

耐铵型产琥珀酸放线杆菌的选育及铵离子对其生长代谢的影响

叶贵子, 姜岷, 陈可泉, 李建, 奚永兰, 黄秀梅, 韦萍

南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

摘要: 经硫酸二乙酯 (DES) 诱变, 在含 61~242 mmol/L NH_4^+ 梯度平板中, 筛选到一株耐铵型突变株 YZ25, 该菌株在含 121 mmol/L NH_4^+ 发酵培养基中, 琥珀酸产量达 32.68 g/L, 转化率为 65.4%, 比出发菌提高了 180.5%。进一步考察了不同形态铵盐对 YZ25 生长的影响, 结果表明添加少量铵盐能够提高突变菌的生长速率, 但当超过一定量后菌株生长受到抑制, 不同铵盐对菌株的抑制程度不同, 硫酸铵、碳酸氢铵、氯化铵和硝酸铵对突变株 YZ25 的半抑制浓度分别为: 215 mmol/L、265 mmol/L、235 mmol/L、210 mmol/L。为了考察铵离子对 YZ25 发酵产琥珀酸的影响过程, 在 3.0 L 发酵罐以氨水作为 pH 的调控剂发酵, 结果表明在稳定期前菌株生长基本不受铵离子抑制, 生物量能够达到正常水平, 但是进入稳定期后铵离子抑制作用越来越明显, 导致菌株生长提前结束, 耗糖不完全, 产酸受阻。最后结合产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* 代谢途径分析了铵离子对菌株抑制作用的机理。

关键词: 琥珀酸, 选育, 耐铵离子, 产琥珀酸放线杆菌, 抑制机理

Breeding of ammonium-tolerant mutants of *Actinobacillus succinogenes* for succinic acid production and effect of ammonium

Guizi Ye, Min Jiang, Kequan Chen, Jian Li, Yonglan Xi, Xiumei Huang, and Ping Wei

State Key Laboratory of Materials-oriented Chemical Engineering, College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: An ammonium-tolerant mutant of *Actinobacillus succinogenes*, YZ25, was obtained in the medium containing 61–242 mmol/L NH_4^+ after DES mutagenesis. Succinic acid produced by the mutant YZ25 reached 32.68 g/L when the medium contains 50 g/L glucose and 121 mmol/L ammonium, which was increased by 180.5% compared with that of the parent strain. The effects of different ammonium salts on the growth of the mutant and its metabolic response to high ammonium concentrations were investigated. The results showed that low ammonium concentration could improve the specific growth rates of the mutants, while high ammonium concentration inhibited cell growth. The ammonia-nitrogen half-inhibition constants (K_i) for different ammonium

Received: September 18, 2009; **Accepted:** November 13, 2009

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724701), National Natural Science Foundation of China (No. 20606017), State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, “Qinglan Project” of Jiangsu Province, “The Six Talent Summit” of Jiangsu Province (No. 06-A-047).

Corresponding author: Min Jiang. Tel: +86-25-83172078; Fax: +86-25-83172075; E-mail: jiangmin@njut.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB724701), 国家自然科学基金 (No. 20606017), 材料化学工程国家重点实验室基金, 江苏省“青蓝工程”, 江苏省“六大人才高峰” (No. 06-A-047) 资助。

salts were as follows: 215 mmol/L for $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 265 mmol/L for NH_4HCO_3 , 235 mmol/L for NH_4Cl , and 210 mmol/L for NH_4NO_3 . The process of ammonium inhibition on the mutant YZ25 was investigated in 3.0 L stirred fermentor. When NH_4OH was used to buffer the pH, cell growth was not inhibited. However, production of succinic acid and consumption of glucose gradually decreased when cells entered the stationary phase, and the glucose could not be utilized completely at the end of fermentation. The possible ammonium inhibition mechanism was discussed based on the metabolic pathway of *A. succinogenes*.

Keywords: succinic acid, breeding, ammonium-tolerant, *Actinobacillus succinogenes*, inhibition mechanism

琥珀酸, 学名丁二酸, 在农业、食品、医药、电镀等领域中有重要用途, 市场总量每年超过 4 亿美元^[1-2]。琥珀酸是一种优秀的化学平台产品, 能够作为许多重要的中间产物和专业化学制品, 并且最新的研究表明琥珀酸在生物降解塑料的制备应用方面也将具有非常广阔的前景^[3]。发酵法生产琥珀酸的过程中需要加碱调节 pH 来维持菌体的最适生长。目前能实现工艺要求的 pH 调控剂主要有钠盐^[4]、钙盐^[5]、镁盐^[6]以及浓氨水^[7], 前三者有试剂消耗量大、价格昂贵、下游提取工艺复杂等缺点, 而采用氨水调节 pH 发酵生产琥珀酸工艺中, 不需要消耗大量的试剂, 生产的副产物少, 结晶的琥珀酸是唯一产物, 该工艺具有闭合、清洁、廉价和高效等优点。

铵盐可以作为厌氧过程中的营养物和缓冲剂, 但高浓度时会产生抑制作用, 主要表现为 NH_4^+ 浓度增高所产生的毒化作用和 pH 值上升改变细胞的生长环境这两方面。本实验室所用菌株 *Actinobacillus succinogenes* NJ113 同样受到铵离子的抑制, 为实现氨水调控 pH 这一廉价工艺, 选育耐受高浓度铵离子的菌株是关键。本研究采用硫酸二乙酯 (DES) 对 *A. succinogenes* NJ113 进行化学诱变, 从硫酸铵平板中选育耐受高浓度铵离子的突变菌株, 通过各种手段研究铵离子对菌株生长代谢的影响, 并分析铵离子对菌株抑制作用的机理。

1 材料与方法

1.1 菌株

产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* NJ113, 保存号 CGMCC 1716, 由本实验室筛选并保存。

1.2 培养基与培养条件

1.2.1 种子培养基 (g/L)

葡萄糖 10 (分消), 酵母膏 5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 15.5,

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 9.6, NaHCO_3 10, 玉米浆 5, pH 7.0, 121℃ 灭菌 15 min, 通无菌 100% CO_2 。

1.2.2 选择性平板培养基 (g/L)

葡萄糖 10 (分消), 酵母膏 5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 15.5, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 9.6, NaCl 1, 玉米浆 5, 琼脂 20, 硫酸铵 0~16, 溴百里香酚蓝 0.1 (pH 6.0~7.6 黄变蓝, 0.2 μm 过滤除菌)。调 pH 至 7.0~7.2, 121℃, 灭菌 15 min。

1.2.3 摇瓶发酵培养基 (g/L)

葡萄糖 (分消) 50, 乙酸钠 1.36, NaCl 1, CaCl_2 0.2, MgCl_2 0.2, Na_2HPO_4 0.31, NaH_2PO_4 1.6, K_2HPO_4 3, 酵母膏 10, 玉米浆 15, 硫酸铵 8, 碳酸镁 25。121℃ 灭菌 15 min 后为碱性, 通无菌 100% CO_2 至 pH 7.0~7.2。

1.3 方法

1.3.1 诱变和筛选

将出发菌株预培养 8 h, 8000 r/min 离心 10 min, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤 2 次, 悬浮, 加 DES 原液, 使得 DES 的终浓度为 1% (V/V), 30℃、200 r/min 摇床振荡处理 10 min。加等体积 25% 硫代硫酸钠溶液中中止反应。0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤 2 次, 稀释后涂布于选择性平板, 37℃ 厌氧 ($\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2=8:1:1$) 培养。从中挑取变色圈大、生长快的菌株, 于新鲜的选择性平板上划线纯化后, 接种于发酵培养基, HPLC 检测各菌株发酵性能。

1.3.2 细胞干重的测定

取干燥 10 mL 离心管称重 (G1), 取 5 mL 发酵液于离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 倒出上清液, 5 mL 0.9% 的生理盐水洗涤 2 次, 将沉淀物连同离心管置于 60℃ 烘箱中烘干至恒重, 取出称重 (G2):

$$\text{细胞干重 } W (\text{g/mL}) = (G2 - G1) / 5$$

1.3.3 厌氧发酵产琥珀酸的菌体比生长速率

菌体比生长速率: $\mu = dx/(xdt) = \Delta x/(x\Delta t) = \Delta(\ln x)/\Delta t$,

取 Δt 为尽可能小的时间间隔。

菌体实际最大比生长速率: $\mu_{\max} = \max(\mu)$

1.3.4 铵离子对菌株生长半抑制浓度的计算

半抑制浓度 (K_i) 是指某一抑制性底物与比生长速率关系曲线中, 比生长速率为最大比生长速率一半时所对应的该抑制性底物的浓度。

1.3.5 发酵罐培养

培养基成分同摇瓶发酵培养基 (不添加硫酸铵和碳酸镁), 在 3 L 发酵罐 (BioFlo 110 fermenter; New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J.) 中进行, 装液量 1.5 L, 接种量 6%, 接种前通无菌 N_2 30 min 以除去罐中氧气, 然后在 100% 无菌 CO_2 、流速 0.5 L/min、温度 37°C、搅拌转速 200 r/min 厌氧条件下培养。pH 6.5, 14 mol/L NH_4OH 或 25% Na_2CO_3 流加调控。

1.3.6 分析检测

葡萄糖的测定: 生物传感分析仪 (SBA240C, 山东省科学院生物研究所)。

菌体密度的测定: 紫外可见分光光度计 (Spectrumlab 752S) 测定吸光值 (OD_{660})。

发酵液中有机的测定: 高效液相 (Ultimate3000, Dionex, America; Alltech 反相 Prevail 有机酸色谱柱; 流动相: 25 mmol/L KH_2PO_4 ; pH 2.5; 流动相流速: 1 mL/min; 紫外检测波长: 215 nm; 进样量 20 μ L; 柱温为 25°C)。

发酵罐中铵离子采用 Nova BioProfile 生化分析仪 (Profile 300A, NOVA Biomedical, America) 测定。

2 结果

2.1 耐铵型产琥珀酸放线杆菌的选育

出发菌株活化 8 h, 制成菌悬液经硫酸二乙酯诱变后涂布含有 61~242 mmol/L NH_4^+ 的梯度平板, 以菌体生长的快慢、菌落直径的大小以及变色圈的明显程度为初筛基准, 以 HPLC 精确检测菌株发酵产酸性能为复筛基准, 最后从 148 株中筛选到 3 株产琥珀酸能力优良的菌株 YZ8、YZ21 和 YZ25, 其产酸情况见表 1。

表 1 部分突变菌株与 *A. succinogenes* NJ113 产酸情况比较^a

Table 1 Comparison of fermentation results between mutants and *A. succinogenes* NJ113^a

Strains	Biomass (OD_{660})	Acetic acid (g/L)	Succinic acid (g/L)	Succinic acid Yield ^b (%)
NJ113 ^c	4.7±0.8	15.83±0.06	11.65±0.1	23.3
YZ8	9.6±0.4	13.17±0.08	32.17±0.15	64.3
YZ21	11.0±0.7	12.37±0.13	31.32±0.18	62.6
YZ25	11.7±0.3	12.87±0.11	32.68±0.19	65.4

a: fermentations were performed in anaerobic bottles containing 121 mmol/L NH_4^+ and each value is the mean of three parallel replicates; b: succinic acid yield is defined as the percentage of the concentrations of succinic acid in initial total glucose; c: growth in batch culture of wild-type strain NJ113 was inhibited seriously, and 18 g/L glucose was residual with initial total glucose concentration of 50 g/L.

比较突变菌株与 *A. succinogenes* NJ113 的产酸情况 (表 1), 可以看出在含有 121 mmol/L NH_4^+ 和初始葡萄糖 50 g/L 的发酵培养基中, 出发菌株 NJ113 明显受铵离子的抑制, 琥珀酸收率仅有 23.3%, 而 3 株突变株发酵性能明显改善, 121 mmol/L NH_4^+ 对突变株基本没有抑制作用, 其中突变株 YZ25 诱变效果最明显, 琥珀酸产量 (32.68 g/L) 比出发菌株 NJ113 (11.65 g/L) 提高了 180.5%, 乙酸产量下降 18.7%, 琥珀酸/乙酸比值由 0.63 提高到 2.5, 琥珀酸相对葡萄糖的质量收率达到 65.4%, 接近出发菌株在不添加铵盐培养基中的产酸水平 (收率 70% 左右)。将 YZ25 平板连续传代 5 次, 然后在发酵培养基中连续传代 5 次, 发酵结果表明 YZ25 具有很好的遗传稳定性, 适合用于进一步研究。

2.2 不同形态的铵盐对突变株 YZ25 生长的影响

高浓度铵离子对细胞生长有抑制作用, 主要表现为 NH_4^+ 浓度增高所产生的毒化作用和 pH 值上升改变细胞生长的环境这两方面。以不同形态铵盐存在的铵离子对环境的影响不同, 从而对细胞生长的抑制程度不同。

由图 1 可知, 添加少量的铵盐都有益于提高菌株的比生长速率, 这可能是由于经 DES 诱变处理后激活了部分酶活性质, 致使细胞能够利用少量无机氮源。当添加的铵盐超过一定量后, 细胞生长速率随着铵盐浓度增加而下降。由于不同铵盐所含阴离子对环境的影响不同, 因此对细胞生长的抑制程度也不同。

从表 2 可以看出硫酸铵、碳酸氢铵、氯化铵和硝酸铵对突变株 YZ25 的生长抑制程度依次为: 硝酸铵 > 硫酸铵 > 氯化铵 > 碳酸氢铵。除碳酸氢铵为碱性盐外, 其他 3 种铵盐都是酸性盐, 灭菌后通 CO_2 1 min, 添加碳酸氢铵的培养基 pH 能够下降到 7.0 左右, 而添加其他 3 种铵盐培养基的 pH 则显酸性, 不利于菌株的生长。随着铵盐浓度的增加, 对环境的 pH 改变越大, 其中以硝酸铵和硫酸铵最为明显, 氯化铵次之。对于碳酸氢铵, 尽管铵离子会抑制菌株的生长, 但是碳酸氢根离子可以作为 CO_2 供体, 支持菌株的生长, 综合考虑碳酸氢铵对菌株抑制作用最弱。

2.3 铵离子对突变株 YZ25 生长产酸的影响过程

为了避免发酵液初始 pH 的不同和其他阴离子对发酵产生不必要的干扰, 选择氨水作为 pH 调控剂, 在 3 L 发酵罐考察铵离子对菌株生长代谢琥珀酸的影响过程。图 2 是分别以氨水和碳酸钠调控 pH 发酵结果的比较。

氨水溶液中含有 H_2O 、 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_3 三种分子和 NH_4^+ 、 OH^- 、 H^+ 三种离子, 当氨水流加入进入发酵罐后迅速电离成 NH_4^+ 和 OH^- , 其中 OH^- 与发酵罐中

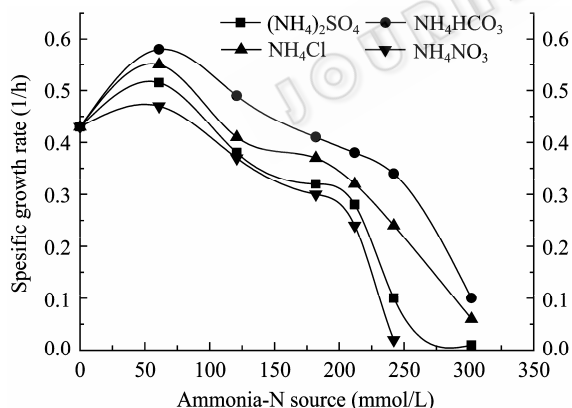


图 1 NH_4^+ 对突变株 YZ25 比生长速率的影响

Fig. 1 Effects of NH_4^+ on batch culture specific growth rates of mutant YZ25.

表 2 不同形态铵盐对突变株 YZ25 的半抑制常数

Table 2 Ammonia half-inhibition constant (K_i) for mutant YZ25 in batch culture

Ammonium source	Half-inhibition constant (K_i)(mmol/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	215
NH_4HCO_3	265
NH_4Cl	235
NH_4NO_3	210

酸发生中和反应, 而由于菌株不能利用无机氮源, NH_4^+ 逐渐被积累, 至一定浓度后抑制菌株的生长和代谢。由图 2 可知, 以氨水作为 pH 调控剂时, 出发菌株 NJ113 受铵离子抑制严重, 琥珀酸产量仅为 13.25 g/L (图 2A), 而突变菌株 YZ25 琥珀酸产量达 27.13 g/L, 琥珀酸绝对产量比出发菌株提高 104.8% (图 2C)。虽然与出发菌株相比突变菌株 YZ25 的发酵效果改善明显, 但是与以常规 pH 调控剂发酵 (图 2B, 碳酸钠调控 pH 发酵琥珀酸收率为 70%) 相比, 氨水调控 pH 发酵效果仍不佳, 琥珀酸收率为 55%。其主要原因从图 2C 中可以看出, 以氨水作为 pH 调控剂发酵过程中, 发酵至对数末期 (8 h) 时, 发酵罐中铵离子积累量已达 161 mmol/L, 超过摇瓶培养中菌株正常生长产酸的耐铵限度, 此后菌株生长受铵离子限制, 耗糖速率减慢, 产酸受阻。随着发酵的进行, 铵离子不断积累, 细胞受其抑制越来越强烈, 发酵至 16 h, 虽然生物量仍然维持在较高水平, 但菌株已不再产琥珀酸; 发酵至 24 h, 铵离子积累量已达 338 mmol/L, 细胞开始自溶。可见以氨水作为 pH 调控剂时, 菌株在进入稳定期前基本不受铵离子的抑制, 能够正常生长并且生物量可以达到正常水平, 但是之后由于铵离子进一步的积累, 使得菌株发酵产酸提前结束, 琥珀酸产量未能达到较高水平。实验进一步表明要使氨水调节 pH 发酵产琥珀酸达到理想效果, 菌株必须能够耐受至少 300 mmol/L 铵离子, 这可以在后续研究中采用其他诱变方法来实现。

3 讨论

由于细胞膜对氨分子的通透性非常高^[8], 在细胞膜两边形成的铵离子浓度梯度非常微小。在缺乏铵离子运转和吸收系统的情况下, 细胞内的铵离子浓度主要由细胞内的 pH、氨水浓度以及 $[\text{NH}_4^+]/[\text{NH}_3][\text{H}^+]$ 反应平衡维持^[9]。Buurman 等^[10] 对大肠杆菌的研究发现在高浓度铵离子环境下, 为了维持胞内 pH 的稳定, 需要一种额外的运转系统 (高亲和性的钾离子吸收系统, Kdp) 负责铵离子的吸收和质子的泵出。由此可知, 细胞环境中铵离子浓度增加, 必然降低细胞对能量的利用效率。如果能量

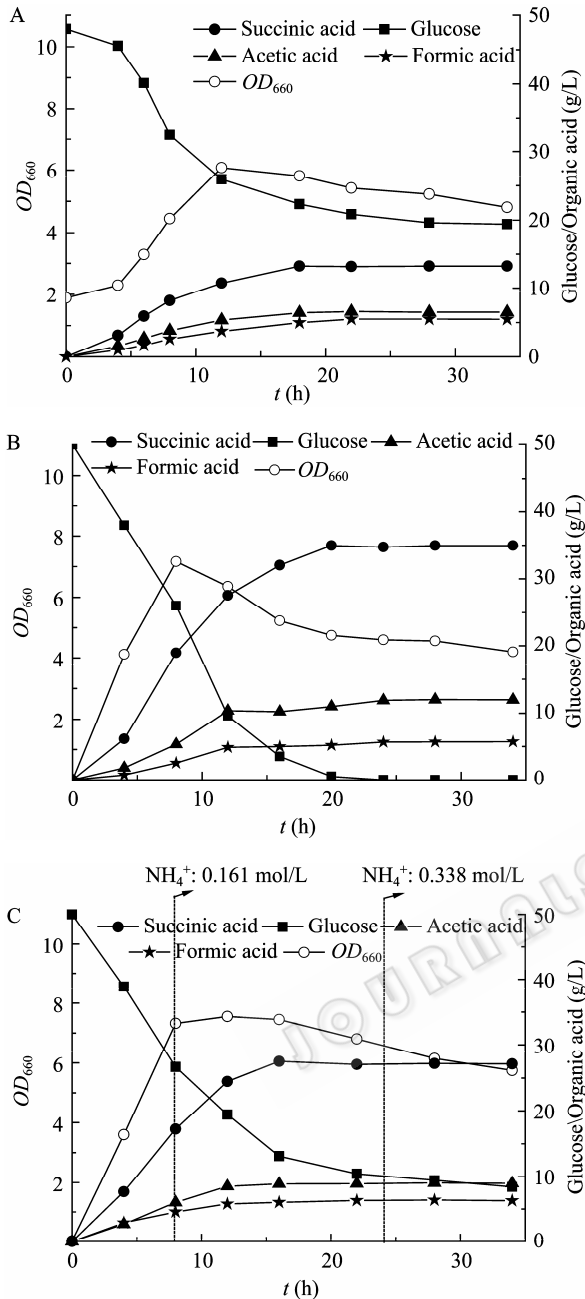


图2 不同 pH 调控剂对出发菌株 NJ113 和突变株 YZ25 发酵的影响

Fig. 2 Effects of different pH controller on mutant YZ25 and *A. succinogenes* NJ113 in 3-liter fermentation. (A) Fermentation by NJ113 with NH₄OH as the pH controller. (B) Fermentation by YZ25 with Na₂CO₃ as the pH controller. (C) Fermentation by YZ25 with NH₄OH as the pH controller.

供应不足, 受铵离子的影响, 细胞内 pH 发生改变, 不利于细胞生长甚至导致细胞死亡。郑梦杰等^[1]通过检测链霉菌发酵过程中相关酶的活力, 发现培养基中的少量铵离子通过作用于糖代谢过程中的多个位点实现对细胞合成代谢的抑制。总体致使 HMP 途

径减弱, NADPH 生成速率减慢, TCA 循环加强, 能量代谢速率加快, 造成胞内 ATP 积累, ATP 积累至一定浓度时, 可反馈抑制 EMP 途径中某些酶的活性, 降低糖的酵解速率, 从而影响细胞的生长和某些代谢产物的合成。

A. succinogenes 是谷氨酸营养缺陷型菌株, 其 TCA 循环是不完整的。图 3 是 *A. succinogenes* 谷氨酸的代谢途径, McKinlay^[12]研究结果证实 *A. succinogenes* 体内谷氨酸缺陷的原因是: 其不能从葡萄糖合成 α -酮戊二酸。这是由以下 2 个途径中酶的缺失或失活造成的: 1) TCA 循环中琥珀酸和 α -酮戊二酸之间的逆反应; 2) TCA 循环中从乙酰辅酶 A 和草酰乙酸到柠檬酸再到 α -酮戊二酸的过程。

由此可知, 导致 *A. succinogenes* 不能正常利用或耐受铵离子的原因主要有以下 3 点: 1) 与 *A. succinogenes* 是谷氨酸缺陷型有关。因为 NH₄⁺ 主要借助于谷氨酸代谢途径进入细胞的同化作用, 谷氨酸缺陷导致 NH₄⁺ 进入细胞的渠道受限。2) 与 *A. succinogenes* 的 TCA 循环不完整有关。TCA 循环不完整, 在高浓度 NH₄⁺ 环境下, 细胞没有足够的能量及时用来维持细胞内 pH 的稳定, 不利于细胞的生长和合成代谢产物。3) 与铵离子会导致 HMP 途径减弱, NADPH 供应不足有关。据报道, 在 *A. succinogenes*

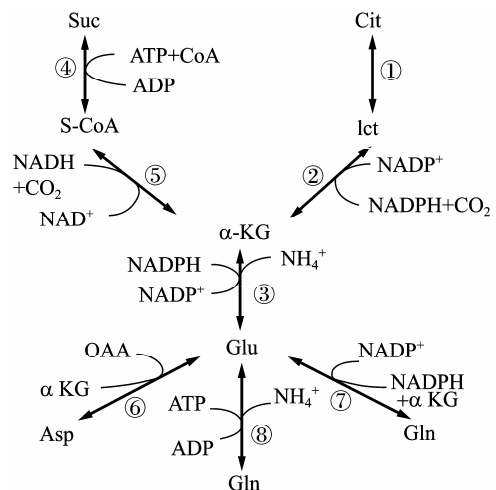


图3 谷氨酸代谢网络图

Fig. 3 Pathway of *A. succinogenes* to glutamate synthesis. ①: aconitase; ②: isocitrate dehydrogenase; ③: glutamate dehydrogenase; ④: succinyl-CoA synthetase; ⑤: α -KG dehydrogenase; ⑥: aspartate:glutamate transaminase; ⑦: glutamate synthase; ⑧: glutamine synthetase.

细胞中, NADPH 主要来自苹果酸酶的作用, 从而将 NADH 转化成 NADPH^[13]。由于铵离子的抑制使得来自 HMP 途径的 NADPH 供应不足, 必然加强苹果酸酶的作用给细胞补充 NADPH, 从而使得苹果酸偏向脱羧作用, 用于转化琥珀酸的途径减弱, 在含铵离子培养基中, 实验检测到的苹果酸酶活性确实是提高了, 进一步证实了以上分析结果 (数据未显示)。

本研究通过 DES 化学诱变, 从铵盐梯度平板中筛选到一株耐铵型突变株 YZ25, 在含 121 mmol/L NH₄⁺、初始葡萄糖 50 g/L 的发酵培养基中, 该菌株产琥珀酸 32.68 g/L, 比出发菌株 NJ113 提高了 180.5%。突变菌株能够耐受一定量铵盐, 但是添加的铵盐过高还是会抑制菌株的生长, 不同形态铵盐对菌株的抑制程度不同, 而添加少量无论哪种形态的铵盐都有益于提高菌株的生长速率, 这对以后的研究提供了重要启示: 高浓度铵离子的筛选打通了菌株不能利用铵离子的屏障? 为菌株利用相对廉价的无机氮源, 从而替代价格昂贵的有机氮源提供可能? 铵离子抑制作用的机理分析, 为后续采用其他手段选育耐受高浓度铵离子的菌株有着重要的指导意义。

REFERENCES

- [1] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markers for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**(5): 545-552.
- [2] McKinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**: 727-740.
- [3] Tokiwa Y, Caiabia BP. Biological production of functional chemicals from renewable resources. *Can J Chem*, 2008, **86**(6): 548-555.
- [4] Datta R, Glassner DA, Jain MK, *et al.* Fermentation and purification process for succinic acid: US, 5168055. 1992-12-01.
- [5] Glassner DA, Datta R. Process for the production and purification of succinic acid: US, 5143834. 1992-09-01.
- [6] Berglund KA, Elankovan P, Glassner DA. Carboxylic acid purification and crystallization process: US, 5034105. 1991-07-23.
- [7] Berglund KA, Yedur S, Dunuwila DD. Succinic acid production and purification: US, 5958744. 1999-09-28.
- [8] Kleiner D. Energy expenditure for cyclic retention of NH₃ NH₄⁺ during N₂ fixation by *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS Lett*, 1985, **187**(2): 237-239.
- [9] Buurman ET, Teixeira de Mattos MJ, Neijssel OM. Nitrogen-limited behaviour of micro-organisms growing in the presence of large concentrations of ammonium ions. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **49**(2): 229-232.
- [10] Buurman ET, Teixeira de Mattos MJ, Neijssel OM. Futile cycling of ammonium ions via the high affinity potassium uptake system (Kdp) of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 1991, **155**(4): 391-395.
- [11] Zheng MJ, Bai XF. Mechanism of ammonia ion restraining the avermectin biosynthesis. *Chin J Antibiot*, 2001, **26**(3): 171-183.
郑梦杰, 白秀峰. 铵离子抑制 avermectin 生物合成的机理. *中国抗生素杂志*, 2001, **26**(3): 171-183.
- [12] McKinlay JB, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(11): 6651-6656.
- [13] McKinlay JB, Shachar-Hill Y, Zeikus JG, *et al.* Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of ¹³C-labeled metabolic product isotopomers. *Metab Eng*, 2007, **9**(2): 177-192.