S Yl Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated *Corynebacterium glutamicum*l *Biochemical Engineering Journal*, 2002, 11: 1372148
- [15] He N, Li Y, Chen J Production of a novel polygalacturonic acid bioflocculant REA211 by *Corynebacterium glutamicum*l *Bioresource Technology*, 2004, 94: 992105
- [16] He Ning (何宁), Li Yin (李寅), Chen Jian (陈坚), Li Qingbiao (李清彪). Control module for dissolved oxygen in a novel bioflocculant production from *Corynebacterium glutamicum*l *Acta Scientiae Circumstantiae (环境科学学报)*, 2004, 24 (3): 4922497
- [17] He Ning (何宁), Li Yin (李寅), Chen Jian (陈坚). Metabolic network modeling and metabolic flux analysis of production of novel bioflocculant REA211l *Journal of Chemical Industry and Engineering (China) (化工学报)*, 2005, 56 (4): 682688
- [18] Miller G Ll Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugarl *Analytical Chemistry*, 1959, 31 (3): 422428
- [19] Jiang Mengyang (蒋萌阳), Bao Miaoqing (包淼清). Measuring amount of carbamide with P2aminobenzen2 formaldehyde colorimetryl *Zhejiang Chemical Industry (浙江化工)*, 2005, 36 (3): 36238
- [20] He Ning (何宁), Li Yin (李寅), Chen Jian (陈坚). Production and flocculation conditions of a novel glycoprotein bioflocculantl *The Chinese Journal of Process Engineering (过程工程学报)*, 2002, 2 (1): 62266
- [21] Guan Huiqin (关惠琴), He Ning (何宁), Du Guocheng (堵国成), Chen Jian (陈坚). Biosynthetic pathway of a novel bioflocculant consisting of galacturonic acid as the functional structural unit produced by *Corynebacterium glutamicum*l *Journal of Wuxi University of Light Industry (无锡轻工大学学报)*, 2003, 22 (4): 713
- [22] Wu Qiuli (武秋立), An Jiayan (安家彦). Kinetic models for exopolysaccharides of *Morchella esculenta* by fermentationl *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis (南开大学学报: 自然科学版)*, 2005, 38 (1): 43248
- [23] Zeng Wenlu (曾文炉), Cai Zhaoling (蔡昭铃), Ouyang Fan (欧阳藩). Studies on the growth characteristics of *Spirulina* cells under batch and continuous conditionsl *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2001, 17 (4): 412419
- [24] Gaden E L Jll Fermentation process kineticsl *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1959, 1 (4): 4132419
- [25] Wang D, Xu Y, Hu J, Zhao Gl Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*l *Journal of the Institute of Brewing*, 2004, 110 (4): 342346
- [26] Kurance R, Toeda K, Takeda K, Suzuki Tl Culture conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*l *Agricultural Biology and Chemistry*, 1986, 50: 23022313