

研究论文

初始生物素含量波动时谷氨酸发酵关键酶系的 酶活变化模式

曹 艳, Enock Mpofu, 丁 健, 段作营, 史仲平

(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 谷氨酸发酵培养基中的生物素初始含量会随玉米浆来源、批次的不同出现波动, 进而影响谷氨酸发酵性能和稳定性。本文研究分析了谷氨酸发酵中, 初始生物素含量正常/不当, 特别是初始含量不当、采取补救措施条件下的丙酮酸、异柠檬酸和 α -酮戊二酸代谢节点处关键酶的活性变化。生物素匮乏时, 催化主代谢途径的关键酶活性均被弱化, 特别是 α -酮戊二酸脱氢酶完全失活, 能量代谢主要靠乙醛酸循环维持。当发现生物素匮乏并补加生物素后, 中心代谢途径关键酶——丙酮酸脱氢酶的活性恢复到正常水平, TCA 重新成为主要供能途径。生物素过量时, 丙酮酸羧化酶和谷氨酸脱氢酶活性基本不变, 而其他关键酶均被激活。当发现生物素过量并添加吐温 40 后, 丙酮酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶依旧保持很高活性, 而 α -酮戊二酸脱氢酶和异柠檬酸裂解酶的活性则下降到正常水平。采用上述补救措施可以挽救因初始生物素匮乏或过量所引起的错误发酵, 终酸浓度均可恢复到对照 (生物素亚适量) 水平 ($75 \sim 80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。另外, 对生物素初始含量和吐温添加进行复合式调控, 终酸浓度可进一步提高, 达到 $87 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 比对照提高 8.8%。

关键词: 代谢分析; 谷氨酸发酵; 酶学分析; 生物素; 吐温

DOI: 10.3969/j.issn.0438-1157.2012.07.028

中图分类号: TQ 922.1

文献标志码: A

文章编号: 0438-1157 (2012) 07-2188-07

Activities changes of key enzymes in glutamate fermentation in response of various initial biotin contents

CAO Yan, Enock Mpofu, DING Jian, DUAN Zuoying, SHI Zhongping

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology,
Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: In glutamate fermentation, initial biotin content in the medium varies with the corn slurry originating sources or even production batches, and this variation affects fermentation performance and stability. In this study, activities changes of the key enzymes at metabolic nodes of pyruvate, isocitrate and α -ketoglutarate when initial biotin content was at normal/improper levels, particularly when initial biotin content was at improper levels but adopting faults-rescue measures during fermentation were carefully investigated. When initial biotin was in shortage, all activities of the key enzymes responsible for catalyzing the main glutamate synthesis route were weakened, in particular, the activity of α -oxoglutarate dehydrogenase complex was inactivated and energy metabolism completely relied on glyoxylate cycle. When biotin in shortage was determined and biotin was supplemented, the enzyme responsible for the central metabolic route, pyruvate dehydrogenase returned to the normal level, and TCA cycle turned to be the main energy metabolism route once again. On the other hand, when initial biotin was in excess, all activities

2011-11-25 收到初稿, 2012-02-25 收到修改稿。

联系人及第一作者: 曹艳 (1985—), 女, 博士研究生。

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA020301-11); 国家重点基础研究发展计划项目 (2007CB714303)。

Received date: 2011-11-25.

Corresponding author: CAO Yan, caoyan_115@163.com

Foundation item: supported by the High-tech Research and Development Program of China (2006AA020301-11) and the National Basic Research Program of China (2007CB714303).

of the key enzymes were activated except pyruvate carboxylase and glutamate dehydrogenase. When biotin in excess was determined and Tween 40 was supplemented, the activities of two key enzymes responsible for glutamate synthesis, pyruvate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase, remained at high levels. At the same time, activities of α -oxoglutarate dehydrogenase complex and isocitrate lysase declined to the normal levels. The final glutamate concentration of the failure-likelihood fermentations could be recovered back to the control level ($75\text{--}80\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) by using the relevant rescue measures. Furthermore, final glutamate concentration could be further increased and reach $87\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, which was over 108.8% of that obtained in the control case, when adopting the “two-stage” optimal operation mode based on combined adjustment of initial biotin content and Tween 40 addition.

Key words: metabolic analysis; glutamate fermentation; enzymatic analysis; biotin; Tween

引 言

在谷氨酸发酵中,培养基中的初始生物素含量直接影响菌体生长和谷氨酸积累,控制生物素亚适量是谷氨酸发酵的优化操作模式之一^[1]。生物素主要来源于培养基中的玉米浆。不同来源、不同生产批次的玉米浆中生物素含量存在波动,容易引起谷氨酸生产的不稳定。一般认为,初始生物素过量时,向培养基中适度添加表面活性剂或青霉素可以增加细胞通透性、强制细胞转型^[2-3],降低 α -酮戊二酸脱氢酶活性,弱化TCA循环,使得主要代谢碳流大量导向 α -酮戊二酸 $\rightarrow$ 谷氨酸的积累方向^[4-6]。而当初始生物素匮乏时,理论上适度添加生物素以刺激细胞继续生长,可使发酵恢复正常。生物素除影响细胞生长、细胞膜完整性、细胞形态转型、谷氨酸分泌等^[7]外,还会对发酵过程的关键酶系产生影响。另外,谷氨酸发酵属于生长非偶联型发酵。理论上,可以利用“两阶段”型优化操作模式^[8],通过复合调控初始生物素含量和表面活性剂吐温的添加,实现谷氨酸高效生产:在细胞生长期通过生物素过量来提高细胞浓度;而在产酸期通过添加表面活性剂,促进谷氨酸的分泌和胞外积累、提高细胞的利用效率。本文研究对比初始生物素含量不当以及采取补救措施后谷氨酸发酵关键酶系的变化模式,可为了解谷氨酸发酵代谢机理和关键酶的作用,及时排除因初始生物素含量不当所引起的发酵故障、稳定发酵性能,为谷氨酸发酵的优化控制提供一定的理论依据和实用参考。

1 实验材料与方法

1.1 菌株

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium Glutamicum*

S₉₁₁₄, 本实验室保藏菌株。

1.2 培养基

种子培养基、发酵培养基(玉米浆量根据实验需要添加)、流加培养基见文献^[9]。

1.3 发酵和培养条件

种子培养条件: 32°C , $220\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 8 h。

罐发酵条件: 实验在 5 L 发酵罐(上海保兴公司产)中进行。初始装液量 3 L, 接种量 8% (体积), 自动流加 25% (质量) 氨水控制 pH 于 7.0~7.2, 发酵周期 34~36 h。控制温度于 32°C 、溶氧浓度约 20%、通风量 1.33 vvm。溶氧、pH、氨耗和糖耗等发酵数据均可在线测量^[9]。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体浓度、谷氨酸、葡萄糖浓度的测定 见文献^[9]。

1.4.2 酶活性测定 样品预处理及粗酶液获取见文献^[9]。丙酮酸脱氢酶(PDH)、丙酮酸羧化酶(PC)、异柠檬酸脱氢酶(ICDH)、异柠檬酸裂解酶(ICL)、 α -酮戊二酸脱氢酶(ODHC)和谷氨酸脱氢酶(GDH)的酶活测定采用文献所报道的方法^[10-15],并根据实际情况对各反应物浓度进行了调整。本文中所涉及酶活均为总酶活,即单位体积发酵液的酶活 [$\text{U} \cdot (\text{ml broth})^{-1}$]。

1.4.3 摄氧速率(OUR)和 CO_2 释放速率(CER)的计算 根据尾气分析仪(LKM2000A, 韩国 LOKAS 产)测得的 CO_2 和 O_2 分压值,按文献报道的公式^[16]在线计算 OUR 和 CER。

2 结果与讨论

本研究中,对照(生物素亚适量)发酵培养基初始玉米浆添加量为 $15\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 相应的生物素含

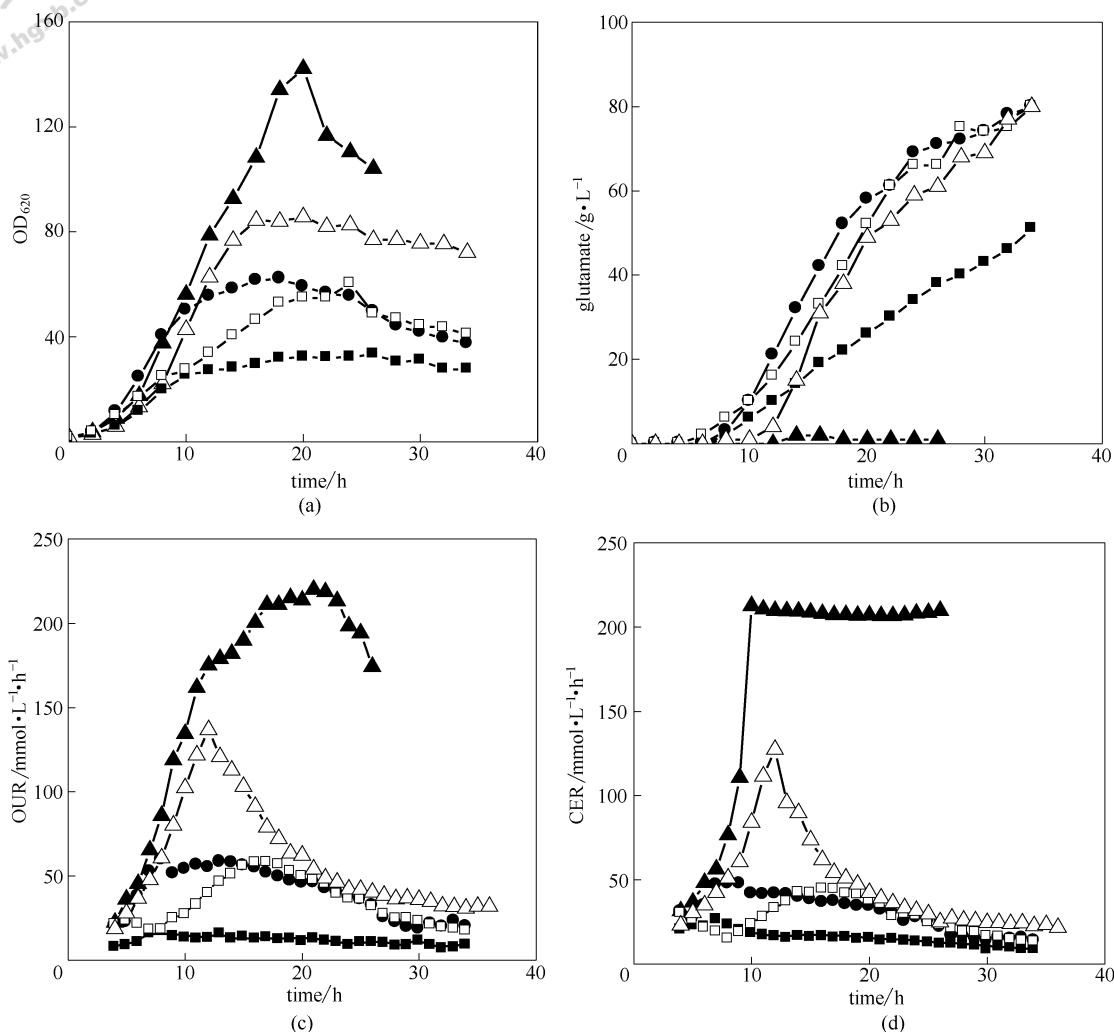


图 1 不同初始生物素含量和操作条件下的发酵参数变化

Fig. 1 Changing patterns of fermentation parameters under different initial biotin amount and operation modes

● control; ▲ biotin in excess; ■ biotin in shortage; △ biotin in excess but 5 g · L⁻¹ Tween 40 added at 10–11 h;
□ biotin in shortage but 6 μg · L⁻¹ pure biotin added at 8 h

量约为 12 μg · L⁻¹，谷氨酸最终浓度可达 70~80 g · L⁻¹。在对照的基础上，额外添加微量纯生物素 (10 μg · L⁻¹) 或降低玉米浆的使用量 (5 g · L⁻¹) 刻意造成生物素过量或匮乏。

2.1 不同初始生物素含量下发酵参数的变化

不同初始生物素含量条件下的菌体浓度、谷氨酸浓度、OUR 和 CER 变化曲线如图 1 所示。对照条件下，发酵在 10 h 后进入稳定期；初始生物素过量时，发酵 10 h 细胞继续生长，最大菌浓度达到对照的 2.2 倍，稳态 OUR 和 CER 分别为对照条件下相应值的 3.4 倍和 4.2 倍，但谷氨酸没有任何积累；初始生物素匮乏时，细胞生长缓慢，最大菌浓度只有对照条件下的一半。稳态 OUR 和 CER

大约为对照条件下的 1/3 和 1/2，最终谷氨酸浓度为对照值的 66.2%。

如果初始生物素过量，利用在线测量的 OUR 和 CER 数据可在发酵 10~11 h 时判别出该故障的出现。这时，加入 5 g · L⁻¹ 的吐温 40 进行补救，OUR、CER 迅速下降，谷氨酸开始积累，16 h 后发酵进入稳定期，终酸浓度恢复到对照水平。如果初始生物素匮乏，发酵前 8 h 的 OUR 和 CER 明显低于对照，进而判别出该故障的出现。补加 6 μg · L⁻¹ 纯生物素后，OUR、CER 立即开始回升。细胞也开始重新生长，终酸浓度也恢复到与对照相当的水平。因此，通过添加表面活性剂或补加生物素，可以对初始生物素过量和匮乏的“错误”发酵

进行补救。

2.2 不同初始生物素含量条件下的谷氨酸发酵

主要关键酶的活性变化

谷氨酸发酵的代谢途径，主要包括糖酵解途径 (EMP)、 CO_2 固定反应、三羧酸 (TCA) 循环和乙醛酸循环 (参见图 4A，各生物酶和代谢产物的缩略符号参见图 4 图注)。理想的谷氨酸合成途径是：草酰乙酸靠 CO_2 固定反应补给， α -酮戊二酸大部分进入谷氨酸合成途径。TCA 和乙醛酸循环适度弱化，满足谷氨酸发酵能量运转正常即可。发酵条件不同，催化不同代谢途径的酶活性也不同，为此，对初始生物素含量正常、匮乏和过量条件下，产酸前、中、后期 (发酵 14、22、30 h) 各关键酶活性进行了分析比较。

2.2.1 生物素匮乏及补加生物素后主要关键酶的活性变化 初始生物素匮乏及初始生物素匮乏但在发酵 8 h 补加 $6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 纯生物素条件下，各关键酶活性的变化如图 2 所示。

对照条件下，除催化乙醛酸循环的 ICL 活性呈上升趋势外，其余酶活性变化都不大。产酸后期，ODHC 失活，能量物质 (NADH) 需要依靠乙醛酸循环得到。初始生物素匮乏条件下，整个产酸期内 ICL 被激活且一直呈增加的趋势，PC 活性变化不大，而其他所有关键酶均被弱化，这时乙醛

酸循环替代 TCA 为整个发酵系统提供能量 (NADH)，有限的碳代谢流几乎完全走向谷氨酸的合成，造成终酸浓度低 ($53 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 但糖酸转化率高，比对照提高 11.5% 以上。初期生物素匮乏，但发酵 8 h 后补加生物素时，PDH 活性恢复到对照水平，ICL 活性明显降低，PC 变化不大，而其他关键酶的活性全部得到强化，TCA 重新成为谷氨酸发酵过程的主要供能途径，发酵代谢体系基本恢复正常。

2.2.2 生物素过量及添加吐温 40 后主要关键酶的活性变化 图 3 显示了初始生物素过量及初始生物素过量但发酵 10~11 h 添加吐温 40 条件下，产酸期各关键酶活性的变化情况。初始生物素过量时，除 PC 和 GDH 基本不变外，所有其他关键酶均被激活。特别是与能量供给相关的酶 (ODHC 和 ICL) 活性提升尤为显著，整个产酸期内 ODHC 活性可以达到对照的 2~3 倍。同时，PDH 和 IC-DH 的活性高于对照，GDH 的活性也与对照基本持平，但谷氨酸却没有任何积累。原因可能有 3 个：①ODHC 活性过高，导致 α -酮戊二酸节点处的绝大部分碳流走向 TCA 循环，大量释放 CO_2 [参见图 1(d)]；②GDH 酶活的高低并不能完全决定 α -酮戊二酸能否向谷氨酸转化，还需要辅酶 NADPH，在 NADH 大量生成、电子呼吸链高度活

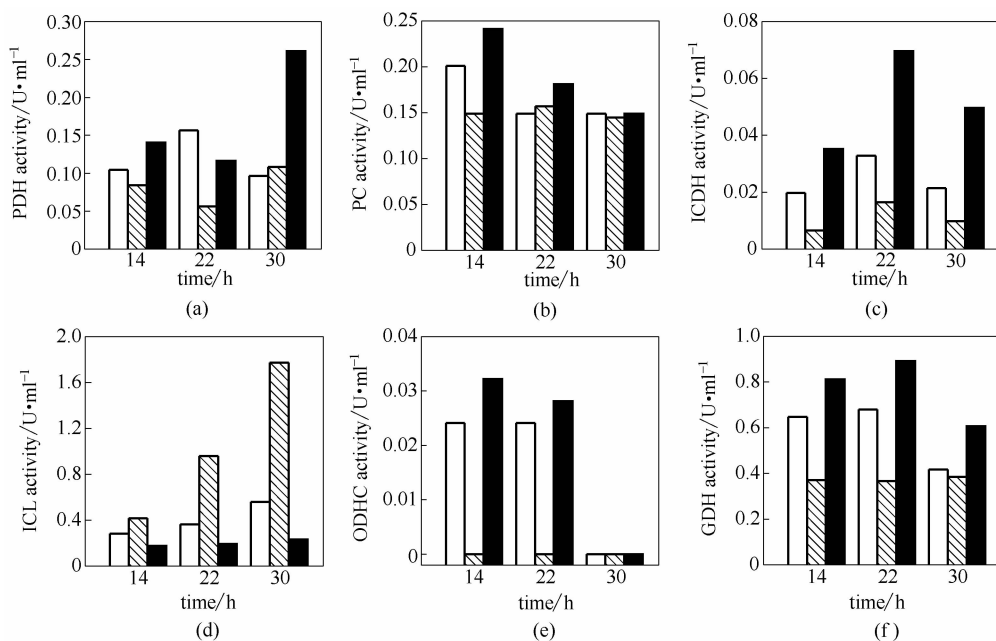


图 2 生物素初期匮乏及初期匮乏但中途补加生物素条件下谷氨酸发酵关键酶的活性变化

Fig. 2 Changing patterns of key enzymes activity when initial biotin in shortage without/with biotin supplement

□ control; ▨ biotin in shortage; ■ biotin in shortage but $6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ biotin added at 8 h

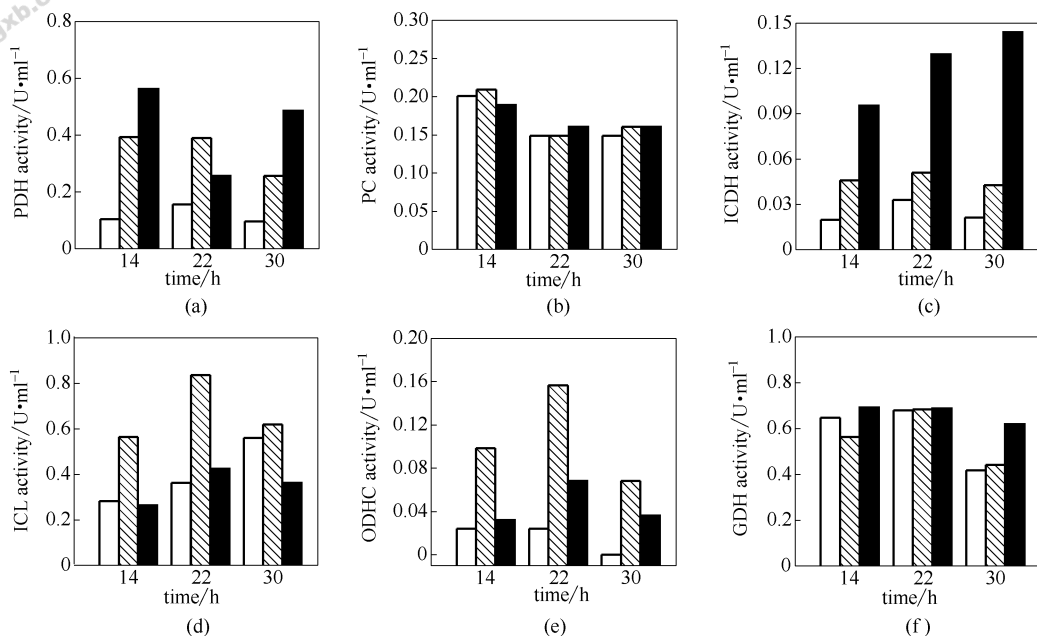


图 3 生物素初期过量及初期过量但中途添加吐温 40 条件下谷氨酸发酵关键酶的活性变化

Fig. 3 Changing patterns of key enzymes activities when initial biotin in excess without/with Tween 40 addition

□ control; ▨ biotin in excess; ■ biotin is excess but $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Tween 40 added at 10–11 h

跃的条件下,还原态的 NADPH 有可能被氧化成 NADP,导致其对谷氨酸转化能力的丧失;③生物素过量导致细胞无法正常转型、细胞膜通透性差,谷氨酸无法分泌到胞外。初期生物素过量、发酵途中适量添加吐温 40 后,PDH 和 ICDH 的活性依旧很高,ODHC 和 ICL 的活性下降或接近到对照水平,整个酶系的运转状态优于对照。发酵恢复正常,谷氨酸生成积累迅速。

2.2.3 谷氨酸发酵最优操作条件的探讨 图 4 总结了不同条件下谷氨酸发酵主要关键酶活性变化的基本规律。一般认为模式 A (生物素亚适量) 是标准或次优的操作模式,而模式 F 则是最为理想的模式。

理想操作条件下,整体酶系的运作具有以下特征:催化谷氨酸合成主途径的 PDH、ICDH 和 GDH 活性高;而催化供能途径的 ODHC 和 ICL 活性较低,满足能量正常运转即可,在避免能量无效循环的同时还减少了 CO_2 的释放、增加糖酸转化率;催化 CO_2 固定反应的 PC 活性高,有利于提高糖酸转化率。如图 4 所示,实际可行的操作模式 (A~E) 中,E 模式,即初期生物素过量+中途添加吐温 40 与理想模式 F 最为接近,只是与供能途径 (TCA、乙醛酸循环) 关联的酶 ODHC 和 ICL 无法得到弱化,与 CO_2 回补途径关联的酶 PC 无法

得到强化。在此条件下,虽然供能效率和糖酸转化率无法提高,但谷氨酸的合成速度和最终浓度却有可能得到提高。谷氨酸发酵是典型的生长非偶联型发酵,谷氨酸生成积累在细胞生长停止后开始。如果利用初期生物素过量的手段在发酵前期大量积累细胞,适度延迟吐温 40 的添入时间,降低产酸期的溶解氧浓度、增强 GDH 活性^[17],进一步提高谷氨酸浓度是完全可能的。

图 5 是初始生物素过量、在不同时刻添加吐温 40 时的发酵曲线。相比于对照,发酵 13 h 添加吐温 40 条件下的最大菌体浓度提高了 50%,最终谷氨酸浓度更是达到 $87 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,比对照和 10.5 h 添加吐温的发酵提高 8.75% 以上。表 1 总结了不同初始生物素含量及实施相应补救措施条件下的最大菌体浓度、最终谷氨酸浓度、 CO_2 释放量及糖酸转化率。

3 结 论

(1) 玉米浆的来源、批次不同会引起生物素含量的波动,导致谷氨酸发酵结果不稳定。利用在线测量数据可在发酵初期判断出生物素的含量 (正常/过量/匮乏) 状况,进而采取措施使“错误”发酵恢复正常。本文通过研究探讨初始生物素含量正常/过量/匮乏以及发酵途中采取相应补救措施条件

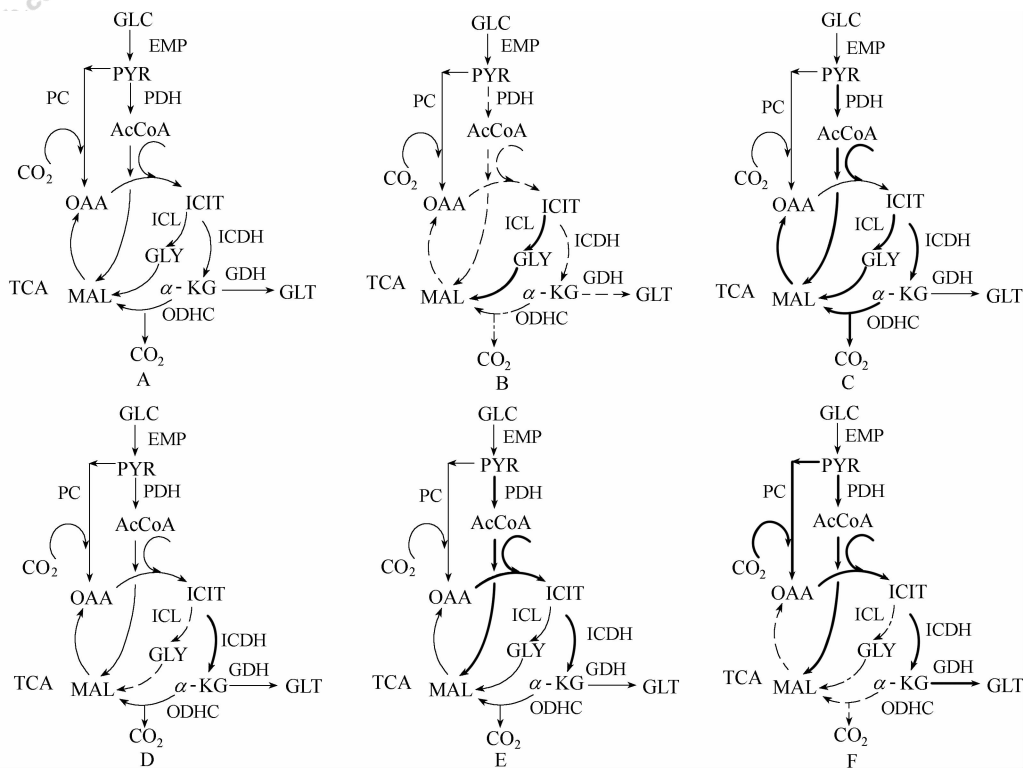


图 4 生物素含量波动条件下谷氨酸发酵主要代谢途径的变化

Fig. 4 Summary of key metabolic pathways of glutamate fermentation under biotin content variations

A—control; B—biotin in shortage; C—biotin in excess; D—biotin in shortage with biotin addition during fermentation;
E—biotin in excess with Tween 40 addition during fermentation; F—operation mode under ideal enzymatic system;

→ activity of enzyme enhanced significantly; → activity of enzyme was equivalent with that of control;
--- activity of enzyme reduced significantly; ---- activity of enzyme was inactivated;

GLC—glucose; PYR—pyruvate; AcCoA—acetyl coenzyme A; ICIT—isocitrate; α-KG—α-ketoglutarate; GLT—glutamate;
MAL—malate; OAA—oxaloacetate; PDH—pyruvate dehydrogenase; PC—pyruvate carboxylase; ICDH—isocitrate dehydrogenase;
ICL—isocitrate lysase; ODHC—α-oxoglutarate dehydrogenase complex; GDH—glutamate dehydrogenase

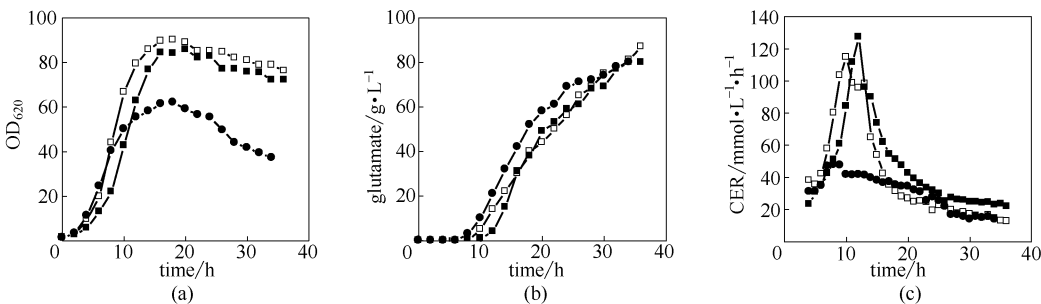


图 5 初始生物素过量、不同吐温 40 添加时间条件下的发酵曲线

Fig. 5 Fermentation curves when initial biotin in excess but adding Tween 40 at different time

● control; ■ initial biotin in excess but adding Tween 40 at 10.5 h; □ initial biotin in excess but adding Tween 40 at 13 h

下的谷氨酸发酵关键酶系的活性变化规律，明确了生物素过量/匮乏条件下谷氨酸无法正常积累的代谢酶学机理，解释了采取补救措施后发酵恢复正常的原因。

(2) 通过使用复合调控初始生物素含量和吐温添加的“两段”式操作模式，并适度延迟吐温添加时间，最终谷氨酸浓度比对照（生物素亚适量）提高 8.8% 以上。

表 1 不同生物素含量发酵条件下最大菌体浓度、最终谷氨酸浓度、CO₂ 总生成量、糖酸转化率

Table 1 Maximum OD, final glutamate concentration, amount of CO₂ released and conversion ratio under different initial biotin content and fermentation modes

Fermentation mode	Maximum OD ₆₂₀	Final glutamate concentration/g · L ⁻¹	Amount of CO ₂ released/g · (L broth) ⁻¹	Conversion ratio/%
control	62.1	80	29.2	45.3
biotin in excess	142.2	0	146.6	0.0
biotin in shortage	33.4	51	13.9	50.5
L+B ^①	60.3	80	30.4	44.7
H+T-1 ^②	85.0	80	52.6	34.3
H+T-2 ^③	90.0	87	41.3	42.5

① Initial biotin was in shortage but biotin was supplemented at 8 h;② Initial biotin was in excess but adding Tween 40 at 10—11 h;

③ Initial biotin was in excess but adding Tween 40 at 13—14 h.

References

[1] Zhang Kexu (张克旭). Amino Acid Technology (氨基酸工艺学)[M]. Beijing: Light Industry Press, 1992: 75-76

[2] Hashimoto K, Kawasaki H, Akazawa K, Nakamura J, Asakura Y, Kudo T, Sakuradani E, Shimizu S, Nakamatsu T. Changes in composition and content of mycolic acids in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, **70** (1): 22-30

[3] Eggeling L, Sahm H. The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux [J]. *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, **92** (3): 201-213

[4] Hasegawa T, Hashimoto K, Kawasaki H, Nakamatsu T. Changes in enzyme activities at the pyruvate node in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum* [J]. *J. Biosci. Bioeng.*, 2008, **105** (1): 12-19

[5] Asakura Y, Kimura E, Usuda Y, Kawahara Y, Matsui K, Osumi T, Nakamatsu T. Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73** (4): 1308-1319

[6] Shirai T, Nakato A, Izutani N, Nagahisa K, Shioya S, Kimura E, Kawarabayasi Y, Yamagishi A, Gojobori T, Shimizu H. Comparative study of flux redistribution of metabolic pathway in glutamate production by two coryneform bacteria [J]. *Metab. Eng.*, 2005, **7**: 59-69

[7] Kim J, Hirasawa T, Sato Y, Nagahisa K, Furusawa C, Shimizu H. Effect of *odhA* overexpression and *odhA* antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **81**: 1097-1106

[8] Liu L, Du G, Chen J, Wang M, Sun J. Influence of culture modes on the microbial production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* [J]. *Biotechnol. Bioproc. E.*, 2008, **13**: 269-273

[9] Cao Yan (曹艳), Ding Jian (丁健), Duan Zuoying (段作营), Liu Liming (刘立明), Shi Zhongping (史仲平). On-line glucose concentration prediction and control for improving glutamate fermentation performance [J]. *Microbiology* (微生物学通报), 2009, **36** (10): 1619-1624

[10] Morgunov I G, Kamzolova S V, Perevznikova O A, Shishkanova N V, Finogenova T V. Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica* [J]. *Process Biochem.*, 2004, **39**: 1469-1474

[11] Koffas M A G, Jung G Y, Aon J C, Stephanopoulos G. Effect of pyruvate carboxylase overexpression on the physiology of *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**: 5422-5428

[12] Popova O V, Ismailov S F, Popova T N, Dietz K J, Gollmack D. Salt-induced expression of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. *Planta*, 2002, **215**: 906-913

[13] Kretzschmar U, Khodaverdi V, Jeoung J H, Görisch H. Function and transcriptional regulation of the isocitrate lyase in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Arch. Microbiol.*, 2008, **190**: 151-158

[14] Kawahara Y, Takahashi-Fuke K, Shimizu E, Nakamatsu T, Nakamori S. Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brvibacterium lactofermentum* [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997, **61** (7): 1109-1112

[15] Bolivar J M, Rocha-Martin J, Mateo C, Cava F, Berenguer J, Vega D, Fernandez-Lafuente R, Guisan J M. Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization [J]. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2009, **58**: 158-163

[16] Shi H, Shimizu K. On-line metabolic pathway analysis based on metabolite signal flow diagram [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **58**: 139-148

[17] Xiao J, Shi Z P, Gao P, Feng H J, Duan Z Y, Mao Z G. On-line optimization of glutamate production based on balanced metabolic control by RQ [J]. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 2006, **29**: 109-117