

玉米浆对丁二酸发酵的影响

张乐¹, 刘龙^{*1}, 李江华¹, 堵国成², 陈坚²

(1. 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; 2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用产琥珀酸放线杆菌 NJ113 为发酵菌种, 研究了 5 种型号的玉米浆 (由法国罗盖特公司提供的 095K, 048K, 095E, No.120924 和一种国产玉米浆) 对丁二酸发酵的影响。研究了 095K 和 No.120924 玉米浆替代酵母膏作为廉价氮源的可行性。结果表明, 095K 玉米浆可以完全替代酵母膏, No.120924 的最适替代比例 (体积分数) 为 60%~80%。测定 095K 玉米浆中氨基酸、维生素和金属离子的含量, 并通过正交试验研究了玉米浆中关键组分对丁二酸发酵的影响, 得到了 6 种关键组分 (谷氨酸、苏氨酸、精氨酸、甲硫氨酸、烟酸和生物素) 的质量浓度优化组合, 与对照组相比, 丁二酸产量提高了 41.8%。

关键词: 产琥珀酸放线杆菌 NJ113; 玉米浆; 正交试验; 丁二酸

中图分类号: TQ 921.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)03—0301—07

Effects of Corn Steep Liquor on Succinic Acid Fermentation

ZHANG Le¹, LIU Long^{*1}, LI Jianghua¹, DU Guocheng^{1,2}, CHEN Jian²

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The effects of five different kinds of corn steep liquor (domestic batch and solulys048K, solulys 095K, solulys 095E, No.120924, provided by Roquette Company) on succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 were studied. The feasibility of replacing yeast extract with corn steep liquor 095K and No.120924 as cheap nitrogen source was also studied. The results showed that 095K can replace yeast extract completely and the optimal replacement ratio was 60%–80% when using No.120924. The contents of amine acids, vitamins and metallic elements of corn steep liquor 095K were determined and the effect of the key ingredients on succinic acid production was studied by orthogonal experiment. A optimal combination of the six kinds of ingredients (glutamic acid, threonine, arginine, methionine, biotin and nicotinic acid) was obtained, and the yield of succinic acid was increased by 41.8% compared with that of the control.

Keywords: *Actinobacillus succinogenes* NJ113, corn steep liquor, orthogonal test, succinic acid

收稿日期: 2013-08-10

基金项目: 江苏省优势学科 973 项目 (2013CB733602)。

* 通信作者: 刘 龙 (1980—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 副教授, 主要从事发酵过程优化研究。E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn

丁二酸,又称琥珀酸,是一种重要的化工中间体原料,广泛存在于人体、动植物和微生物中,应用于医药、食品添加剂、绿色溶剂和表面活性剂等领^[1]。传统工业中主要是利用石油基产品为原料通过化学合成的方法生产丁二酸,但这种方法具有高价格和高污染等局限性^[2]。利用微生物发酵法生产丁二酸因具有可再生、环境友好、价格低廉等特性,逐渐成为国内外学者研究的热点,生物基丁二酸在石油基大宗化学产品市场中也越来越受到关注^[3-4]。此外,微生物发酵法生产丁二酸因具有发酵过程中利用 CO₂、能够缓解温室效应这一优点,被看做是一种非常绿色的工业技术^[5]。

酵母膏是一种营养成分丰富、产品品质稳定并广泛应用于发酵工业的氮源原料。相对其他氮源,酵母膏价格较高,增加了丁二酸生产的成本。玉米浆是玉米淀粉生产过程中得到的副产物,富含糖类、可溶性蛋白质、氨基酸、多肽、脂肪酸、维生素、肌醇、水解酶,以及其他有机化合物、重金属和无机离子^[6-7]。玉米浆是生产抗生素、有机酸和其他发酵产品的培养基组成成分之一,由于其富含可溶性蛋白质和多种游离氨基酸,是微生物发酵的良好氮源^[8-9],且价格低廉,有利于降低丁二酸生产成本,作为廉价替代氮源,具有重要的研究意义。

作者所在研究室利用法国罗盖特公司提供的4种不同型号的玉米浆和一种国产玉米浆,研究在琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* NJ113 发酵产丁二酸的过程中玉米浆可否替代酵母膏作为廉价氮源,并研究玉米浆中的关键组分(氨基酸、维生素和金属元素)对丁二酸发酵的影响,以进一步降低丁二酸生产的成本,并提高利用玉米浆作为氮源时丁二酸的产量。

1 材料与方法

1.1 生产菌株

Actinobacillus succinogenes NJ113,由南京工业大学 制药与生命科学学院 材料化学工程国家重点实验室筛选并保存。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基质量浓度 (g/L) 葡萄糖 10,酵母粉 5, NaH₂PO₄ 9.6, K₂HPO₄ 15.5, NaHCO₃ 10,玉米浆 2.5, NaCl 1。

1.2.2 原始发酵培养基质量浓度 (g/L) 葡萄糖50,

NaH₂PO₄ 1.6, Na₂HPO₄ 0.31, KH₂PO₄ 3, NaAC 1.36, NaCl 1, CaCl₂ 0.2, MgCl₂·6H₂O 0.2, 酵母膏 5, (MgCO₃)₄Mg(OH)₂·5H₂O 50, 玉米浆 5。

1.2 培养方法

将冻存于-70 °C冰箱的菌种接种于种子培养基中,并在厌氧发酵瓶中通入 CO₂ 2 min,拧紧瓶塞。220 r/min, 37 °C培养 12 h 作为种子液。将种子液接种于发酵培养基中,接种量为体积分数 5%,并在厌氧发酵瓶中通入 CO₂ 2 min,拧紧瓶塞。220 r/min, 37 °C培养 24 h。

1.3 分析方法

采用生物传感分析仪 (SBA240C, 山东省科学院生物研究所提供)测定葡萄糖含量。发酵液中丁二酸含量测定采用高效液相色谱法^[10]。采用UV mini-1240 型紫外可见分光光度计(岛津公司制)于 660 nm 处测定 OD 值。

天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸 16 种氨基酸含量均以高效液相色谱法测定^[11]。

VB₁、VB₂、VC、烟酸、VB₆、VB₁₂ 和生物素均以高效液相色谱法测定^[12]。

锰(Mn)和铜(Cu)以石墨原子吸收光谱法测定^[13-14];锌(Zn)、铁(Fe)、镁(Mg),以火焰原子吸收光谱法测定^[15-16];钾(K)和钠(Na)以火焰原子发射光谱法测定。

2 结果与讨论

2.1 玉米浆替代酵母膏的初步研究

为初步研究玉米浆替代酵母膏作为氮源的可行性,首先在原始发酵培养基的基础上,研究不同氮源组合对丁二酸发酵的影响,分别在发酵培养基中采用不同型号玉米浆与酵母膏的组合作为氮源,结果见表 1。

由表 1 可知,在总质量浓度相同的情况下,不同型号玉米浆和酵母膏的组合作为氮源与仅用酵母膏作为氮源时相比,丁二酸产量和 OD 值有所不同:添加国产玉米浆后丁二酸产量和 OD 值降低较多;但添加 095E、048K 和 No.120924 玉米浆后二者降低较少;而添加 095K 玉米浆后丁二酸产量有所升高。初步判定玉米浆替代酵母膏作为氮源是可行的。但考虑到原始发酵培养基中玉米浆质量浓度较

低,需进一步优化玉米浆的最适质量浓度,在最适玉米浆质量浓度的基础上研究玉米浆替代酵母膏的可行性。

表 1 不同氮源组合对丁二酸发酵的影响

Table 1 Effect of different nitrogen source combinations on succinic acid fermentation

氮源组合质量浓度/(g/L)		丁二酸产量/(g/L)	OD 值
不同型号的玉米浆	酵母膏		
095K	5	21.3	9.54
095E	5	17.6	6.54
048K	5	18.3	8.23
NO.120924	5	18.8	8.12
国产	5	14.3	6.33
无	5	20.5	10.23

2.2 玉米浆型号和质量浓度对丁二酸发酵的影响

对 5 种型号玉米浆设置 6 个质量浓度水平 (10、20、30、40、50、60 g/L) 进行实验,研究不同型号玉米浆的最适质量浓度,结果见图 1 和图 2。

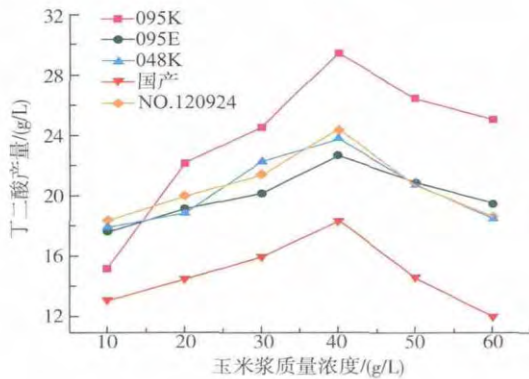


图 1 5 种型号玉米浆不同质量浓度水平的丁二酸产量

Fig. 1 Effect of batches and concentration of five corn steep liquor on the succinic acid yield of

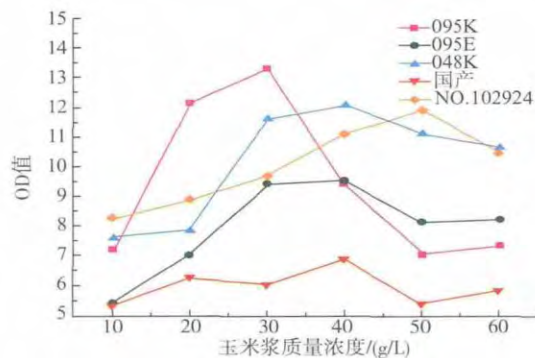


图 2 5 种型号玉米浆不同质量浓度水平的 OD 值

Fig. 2 Effect of batches and concentration of five corn steep liquor on OD

由图 1 图 2 可知,分别单独使用 5 种型号的玉米浆作为氮源时,丁二酸产量和 OD 值如表 2 所示。

表 2 不同型号玉米浆的最适质量浓度及相应丁二酸产量和 OD 值

Table 2 Optimal concentration of five batches of corn steep liquor and the corresponding yield of succinic acid and OD

玉米浆	最适质量浓度/(g/L)	丁二酸产量/(g/L)	OD 值
095K	40	29.4	9.44
095E	40	22.7	9.54
048K	40	23.8	12.44
NO.120924	40	24.3	11.10
国产	40	18.3	7.1

由表 2 可知,5 种型号玉米浆的最适质量浓度均为 40 g/L,当采用玉米浆 095K 和 No.120924 时,丁二酸产量较高,分别为 29.4 g/L 和 24.3 g/L,故选择此两种型号玉米浆进行进一步替代实验。

2.3 玉米浆替代酵母膏作为氮源的最适比例

基于以上研究,选择 095K 和 No.120924 玉米浆进一步研究玉米浆可否替代酵母膏作为廉价氮源以及最适替代比例,因两种型号的玉米浆的最适质量浓度均为 40 g/L,故比较质量浓度为 40 g/L 的玉米浆、酵母粉和不同比例的二者混合物作为氮源时丁二酸的产量和 OD 值。其中玉米浆替代酵母膏的比例(体积分数)分别为 0、20%、40%、60%、80%、100%。结果见图 3 和图 4。

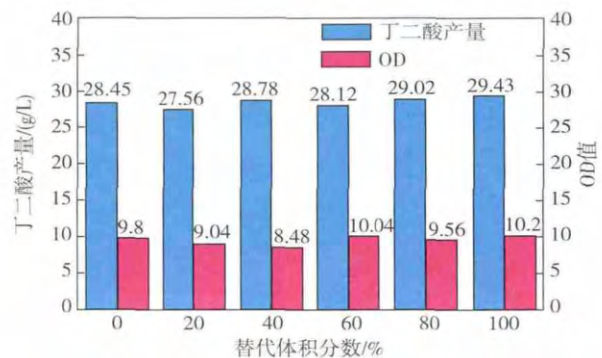


图 3 玉米浆 095K 替代不同比例酵母膏作为氮源时丁二酸的产量和 OD 值

Fig. 3 Yield of succinic acid and OD of different replacement ratios of 095K

由图 3 可知,095K 玉米浆代替不同比例的酵母膏作为氮源时,丁二酸产量和 OD 值相差很小,替代比例(体积分数)可以达到 100%,故可以用 095K 玉米浆完全替代酵母膏作为廉价氮源。

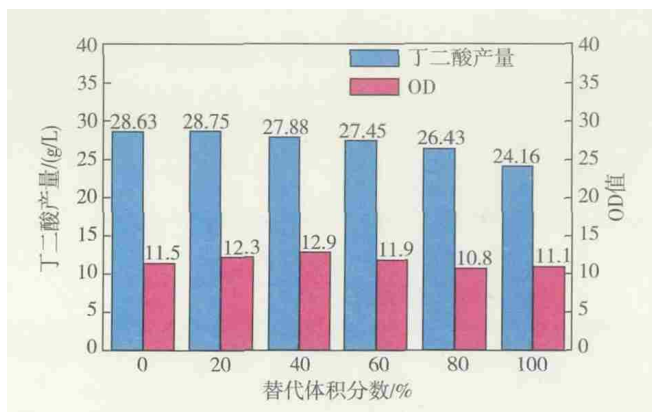


图 4 玉米浆 NO.120924 替代不同比例酵母膏作为氮源时丁二酸的产量和 OD 值

Fig. 4 Yield of succinic acid and OD of different replacement ratios of NO.120924

由图 4 可知, 当 No.120924 玉米浆替代酵母膏的体积分数达到 80% 时, 丁二酸产量下降 7.6%, 为 26.43 g/L。当替代体积分数为 100% 时, 丁二酸产量下降 15.6%, 为 24.16 g/L。可知, No.120924 玉米浆无法完全替代酵母膏, 最高替代体积分数为 60%~80%。

2.4 玉米浆中关键组分对丁二酸发酵的影响

玉米浆中含有丰富的营养成分并对丁二酸发酵具有较大影响, 为进一步研究玉米浆影响丁二酸发酵的机理, 充分发挥玉米浆作为廉价氮源的替代价值, 将深入研究玉米浆中关键组分对丁二酸发酵的影响。测定 095K 玉米浆中各种氨基酸、维生素和金属离子的含量, 通过单因素实验初步研究各组分对丁二酸发酵的影响, 选择对丁二酸发酵影响较大的组分进行正交试验, 得到各关键组分的优化组合并验证, 以期提高丁二酸产量。

2.4.1 玉米浆主要成分检测 玉米浆 095K 中各组分的含量见表 3。

2.4.2 玉米浆中各种成分对丁二酸产量的影响 基于以上研究, 利用 16 种氨基酸, 4 种金属离子 (Zn、Fe、Cu、Mn), 6 种维生素 (VB₁、VB₂、VB₆、VB₁₂、烟酸, 生物素) 配制的合成氮源替代玉米浆, 各组分的初始质量分数相当于其在含有 40 g/L 095K 玉米浆的培养基中的质量分数。以该合成氮源作为对照组, 通过单因素缺失法初步研究各组分对丁二酸发酵的影响, 结果见表 4。

由表 4 单因素实验可知, 对丁二酸产量影响最大的为谷氨酸、苏氨酸、精氨酸、甲硫氨酸、烟酸和生物素 6 种组分, 故选用这 6 种组分进行正交实验。

表 3 玉米浆中氨基酸、维生素和金属离子质量分数

Table 3 Contents of ingredients of corn steep liquor 095K

氨基酸	在玉米浆中质量分数/%	维生素和金属离子	在玉米浆中质量分数/%
天冬氨酸	0.013 9	Zn	0.019 9
谷氨酸	0.599 9	Fe	0.013 2
丝氨酸	0.022 5	Cu	0.001 0
苏氨酸	0.251 1	Mn	0.004 1
精氨酸	0.672 3	K	5.441 2
丙氨酸	1.721 9	Na	0.048 4
酪氨酸	0.038 3	Mg	1.303 4
缬氨酸	0.626 9	P	0.152 2
甲硫氨酸	0.177 8	VB ₁	0.011 3
苯丙氨酸	0.403 5	VB ₂	0.042 2
异亮氨酸	0.306 2	VB ₆	0.017 8
亮氨酸	1.057 3	VB ₁₂	0.006 0
赖氨酸	0.519 3	生物素	0.010 5
脯氨酸	1.009 6	烟酸	0.013 3
组氨酸	0.009 0	VC	0
甘氨酸	0.156 4		

表 4 氨基酸、维生素及金属离子对丁二酸发酵的影响

Table 4 Effect of the ingredients on the yield of succinic acid

实验组	丁二酸产量/(g/L)	实验组	丁二酸产量/(g/L)
对照	7.83	对照	7.83
缺天冬氨酸	6.76 (-14%)	缺 Zn	7.79 (-0.4%)
缺谷氨酸	4.91 (-37%)	缺 Fe	7.67 (-2%)
缺丝氨酸	8.78 (+12%)	缺 Cu	8.14 (+4%)
缺苏氨酸	4.78 (-39%)	缺 Mn	7.59 (-3%)
缺精氨酸	5.05 (-35%)	缺 VB ₁	7.43 (-5%)
缺丙氨酸	6.45 (-17%)	缺 VB ₂	7.20 (-8%)
缺酪氨酸	6.77 (-13%)	缺 VB ₆	7.12 (-9%)
缺缬氨酸	6.98 (-10%)	缺 VB ₁₂	7.75 (-1%)
缺甲硫氨酸	4.78 (-39%)	缺生物素	6.02 (-23%)
缺苯丙氨酸	8.89 (+14%)	缺烟酸	6.26 (-20%)
缺异亮氨酸	6.78 (-13%)		
缺亮氨酸	7.77 (-0.7%)		
缺赖氨酸	7.02 (-1%)		
缺脯氨酸	6.87 (-12%)		
缺组氨酸	6.42 (-18%)		
缺甘氨酸	7.99 (+2%)		

2.4.3 正交试验结果与分析 根据表 4 中单因素实验结果, 采用正交试验考察谷氨酸、苏氨酸、精氨酸

酸、甲硫氨酸、烟酸和生物素 6 种组分在丁二酸发酵中的重要作用及其相关关系。按照 $L_{25}(5^6)$ 正交试验因素水平表(表 5) 安排正交试验,其中 6 种组分的质量浓度范围根据不同质量浓度梯度试验来确定,其他组分的质量浓度不变。具体试验设计及实验结果分析见表 6—8 及图 5。

表 5 正交试验因素水平表

Table 5 Factors level table of orthogonal test

因素	水平及相应质量浓度/(g/L)				
	1	2	3	4	5
A 谷氨酸	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
B 苏氨酸	0.15	0.3	0.45	0.6	0.75
C 精氨酸	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25
D 甲硫氨酸	0.15	0.3	0.45	0.6	0.75
E 生物素	0.002 5	0.005	0.007 5	0.01	1.25
F 烟酸	0.003	0.006	0.009	0.012	1.5

表 6 正交试验设计

Table 6 Orthogonal test design

水平组合						OD 值	丁二酸产量/(g/L)
A	B	C	D	E	F		
1	1	1	1	1	1	2.76	5.15
1	2	2	2	2	2	4.91	8.15
1	3	3	3	3	3	4.71	8.81
1	4	4	4	4	4	2.77	5.73
1	5	5	5	5	5	2.56	5.21
2	1	2	3	4	5	4.51	8.05
2	2	3	4	5	1	2.89	6.06
2	3	4	5	1	2	5.01	8.45
2	4	5	1	2	3	3.55	8.13
2	5	1	2	3	4	4.60	7.69
3	1	3	5	2	4	3.52	8.59
3	2	4	1	3	5	4.73	8.82
3	3	5	2	4	1	4.57	9.37
3	4	1	3	5	2	5.02	9.21
3	5	2	4	1	3	2.75	9.79
4	1	4	2	5	3	2.92	7.85
4	2	5	3	1	4	2.75	7.87
4	3	1	4	2	5	4.62	8.47
4	4	2	5	3	1	4.79	9.67
4	5	3	1	4	2	4.68	9.33
5	1	5	4	3	2	5.22	9.25
5	2	1	5	4	3	2.50	7.40
5	3	2	1	5	4	2.83	6.89
5	4	3	2	1	5	2.98	7.38
5	5	4	3	2	1	2.95	7.88

表 7 正交试验丁二酸产量的极差分析

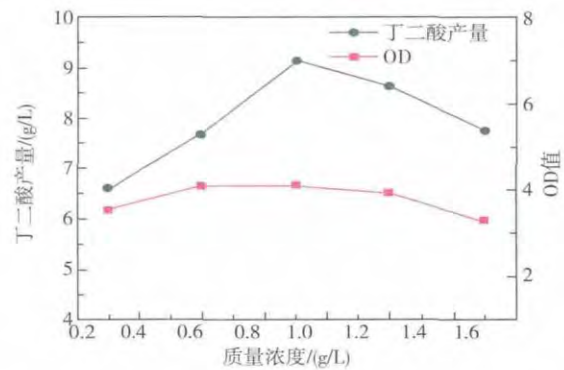
Table 7 Range analysis of yield of succinic acid

	A	B	C	D	E	F
K_1	6.610	7.778	7.584	7.664	7.724	7.626
K_2	7.676	7.656	8.510	8.088	8.244	7.012
K_3	9.156	8.398	8.034	8.360	8.848	8.878
K_4	8.634	8.024	7.746	7.860	7.976	8.396
K_5	7.760	7.980	7.962	7.864	7.044	7.586
极差 R	2.546	0.742	0.926	0.696	1.804	1.866
主次顺序	$A>F>E>C>B>D$					
优水平	A_3	B_3	C_2	D_3	E_3	F_3
优组合	$A_3B_3C_2D_3E_3F_3$					

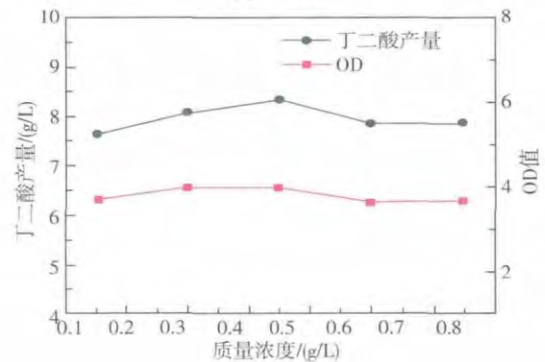
表 8 正交试验 OD 值的极差分析

Table 8 Range analysis of OD

	A	B	C	D	E	F
K_1	3.542	3.786	3.900	3.710	3.250	3.592
K_2	4.112	3.556	3.958	3.996	3.910	3.286
K_3	4.118	4.348	3.756	3.988	4.810	4.968
K_4	3.952	3.822	3.676	3.650	3.806	3.294
K_5	3.296	3.508	3.730	3.676	3.244	3.880
极差 R	0.822	0.840	0.282	0.346	1.566	1.682
主次顺序	$F>E>B>A>D>C$					
优水平	A_3	B_3	C_2	D_2	E_3	F_3
优组合	$A_3B_3C_2D_2E_3F_3$					



(a) 谷氨酸



(b) 甲硫氨酸

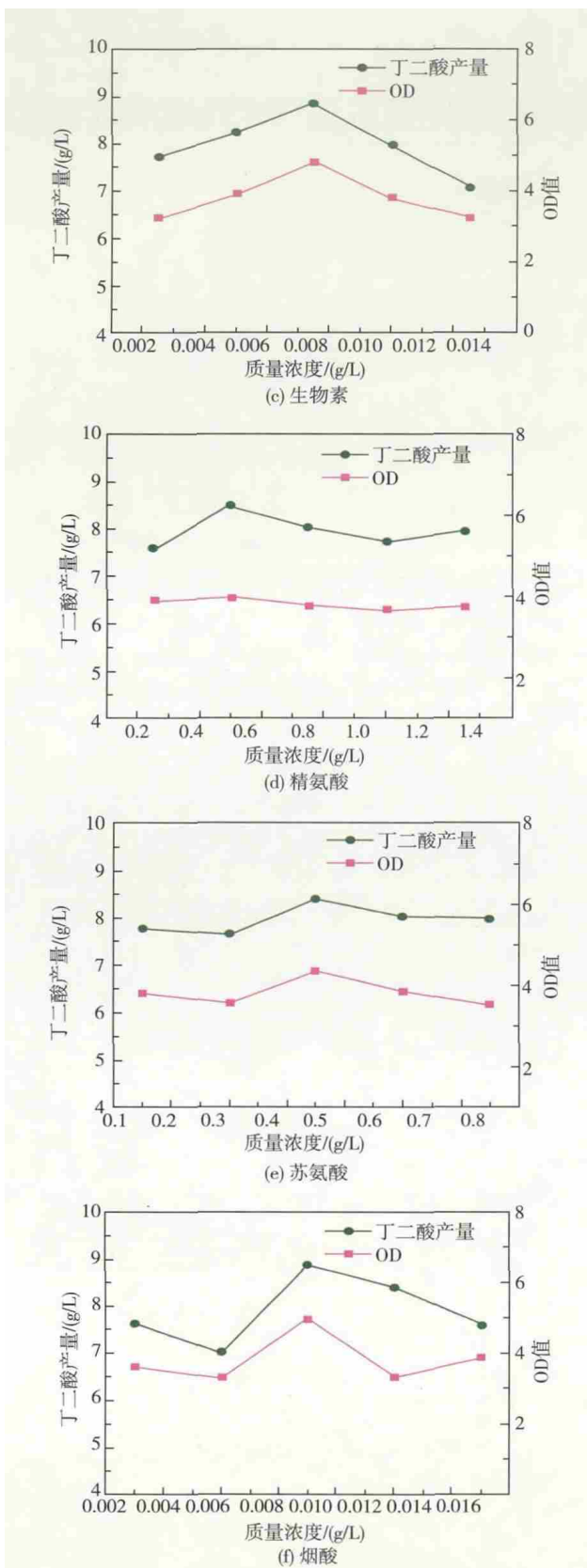


图 5 正交试验结果直观分析

Fig. 5 Intuitive analysis of orthogonal test results

通过对以上正交试验结果的分析可以看出,在

所选择的质量浓度范围内:1)谷氨酸、生物素和烟酸是影响丁二酸生产的最重要因素;2)生物素、烟酸、谷氨酸和苏氨酸是影响细胞生长的关键因素;3)对正交试验结果进行极差分析,得到了以丁二酸高产量为目标的6种组分质量浓度优化组合,如表9所示。

表 9 由正交试验得到的各组分质量浓度优化组合

Table 9 Optimal combination of six kinds of ingredients

质量浓度/(g/L)					
谷氨酸	苏氨酸	精氨酸	甲硫氨酸	生物素	烟酸
0.9	0.45	0.5	0.45	0.0075	0.009

对表9所示的6种组分质量浓度优化组合进行了实验验证。得到丁二酸产量和OD值分别为11.12 g/L和4.95,其中丁二酸产量与对照组(7.83 g/L)相比增加了41.8%。按照该质量浓度优化组合,向40 g/L 095K 玉米浆中补充添加6种关键组分,以使用40 g/L 095K 玉米浆为氮源作为对照组进行了验证试验。结果表明,补充添加6种关键组分后,丁二酸产量和OD值可达到32.56 g/L和11.17,其中丁二酸产量与对照组(28.65 g/L)相比增加了14.7%。

3 结论

研究了在丁二酸发酵中不同型号玉米浆对丁二酸发酵的影响、玉米浆替代酵母膏作为廉价氮源以及玉米浆中关键组分对丁二酸发酵的影响,结果如下:

1) 采用不同型号玉米浆作为氮源,丁二酸产量有较大差别,其中采用095K玉米浆时丁二酸产量最高,为29.4 g/L,其次为No.120924、048K和095E,采用国产玉米浆丁二酸产量最低,为18.3 g/L。

2) 采用095K玉米浆和No.120924研究了玉米浆替代酵母膏作为廉价氮源的可行性。结果表明,095K玉米浆可以完全替代酵母膏作为廉价氮源,而No.120924的最适替代体积分数为60%~80%。表明替代酵母膏作为廉价氮源是可行的,有利于降低丁二酸生产成本。

3) 测定095K玉米浆中氨基酸、维生素和金属离子的含量,并通过正交试验研究了玉米浆中谷氨酸、苏氨酸、精氨酸、甲硫氨酸、烟酸和生物素6种组分对丁二酸发酵的影响,得到了6中关键组分的最适质量浓度组合,通过实验验证,与对照组相比,

丁二酸产量提高了41.8%。向40 g/L 095K玉米浆中补充添加6种关键组分后,与使用40 g/L 095K玉米浆为氮源相比,丁二酸产量增加了14.7%。通过

研究玉米浆中关键组分对丁二酸产量的影响以及最适质量浓度组合,对于提高玉米浆产品质量具有一定指导意义,有利于进一步提高丁二酸产量。

参考文献:

- [1] Zeijus G, Jain M K, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and market for derived industrial products [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1999, 51: 525-545.
- [2] Willke T, Vorlop K D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2004, 66(2): 131-142.
- [3] 王庆昭, 吴巍, 赵学明. 生物转化法制取琥珀酸及其衍生物的前景分析[J]. 化工进展, 2004, 23(7): 794-798.
WANG Q Z, WU W, ZHAO X M. Market analysis for bioconversion of succinic acid and its derivatives [J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**, 2004, 23(7): 794-798. (in Chinese)
- [4] Song Hyohak, Lee Sang Yup. Production of succinic acid by bacterial fermentation [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 39(3): 352-361.
- [5] McKinlay J B, Vieille C, Zeikus J G. Prospects for a bio-based succinate industry [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2007, 76: 727-740.
- [6] Liggett R W, Koffler H. Corn steep liquor in microbiology[J]. **Microbiol Mol Biol R**, 1948, 12: 297-311.
- [7] Hull S R, Yang B Y, Venzke D, et al. Composition of corn steep water during steeping [J]. **J Agric Food Chem**, 1996, 44(7): 1857-1863.
- [8] 庞巧兰, 李庆刚. 玉米浆对青霉素发酵生产的影响[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(8): 528-530.
PANG Q L, LI Q G. Effects of corn steep liquor on penicillin fermentation [J]. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**, 2006, 37(8): 528-530. (in Chinese)
- [9] 李文友, 赵学明. 玉米浆为有机氮源的L-乳酸发酵的研究[J]. 化工时刊, 2006, 20(9): 61-63.
LI W Y, ZHAO X M. Production of L-Lactic acid by L-lactic acid bacteria with corn steep liquor as organic nitrogen source[J]. **Chemical Industry Times**, 2006, 20(9): 61-63. (in Chinese)
- [10] Chen Kequan, Wei Ping, Cai Ting, et al. Application of reversed phase HPLC for the production of succinic acid by fermentation [J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2005, 3(2): 50-52.
- [11] Chen D W, Zhang M, Shrestha S. Compositional characteristics and nutritional quality of Chinese mitten crab: *Eriocheir sinensis* [J]. **Food Chem**, 2007, 103(4): 1343-1349.
- [12] Heudi O, Kilinc T, Fontannaz P. Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: application to polyvitaminated premixes[J]. **J Chromatogr A**, 2005, 1070(1-2): 49-56.
- [13] Hallen I P, Jorhem L, Lagerkvist B J, et al. Lead and cadmium levels in human milk and blood [J]. **Sci Total Environ**, 1995, 166: 149-155.
- [14] Lin T W, Huang S D. Direct and simultaneous determination of copper, chromium, aluminum, and manganese in urine with a multielement graphite furnace atomic absorption spectrometer[J]. **Anal Chem**, 2001, 73(17): 4319-4325.
- [15] Matusiewicz H, Krawczyk M. On-line hyphenation of hydride generation with in situ trapping flame atomic absorption spectrometry for arsenic and selenium determination[J]. **Anal Sci**, 2006, 22(2): 249-253.
- [16] Bermejo-Barrera P, Muniz-Naveiro O, Moreda-Pineiro A, et al. Experimental designs in the optimisation of ultrasonic bath-acid-leaching procedures for the determination of trace elements in human hair samples by atomic absorption spectrometry [J]. **Forensic Sci Int**, 2000, 107(1-3): 105-120.