

## 微生物发酵生产 $\alpha$ -酮戊二酸研究进展

郭洪伟<sup>1</sup>, 堵国成<sup>1,2</sup>, 周景文<sup>1,2</sup>, 陈坚<sup>1,2</sup>

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

郭洪伟, 堵国成, 周景文, 等. 微生物发酵生产 $\alpha$ -酮戊二酸研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(2): 141-152.

Guo HW, Du GC, Chen JW, et al. Progress in microbial production of  $\alpha$ -ketoglutarate. Chin J Biotech, 2013, 29(2): 141-152.

**摘要:**  $\alpha$ -酮戊二酸是微生物三羧酸循环中重要的代谢中间产物, 是连接细胞内碳-氮代谢的关键节点, 具有广泛的应用价值。文中从 4 个方面归纳了国内外关于  $\alpha$ -酮戊二酸研究进展: 能够过量积累  $\alpha$ -酮戊二酸的原核和真核微生物的发现和筛选; 硫胺素缺陷型和氮源饥饿引起的  $\alpha$ -酮戊二酸过量积累的生理学特性; 控制培养环境中的 pH、溶氧和辅因子对生产  $\alpha$ -酮戊二酸发酵过程控制与优化; 调控辅因子再生和代谢途径改造高产菌株。最后, 讨论了微生物法生产  $\alpha$ -酮戊二酸存在的不足和今后研究的方向。

**关键词:**  $\alpha$ -酮戊二酸, 微生物发酵生产,  $\alpha$ -酮戊二酸高产微生物筛选, 优化控制, 代谢改造

## Progress in microbial production of $\alpha$ -ketoglutarate

Hongwei Guo<sup>1</sup>, Guocheng Du<sup>1,2</sup>, Jingwen Zhou<sup>1,2</sup>, and Jian Chen<sup>1,2</sup>

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

2 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:**  $\alpha$ -ketoglutarate is one of the key intermediates in the TCA cycle, playing an important role in the connection of carbon and nitrogen metabolism. This article aims at stating recent research progress in the production of  $\alpha$ -ketoglutarate by microbial fermentation. First, a large group of microbes have been screened to accumulate  $\alpha$ -ketoglutarate including prokaryotes and eukaryotes. Second, physiological characterization of over-accumulation of  $\alpha$ -ketoglutarate is caused by thiamine defect and nitrogen starvation. Third, the process of fermentation was controlled and optimized by the manipulation of pH, dissolved oxygen and cofactors. Fourth, many metabolic engineering strategies were also presented for

**Received:** October 4, 2012; **Accepted:** November 26, 2012

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31171638, 21276109).

**Corresponding author:** Jingwen Zhou. Tel: +86-510-85918312; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zhoujw1982@gmail.com

国家自然科学基金 (Nos. 31171638, 21276109) 资助。

$\alpha$ -ketoglutarate production focusing on regeneration of cofactor and manipulation of the pathway. Last, we discussed the limitation of current progress and proposed the future research needs for microbial production of  $\alpha$ -ketoglutarate.

**Keywords:**  $\alpha$ -ketoglutarate, production by fermentation, screening of organisms for over-accumulating  $\alpha$ -ketoglutarate, optimization and regulation, metabolic modification

$\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -KG) 是一种重要的短链羧酸分子, 具有广泛的应用前景<sup>[1-3]</sup>。近年来, 由于 $\alpha$ -KG 能减轻肾病患者的肾脏负担、减少并发症和促进患者手术后快速恢复, 被广泛应用于医学领域<sup>[4]</sup>;  $\alpha$ -KG 与精氨酸等氨基酸复配, 能快速帮助运动员补充能量。除此以外, 由于 $\alpha$ -KG 特殊的化学性质, 被广泛用于化学合成行业<sup>[5-6]</sup>。以上三大应用促使 $\alpha$ -KG 的需求量大幅增加。

虽然国际市场对该短链羧酸的需求不断扩大, 但由于其分子中同时存在羰基和羧基的特殊化学结构导致化学合成路线长、收率低、合成过程中有毒化学试剂氧化物的使用等问题, 制约了化学合成 $\alpha$ -KG 在医药、食品等领域的使用<sup>[5]</sup>。此外, 由于石油、煤炭等非可再生资源的快速消耗, 以及有毒废弃物的排放造成环境恶化问题日益突出, 所以以可再生生物资源为底物, 利用微生物发酵生产 $\alpha$ -KG 成为最佳选择。本文从高产菌株的筛选、高产菌株生理学特性、发酵过程优化控制和代谢工程改造 4 个方面进行归纳。

$\alpha$ -KG 是微生物细胞中三羧酸循环 (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 中重要的代谢中间产物, 环境中的碳源物质转运进入细胞内后, 经过糖酵解形成丙酮酸 (Pyruvate,

PYR), 以 PYR 形式进入三羧酸循环的碳源物质依次在丙酮酸脱氢酶系 (Pyruvate dehydrogenase complex, PDHC)、柠檬酸合成酶 (Citrate synthase)、顺乌头酸酶 (Aconitase) 和异柠檬酸脱氢酶 (Isocitrate dehydrogenase) 作用下形成  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -KG 在  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢系 ( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase, KGDH) 的作用下进一步代谢成琥珀酰-CoA, 进入下一个碳代谢节点, 在这一过程中伴随着电子传递和能量产生, 这一过程为细胞的生长繁殖提供碳源物质和能量; 除此之外,  $\alpha$ -KG 经转氨基作用形成 L-谷氨酸进入氮代谢中, 所以 $\alpha$ -KG 是连接碳代谢和氮代谢的重要代谢中间产物 (图 1)<sup>[7]</sup>。

$\alpha$ -KG 能表征细胞中碳-氮平衡水平, 在机体内能参与多种调节过程。Forchhammer 研究表明:  $\alpha$ -KG 能与广泛存在于植物、微生物和藻类细胞内对细胞内碳源、氮源和能量水平的感知的调控因子 P<sub>II</sub> 蛋白结合, 调控细胞碳、氮源代谢。在不同氮源条件下, 大肠杆菌 *Escherichia coli* 中 P<sub>II</sub> 蛋白能与组氨酸激酶 NtrB/NtrC 调节系统中的 NtrB 结合形成复合物, 该复合物能调节细胞内 *glnA* 和 *glnK* 等氮源代谢基因的表达<sup>[8]</sup>。

综上, 研究 $\alpha$ -KG 的形成机制和其参与细胞内调节作用具有广泛的理论和实践意义。

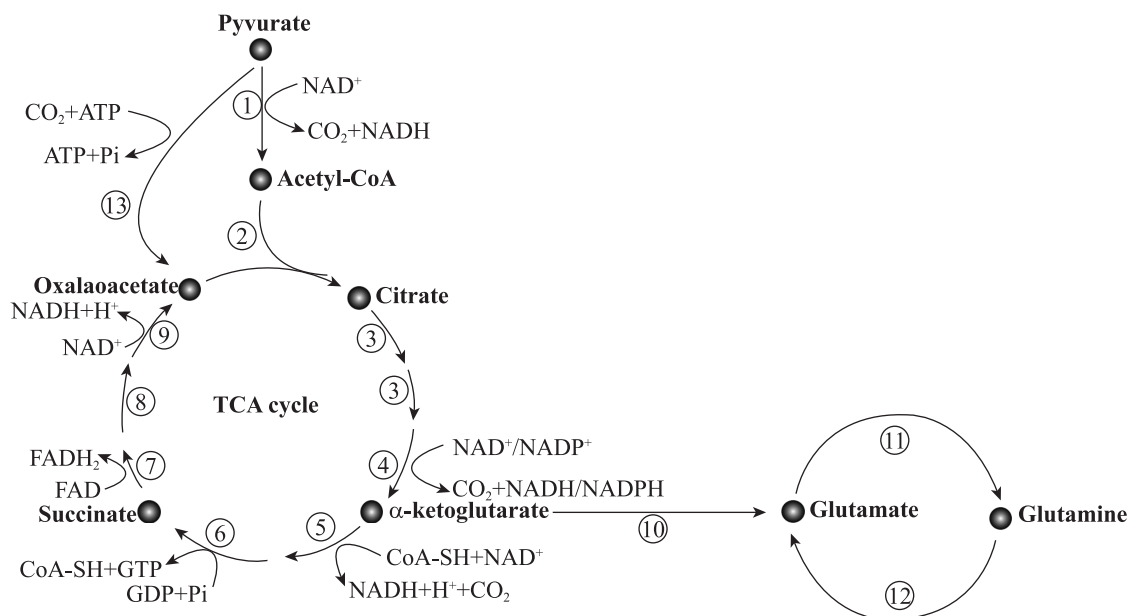


图 1 碳-氮源代谢联系

Fig. 1 Connection of carbon-nitrogen metabolism. ① pyruvate dehydrogenase; ② citrate synthase; ③ aconitase; ④ isocitrate dehydrogenase; ⑤ ketoglutarate dehydrogenase; ⑥ succinyl-CoA synthase; ⑦ succinate dehydrogenase; ⑧ fumarase; ⑨ malate dehydrogenase; ⑩ glutamate dehydrogenase; ⑪ glutamine synthetase; ⑫ glutamate synthase; ⑬ pyruvate carboxylase.

## 1 过量积累 $\alpha$ -KG 菌株的发现与筛选

### 1.1 能够过量积累 $\alpha$ -KG 的原核微生物

早在 1946 年, Lockwood 等发现了荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 在胞外积累  $\alpha$ -KG 的现象, 他们的研究表明: 当培养基中碳源: 氮源含量比例为 40:1~400:1 时, *P. fluorescens* NRRL B-6 可以利用 100 g/L 葡萄糖积累 16~17 g/L  $\alpha$ -KG<sup>[9]</sup>。随后, Asai 等发现多种原核微生物菌种能过量积累  $\alpha$ -KG, 包括粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 和多种芽胞杆菌属 *Bacillus* ssp. 的菌株。这些菌株能积累 18 g/L 的  $\alpha$ -KG, 但是伴随着代谢副产物丙酮酸的积累<sup>[10]</sup>。1969 年, Tanaka 等发现石蜡节杆菌

*Arthrobacter paraffineus* 能利用石蜡积累高达 70 g/L 的  $\alpha$ -KG, 这是目前发现原核生物中积累  $\alpha$ -KG 最高的菌株<sup>[11]</sup>, 此外, 也有报道利用代谢工程手段对谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 改造发酵生产  $\alpha$ -KG。Verseck 等利用一株谷氨酸脱氢酶编码基因缺失的谷氨酸棒杆菌, 并在发酵过程中通过维持发酵液中高的  $\text{NH}_4^+$  浓度从而抑制谷氨酸合酶和谷氨酰胺合成酶活性, 使得发酵液中  $\alpha$ -KG 浓度达到 5 g/L<sup>[12]</sup>。

以上研究开创了利用微生物过量积累  $\alpha$ -KG 的先河, 并对发酵生产的培养条件进行了初步探索, 但是这些原核微生物不能有效地维持细胞内 pH 值的平衡, 导致产量低和生产强度不高, 从而未能实现工业大规模的发酵生产。

## 1.2 能够过量积累 $\alpha$ -KG 的真核微生物

真核微生物细胞能产生足够的 ATP 分子维持细胞内的 pH 平衡和跨细胞膜  $H^+$  梯度抵御低 pH 环境条件, 更适合发酵法生产短链有机酸<sup>[13]</sup>, 近年来研究报道的过量积累 $\alpha$ -KG 的微生物多以真核微生物为主。

1968 年, Finogenova 等利用液体石蜡生产微生物蛋白时发现解脂亚洛酵母 *Yarrowia lipolytica* 能够积累 $\alpha$ -KG<sup>[14]</sup>。这是真核微生物积累 $\alpha$ -KG 的首次报道。此后, 研究人员进一步发现多种真核微生物能在胞外过量积累 $\alpha$ -KG。1997 年, Chernyavskaya 等对比研究了来源于假丝酵母属 *Candida* ssp.、毕赤酵母属 *Pichia* ssp. 和解脂亚洛酵母等 20 株酵母菌株以乙醇为唯一碳源生产 $\alpha$ -KG, 这些酵母菌株都需要在发酵培养基中外源添加生物素或者硫胺素等辅因子才能过量积累 $\alpha$ -KG<sup>[15]</sup>。2007 年, Liu 等通过控制发酵液中的  $Ca^{2+}$  浓度、生物素和硫胺素等辅因子水平, 促使过量积累的丙酮酸进入三羧酸循环, 使 *Torulopsis glabrata* 能过量积累 43.7 g/L 的 $\alpha$ -KG<sup>[16]</sup>。这些微生物在过量积累 $\alpha$ -KG 的过程中, 有大量的丙酮酸、柠檬酸或异柠檬酸等副产物产生, 利用代谢工程手段对其进行改造日益成为研究热点。

在这些报道的酵母菌株中, *Y. lipolytica* 因其生理特性清晰、生长快速、底物谱宽、能过量积累三羧酸循环中多种中间代谢产物等优点被广泛关注<sup>[17-18]</sup>。随着 *Y. lipolytica* 全基因组序列的公布<sup>[19]</sup>和分子生物学操作所必需的质粒等工具的完善, 使其成为发酵法生产 $\alpha$ -KG 的理想菌株<sup>[20-22]</sup>。

1997 年, Chernyavskaya 等选育出一株可以利用乙醇为唯一碳源生产 $\alpha$ -KG 的高产菌

*Y. lipolytica* N1, 该菌株能积累 48 g/L 的 $\alpha$ -KG<sup>[15]</sup>。随后, 德国 Barth 研究小组以 *Y. lipolytica* H222 菌株为出发菌株, 利用分子生物学操作, 对丙酮酸羧化酶、延胡索酸酶、顺乌头酸酶和乙醛酸循环中异柠檬酸裂解酶编码基因进行过量表达或者敲除降低产酸过程中代谢副产物<sup>[23-25]</sup>。

2010 年, Zhou 等从富含油脂的土壤中筛选得到一株能过量积累 $\alpha$ -KG 的菌株 *Y. lipolytica* WSH-Z06, 在外源添加硫胺素的条件下, 以甘油为碳源能积累 39.2 g/L 的 $\alpha$ -KG<sup>[26]</sup>。2012 年, Yin 等利用 *Y. lipolytica* WSH-Z06 为出发菌株, 通过调控辅因子再生和过量表达三羧酸循环中酶两个层次降低代谢副产物丙酮酸含量<sup>[27-28]</sup>。

上述报道的菌株归纳于表 1。

## 2 微生物积累 $\alpha$ -KG 的代谢途径与调控过程

由于 $\alpha$ -KG 处于三羧酸循环的关键位置, 不仅连接着细胞内碳-氮代谢, 而且还表征着细胞内碳-氮代谢平衡状态, 并参与细胞内多种调控过程。因此, 分析 $\alpha$ -KG 积累过程, 对于揭示碳-氮代谢平衡的生理机制, 具有重要的理论意义。

### 2.1 硫胺素不足引起菌株过量积累 $\alpha$ -KG

硫胺素是三羧酸循环中丙酮酸脱氢酶和酮戊二酸脱氢酶的辅因子, 该辅因子的不足会引起细胞生理特性的改变。上世纪 60 年代, Finogenova 等发现当硫胺素不足时, *Y. lipolytica* 能积累 $\alpha$ -KG<sup>[14]</sup>, 他们的研究小组发现所有能过量积累 $\alpha$ -KG 的 *Y. lipolytica* 菌株都不能合成硫胺素中的嘧啶环, 导致了这些菌株对外源添加

表 1  $\alpha$ -KG 生产菌株Table 1  $\alpha$ -KG producing organisms

Organisms	Carbon source	$\alpha$ -KG content (g/L)	Yield (g/g)	References
<i>P. fluorescens</i> NRRL B-6	Glucose	17.0	0.17	[9]
<i>S. marcescens</i> No.18	Glucose	18.0	0.25	[10]
<i>B. megatherium</i> DE BARY	Glucose	13.8	0.16	[10]
<i>A. paraffineus</i> ATCC15591	<i>n</i> -Alkanes	70.0	0.70	[11]
<i>C. glutamicum</i>	/	5.0	/	[12]
<i>Y. lipolytica</i>	Paraffin	108.0	/	[14]
<i>Candida paludigena</i> BKM Y-2443	Ethanol	17.0	/	[15]
<i>Pichia inositovora</i> BKM Y-2494	Ethanol	22.0	/	[15]
<i>T. glabrata</i> CCTCC M202019	Glucose	44.0	0.46	[16–29]
<i>Y. lipolytica</i> N1	Ethanol	48.0	0.42	[15]
<i>Y. lipolytica</i> H222-S4(JMP6) T5	Rapeseed oil	126.0	1.20	[23]
<i>Y. lipolytica</i> WSH-Z06	Glycerol	39.2	0.40	[26]

/ not available.

硫胺素的依赖<sup>[18]</sup>。Morgunov 等对这一现象进行深入研究发现：*Y. lipolytica* 在生产  $\alpha$ -KG 过程中，菌株过量合成  $\alpha$ -KG 和 PYR 的过程伴随着菌株的生长速率下降，并且以硫胺素为辅因子的 PDHC 和 KGDHC 活性下降。由此，他们得出结论：硫胺素是菌株积累  $\alpha$ -KG 的关键因素<sup>[30]</sup>。

硫胺素缺陷导致多种酵母菌株过量积累  $\alpha$ -KG。2000 年，Chernyavskaya 等对比研究了在不同硫胺素浓度下 20 株酵母菌株利用乙醇为碳源合成  $\alpha$ -KG 情况，这 20 株酵母菌株中，生长不依赖外源添加这一辅因子的酵母亦不能过量积累  $\alpha$ -KG；低浓度硫胺素 (0.2~0.5  $\mu\text{g/L}$ ) 为菌体生长限制因素时，菌体能过量合成  $\alpha$ -KG；当硫胺素浓度超过 500  $\mu\text{g/L}$  时，菌体停止合成  $\alpha$ -KG<sup>[31]</sup>。当环境中硫胺素充足时，PDHC 和

KGDHC 能维持较高活力，三羧酸循环能顺利进行；当环境中硫胺素不足时，这些以硫胺素为辅因子的 PDHC 和 KGDHC 活力大幅下降，从细胞外流入三羧酸循环中的碳源的物质只能部分氧化成 PYR 和  $\alpha$ -KG，菌体停止生长，从而过量积累三羧酸循环中间代谢产物。此外，过量合成  $\alpha$ -KG 所需的最适硫胺素浓度与培养基中底物种类有关。当葡萄糖为碳源时，酵母细胞合成  $\alpha$ -KG 所需的最适硫胺素浓度比以烷烃为碳源时对硫胺素需求量高 3~5 倍。

## 2.2 环境中的碳氮比对 $\alpha$ -酮戊二酸积累的影响

Finogenova 等发现由环境中的氮源不足引起的生长限制能促使 *Y. lipolytica* N1 菌株在硫胺素过量条件下过量合成柠檬酸 (Citric acid, CA) 和异柠檬酸 (Isocitric acid, ICA)<sup>[32]</sup>。

Chernyavskaya 等研究发现培养环境中的不同碳氮比对积累产物种类有重要影响, 发酵液中过量的碳源和限量的氮源 (C:N=40:1~400:1) 是促使细胞过量合成 $\alpha$ -KG 的因素之一, 当低浓度 (3 g/L) 的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  成为菌体生长限制性因素时, 发酵液中主要产物是柠檬酸 (30 g/L) 而非  $\alpha$ -KG (5 g/L); 当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度提高至 10 g/L 时, 细胞主要合成  $\alpha$ -KG, 柠檬酸的合成受到抑制; 当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度进一步提高至 12 g/L 时, 菌体生长和  $\alpha$ -KG 的合成都受到抑制<sup>[31]</sup>。类似地, Il'chenko 发现当菌体开始积累三羧酸循环中间代谢产物时, 如果维持发酵液中的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度为 0.9~1 g/L 时,  $\alpha$ -KG 积累的速率达到最大; 当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  完全被消耗后, 发酵液中的主要产物是柠檬酸<sup>[33]</sup>。细胞在过量积累柠檬酸时, 细胞中的谷氨酸脱氢酶几乎为 0; 而在过量积累  $\alpha$ -KG 时, 谷氨酸脱氢酶活性较高, 高浓度的  $\text{NH}_4^+$  离子能抑制谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶的活性<sup>[34]</sup>。

然而, 上述研究并未揭示培养环境中不同碳氮比影响产物谱的机制和菌体生理特性的改变。

### 2.3 过量积累 $\alpha$ -KG 菌株细胞内代谢特点

#### 2.3.1 柠檬酸和 $\alpha$ -KG 是菌株应对不良环境条件的策略

2002 年, Il'chenko 等对比 *Y. lipolytica* N1 在过量积累  $\alpha$ -KG 和过量积累柠檬酸条件下, 三羧酸循环和乙醛酸循环 (Glyoxylate cycle) 中酶的活力, 在过量合成  $\alpha$ -KG 条件下, 除了柠檬酸合成酶外, 三羧酸循环和乙醛酸循环中所有其他酶的活性都要比过量合成柠檬酸条件下的

酶活性要高。由此推断: 当外界环境中氮源物质完全被消耗完, 导致三羧酸循环和乙醛酸循环中酶活力下降, 唯独柠檬酸合成酶保持较高的活力, 促使细胞过量积累柠檬酸, 微生物细胞过量合成柠檬酸抵御环境不良条件。另一方面, 由于低浓度硫酸素引起的微生物细胞生长限制, 菌体通过过量合成  $\alpha$ -KG 应对外界不良的环境条件, 此时, 环境中的  $\text{NH}_4^+$  被用来合成氨基酸<sup>[35]</sup>。

#### 2.3.2 产酸阶段细胞内氮代谢的改变

2003 年, Il'chenko 等对比 *Y. lipolytica* N1 在过量积累  $\alpha$ -KG 和柠檬酸时细胞内氮代谢相关酶的活力, 当菌株在过量合成  $\alpha$ -KG 时, 以  $\text{NADP}^+$  为辅因子的谷氨酸脱氢酶的活力和以  $\text{NAD}^+$  为辅因子的谷氨酸脱氢酶都维持较高活力, 而在过量合成柠檬酸的菌株细胞内这两个酶的活力几乎为 0。由于过量积累  $\alpha$ -KG 的发酵液中  $\text{NH}_4^+$  浓度接近 20~30 mmol/L, 而过量积累柠檬酸的发酵液中  $\text{NH}_4^+$  浓度接近于 0, 高浓度  $\text{NH}_4^+$  离子能抑制谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶的活性, 因此在过量合成柠檬酸的菌体细胞内的谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶都维持较高活力, 而这两种酶在过量合成  $\alpha$ -KG 的条件下活力很低, 甚至为 0。由此可见在  $\alpha$ -KG 过量积累的条件下, 细胞利用  $\text{NH}_4^+$  合成谷氨酸; 在柠檬酸积累过程中, 谷氨酰胺的酰胺基作为菌体氮代谢的来源。除此之外, 在过量积累  $\alpha$ -KG 的细胞内, 天冬氨酸转氨酶和丙氨酸转氨酶活力都很高, 而在过量积累柠檬酸的细胞内, 只有天冬氨酸转氨酶活力维持很高<sup>[34]</sup>。

#### 2.3.3 改变代谢途径对三羧酸循环进行回补

2010 年, Il'chenko 等发现 *Y. lipolytica* N1

在过量积累 $\alpha$ -KG的条件下,细胞中的谷氨酸、丙氨酸和 $\gamma$ -氨基丁酸含量在17种氨基酸中含量最高,与之前研究得到的细胞中谷氨酸脱氢酶和丙氨酸转氨酶活力高的结论相吻合,并且细胞匀浆中的谷氨酸脱羧酶、 $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶和琥珀酰半醛脱氢酶活力很高,综合之前研究表明:由于硫胺素缺乏导致KGDHC活力低,三羧酸循环中断,细胞过量积累 $\alpha$ -KG,细胞无法通过三羧酸循环合成琥珀酰-CoA,在该条件下,谷氨酸脱羧形成 $\gamma$ -氨基丁酸,在 $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶作用下形成琥珀酰半醛,再由琥珀酰半醛脱氢形成琥珀酸,对三羧酸循环进行回补<sup>[36]</sup>。

### 3 微生物法产 $\alpha$ -KG的发酵过程优化与控制

对微生物发酵生产 $\alpha$ -KG的影响较大的环境因素主要有:环境pH、发酵液中溶氧水平和发酵液中辅因子添加等,目前对发酵过程控制的研究主要集中在这三方面。

#### 3.1 控制环境中的pH

Yu等利用7L发酵反应器发酵生产 $\alpha$ -KG时,对比研究了3种不同维持发酵液中pH值的策略:当利用4mol/L的NaOH维持发酵液中的pH为4.5时,菌体量为9.6g/L DCW,最大 $\alpha$ -KG产量为22.0g/L,副产物丙酮酸高达36.9g/L,这现象与之前Chernyavskaya等的研究中维持发酵中pH4.0有着较大的差别<sup>[31]</sup>。如果在发酵过程中不使用pH中和剂并对发酵全过程pH值变化解析发现:菌体生长阶段发酵液中的pH从6.5下降至3.5;伴随着pH进一步下降至2.7,有大量的 $\alpha$ -KG积累,这一过程 $\alpha$ -KG的生产强

度达到最大,随后生产强度下降,此时pH降至2.4。因此,在菌体生长阶段用CaCO<sub>3</sub>维持发酵液中的pH值,在产酸阶段利用4mol/L的NaOH溶液维持发酵液中pH3.0, $\alpha$ -KG的产量达到53.4g/L,丙酮酸的含量为21.3g/L<sup>[37]</sup>。

低pH值不仅有利于发酵生产阶段积累过量的 $\alpha$ -KG,并且由于减少pH中和剂的使用,减少下游的分离提取步骤,有利于降低生产成本。

#### 3.2 控制发酵液中的溶氧水平

1991年,Finogenova等在研究发酵生产异柠檬酸时发现:发酵液中高溶氧水平对*Y. lipolytica*产酸有利<sup>[38]</sup>。这一现象也出现在发酵生产 $\alpha$ -KG的过程中,Chernyavskaya等利用同一菌株以乙醇为碳源发酵产 $\alpha$ -KG时,研究了发酵液中的不同溶氧水平对发酵产酸情况,研究表明:维持低溶氧水平时,不仅发酵液中的菌体浓度比高溶氧水平时的菌体浓度高,达到15g/L,而且菌体对发酵液中的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的利用更快、更彻底,与此相对应地,维持高溶氧水平的发酵液中的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>未被完全利用,此时外源添加NH<sub>4</sub><sup>+</sup>并维持20~30mmol/L,比 $\alpha$ -KG合成速率达到最大,最高产量达到49g/L。因此,溶氧水平能影响细胞对NH<sub>4</sub><sup>+</sup>利用速率,从而影响 $\alpha$ -KG的积累<sup>[31]</sup>。

2001年,Il'chenko等深入研究了溶氧水平对菌体发酵产酸的影响,由于菌株因低NH<sub>4</sub><sup>+</sup>引发柠檬酸积累时,此时,发酵液中的溶氧水平(pO<sub>2</sub>=5%或pO<sub>2</sub>=50%)的变化不会导致细胞内的呼吸速率发生明显的变化,维持相对稳定的水平。由于硫胺素不足而引起的 $\alpha$ -KG过量积累时,高溶氧水平(pO<sub>2</sub>=50%)发酵液中的细胞内的好氧水平要比低溶氧水平(pO<sub>2</sub>=5%)发酵液

中细胞内好氧水平高 1.5~2 倍,而过量积累柠檬酸条件下的细胞内呼吸水平要比过量积累 $\alpha$ -KG 条件下呼吸水平高 2~2.5 倍<sup>[33]</sup>。

与上述研究成果相似, Barth 等利用 *Y. lipolytica* H222 及经过代谢工程改造的基因工程菌在发酵反应器中进行发酵产酸实验时,根据菌株生长-产酸两阶段变化,分阶段控制发酵液中的 pH 值和溶氧水平,生长阶段维持发酵液 pH 5.0、 $pO_2=50\%$ ,在产酸阶段将这两个参数分别维持在 pH 3.8、 $pO_2=10\%$ ,利用菜籽油为底物时, $\alpha$ -KG 的产量高达 134 g/L<sup>[25-39]</sup>。

### 3.3 在发酵液中外源添加辅因子等及控制优化

辅因子的生成及细胞内水平是调节微生物细胞代谢的关键参数,通过调节金属离子、维生素、AMP/ADP/ATP<sup>[40-41]</sup>、NADH/NAD<sup>+</sup>(NADPH/NADP<sup>+</sup>)<sup>[42-44]</sup>和辅酶 A 及其衍生物<sup>[45]</sup>的细胞内水平已经实现多种发酵产品的产量提高和生产强度的加大<sup>[46]</sup>。

2003 年,刘立明等利用多重维生素缺陷型的 *T. glabrata* CCTCC M202019 摇瓶发酵生产丙酮酸时,发现在外源添加  $CaCO_3$  调节发酵液中 pH 时, $Ca^{2+}$  能使丙酮酸羧化酶 (Pyruvate carboxylase, PYC) 活性提高 40%,从而调节碳代谢流流向 $\alpha$ -KG,使得 $\alpha$ -KG 产量提高至 15.8 g/L,此时,添加生物素亦能促进 *T. glabrata* 积累 $\alpha$ -KG<sup>[29]</sup>。在此基础上, Huang 等对外源添加的硫胺素和生物素优化,不仅提高了 $\alpha$ -KG 的产量,而且发酵液中的葡萄糖耗尽后,延长培养时间促使前期积累的丙酮酸进一步转化成 $\alpha$ -KG<sup>[47]</sup>。2007 年, Liu 等利用 *T. glabrata* CCTCC M202019 在 7 L 发酵罐中生产 $\alpha$ -KG 时,通过控

制发酵液中的  $Ca^{2+}$ 、生物素和硫胺素的含量等控制手段调控细胞内的 PDHC、KGDHC 和 PYC 的活性,将碳代谢流重新分布,有效地促使碳代谢流从丙酮酸代谢节点流向三羧酸循环中 $\alpha$ -KG 代谢节点,最终 $\alpha$ -KG 的产量达到 43.7 g/L<sup>[16]</sup>。

综上,在发酵生产 $\alpha$ -KG 过程中,根据菌体在生长和产酸阶段的生理特点的变化,通过在生长阶段维持发酵液中的 pH 5.0 和  $pO_2=50\%$ ,在产酸阶段维持发酵液中的低 pH 值 (pH 3.8 甚至 pH 3.0) 和  $pO_2=5\%$  有利于菌体发酵产酸,在这过程中维持 20~30 mmol/L 的  $NH_4^+$  有利于菌体积累 $\alpha$ -KG 减少柠檬酸等代谢副产物的积累。通过添加  $CaCO_3$  调节发酵液 pH 值,亦能提高丙酮酸羧化酶活力,增大流向三羧酸循环的流量。根究菌株生长需要优化添加生物素和硫胺素添加的最优量是菌株过量积累 $\alpha$ -KG 的重要因素。

## 4 生产菌株代谢工程改造

目前针对生产菌株的代谢工程改造的工作主要集中于调控辅因子再生和中心代谢途径的改造两方面。

### 4.1 调控辅因子再生

$\alpha$ -KG 是微生物三羧酸循环中重要中间代谢产物,受到乙酰 CoA、NAD<sup>+</sup>/NADH 和 NADP<sup>+</sup>/NADPH 等多种辅因子的调控,所以通过调控这些辅因子的再生可直接或者间接调控 $\alpha$ -KG 的积累。

2012 年, Zhou 等在 *Y. lipolytica* WSH-Z06 细胞中分别过量表达来源于 *S. cerevisiae* 的乙酰 CoA 合成酶编码基因 *ScACS1* 和来源于小鼠 *Mus*



*musculus* 的柠檬酸裂解酶编码基因 *MmACL*, 不仅重组菌株比出发菌株生长更旺盛, 而且重组菌株细胞中乙酰 CoA 合成酶的活力和乙酰 CoA 含量大幅提高, 经过发酵优化后重组菌株在 3 L 发酵罐中积累的  $\alpha$ -KG 分别提高至 52.6 g/L 和 56.5 g/L, 同时, 代谢副产物丙酮酸分别降至 25.4 g/L 和 20.2 g/L<sup>[28]</sup>。以上例子通过增强细胞中乙酰 CoA 这一辅因子的再生, 成功增大了从丙酮酸流向目标代谢产物  $\alpha$ -KG 代谢流, 足以说明调控辅因子再生是提高目标代谢产物生产性能的有效手段。

## 4.2 中心代谢途径改造

对目标代谢产物的代谢途径的改造是提高目标产物产量的最直接的方法, 主要包括增大流向目标代谢产物的代谢流和削弱目标代谢产物的进一步代谢消耗两种途径。

### 4.2.1 增大流向目标代谢产物的代谢通量“开源”

2007 年, Förster 等过量表达和敲除异柠檬酸裂解酶编码基因 *ICL1*, 试图改变 *Y. lipolytica* H222 产酸过程中柠檬酸/异柠檬酸比例, 过量表达该编码基因的重组菌株细胞内的异柠檬酸裂解酶活力提高了 12~15 倍, 随后的发酵试验表明该重组菌株在产酸过程中, 菌株总产酸量不仅没有受到影响, 而且异柠檬酸占总产酸量的比例由 10%~12% 降低至 3%~6%; *ICL1* 基因敲除的重组菌株, 细胞内检测不到异柠檬酸裂解酶的活性, 但是异柠檬酸在总产酸中的比例上升了 2%~5%<sup>[24]</sup>。围绕该问题, Holz 等通过过量表达顺乌头酸酶编码基因 *ACO1*, 过量表达 *ACO1* 的重组菌株细胞内该酶的活性是出发菌株的 7.6~8.3 倍, 发酵试验表明, 异柠檬酸占

重组菌株发酵产酸的比例从 35%~49% 提高至 66%~71%<sup>[23]</sup>。

Yin 等以 *Y. lipolytica* WSH-Z06 为出发菌株分别过量表达来源于 *S. cerevisiae* 和米根霉 *Rhizopus oryzae* *PYC* 编码基因 *ScPYC1* 和 *RoPYC2* 提高  $\alpha$ -KG 产量, 降低丙酮酸等代谢副产物的含量, 摇瓶发酵实验中, 重组菌株在  $\alpha$ -KG 分别提高了 24.5% 和 35.3%, 与此同时丙酮酸含量降低了 51.9% 和 69.8%, 随后的 3 L 发酵罐试验中, 经过发酵优化  $\alpha$ -KG 产量高达 69.2 g/L<sup>[27]</sup>。与此相对应的是, Otto 等试图在 *Y. lipolytica* H355 菌株中分别过量表达延胡索酸酶编码基因 (*FUM1*)、*PYC1* 改变发酵产酸过程中的代谢副产物。过量表达 *FUM1* 使胞内延胡索酸酶水平提高了 27~28 倍, 同时延胡索酸、苹果酸、琥珀酸和丙酮酸等代谢杂酸含量降至原出发菌株的 42%; 过量表达 *PYC1* 使胞内 *PYC* 的活力提高 7 倍, 但是上述代谢副产物并没有下降, 与出发菌株相比, 这些副产物的含量提高了 62%; 在同时过量表达 *FUM1* 和 *PYC1* 的重组菌株的细胞内这两个酶的活力都上升了, 但是这些副产物的含量提高了 51%, 过量表达 *FUM1* 降低代谢副产物含量效果被中和<sup>[39]</sup>。

### 4.2.2 削弱目标代谢产物的进一步代谢消耗“节流”

2009 年, Verseck 等对 *C. glutamicum* 谷氨酸脱氢酶编码基因 *gdh* 敲除, *gdh* 缺失的重组菌株在发酵过程中通过维持发酵液中高浓度的  $\text{NH}_4^+$  浓度从而抑制谷氨酸合酶和谷氨酰胺合成酶活性, 使得发酵液中  $\alpha$ -KG 浓度达到 5 g/L<sup>[12]</sup>。2011 年, Holz 等以 *Y. lipolytica* H222 为出发菌株,

试图过量表达 KGDHC 中酮戊二酸脱氢酶编码基因 *KGD1*、硫辛酸酰基转琥珀酰酶编码基因 *KGD2* 和硫辛酰胺脱氢酶编码基因 *LPD1* 削弱  $\alpha$ -KG 的代谢消耗, 重组菌株细胞内的  $\alpha$ -KG 脱氢酶的活力是出发菌株的 1.8~2.1 倍, 在摇瓶中的发酵试验表明, 重组菌株发酵液中  $\alpha$ -KG 含量降低, 而丙酮酸含量提高<sup>[25]</sup>。

以上研究结果表明通过代谢工程手段能有效地改变细胞生理特性、提高生产性能和降低代谢副产物, 但是通过分子生物学操作对代谢途径的加强或削弱引起的细微扰动会被微生物通过改变代谢途径等细胞精细的调控手段“中和”, 带有一定盲目性, 基于全局考虑的代谢工程改造将是今后研究工作的热点。

## 5 展 望

上述研究在代谢积累  $\alpha$ -KG 机制、控制优化和代谢工程等方面做了大量的工作, 取得了许多可喜的成绩, 但是还存在着代谢副产物过多和过量积累  $\alpha$ -KG 机制不清楚等问题, 利用微生物发酵法生产  $\alpha$ -KG 还需要在以下 3 方面做深入研究: 1) 围绕高产菌株发酵不同阶段的代谢特点和生理特点的变化, 在不同阶段通过控制环境中的溶解氧、pH 值、碳氮比和辅因子水平等环境因素, 精确控制细胞内的代谢流促使碳代谢流流向  $\alpha$ -KG 节点, 减少分支代谢流量, 减少副产物积累。2) 虽然通过代谢工程改造增强代谢途径中上游基因表达和削弱  $\alpha$ -KG 下游基因的表达, 能提高  $\alpha$ -KG 的积累, 但是其他生理特性的改变也促使丙酮酸、富马酸、琥珀酸和苹果酸等代谢副产物的含量上升, 需要从全局代谢网络和调控网络出发, 寻找更为有效的代谢

工程改造位点。3) 细胞内  $\alpha$ -KG 水平是表征细胞内碳氮代谢平衡水平, 利用蛋白质组学、代谢组学和转录组学等组学研究对生产菌株过量积累  $\alpha$ -KG 机理进行系统的研究, 特别是深入理解细胞内碳氮代谢平衡, 为挖掘潜在的代谢工程改造位点提供指导。通过后续研究提高  $\alpha$ -KG 产量, 减少细胞向发酵液中分泌代谢副产物, 减少后续分离成本, 实现工业大规模生产。

## REFERENCES

- [1] Moser P, Greilberger J, Maier A, et al. Verwendung von alpha-Ketoglutar Säure und 5-hydroxymethylfurfural zur reduktion von oxidativem stress: EP, 1842536, 2007.
- [2] Lininger SW, Gaby AR, Austin S, et al. The Natural Pharmacy. Rocklin, Calif: Prima Publishing, 1998.
- [3] Ur-Rehman S, Fox PF. Effect of added  $\alpha$ -ketoglutaric acid, pyruvic acid or pyridoxal phosphate on proteolysis and quality of Cheddar cheese. Food Chem, 2002, 76(1): 21–26.
- [4] Matzi V, Lindenmann J, Muench A, et al. The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined  $\alpha$ -ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. Eur J Cardio-Thorac Surg, 2007, 32(5): 776–782.
- [5] Stottmeister U, Aurich A, Wilde H, et al. White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005, 32(11/12): 651–664.
- [6] Barrett DG, Yousaf MN. Poly (triol  $\alpha$ -ketoglutarate) as biodegradable, chemoselective, and mechanically tunable elastomers. Macromolecules, 2008, 41(17): 6347–6352.
- [7] Baldwin JE, Krebs H. The evolution of metabolic cycles. Nature, 1981, 291(5814): 381–382.
- [8] Forchhammer K.  $P_{II}$  signal transducers: novel

- functional and structural insights. *Trends Microbiol*, 2008, 16(2): 65–72.
- [9] Lockwood LB, Stodola FH. Preliminary studies on the production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem*, 1946, 164(1): 81–83.
- [10] Asai T, Aida K, Sugisaki Z, et al. On  $\alpha$ -ketoglutaric acid fermentation. *J Gen Appl Microbiol*, 1955, 1(4): 308–346.
- [11] Tanaka K, Kimura K. Process for producing L-glutamic acid and alpha-ketoglutaric acid: US, 3450599, 1972.
- [12] Verseck S, Karau A, Weber M. Fermentative production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid: DE, WO2009053489, 2009-04-30.
- [13] Yuzbashev TV, Yuzbasheva EY, Sobolevskaya TI, et al. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107(4): 673–682.
- [14] Finogenova TV, Lozinov AB, Belikov VM, et al. Keto-acid production by paraffin-oxidizing yeasts. *Mikrobiologiya*, 1968, 37(1): 38–43.
- [15] Chernyavskaya OG, Shishkanova NV, Finogenova TV. Biosynthesis of  $\alpha$ -ketoglutaric acid from ethanol by yeasts. *Appl Biochem Microbiol*, 1997, 33(3): 261–265.
- [16] Liu LM, Li Y, Zhu Y, et al. Redistribution of carbon flux in *Torulopsis glabrata* by altering vitamin and calcium level. *Metab Eng*, 2007, 9(1): 21–29.
- [17] Barth G, Beckerich JM, Dominguez A, et al. 8 Functional Genetics of *Yarrowia lipolytica*. Berlin Heidelberg: Springer, 2003: 227–272.
- [18] Finogenova TV, Morgunov IG, Kamzolova SV, et al. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a review of prospects. *Appl Biochem Microbiol*, 2005, 41(5): 418–425.
- [19] Dujon B, Sherman D, Fischer G, et al. Genome evolution in yeasts. *Nature*, 2004, 430(6995): 35–44.
- [20] Juretzek T, Le Dall MT, Mauersberger S, et al. Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 2001, 18(2): 97–113.
- [21] Madzak C, Treton B, Blanchin-Roland S. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2000, 2(2): 207–216.
- [22] Fickers P, Le Dall MT, Gaillardin C, et al. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods*, 2003, 55(3): 727–737.
- [23] Holz M, Förster A, Mauersberger S, et al. Aconitase overexpression changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 81(6): 1087–1096.
- [24] Förster A, Jacobs K, Juretzek T, et al. Overexpression of the *ICL1* gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(4): 861–869.
- [25] Holz M, Otto C, Kretzschmar A, et al. Overexpression of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* and its effect on production of organic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(5): 1519–1526.
- [26] Zhou JW, Zhou HY, Du GC, et al. Screening of a thiamine-auxotrophic yeast for  $\alpha$ -ketoglutaric acid overproduction. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 51(3): 264–271.
- [27] Yin XX, Madzak C, Du GC, et al. Enhanced  $\alpha$ -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 96(6): 1–11.
- [28] Zhou JW, Yin XX, Madzak C, et al. Enhanced  $\alpha$ -ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by alteration of the acetyl-CoA metabolism. *J Biotechnol*, 2012, 161(3): 257–264.
- [29] Liu LM, Li Y, Du GC, et al.  $\text{CaCO}_3$  stimulates alpha-ketoglutarate accumulation during pyruvate fermentation by *Torulopsis glabrata*. *Chin J Biotech*, 2003, 19(6): 745–749 (in Chinese).  
刘立明, 李寅, 堵国成, 等 碳酸钙促进丙酮酸发酵过程中 $\alpha$ -酮戊二酸的形成. *生物工程学报*, 2003, 19(6): 745–749.
- [30] Morgunov IG, Kamzolova SV, Perevoznikova OA, et al. Pyruvic acid production by a thiamine

- auxotroph of *Yarrowia lipolytica*. Proc Biochem, 2004, 39(11): 1469–1474.
- [31] Chernyavskaya OG, Shishkanova NV, Il'chenko AP, et al. Synthesis of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 53(2): 152–158.
- [32] Finogenova TV, Shishkanova NV, Ermakova IT, et al. Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and their ability to produce citric and isocitric acid. Appl Microbiol Biotechnol, 1986, 23(5): 378–383.
- [33] Il'chenko AP, Chernyavskaya OG, Shishkanova NV, et al. Metabolic characteristics of the mutant *Yarrowia lipolytica* strain 1 producing  $\alpha$ -ketoglutaric and citric acids from ethanol and the effect of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{O}_2$  on yeast respiration and acidogenesis. Microbiology, 2001, 70(2): 151–157.
- [34] Il'chenko AP, Chernyavskaya OG, Shishkanova NV, et al. Biochemical characterization of the yeast *Yarrowia lipolytica* overproducing carboxylic acids from ethanol. Nitrogen metabolism enzymes. Mikrobiologiya, 2003, 72(4): 470–475.
- [35] Il'chenko AP, Chernyavskaya OG, Shishkanova NV, et al. Metabolism of *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol under conditions promoting the production of  $\alpha$ -ketoglutaric and citric acids: A comparative study of the central metabolism enzymes. Microbiology, 2002, 71(3): 269–274.
- [36] Il'chenko AP, Lysyanskaya VY, Finogenova TV, et al. Characteristic properties of metabolism of the yeast *Yarrowia lipolytica* during the synthesis of  $\alpha$ -ketoglutaric acid from ethanol. Microbiology, 2010, 79(4): 450–455.
- [37] Yu ZZ, Du GC, Zhou JW, et al. Enhanced  $\alpha$ -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy. Bioresour Technol, 2012, 114: 597–602.
- [38] Finogenova TV, Shishkanova NV, Fausek EA, et al. Biosynthesis of isocitric acid from ethanol by yeasts. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 36(2): 231–235.
- [39] Otto C, Yovkova V, Aurich A, et al. Variation of the by-product spectrum during  $\alpha$ -ketoglutaric acid production from raw glycerol by overexpression of fumarase and pyruvate carboxylase genes in *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 95(4): 1–13.
- [40] Zhou JW, Huang LX, Liu LM, et al. Enhancement of pyruvate productivity by inducible expression of a  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPase inhibitor *INH1* in *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019. J Biotechnol, 2009, 144(2): 120–126.
- [41] Liu LM, Li Y, Li HZ, et al. Significant increase of glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by inhibition of oxidative phosphorylation. FEMS Yeast Res, 2006, 6(8): 1117–1129.
- [42] Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. The effect of increasing NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* chemostat cultures. Metab Eng, 2002, 4(3): 230–237.
- [43] Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an  $\text{NAD}^+$ -dependent formate dehydrogenase. Metab Eng, 2002, 4(3): 217–229.
- [44] Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN. The effect of NAPRTase overexpression on the total levels of  $\text{NAD}^+$ , The  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  ratio, and the distribution of metabolites in *Escherichia coli*. Metab Eng, 2002, 4(3): 238–247.
- [45] Vadali RV, Bennett GN, San KY. Enhanced isoamyl acetate production upon manipulation of the acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. Biotechnol Prog, 2004, 20(3): 692–697.
- [46] San KY, Bennett GN, Berrios-Rivera SJ, et al. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. Metab Eng, 2002, 4(2): 182–192.
- [47] Huang HJ, Liu LM, Li Y, et al. Redirecting carbon flux in *Torulopsis glabrata* from pyruvate to  $\alpha$ -ketoglutaric acid by changing metabolic co-factors. Biotechnol Lett, 2006, 28(2): 95–98.

(本文责编 陈宏宇)